

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

**ESTUDO DO POTENCIAL DESREGULADOR ENDÓCRINO DO LODO
DE ESGOTO TRATADO (LETE) EM RATOS WISTAR MACHO**

JOÃO FRANCISCO LOZANO LUVIZUTTO

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

**BOTUCATU – SP
2013**

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

**ESTUDO DO POTENCIAL DESREGULADOR ENDÓCRINO DO LODO
DE ESGOTO TRATADO (LETE) EM RATOS WISTAR MACHO**

**Doutorando: João Francisco Lozano Luvizutto
Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo**

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

BOTUCATU - SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Luvizutto, João Francisco Lozano.

Estudo do potencial desregulado endócrino do lodo de esgoto tratado (LETE) em ratos Wistar macho / João Francisco Lozano Luvizutto. - Botucatu, 2013

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

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Capes: 40105008

1. Andrógenos. 2. Lodo de esgoto. 3. Águas residuais - Purificação - Processo de lodo ativado. 4. Endocrinologia.

Palavras-chave: Desregulação endócrina; Efeito androgênico ; Efeito anti-androgênico; Estação de tratamento de esgoto; Lodo.

*À mulher da minha vida, Patrícia, por seu amor, carinho e companheirismo,
mas principalmente pela sua força perante os obstáculos e por tornar meus
sonhos nossos sonhos, com você a minha vida é mais feliz a cada dia. Te amo
muito, hoje e sempre.*

E desde então, sou porque tu és
E desde então és
sou e somos...
E por amor
Serei... Serás... Seremos...

Pablo Neruda

Ao meu orientador Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, pela orientação segura, pelo exemplo de dedicação a carreira científica. Serei eternamente grato por tudo que me ensinou na vida profissional e pessoal.

À Deus por ser infinitamente generoso comigo. Por me presentear com uma família e amigos maravilhosos.

Aos meus pais Donizetti e Sueli, exemplos de fé, perseverança e honestidade, pelo amor incondicional, pelos sacrifícios em prol da minha felicidade e pelo apoio nos momentos difíceis. Sou eternamente grato a vocês.

A minha irmã Luciana, que me acompanha sempre, pelos momentos felizes e de companheirismo.

À Marize de Loudes Marzo Solano e Mitscheli Sanches da Rocha pela amizade e inestimável ajuda nas horas mais difíceis.

À Secretária da Pós-Graduação da Patologia, Vânia Soler, pela presteza e carinho com que sempre atendeu minhas solicitações.

Aos queridos amigos do anexo Tony, Merielen, Meire, Carla e Camila e todos que durante esses anos passaram por lá (mesmo que só para almoçar na nossa mesa redonda) pelos inúmeros momentos felizes e de descontração. Vocês fazem parte das melhores lembranças.

Aos colegas e amigos do grupo TOXICAM, pelo companheirismo e momentos de convívio.

À Cristina Dorico por toda ajuda e incontestável eficiência.

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

Ao Paulo Roberto Cardoso e Maria Luísa Ardanaz (Mara), pela amizade, profissionalismo, companheirismo e colaboração no processamento de todo material histológico.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP, pelos ensinamentos e amizade.

À Dra Janete Aparecida Anselmo Franci, pelas dosagens hormonais.

Aos funcionários, professores e alunos do Colégio Embraer Casimiro Montenegro Filho pelo apoio e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo auxílio financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Sumário

Revisão de Literatura	01
O lodo de estações de tratamento de esgoto (LETE)	01
Desregulação endócrina por agentes ambientais	08
Referências	13
Artigo científico	19
Resumo	20
<i>Abstract</i>	21
Introdução	22
Material e Métodos	26
Resultados	35
Discussão	38
Referências	46
Tabelas	53
Figuras	63
Anexos	64

Lista de Ilustrações

Figura 1	Delineamento Experimental do Estudo A.....	27
Figura 2	Delineamento Experimental do Estudo B	29
Figura 3	Motilidade espermática dos diferentes grupos experimentais	63
Figura 4	Concentração hormonal plasmática dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1	Estudo A: Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	53
Tabela 2	Estudo A: Consumo médio de ração e água e ingestão de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais.....	54
Tabela 3	Estudo A: Peso relativo dos órgão dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	55
Tabela 4	Estudo A: Produção espermática, contagem de espermatozoides e tempo de transito espermático dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	56
Tabela 5	Estudo A: Análise da dinâmica do processo espermatogênico dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	57
Tabela 6	Estudo A: Motilidade espermática nos animais dos diferentes grupos experimentais.....	58
Tabela 7	Estudo A: Concentração hormonal plasmática dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	59
Tabela 8	Estudo B: Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais	60
Tabela 9	Estudo B: Consumo médio de ração e água e ingestão de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais.....	61
Tabela 10	Estudo B: Peso relativo dos órgão dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	62

REVISÃO DE LITERATURA

1. O lodo de estações de tratamento de esgoto (LETE)

A crescente população dos centros urbanos é importante produtora de diversos resíduos que muitas vezes são acumulados no ambiente sem o adequado tratamento ou a sua devida reciclagem. Dentre esses resíduos está o Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (LETE), resíduo semissólido resultante do tratamento de esgoto, cuja composição é predominantemente orgânica, variando em função do local de origem e período do ano (Coscione et al., 2010).

Durante muito tempo, a maior preocupação quanto ao descarte desses resíduos foi com a construção de sistemas de coleta, que se limitavam a despejar esses resíduos não tratados (brutos) em rios e mares, gerando uma série de problemas ambientais e de saúde pública para os que se beneficiavam de regiões banhadas por essas águas. No Brasil, o percentual de esgoto tratado em relação ao coletado passou de 8,7% para 61,6% em dez anos (1995-2005), mantendo-se nesse patamar de 2006 a 2008, quando atingiu 66,2% (IBGE, 2012).

Estima-se que a produção de LETE no Brasil está entre 150 a 220 mil toneladas de matéria seca por ano. Se todo o esgoto do país fosse tratado, seria de se esperar uma geração de lodo superior a 400 mil toneladas (Soares, 2004), ou mesmo de 3 a 4 vezes a mais(Andreoli et al., 2002).

Atualmente, a conscientização ambiental crescente tem levado a busca de soluções mais adequadas para este tipo de problema, obrigando maior investimento em novas tecnologias de tratamento e disposição final dos resíduos sanitários, o que é realizado para atender padrões de qualidade de controle ambiental.

Os projetos de tratamento de esgotos quase sempre foram elaborados e executados sem uma destinação adequada para o LETE gerado, mas recentemente órgãos ambientais passaram a exigir projetos que contemplem também o gerenciamento deste material (Berton et al., 2010). O LETE contém considerável percentual de matéria orgânica e de elementos essenciais para as plantas, podendo substituir, ainda que parcialmente, fertilizantes minerais, desempenhando importante papel na produção agrícola e na manutenção da fertilidade do solo (Nogueira et al., 2008).

Sua composição típica é 98% de água; 70 a 80% dos sólidos contidos são matéria orgânica. O volume e a composição do lodo gerado recebe influência de fatores sazonais assim como da composição da água a ser tratada, grau de estabilização ou mineralização, e do tipo de processo utilizado no tratamento (Van Vooneburg et al., 1993; Lombardi et al., 2002).

Existem várias alternativas para a disposição final do LETE, como descarte em aterros, oceanos e lagoas de armazenagem, incineração, e, também, a reciclagem agrícola. Opções como incineração e disposição em aterros sanitários apresentam alto custo por tonelada tratada e requerem tecnologia sofisticada (Webber et al., 1984; Carvalho et al., 1981; Saabye et al., 1994). A disposição em aterros sanitários pode ser realizada de duas maneiras: disposição conjunta com os resíduos sólidos urbanos e disposição em aterros exclusivos para este material, sendo que essa prática diminui a vida útil dos aterros destinados a resíduos sólidos, sendo que são necessárias áreas próximas dos centros geradores, já que o custo do transporte é alto (Tsutya, 2001).

A incineração é empregada quando a contaminação é muito alta ou quando há falta de áreas adequadas à implantação de aterros específicos, como no Japão

(Endo et al.,1997). Apesar de alguns aspectos favoráveis, como a possibilidade de reaproveitamento da energia que contém, substituindo outras fontes energéticas, e.g., óleo combustível ou gás natural, a incineração tem como desvantagens o consumo de enorme quantidade de energia para ser desencadeada, e a geração de poluição atmosférica, que gera a necessidade de grandes investimentos em filtros para a retenção de gases tóxicos como as dioxinas produzidas durante o processo (USEPA, 1999).

A grande produção de LETE, principalmente em grandes centros urbanos, levou pesquisadores e órgãos reguladores como a CETESB a intensificar os estudos para a reutilização desses resíduos para fins agrícolas. A utilização agrônômica por meio da aplicação deste material no solo apresenta-se como tendência mundial (Lopes et al., 2005). Quando bem conduzido, o tratamento do esgoto produz um resíduo que não apresenta características desagradáveis quanto ao aspecto ou odor, uma particularidade importante na aplicação final do LETE (Rocha et al., 1999).

Segundo o USEPA (1979), o uso do LETE como fertilizante orgânico representa o reaproveitamento integral de seus nutrientes e a substituição de parte da adubação química sobre as culturas, com rendimentos equivalentes ou superiores aos conseguidos com fertilizantes comerciais.

A base para essa utilização como fertilizante orgânico e condicionador de solos é o retorno ao solo de matéria orgânica e nutrientes removidos com a produção agrícola, pois o aumento no consumo de alimentos nos centros urbanos resultou em grande transferência de nutrientes e matéria orgânica para os resíduos urbanos (Corrêa et al., 2003).

Regiões de clima tropical e subtropical apresentam predominância de solos com baixos teores de matéria orgânica e de nutrientes disponíveis; nesse caso, o uso agrícola do LETE pode ser vantajoso por proporcionar benefícios agrônômicos como a elevação dos valores de pH e aumento na disponibilidade de nutrientes (Silva et al., 2001, Nogueira et al., 2006), além de representar uma disposição final com menor impacto ambiental. O LETE pode, ainda, promover melhorias físicas do solo como a estrutura e agregação de partículas e aeração com consequente melhoria da infiltração e retenção de água. (Andreoli et al., 1996).

Quando utilizado de maneira adequada na produção de vegetais o LETE é mais vantajoso que os fertilizantes químicos, pois é um produto reciclado e não esgota fontes não renováveis de nutrientes, seus nutrientes são menos solúveis, sendo liberados lentamente durante o ciclo produtivo das culturas e sua aplicação, sendo regulada por normas, possibilita maior controle do que a aplicação de fertilizantes químicos e orgânicos utilizados indiscriminadamente (Muchovej et al., 2004).

Aparentemente, o lodo é uma importante fonte de nitrogênio e fósforo para a cultura de cana-de-açúcar, dispensando a aplicação de fertilizantes nitrogenados (Chiba et al., 2005). Lourenço et al. (1996) observaram que, quando empregado em doses elevadas, o LETE pode apresentar efeito residual para as culturas subsequentes.

Mesmo com todas as vantagens ambientais da utilização do LETE como fertilizante agrícola, sua composição química é variável e se mostra dependente da carga de poluentes contida em esgotos originários das cidades, indústrias, agroindústrias ou de atividades mistas, além de depender também do tratamento e pós tratamento (uso de sais, calcário, processos de secagem, adição de agentes surfactante, etc.) das águas e do tipo de decomposição da matriz orgânica contida

no esgoto (Schowanek et al., 2004). Fatores como a presença de contaminantes biológicos e compostos orgânicos tóxicos podem causar graves problemas por escoamento, contaminando fontes de água subterrâneas e superficiais e colocando a população e a fauna em contato direto com esse material (Rocha et al., 1999; USEPA, 1999).

Um dos maiores problemas na utilização agrícola do LETE é a possível presença de metais pesados em sua composição, porém alguns elementos classificados como metal pesado são micronutrientes das plantas (Cu, Fe, Mn, Zn, B, Mo), outros são dos animais (Co) e também existem os que não têm função biológica no desenvolvimento das plantas e podem acumular no solo causando fitotoxicidade (Al, Cd, Pb, Cr, Hg) (Mcbride et al., 1997; Melo et al., 2010). A sua absorção, translocação, e acúmulo em plantas e animais é uma variável crucial de assimilação desse material pelo solo e está relacionada principalmente ao seu comportamento químico após a aplicação do LETE (Berton et al., 2010; Giasson et al., 2010). Com relação a transferência de metais pesados para os vegetais (cenoura, brócolis, alface, espinafre, couve, beterraba, aipo e alho poro), Melo et al., (2010) observaram que existem diferenças entre as espécies de plantas, assim como entre os diferentes metais pesados, sendo o cádmio (Cd) e zinco (Zn) os que tem maiores taxas de transferência, e o cromo (Cr) e o chumbo (Pb) as menores. Mercúrio e chumbo, devido a acidentes no passado, foram bastante estudados; aparentemente, esses dois elementos não implicam em riscos elevados para o homem quando incorporados ao solo via LETE, pois adquirem formas minerais quase insolúveis neste meio, além de serem imóveis em sistemas radiculares fibrosos, levando à fitotoxicidade em concentrações abaixo das problemáticas para os animais (Sommers et al., 1986).

Deve-se considerar que os metais presentes no solo estão na forma orgânica e por isso são menos disponíveis para absorção pelas plantas do que aqueles encontrados como impurezas em fertilizantes químicos comerciais dependendo da matéria prima utilizada e do seu processo de fabricação (Frost et al., 2000).

Por ser um resíduo do tratamento de esgoto sanitário humano, podemos encontrar também vários microorganismos causadores de doenças humanas. A eliminação desses microorganismos no processo de tratamento do esgoto é uma etapa importante já que, no solo, as bactérias intestinais desaparecem por estarem em um meio pouco adequado, mas os parasitas encistados (helmintos e protozoários) e seus ovos são mais resistentes (Fernandes et al., 1997). Alguns dos tratamentos eficazes para redução desses últimos são a compostagem, a desinfecção química, lagoas de tratamento, tratamento com cal e microondas (Coscione et al., 2010). No Brasil, Martins et al. (1986) observaram que os tratamentos térmicos e químicos apresentam excelentes resultados na desinfecção do lodo. Outros países veem acumulando experiências interessantes com a disposição do LETE. Nos EUA, 36% do que é gerado por ano é aplicado na agricultura, em florestas e na recuperação de solos e na Europa estuda-se um padrão comum de disposição, onde aterros sanitários são permitidos apenas para resíduos impróprios para a reciclagem (Schroder et al., 2005).

Um dos primeiros países a regulamentar o uso e disposição do LETE doméstico foram os Estados Unidos que, em 1993, publicou padrões para o uso e disposição de lodo de esgoto em solo agrícola (USEPA, 1999). Esta regulamentação foi baseada em um banco de dados de caracterização dos lodos gerados em ETEs dos seus diversos estados e em um extenso trabalho de análise e gerenciamento de risco. Ela serviu de base para a elaboração da norma CETESB P4.230 - Aplicação

de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas - Critérios para projeto e operação (Manual Técnico), de agosto de 1999 (CETESB, 1999).

Essa Norma, por sua vez, contribuiu para a elaboração da regulamentação federal, Resolução CONAMA 375/2006, visando benefícios à agricultura e evitando riscos à saúde pública e ao ambiente, definindo critérios e procedimentos para o uso agrícola do LETE e seus produtos derivados. A Resolução define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, dando critérios para sua fiscalização pelo IBAMA e órgãos ambientais, promovendo o uso adequado deste resíduo.

A falta de dados nacionais sobre a caracterização dos lodos gerados pelas estações de tratamento de esgotos dificultou o desenvolvimento de padrões nacionais no estabelecimento dos critérios para a Resolução CONAMA 375/2006, adotando-se padrões internacionais ou mais restritivos.

Em 2009, a CETESB publicou os resultados das análises de caracterização físico-química, microbiológica, parasitológica e ecotoxicológica de sete estações de tratamento de esgoto do estado de São Paulo (CETESB, 2009). Foram analisadas amostras de LETE coletadas em quatro campanhas realizadas em abril, julho e outubro de 2007 e janeiro de 2008 junto as estações de tratamento de esgoto (ETEs) de Barueri, Suzano, Parque Novo Mundo, Americana, Jundiaí, Vinhedo e Franca. A quantificação dos poluentes inorgânicos, com exceção de cromo, molibdênio, níquel e zinco para Suzano, e zinco para Parque Novo Mundo, foi inferior aos limites da Resolução CONAMA 375/2006. Teores elevados de alguns compostos podem ser associados a descartes pontuais e de forma incorreta, mostrando que é necessária a conscientização da população e controle rigoroso

dos efluentes recebidos para melhorar a qualidade do LETE. Também, foi evidenciado que as bacias em que ocorre contribuição de efluentes industriais apresentaram maior teor de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (e.g., ETES Barueri, Suzano e Americana). Com base nesse estudo, destaca-se a importância do conhecimento das características da região onde o LETE é coletado e dos procedimentos adotados na estação de tratamento. Considerando as informações, faz-se necessário o conhecimento do eventual potencial toxicológico do LETE sobre mamíferos, a fim de calcular quantidades seguras para sua incorporação ao solo, sem riscos às espécies expostas.

2. Desregulação endócrina por agentes ambientais

Substâncias químicas naturais e sintéticas existentes no meio ambiente têm o potencial de desregular o delicado equilíbrio endócrino em humanos e outros animais. Essas substâncias, também denominadas desreguladores endócrinos (DEs), podem mimetizar, bloquear, ou interferir na síntese, liberação, transporte e eliminação de hormônios endógenos (USEPA, 2008). A presença de DEs no ambiente está particularmente associada à contaminação antrópica por substâncias de origem industrial, como praguicidas agrícolas, produtos de degradação de fármacos, detergentes, repelentes, desinfetantes, solventes orgânicos, retardantes de chama, etc. (Fontanele et al., 2010; Martin et al., 2007). Sua ocorrência no ambiente decorre também da ineficiência dos processos de mitigação dessas contaminações, como os utilizados por Estações de Tratamento de Água (ETA) e de Esgoto (ETE) e, por isso, são também encontrados nos efluentes e/ou esgoto bruto dessas estações, consideradas as principais fontes de DEs para ambientes aquáticos naturais (Mantovani et al., 1999; Marty et al., 2011). Os mais conhecidos

DEs de origem industrial têm atividade desreguladora das funções e estruturas orgânicas dependente de estrógenos e andrógenos, sendo denominados xenoestrógenos (Baker, 2001).

Historicamente, ficou claro que níveis elevados desta contaminação ambiental afetaram espécies selvagens como peixes, aves, répteis, etc (Colborn et al., 1993; Sumpter, 1995), levando ao desenvolvimento de hermafroditismo, masculinização/feminização (Guillette et al., 1996) e outras desordens reprodutivas (Wiemeyer et al., 1984). Embora a espécie humana esteja potencialmente exposta a esta poluição pelo ar, água e por contaminação alimentar, os efeitos destes tipos de exposição ainda não estão completamente esclarecidos, particularmente no que se refere à desregulação endócrina (Martin et al., 2007). Na última década, têm se acumulado referências sobre disfunções do sistema reprodutivo e endócrino, como puberdade precoce, diminuição da quantidade e funcionalidade espermática, aumento da incidência de cânceres de mama, próstata e testículos e malformações congênitas (Argemi et al., 2005; Swan et al., 2007). Agências governamentais e transnacionais, como a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), a Agência Americana de Administração de Alimentos e Fármacos (USFDA) e a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), estão analisando estratégias *in vivo* e *in vitro* para identificar agentes químicos que têm potencial de desregulação endócrina (Reif et al., 2003; Marty et al., 2011).

Criado pela USEPA, o “Endocrine Disruptor Screening Program” (EDSP) tem como objetivo identificar substâncias químicas com potencial de desregulação hormonal através de uma bateria inicial com onze ensaios (Tier 1), que incluem ensaios *in vitro* (e.g., teste de ligação ao receptor de estrógeno (ER) e ao receptor de andrógeno (AR), teste do gene repórter para avaliação da capacidade de

ativação de transcrição hormonal, teste para avaliação da esteroidogênese e da aromatase) e ensaios *in vivo* (teste uterotrófico, teste de Hershberger, ensaio com roedores machos e fêmeas púberes, reprodução de peixes, e metamorfose de anfíbios – sapo) (OECD, 2010; EDSP, 2011). Após análise dos resultados iniciais é determinado se a substância tem potencial de interação hormonal, além da necessidade de novos testes *in vivo* (Tier 2). Esses testes devem ser mais abrangentes e envolver mamíferos, aves, anfíbios, peixes e invertebrados para estabelecer relações de dose-resposta em um contexto maior de toxicidade, além de identificar potenciais adversidades relacionadas à reprodução e desenvolvimento, ao sistema endócrino e sistemas não endócrinos (por exemplo: neurológicos, hepáticos, imunológicos e renais) (OECD, 2010; EDSP, 2011).

O teste de Hershberger é um ensaio *in vivo* de curta duração recomendado pelo Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC, 1998) para triagem de substâncias que apresentam atividade androgênica ou antiandrogênica. Este teste é baseado nas mudanças de peso de cinco tecidos andrógeno-dependentes em ratos pré-púberes machos castrados cirurgicamente. Os cinco tecidos analisados são: próstata ventral, vesículas seminais, músculo levantador do ânus, glândulas de Cowper e glândula do pênis. Um significativo aumento (ação androgênica) ou diminuição (ação antiandrogênica) nos pesos de dois dos cinco órgãos indica uma resposta positiva neste ensaio (OECD, 2009; Tyl et al., 2006).

A base para o teste de Hershberger é a necessidade de testosterona (produzida nos testículos) para o crescimento e maturação dos órgãos sexuais durante a puberdade em machos normais, não castrados. A castração (remoção cirúrgica dos testículos) leva à rápida regressão e involução dos órgãos sexuais, particularmente

de seus pesos, que são os parâmetros principais deste ensaio. Quando uma fonte de andrógeno (e.g., propionato de testosterona, TP) é administrada, ocorre o retorno às condições prévias. Este ensaio pode ser realizado por dois métodos; o primeiro é o ensaio clássico que impõe a castração de animais adultos jovens; o segundo utiliza animais recém-desmamados não castrados. A sensibilidade dos dois métodos está no fato de os animais estarem com mínima produção endógena de andrógeno. Como os níveis de andrógenos circulantes são muito baixos, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal não é capaz de exercer *feedback* sobre os órgãos alvo periféricos, que têm a variabilidade de seus pesos minimizada, e maximizada a sua habilidade de resposta aos estímulos androgênicos (OECD, 2009).

Um problema potencial com o ensaio de Hershberger em ratos adultos é a castração cirúrgica, não só pela necessidade de uma técnica precisa, mas também pelo bem estar dos animais (Ashby et al., 2004). A utilização de ratos imaturos não castrados foi relatado há mais de 60 anos (Greene et al., 1940, 1941), porém só recentemente foi reconhecida como uma alternativa com a mesma eficiência na detecção de compostos (anti)androgênicos (Ashby et al., 2004; 2000b; Kelce et al., 1995; Monosson et al., 1999; Stoker et al., 2000; Marty et al., 2001).

Em trabalhos anteriores verificamos que o LETE de uma estação de tratamento localizada no estado de São Paulo não induziu toxicidade oral sistêmica nem genotoxicidade em ratos Wistar machos e fêmeas quando administrado pela ração em concentração de 50.000 ppm durante 90 dias consecutivos (Solano et al., 2009; Luvizutto et al., 2010).

Assim, além dos estudos ambientais, é de grande necessidade que, em paralelo, sejam realizados estudos que avaliem *in vivo* o potencial toxicológico do LETE, objetivando indicar quantidades seguras para sua incorporação ao solo,

minimizando os riscos das espécies expostas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o possível efeito desregulador endócrino do Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (LETE) em modelos experimentais utilizando ratos machos jovens da linhagem Wistar, em particular em um ensaio baseado no teste de Hershberger.

REFERÊNCIAS

Andreoli CV, Carvalho FJPdC, Bonnet BrRP, Fernandes F, Domaszak SC. Efeitos In Vitro do composto de lixo urbano em alguns parâmetros da população microbiana do solo e na solubilização de fosfatos. 1996. Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental; 1996: sn.

Andreoli CVr, Backes SA, Cherubini C. Avaliação do processo de compostagem utilizando podas verdes e resíduos do saneamento. Anais FERT BIO. 2002.

Argemi F, Cianni N, Porta A. Disrupción endócrina: perspectivas ambientales y salud pública. Acta Bioquímica Clínica Latino America. 2005; 39 (3): 291-300.

Ashby J, Lefevre PA. Preliminary evaluation of the major protocol variables for the Hershberger castrated male rat assay for the detection of androgens, antiandrogens, and metabolic modulators. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2000;31(1):92-105.

Ashby J, Lefevre PA, Tinwell H, Odum J, Owens W. Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hershberger anti-androgen assay. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2004;39(2):229-38.

Berton RS, Nogueira TAR. Uso de lodo de esgoto na agricultura. In: FEPAF, editor. Uso Agrícola de Lodo de Esgoto: Avaliação após a resolução nº 375 do CONAMA. Botucatu: 2010; 2010. p. 407.

Baker VA. Endocrine disrupters--testing strategies to assess human hazard. Toxicol In Vitro. 2001 Aug-Oct;15(4-5):413-9.

Carvalho PCT, Barral MF. Aplicação de lodo de esgoto como fertilizante. Fertilizantes. 1981;3(2):3-5.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas: critérios para projeto e operação. São Paulo: CETESB; 1999. (Manual Técnico, Norma P4. 230).

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Caracterização físico-química, microbiológica, parasitológica e ecotoxicológica de lodos de estações de tratamento de esgoto do estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2009. (Relatório técnico).

Chiba MK. Uso de lodo de esgoto na cana-de-açúcar como fonte de nitrogênio e fósforo: parâmetros de fertilidade do solo, nutrição da planta e rendimentos da cultura. 2005. 142f: Tese de Doutorado; 2005.

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ Health Perspect. 1993 Oct;101(5):378-84.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 375, 11 de julho de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto

gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências, Diário Oficial da União, Brasília, 29 agosto de 2006 (Acesso em: 9 out. 20011). Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>.

Conscione A, Nogueira TAR, Pires A. Uso Agrícola de Lodo de Esgoto: Avaliação após a resolução Nº375 do CONAMA. 2010. FEPAF ed. Botucatu: FEPAF.

Conscione AR, Berton RS. Barium extraction potential by mustard, sunflower and castor bean. *Scientia agricola*. 2009;66(1):59-63.

Corrêa RS, Corrêa AS. Eficiência agrônômica e produção vegetal de cinco biossólidos aplicados a dois solos tropicais. *Sanare*, 2003; 20:49-57.

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

EDSTAC - United States Environmental Protection Agency (1998). Health Effects Test Guidelines -USEPA. OPPTS 870.3800, Reproduction and Fertility Effects EPA 712-C-98-239. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC

Endo H, Nagayoshi Y, Suzuki K. Production of glass ceramics from sewage sludge. *Water Science and Technology*. 1997;36(11):235-41.

Fernandes F, Andreoli CV. Manual técnico para utilização agrícola do lodo de esgoto no Paraná. Curitiba: SANEPAR, 1997. 96p.

Fontanele EGP, Martins MRA, Quidute ARP, Júnior RMM. Contaminantes ambientais e interferentes endócrinos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2010; 54(1): 6-16,

Frost HL, Ketchum Jr LH. Trace metal concentration in durum wheat from application of sewage sludge and commercial fertilizer. *Advances in Environmental Research*. 2000;4(4):347-55.

Giasson E, Tedesco M. Classificação das terras e quantidades máximas de metais pesados a adicionar por lodo de esgoto. In: FEPAF, editor. *Uso Agrícola do Lodo de Esgoto* Botucatu; 2010. p. 407.

Guillette Jr, Pickford LJ, Crain DA, Rooney AA, Percival HF. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *General and Compar Endocrin*. 1996; 101:(1) 32-42.

Gray LE, Jr., Ostby J, Wilson V, Lambright C, Bobseine K, Hartig P, et al. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing: filling key data gaps. *Toxicology*. 2002 Dec 27;181-182:371-82.

Greene RR, Burrill MW. FORTY-EIGHT-HOUR-RESPONSE OF THE IMMATURE MALE RAT TO ANDROGENS¹. *Endocrinology*. 1941;29(3):402-8.

Greene RR, Burrill MW. Twenty-four Hour Response to Androgens in the Immature Male Rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*; 1940: Royal Society of Medicine; 1940. p. 780-2.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). IDS 2012: Brasil avança rumo ao desenvolvimento sustentável, mas ainda tem muitos desafios a enfrentar (internet). Acesso em 12/jun/2013. Disponível em <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2161>

Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*. 1995 Jun 15;375(6532):581-5.

Lombardi AT, Garcia O, Jr. Biological leaching of Mn, Al, Zn, Cu and Ti in an anaerobic sewage sludge effectuated by *Thiobacillus ferrooxidans* and its effect on metal partitioning. *Water Res*. 2002 Jul;36(13):3193-202.

Lopes JC, Ribeiro LG, Araújo MGd, Beraldo MR. Lettuce production using doses of sewage sludge. *Horticultura Brasileira*. 2005;23(1):143-7.

Lourenço RS, Anjos ARMd, Libardi PL, Medrado MJS. Efeito do lodo de esgoto na produtividade de milho e feijão, no sistema de produção de bractinga. *Revista Técnica da SANEPAR*. 1996;5(05):90-2.

Luvizutto JFL, Solano MLM, Passareli D, Franchi CDS, Umbuzeiro GA, Camargo JLV. Subchronic toxicity evaluation of a treated urban sewage sludge. *J Toxicol Environ Health A*. 73(13-14):916-25.

Mantovani A, Stazi AV, Macri C, Maranghi F, Ricciardi C. Problems in testing and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology. *Chemosphere*. 1999 Oct;39(8):1293-300.

Martin OV, Lester JN, Voulvoulis N, Boobis AR. Human health and endocrine disruption: a simple multicriteria framework for the qualitative assessment of end point specific risks in a context of scientific uncertainty. *Toxicol Sci*. 2007 Aug;98(2):332-47.

Martins MT, Sanches PS. Eficácia do tratamento químico e térmico na destruição de patógenos em lodo digerido. *Rev Bras Microbiol*. 1986; 17:148-54.

Marty MS, Carney EW, Rowlands JC. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci*. 2011 Mar;120 Suppl 1:S93-108.

Marty MS, Crissman JW, Carney EW. Evaluation of the male pubertal onset assay to detect testosterone and steroid biosynthesis inhibitors in CD rats. *Toxicol Sci.* 2001 Apr;60(2):285-95.

McBride M, Sauve S, Hendershot W. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science.* 1997;48(2):337-46.

Melo W, Melo GMP, Melo VP, Bertipaglia L. A Resolução CONAMA 375 e os metais pesados. In: FEPAF, editor. *Uso Agrícola de Lodo de Esgoto*. Botucatu: FEPAF; 2010. p. 407.

Monosson E, Kelce WR, Lambright C, Ostby J, Gray LE, Jr. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health.* 1999 Jan-Mar;15(1-2):65-79.

Muchovej RM, Obreza TA. *Biosolids: Are These Residuals All the Same?*: University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS; 2001.

Nogueira TAR, Oliveira LR, Melo WJd, Fonseca IM, Melo GMPd, Melo VPd, et al. Cádmio, cromo, chumbo e zinco em plantas de milho e em Latossolo após nove aplicações anuais de lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.* 2008;32(5):2195-207.

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

OECD. *Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties*. In OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 115; OECD Publication Office: Paris, France, 2009.

Reif DM, Martin MT, Tan SW, Houck KA, Judson RS, Richard AM, et al. Endocrine profiling and prioritization of environmental chemicals using ToxCast data. *Environ Health Perspect.* 2003 Dec;118(12):1714-20.

Rocha MT, Shirota R. Disposição final de lodo de esgoto. *Revista de estudos ambientais.* 1999;1(3):1-25.

Saabye A, Schwinning HG. Treatment and beneficial use of sewage sludge in the European Union. *ISWA Times.* 1994;3:1-6.

Schowaneck D, Carr R, David H, Douben P, Hall J, Kirchmann H, et al. A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture--Conceptual Framework. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004 Dec;40(3):227-51.

Schroder J. Revisiting the agronomic benefits of manure: a correct assessment and exploitation of its fertilizer value spares the environment. *Bioresour Technol.* 2005 Jan;96(2):253-61.

Silva, F.C., Boaretto, A.E., Berton, R.S., Zotelli, H.B., Pexe, C.A., Bernardes, H.M.,. Efeito do lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. *Pesqui Agropec Bras.* 2001; 36, 831-840.

Soares MR. Coeficiente de distribuição (Kd) de metais pesados em solos do Estado de São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

Solano MLM, de Lima PL, Luvizutto JF, Silva PR, de Aragao Umbuzeiro G, de Camargo JL. In vivo genotoxicity evaluation of a treated urban sewage sludge sample. *Mutat Res.* 2009 May 31;676(1-2):69-73.

Sommers LE, Barbarick KA. Constraints to land application of sewage sludge. *Utilization, Treatment, and Disposal of Waste on Land.* 1986(utilizationtrea):193-216.

Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *CRC Critical Reviews in Toxicology.* 2000;30(2):197-252.

Sumpter JP. Feminized responses in fish environmental estrogens. *Toxicology Letters.* 1995; 82-83: 737-742.

Swan SH, Liu F, Overstreet JW, Brazil C, Skakkebaek NE. Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy. *Hum Reprod.* 2007 Jun;22(6):1497-502.

Tsutiya MT, Tsutiya MT, Comparini JB, Sobrinho AP, Hespanol I, Carvalho PCT, et al. Características de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. TSUTIYA, MT; COMPARINI, JB; SOBRINHO, AP; HESPANOL, I. 2001:89-131.

Tyl RW, Sloan CS, Hamby BT, Ehman KD, Sumner S. Hershberger background review document, Draft. Prepared for the US Environmental Protection Agency, Endocrine Disruptor Screening Program, EPA Contract Number EPW-06-026, Task Order. 2006;1:17-70.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Centre for Environmental Research Information. Process design manual for sludge treatment and disposal. 1979. EPA 625/1-79-011. Washington, D.C.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Environmental Regulations and Technology: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge (Including Domestic Septage) Under 40 CFR Part 503. 1999 (Revised July 2003). EPA, Washington.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1998a. Research Plan for Endocrine Disruptors. EPA/600/R-98/087. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. Available:

<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/docs/edstac/exesum14.pdf> [acesso em 08/mar/2012]

Van Voorneburg F, Van Veen HJ. Treatment and disposal of municipal sludge in the Netherlands. *Water and Environment Journal*. 1993;7(2):116-20.

Webber MS, Shames A. A. Land utilization of sewage: a discussion paper. Expert Committee on soil and water management Toronto. 1984.

Weimeyer SN, Lamont TG, Bunck CM, Sindelar CR, Gramlich FJ, Fraser JD, et al. Organochlorine pesticide, polychlorobiphenyl, and mercury residues in Bald Eagle eggs (1969,1979) and their relationships to shell thinning and reproduction. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1984;13:529-49.

ESTUDO DO POTENCIAL DESREGULADOR ENDÓCRINO DO LODO DE ESGOTO TRATADO (LETE) EM RATOS WISTAR MACHO

Potential endocrine disruption of an urban sewage sludge (SS) sample evaluated in male Wistar rats

¹LUVIZUTTO JFL, ¹MARTINEZ MF, ¹SOLANO MLM, ²FERNANDEZ, C D B,
de ¹CAMARGO JLV

*¹Center for Evaluation of the Environmental Influence on Human Health (TOXICAM),
Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Brazil*

*²Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University
(UNESP), Brazil*

Autor Correspondente: João Francisco Lozano Luvizutto

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Distrito de Rubião Junior, S/N

Botucatu/SP – CEP: 18.618-000

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

e-mail: jluvizutto@yahoo.com.br

RESUMO

O processamento do esgoto urbano pelas estações de tratamento (ETE) produz uma mistura pastosa e complexa constituída por material orgânico (microorganismos, vegetais, etc.) e inorgânico (hidrocarbonetos aromáticos, minerais, metais pesados, etc.). Diante da possibilidade de utilização deste lodo para enriquecimento de solo agrícola (USEPA, 1999), o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de desregulação endócrina do Lodo de uma Estação de Tratamento de Esgoto (LETE) do estado de São Paulo em modelos *in vivo* utilizando ratos machos adultos e recém-desmamados. No Estudo A, ratos Wistar machos com 98 dias de idade receberam por oito semanas ração basal (grupo GI) ou acrescida de 2.500, 5.000, 10.000 e 20.000ppm de LETE (grupos GII, GIII, GIV e GV respectivamente). Foram avaliados peso e aspectos histológicos do fígado, rins, adrenais, testículos, epidídimos, próstata ventral e vesículas seminais. Outros parâmetros analisados foram os níveis plasmáticos de hormônios sexuais e a qualidade e quantidade de espermatozoides. A exposição ao LETE reduziu a concentração plasmática do FSH e também o número de espermatozoides com movimento progressivo em ratos adultos. Esse resultado ocorreu de forma dose-resposta e significativamente nas concentrações de 10.000 e 20.000 ppm de LETE, podendo indicar comprometimento da qualidade do esperma. O Estudo B baseou-se no protocolo de Hershberger (OECD Nº 144, 2009) e visou avaliar efeitos androgênicos e anti-androgênicos em ratos Wistar machos desmamados no 21º dia pós-natal. Também nesses animais não foram registradas alterações do peso corpóreo e dos órgãos, do consumo de ração. Como conclusão no Estudo A os resultados sugerem alterações espermáticas funcionais que podem comprometer a fertilidade, e no Estudo B a exposição ao LETE não induziu efeito androgênico ou anti-androgênio em ratos adultos e imaturos expostos por 10 dias.

Palavras-chave: Desregulação endócrina, lodo de estação de tratamento de esgoto, ratos Wistar machos, efeitos androgênico e anti-androgênico.

Potential endocrine disruption of an urban sewage sludge (SS) sample evaluated in male Wistar rats

¹LUVIZUTTO JFL, ¹SOLANO MLM, ¹MARTINEZ MF, ²FERNANDEZ, C D B, de
¹CAMARGO JLV

¹Center for Evaluation of the Environmental Influence on Human Health (TOXICAM),
Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Brazil

²Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP)

The complex mixture of organic and inorganic materials that constitutes sewage sludge (SS) has been proposed for use in agriculture and as raw material for the pottery industry. This study aimed to assess the potential for endocrine disruption of SS *in vivo* using adult and weanling male Wistar rats. In a first experiment, pubertal male rats (42th postnatal day, PND) were exposed *ad libitum* up to adulthood (56th PND) to a diet containing 0, 2,500, 5,000, 10,000 or 20,000 ppm of SS. The liver, kidneys, adrenals, testes, epididymis, ventral prostate and full seminal vesicle weights were evaluated, in addition to sexual hormones levels, sperm counts and sperm motility. In the second study, androgenic and anti-androgenic effects were evaluated in weanling male rats (21th PND), daily treated during 10 days with flutamide (anti-androgenic positive control, 3mg/kg/day, gavage), testosterone propionate (androgenic positive control, 1mg/kg/day, s.c.) and fed diets with SS at 10,000 or 20,000 ppm. In these later animals, no alterations were registered in body and organs weights, diet consumption and sperm countings. Exposure to the SS only induced a dose-response decrease in the quality of adult rats sperm (first experiment), documented by decreased number of sperm with progressive movement (10,000 ppm, 20,000ppm). According to these results, SS exposure did not induce androgenic or antiandrogenic effect in both periods of the life of Wistar rats.

INTRODUÇÃO

A transformação do esgoto em água reutilizável pelas estações de tratamento de esgotos (ETE) produz, secundariamente, uma mistura complexa de material inorgânico, orgânico e biológico, denominada “lodo de ETE” (LETE), basicamente constituída por detritos domésticos e industriais. A composição do LETE pode variar de acordo com sua origem, região, tipo de tratamento e época do ano (USEPA, 1999). Em geral, agentes tóxicos fazem parte da composição do LETE, como metais pesados, praguicidas e solventes, que podem representar risco potencial para o ambiente e para a biota exposta de forma direta ou indireta a ele. A designação “lodo de esgoto” tem sido substituída pelo termo “biossólido”; nos EUA, termo esse que indica o lodo que já passou por tratamento e atinge os padrões governamentais para sua reutilização (USEPA, 1999).

A disposição final do LETE tem sido uma preocupação mundial pelo crescente aumento do seu volume, pelo fato de que alguns países têm adotado esse material para enriquecer o solo e, também, pelo desconhecimento quase completo de seu potencial tóxico (Bettiol et al., 2000; Tollefsson, 2008). Esta prática de enriquecimento do solo não é muito difundida no Brasil, particularmente porque ainda são relativamente poucas as zonas urbanas que possuem estações de tratamento. No entanto, poderia ser uma solução para escoar o LETE produzido por regiões metropolitanas como a cidade de São Paulo, onde a produção do lodo é enorme e aterros sanitários são escassos. Uma possível limitação à esta medida é a intensa atividade industrial dessas regiões, que geram um lodo com altas concentrações de metais pesados e compostos orgânicos persistentes, que pode torná-lo potencialmente nocivo. A possibilidade de reutilização do LETE para

enriquecer áreas agrícolas é interessante porque aparentemente ele melhora as condições físicas do solo, permitindo a incorporação de macro e micronutrientes, além de proporcionar benefícios agronômicos como elevação do pH do solo (Silva et al., 2001; Berton et al., 1989; Da Ros et al., 1993). Existem informações nacionais de uso favorável do LETE em culturas de arroz, aveia, trigo, pastagens, feijão, soja, girassol, café e pêssego, e no cultivo de plantas do gênero *Eucalyptus*, entre outras, de modo que o produto apresenta potencial para substituição dos fertilizantes minerais. (Bettioli et al., 2000; Gonçalves et al., 1997).

Assim, a incorporação do LETE ao solo pode representar um benefício social, pela possibilidade de disposição final deste composto sem impacto relevante com um hipotético pequeno impacto no ambiente. No entanto, esta aplicação gera a possibilidade de exposição direta ou indireta dos seres humanos e da fauna silvestre aos componentes do lodo. Embora estudos agronômicos com LETE indiquem que ele possui nutrientes essenciais às plantas, que é rico em matéria orgânica, e atua como um condicionador do solo, melhorando sua estrutura, há a necessidade de avaliação do impacto ambiental decorrente da aplicação do LETE no solo (Barbosa et al., 2006).

Em países onde o LETE é aplicado na agricultura, como nos Estados Unidos, existem normas que regulamentam as concentrações máximas de metais pesados no lodo e seu teor máximo acumulado no solo. No Brasil, a Resolução Nº 375 do CONAMA estabeleceu normas para o uso agrícola do LETE, vinculadas ao monitoramento periódico dos solos quanto aos níveis de metais pesados, compostos orgânicos e patógenos humanos (CONAMA, 2006).

A literatura nacional tem informações sobre a incorporação do LETE em solos cultiváveis (Caldeira Junior et al., 2007; Teixeira et al., 2007), mas não provê

subsídios para a regulamentação, manejo, fiscalização e controle da aplicação do lodo na agricultura. Por isso, é indispensável o conhecimento do potencial tóxico do LETE, para calcular quantidades seguras para sua incorporação ao solo sem riscos às espécies expostas. Em trabalhos anteriores verificamos que o LETE de uma estação de tratamento localizada no estado de São Paulo, não induziu toxicidade oral sistêmica nem genotoxicidade em ratos Wistar machos e fêmeas quando administrado pela ração em concentração de 50.000 ppm, durante 90 dias consecutivos (Solano *et al.*, 2009; Luvizutto *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, muitos estudos apontaram para o fato de que alguns poluentes ambientais podem mimetizar ou antagonizar os efeitos dos hormônios esteróides, como estrógenos e andrógenos, provocando o que é denominado desregulação endócrina (DE) (Massaad *et al.*, 2002). É considerado desregulador endócrino todo agente exógeno capaz de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais, que são os responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamentos normais do organismo (Mendes *et al.*, 2002). Investigações epidemiológicas indicam aumento de incidência de malformações do sistema reprodutor e decréscimo da fertilidade masculina, bem como o aumento da incidência de neoplasias de testículos e próstata, e da mama e vagina (Heley *et al.*, 2006). Estas observações podem, possivelmente, estar associadas a substâncias desreguladoras endócrinas contaminantes do meio ambiente (Toppari *et al.*, 2002; Skakkekebaek *et al.*, 2001).

Para avaliação do potencial desregulador endócrino de substâncias químicas existem ensaios de curta e longa duração com animais de experimentação, associados a testes *in vitro* para identificar seus modos e mecanismos de ação em órgãos alvo específicos (USEPA, 1997; 1998). Por exemplo, o teste uterotrófico

(EDSTA, 1998), bem como o ensaio com roedores fêmeas púberes (Gray et al., 2002; Marty et al., 1999), têm como objetivo a detecção de ação estrogênica de determinada substância, enquanto o teste de Hershberger, juntamente com o ensaio em roedores machos púberes, procuram detectar se a substância tem efeito androgênico ou antiandrogênico (OECD Nº144, 2009). Todos estes ensaios são considerados de curta duração, variando de 5 dias a 7 semanas. Existem também testes com animais *knockout* para determinação do mecanismo de ação e interação das substâncias potencialmente desreguladoras com receptores hormonais (Heley e Korach, 2006), estes sendo de duração relativamente longa (18 meses).

Recentemente, Ashby et al. (2004) e Tinwell et al. (2007) desenvolveram ensaios com duração de 10 dias em machos recém-desmamados e imaturos (alternativo ao teste de Hershberger), para detecção de compostos com ação anti/androgênica, evitando assim a castração dos animais e preservando os testículos. Nesses ensaios, é possível uma abordagem mais sistêmica e análise de parâmetros mais específicos, os quais permitem o refinamento e a caracterização do modo e mecanismo de ação de substâncias químicas. Neste caso, deve-se levar em conta que o agravo pode ocorrer indiretamente, em tecidos diferentes dos tecidos alvo esperados, muito tempo após a exposição ou até mesmo em geração futura, dependendo também da intensidade e da frequência da exposição (Mantovani et al., 2006; USEPA, 2007).

Considerando todo este contexto, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar o possível efeito desregulador endócrino do Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (LETE) em modelos experimentais utilizando ratos machos jovens da linhagem Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da Ração

Amostras do LETE in natura foram coletadas pela CETESB/SP, de uma ETE na região de São Paulo, em lotes sucessivos de 5 Kg durante 60 dias, e mantidas sob refrigeração a -20°C . Após o período de coleta, os lotes foram homogeneizados, secos a temperatura ambiente, pulverizados e adicionados nas concentrações finais de 2.500, 5.000, 10.000 e 20.000 ppm à ração em pó (Nuvilab-CR1, Nuvital-PR) no dietário da unidade experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, conforme indicado abaixo. Após homogeneização e umidificação em misturador industrial (CAF-modelo M60), as misturas foram *peletizadas* em máquina industrial (Prensa Peletizadora Chavantes - PR). Os *pelets* foram secos por ventilação a temperatura ambiente durante 24h. Os diferentes tipos de ração adicionados de LETE foram embalados em sacos plásticos identificados e mantidos em *freezer* (-5°C) por período máximo de 30 dias.

Estudo A (Figura 1)

Ratos machos da linhagem Wistar foram adquiridos com 4 semanas de idade do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB - UNICAMP, Campinas-SP). Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 5 grupos experimentais de acordo com as concentrações de LETE na ração. A partir do primeiro dia do experimento, que correspondeu ao 42º. dia pós-natal (42 DPN), os animais receberam ração basal (grupo GI) ou acrescida com 2.500, 5.000, 10.000 e 20.000 ppm de LETE (grupos GII, GIII, GIV e GV respectivamente) (Figura 1) durante 8 semanas. A duração deste estudo deve ter coberto pelo menos um ciclo de espermatogênese do rato (52 dias) (Russel et al., 1990). As doses de LETE na

ração foram definidas partindo de estudos prévios com esse material (Solano *et al.*, 2009; Luvizutto *et al.*, 2010).

Água e ração foram fornecidos *ad libitum*; seu consumo e o peso corpóreo foram avaliados 2 vezes por semana. No momento da pesagem foram observados aspectos clínicos gerais dos animais como comportamento, estado da pelagem e eventuais secreções oculares, genital e anal. Todos os animais foram eutanasiados por narcose induzida em câmara de CO₂ ao final da 8ª semana após o início do tratamento.

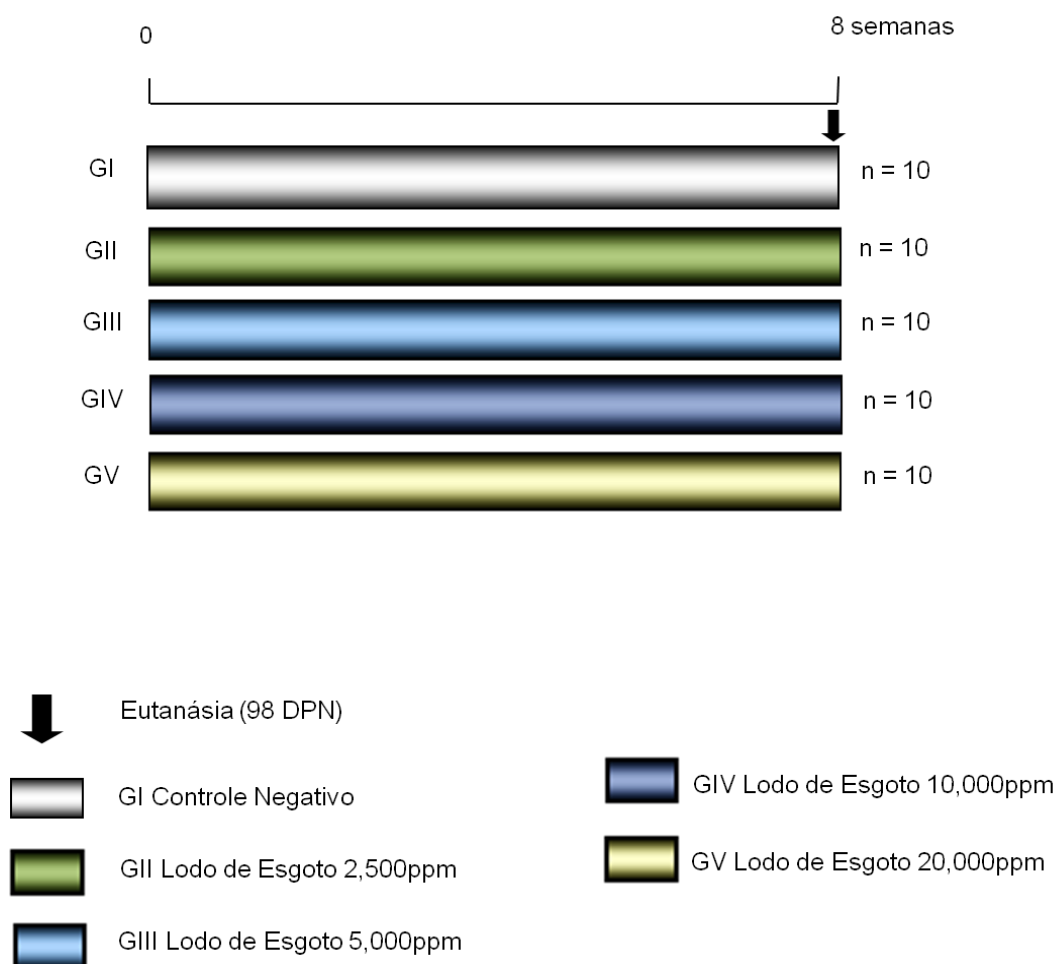


Figura 1: Delineamento Experimental do Estudo A

Estudo B (Figura 2)

Matrizes da linhagem Wistar (4 machos e 10 fêmeas) foram adquiridas do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB- UNICAMP, Campinas-SP). A reprodução das matrizes foi realizada no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP para possibilitar o início do tratamento no DPN21, imediatamente após o desmame.

No DPN21 os filhotes machos foram distribuídos em grupos conforme o número disponível dentro de cada ninhada até que completassem a quantidade de 10 animais por grupo. Os tratamentos ocorreram da seguinte maneira: Grupo I – Ração basal + soro fisiológico s.c.+ óleo de milho via gavagem; Grupo II – Ração basal + propionato de testosterona (TP) (1mg/Kg/dia s.c.) + óleo de milho via gavagem; Grupo III: ração basal + TP (1mg/Kg/dia s.c.) + flutamida (FLU) 3 mg/kg/dia via gavagem; Grupo IV: ração basal acrescida de 10.000 ppm de LETE + TP (1mg/Kg/dia s.c.) + óleo de milho via gavagem; Grupo V: ração basal acrescida de 20.000 ppm de LETE + TP (1mg/Kg/dia s.c.) + óleo de milho via gavagem.

O propionato de testosterona (TP) é utilizado como controle positivo de atividade androgênica. A dose adotada de TP (1 mg/kg/dia) foi a mesma utilizada por Ashby et al. (2004) em sua proposta de modificação do ensaio de Hersberger em ratos jovens, recém desmamados e não castrados (Tinwell et al., 2007). A flutamida (FLU) é um composto não-esteróide conhecido por sua atividade antiandrogênica, bloqueando a ação da testosterona por competir pelos receptores de andrógenos (AR). A dose de FLU (3 mg/kg/dia; gavagem) foi recomendada para a validação do ensaio de Hersberger (OECD, 2009).

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

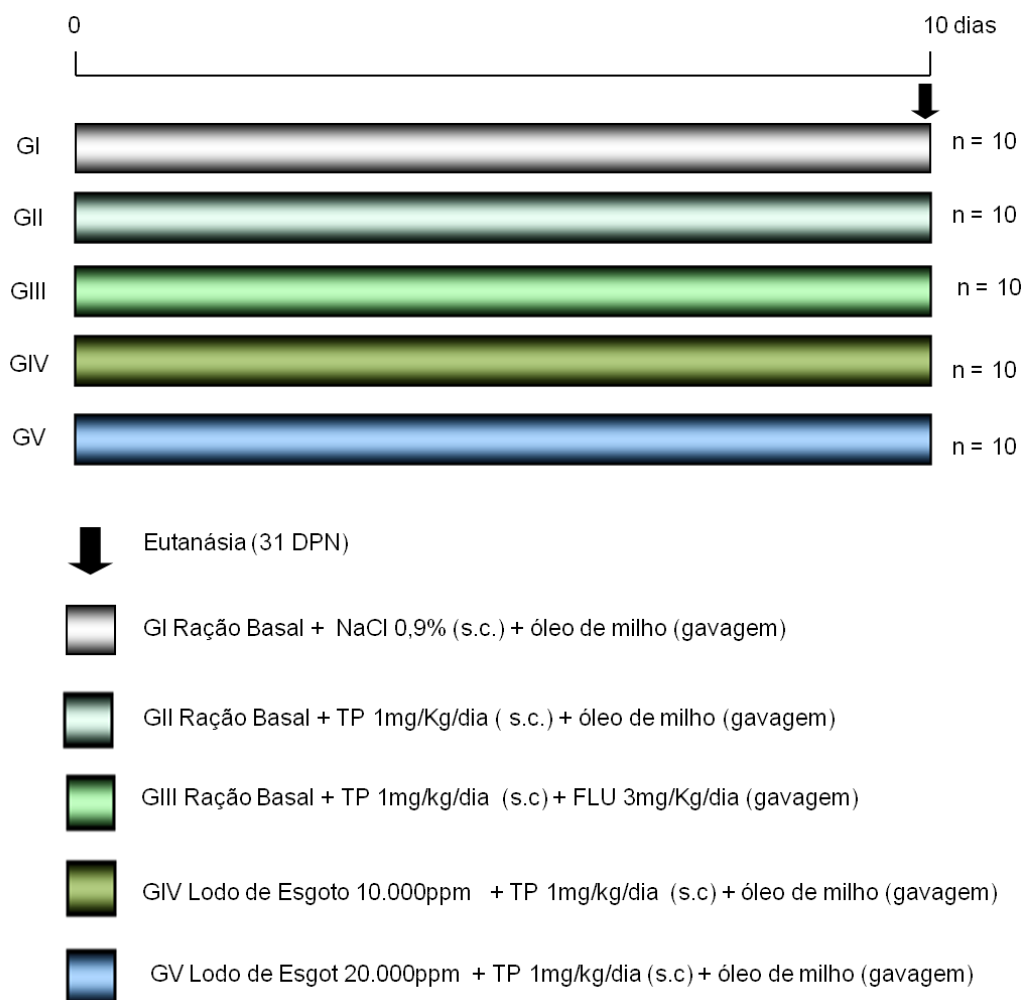


Figura 2: Delineamento Experimental do Estudo B

Animais e ambiente de experimentação (Estudos A e B)

Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada (cinco animais por gaiola, duas gaiolas por grupo), sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas três vezes por semana.

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

Ambos os estudos respeitaram os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CEEAA), protocolo nº 775.

Análises Hormonais

Após narcose induzida por CO_2 o sangue dos animais do estudo A foi coletado ($n=10/\text{grupo}$) por punção cardíaca, no período das 8 horas até as 11 horas, para determinação das concentrações (ng/ml) de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona sérica pela técnica de radioimunoensaio de duplo anticorpo. O plasma foi obtido após centrifugação (2400rpm, 20min, 4°C) e as amostras foram mantidas e transportadas à -20°C até o momento dos testes realizados no laboratório de Neuroendocrinologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, sob a supervisão da Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci. A quantificação de testosterona foi realizada utilizando o kit TESTOSTERONE MAIA® (Biochem Immuno System, Allentown, PA, USA). Para as medições de LH e FSH foram utilizados kits específicos fornecidos pelo National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases (NIADDK, USA). O nível plasmático de

cada hormônio foi detectado no mesmo ensaio para evitar erros inter ensaio. O erro intra-ensaio foi de 3,4% para LH, de 2,8% para FSH e 4% para testosterona.

Análises histológicas

Nos dois Estudos foram coletados para análise histológica o fígado, testículos, epidídimos, vesículas seminais e glândulas de coagulação. Estes foram secos em papel filtro antes de serem pesados. A seguir, foram imersos em formalina 10% tamponada por 48 horas, exceto os testículos direitos e epidídimos, que foram fixados em ALFAC (5% de ácido acético, 10% de formol 100%, 85% de álcool 80%). Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.) e analisados em microscópio de luz Leica®, sem conhecimento do animal do qual a peça procedia.

Análise histológica dos testículos

O testículo esquerdo foi coletado, dissecado e imerso em solução fixadora de ALFAC. Após pré-fixação de 4 horas os órgãos foram seccionados, retornando em seguida ao fixador. Após 24 horas de fixação, a solução foi substituída por álcool 80°, onde as peças permaneceram até o processamento histológico convencional e coloração H.E..

A avaliação histológica foi realizada de modo qualitativo analisando-se 3 cortes não consecutivos do órgão, totalizando 100 túbulos por animal, classificando-os em normais (presença, no epitélio seminífero, de camadas de células germinativas organizadas e de forma concêntrica) ou anormais (células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, vacuolização do epitélio ou esfoliação de células para a luz (Foley, 2001).

Motilidade espermática

A análise da motilidade espermática foi realizada como descrito por Perobelli et al. (2010), onde imediatamente após a eutanásia (98 DPN) o esperma foi obtido do ducto deferente esquerdo e diluído em 2 ml de meio HTF modificado (fluido tubular humano, Irvine Scientific), pré-aquecido a 34°C. Em seguida, uma alíquota de 10ul do esperma diluído foi colocada numa câmara de Makler (Irvine Israel) e analisada em microscópio óptico, com uma ampliação de 400x. Foram avaliados cem espermatozoides por animal e classificados quanto sua motilidade em tipo A: móvel com trajetória progressiva, tipo B: móvel com trajetória não progressiva e tipo C: imóvel.

Contagem de espermatozoides, produção espermática diária e tempo de trânsito do espermático

O testículo direito de cada animal, desencapsulado e previamente pesado, foi homogeneizado em 5 ml de NaCl a 0,9% contendo Triton X-100 a 0,5% e submetido a ultrassom durante 30 segundos. Após diluição de 10x, uma amostra foi transferida para câmara de Neubauer (4 campos por animal), onde as espermátides maduras foram contadas. As espermátides resistentes ao processo de homogeneização testicular (etapa 19 da espermatogênese) e os espermatozoides presentes na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram enumerados como descrito por Robb et al. (1978), com modificações de Fernandes et al. (2007). Para calcular a produção de espermatozoides por dia (DSP), a concentração de espermátides por testículo foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero. Em seguida, o DSP por grama foi calculada de forma a determinar a eficácia do processo. Da mesma forma, cabeça/corpo e

porções da cauda do epidídimo foram recortadas em pequenos fragmentos e homogeneizadas para a contagem de espermatozoides, como descrito para o testículo. O tempo de trânsito através da cabeça/corpo e cauda do epidídimo foi obtido dividindo o número de espermátides presente em cada uma destas regiões pela produção de espermatozoides por dia (DSP).

Avaliação da dinâmica da espermatogênese

No testículo foram analisadas 100 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, os quais apresentavam forma a mais regular e circular possível, sendo os mesmos caracterizados segundo as etapas da espermatogênese (Clermont Y, 1972) como se segue: Estágios I-VI: com duas gerações de espermátides; Estágios VII-VIII: com espermátides maduras localizadas na borda do lúmen; Estágios IX-XIII: com somente uma geração de espermátides; Estágio XIV: com espermatócitos secundários (Tabela 6). As avaliações espermáticas foram realizadas com o apoio do Centro de Toxicologia Reprodutiva (REPROTOX - UNESP- Botucatu), Dra. Wilma de Grava Kempinas.

Análise histológica dos epidídimos

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

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) para amostras independentes. Aqueles que não passaram pelo teste de normalidade utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis, Dunn, Tukey e Bonferroni; as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o software SigmaStat versão 3.5.

RESULTADOS

Em ambos os estudos não foram observados sinais clínicos expressivos ou mortalidade em quaisquer grupos, assim como não ocorreram alterações no ganho de peso. Durante o experimento todos os grupos do Estudo A apresentaram ganho progressivo de peso (Tabela 1); já no Estudo B os grupos tratados com o TP apresentaram aumento de peso quando comparados ao grupo GI (controle negativo); os grupos tratados com o TP+LETE não diferiram do grupo tratado apenas com o TP (Tabela 8).

As Tabelas 2 e 9 indicam os valores do consumo médio estimado de água (ml/rato/dia) e ração (g/rato/dia), assim como os de ingestão estimada de LETE (calculada a partir de sua concentração na ração). No Estudo A os grupos tratados com LETE tiveram maior ingestão de ração em relação ao controle, assim como, os grupos GIV e GV também tiveram aumento no consumo de água quando comparados com o grupo controle. No Estudo B o consumo médio de ração e água permaneceu constante e não apresentou diferença entre os grupos. Em ambos os Estudos o consumo de lodo foi satisfatório e manteve relação entre as concentrações nominais do LETE.

Estudo A

No Estudo A, o peso médio relativo dos rins dos animais do grupo tratado com 20.000 ppm de LETE apresentou aumento significativo quando comparado ao do grupo controle (Tabela 3), já os epidídimos dos grupos tratados com 5.000 e 10.000 ppm apresentaram diminuição significativa do peso relativo. Tanto nos rins como nos epidídimos as alterações não apresentaram dose-resposta e pareceram não estar relacionadas ao tratamento.

O número de espermatozoides no testículo e epidídimo, a produção diária de espermatozoides, e o tempo de trânsito espermático no epidídimo foram similares entre os grupos experimentais, e não apresentaram diferenças significativas relacionadas ao tratamento com LETE (Tabela 4). Na análise da dinâmica da espermatogênese também não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle (Tabela 6).

A proporção de espermatozoides com trajeto progressivo (tipo A) apresentou-se significativamente reduzida nos grupos tratados com LETE e, conseqüentemente, as frações de espermatozoides com trajeto não progressivo (tipo B) ou imóvel (tipo C) aumentaram (Tabela 5). Os níveis plasmáticos de testosterona e diidrotestosterona (DHT) não diferiram significativamente quando comparados com os do grupo controle. Entretanto, os níveis plasmáticos do FSH apresentaram diminuição significativa em todos os grupos tratados com o LETE. Além disto, grupo GII apresentou diminuição significativa na concentração do hormônio luteinizante (LH); os outros grupos tratados com LETE também apresentaram essa diminuição, porém sem significância estatística (Tabela 7).

Estudo B

No Estudo B (Tabela 10) o propionato de testosterona (TP) aumentou de modo significativo o peso relativo dos epidídimos, próstata e vesícula seminal. O TP também levou à diminuição significativa do peso relativo dos testículos (órgão hormônio dependente) quando comparado com o grupo GI – controle negativo. No grupo GIII tratado com flutamida (FLU), houve diminuição significativa no peso relativo dos testículos, epidídimos, próstata e vesículas seminais, quando comparados com o grupo estimulado com o TP (GII). Nos demais grupos tratado com TP+LETE observou-se aumento significativo no peso relativo da próstata

ventral do grupo tratado com 10.000 ppm de LETE. Os demais órgãos coletados (fígado, rins e adrenais) não apresentaram diferenças de pesos significativas entre todos os grupos (Tabela 10).

A FLU e o TP agiram como o esperado em GII e GIII, e os grupos tratados com o LETE foram equivalentes ao controle negativo (GI). Neste estudo, a próstata e a vesícula seminal dos animais tratados com TP naturalmente, por estarem sob influência da testosterona exógena, demonstraram características de amadurecimento mais rápido que o controle, visualizado por ácinos grandes e com muita secreção. Já o tratamento com a FLU inibiu os efeitos do TP, fato indicado pela redução do peso dos órgãos, ácinos pequenos e com pouca secreção, alterações estas também demonstradas por Tinwell et al. (2007) e Ashby et al. (2004).

DISCUSSÃO

Embora os grupos GII, GIII e GV do Estudo A tenham começado o experimento com peso inicial significativamente maior que os GI e GIV, no final do período experimental não foram observadas diferenças significativas entre eles. Nos grupos tratados com LETE, GII, GIII e GIV, houve aumento da ingestão de ração, que pode estar associado ao aumento da ingestão de água observado nos grupos GIV e GV.

O aumento da ingestão alimentar, já observado em nossos estudos anteriores (Solano et al., 2009; Luvizutto et al., 2011), pode ser explicado por possível melhora da palatabilidade, para os ratos, pela presença do LETE na ração, ou por ação, ainda não definida, mas possível, de componentes do lodo sobre centros de regulação da ingestão alimentar. Agonistas que agem diretamente sobre o receptor 5HT-1A podem produzir aumento do apetite, diminuindo a liberação de serotonina (Dhillon, 2007).

Durante o desenvolvimento sexual, hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise anterior e gônadas controlam o sistema reprodutor masculino. Nos machos, o principal hormônio envolvido no controle das funções reprodutivas é a testosterona. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH/LHRH), produzido pelo hipotálamo, controla a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise anterior. O FSH é responsável pela integridade dos túbulos seminíferos e, após a puberdade, é importante na gametogênese através de sua ação sobre as células de Sertoli. O LH estimula as células de Leydig a secretarem androgênios – em particular a testosterona, agente importante para a manutenção dos órgãos reprodutores, desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários masculinos, manutenção da espermatogênese, incluindo a maturação dos espermatozoides no epidídimo e, conseqüentemente, para a fertilidade (Rang,

et al., 2001). Assim, a homeostase hormonal é modulada pelo estágio de vida do organismo mamífero e, portanto, susceptível à ação desreguladora endócrina na puberdade, com implicações na idade adulta (Mantovani et al., 2013).

Alguns estudos demonstraram que substâncias antiandrogênicas interferem na síntese hormonal causando elevação dos níveis de testosterona no plasma sanguíneo. (Friry-Santini et al., 2007; Rouquie et al., 2009; Svechnikov et al., 2010).

A administração pré-púbere de antiandrógenos como o fungicida vinclozolin, por exemplo, retarda a puberdade, reduz o crescimento do epidídimo e aumenta os níveis plasmáticos de LH, testosterona e 5-androstene,3,17-diol em ratos machos (Monosson et al., 1999). Os resultados do Estudo A com ratos adultos jovens indicam que, apesar de o tratamento com o LETE diminuir a concentração plasmática de FSH e LH, a produção espermática diária, o tempo de trânsito espermático pelo epidídimo, o aspecto histológico dos testículos e dos epidídimos não diferiram significativamente entre os grupos experimentais. O FSH desempenha seu maior papel nas células de Sertoli durante o desenvolvimento; em ratos adultos seus efeitos são mais sutis, estando ligados à função tanto das células de Sertoli como das germinativas (Chapin et al., 2012; Ruwanpura et al. 2008; Zirkin et al., 1995)

Houve aumento pequeno, embora significativo, do peso relativo do rim no grupo GIV, sem lesões histológicas evidentes. Em estudos prévios com doses maiores de LETE obtido da mesma estação de tratamento de esgoto, também não verificamos alterações morfológicas nos mesmos órgãos avaliados (Solano et al., 2009; Luvizutto et al., 2010). Portanto, este achado nos rins pode ser decorrente do ganho de peso dos animais desse grupo, que foi um dos menores se comparado com os

outros cinco grupos, ou então um evento incidental, uma variação dentro da linhagem estudada.

A histologia dos testículos foi avaliada para detectar possível prejuízo no processo de espermatogênese, que é considerado um parâmetro sensível da toxicidade testicular (Anahara et al., 2008). Não foram encontradas alterações morfológicas nos túbulos seminíferos, o que sugere que o LETE não induziu dano ao processo de espermatogênese. No entanto, a redução no número de espermatozoides com movimento progressivo (Estudo A - 10.000 ppm e 20.000 ppm de LETE) pode significar comprometimento da qualidade do espermatozoide, com potencial diminuição da fertilidade dos ratos expostos às mais altas concentrações do lodo.

Há relatos de diminuição na concentração dos espermatozoides e do volume do sêmen nos últimos 50 anos (Carlsen et al., 1992; Younglai, et al., 1998). Isto vem sendo associado a fatores ambientais e ao estilo de vida (Sharpe et al., 2000; Sharpe et al., 2002; Horak et al., 2003). Diferentemente das causas genéticas de infertilidade masculina, causas ambientais de infertilidade são de particular interesse devido à possibilidade de medidas curativas ou preventivas. Um fator significativo e corrigível é a nutrição e mudança de estilo de vida. Estudos experimentais em animais têm demonstrado a importância dos efeitos da nutrição na espermatogênese (Kwiecinski et al., 1989; Van Pelt et al., 1991; Ciereszko et al., 1995; Wong et al., 2000a).

A motilidade espermática depende diretamente da produção de energia sob a forma de ATP pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária do espermatozoide. Assim, os espermatozoides podem apresentar uma diminuição na motilidade devido a dois fatores: uma diminuição na produção de energia pelas

mitocôndrias da peça intermediária ou a ocorrência de lesão nas proteínas do axonema (Aitken et al., 2003; Turner et al., 2003). Estudos realizados por De Lamirande & Gagnon (1992a, 1992b) indicaram que a motilidade espermática pode ser o indicador mais sensível de estresse oxidativo, pois os altos níveis de EROs inibem as enzimas da fosforilação oxidativa e/ou da glicólise, limitando a geração de ATP (Baumber et al., 2000; Huang et al., 2000; Huang et al., 2001). Devido à abundância de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas das células germinativas e sua susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilenos entre duplas ligações, tornam-se alvos mais prováveis para ação dos oxidantes (Wagner et al., 1994; Dix et al., 1993). É importante considerar que metais pesados, em altas concentrações, podem também catalisar as reações que levam à formação de EROs (Lloyd et al., 1998).

Em roedores a fertilidade (capacidade de gerar descendentes) não é um parâmetro muito sensível para estudos toxicológicos, visto que há uma excessiva produção de espermatozoides nessa espécie, provavelmente desnecessários para a fertilidade basal. Em humanos, porém, a produção espermática é bem reduzida (Sharpe et al., 1994). Dessa forma, o potencial de um agente tóxico afetar a reprodução masculina é provavelmente maior para humanos que para animais, já que em ratos uma redução de 50 ou 90% no número de espermatozoides férteis durante o acasalamento não diminui a fertilidade (Amann et al., 1989).

O número de espermatozoides presente nos testículos e sua produção diária total também são indicadores importantes da fertilidade masculina (Ashby et al., 2004). Embora nenhum efeito tenha sido observado na produção espermática diária, o comprometimento da motilidade é um achado dependente de alterações no processo de maturação dos espermatozoides no epidídimo (Mangelsdorf, 2003;

Kempinas et al., 2010), sugerindo que este órgão, mais do que o testículo, poderia ser sensível à eventual toxicidade do LETE.

Os resultados da contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo, assim como a análise cinética da espermatogênese, demonstraram que o processo de espermatogênese ocorreu normalmente e não foi alterado pelo LETE. No entanto, novas análises de conjuntos mais abrangentes de parâmetros reprodutivos masculinos, incluindo a fertilidade e o desempenho reprodutivo, são necessárias para confirmar a integridade funcional dos gametas após a exposição ao LETE.

O peso da próstata e vesículas seminais (incluindo secreção) são indicadores relativamente mais sensíveis que a análise histológica, pois muito do peso desses órgãos de roedores é resultado da sua função secretora (Chapin et al., 2012), que traduz uma resposta direta e macroscópica da indução e ativação de receptores celulares. Esse parâmetro pode ser facilmente evidenciado pelo ensaio de Hershberger (OECD, 2009) que é um ensaio *in vivo* utilizado na triagem de substâncias que apresentam atividade androgênica ou antiandrogênica. O protocolo original deste teste indica a utilização de ratos pré-puberes machos castrados. O efeito androgênico é indicado pelo aumento da massa de órgãos responsivos a andrógenos (próstata e vesículas seminais) frente ao estímulo anabólico similar ao do hormônio testosterona. O efeito anti-androgênico é caracterizado pelo não aumento da massa do órgão na presença da testosterona.

Os epidídimos também foram sensíveis à ação do TP e, quando o associado à FLU, houve diminuição do peso, assemelhando-se ao grupo controle negativo (GI). A redução de peso dos testículos em relação ao controle negativo pode ser explicada pela exposição ao TP, que leva à redução do LH circulante, que por sua vez diminui a produção de testosterona pelas células de Leydig, resultando menor

concentração da testosterona intratesticular (Steinberger et al., 1971; Yamasaki et al., 2000).

Neste experimento, com duração de dez dias, o tratamento não induziu efeito androgênico ou anti-androgênico nos ratos Wistar machos tratados com o LETE as alterações de pesos dos testículos, epidídimos, vesículas seminais e próstata dos grupos tratados com TP e TP+FLU mostraram boa reprodutibilidade dos dados da literatura e sugerem confiança no modelo adotado. Nos demais grupos, tratados com TP e com LETE adicionado à ração, observou-se aumento significativo no peso da próstata ventral no grupo tratado com 10.000 ppm de LETE. Porém, essa alteração foi um evento isolado, sem relação dose-resposta e provavelmente sem relação com o tratamento.

Tinwell et al., (2007) e Ashby et al., (2004) mostraram dados conflitantes em relação aos testículos, como alta variabilidade entre os animais com relação ao peso do órgão e gravidade das lesões, sugerindo que o testículo imaturo não é um bom órgão para identificação de substâncias desreguladoras endócrinas em animais recém desmamados.

Estudos para a avaliação de toxicidade em animais de experimentação são feitos com substâncias isoladas, geralmente com níveis de pureza bem definidos. A avaliação do risco toxicológico de bio sólidos, também é atualmente utilizada, mas com base em dados toxicológicos disponíveis de forma isolada, sobre cada um de seus componentes, ou testando-os separadamente (como o chumbo e outros metais pesados). Nesse sentido, a avaliação toxicológica de um agente como o LETE necessariamente difere dos estudos convencionais, pois se trata de uma mistura complexa e muito variável em sua composição (Coscione et al., 2010; Schowanek et al., 2007)

A caracterização físico-química, microbiológica, parasitológica e ecotoxicológica realizada pela CETESB em amostras de LETE coletadas entre abril de 2007 e janeiro de 2008 nas estações de Barueri, Suzano, Parque Novo Mundo, Americana, Jundiaí, Vinhedo e Franca , demonstrou que todas elas continham teores de poluentes inorgânicos inferiores aos limites da Resolução CONAMA, com exceção dos níveis de cromo, molibdênio, níquel e zinco nas amostras de Suzano, e zinco nas do Parque Novo Mundo (CETESB, 2009). O documento da CETESB referiu ainda que as ETEs onde há maior aporte de esgotos oriundos de atividades industriais são as que apresentaram maiores concentrações dos poluentes, o que evidencia a influência das características da bacia de contribuição sobre a qualidade do lodo (CETESB, 2009).

Nossos estudos sugerem que a exposição ao LETE, nas condições estudadas (origem das amostras, concentrações dietárias e linhagem de roedor), induz diminuição na motilidade espermática que, no homem, pode significar queda na fertilidade. A consistência desta observação e seu significado para o roedor e para a espécie humana deve ser explorada por outros estudos, como análise da viabilidade e morfologia espermática e teste de capacidade reprodutiva.

Independente dos resultados aqui apresentados, a utilização do LETE na agricultura naturalmente deve ser monitorada e fiscalizada conforme as normas regulamentadoras P4230 da CETESB e Resolução CONAMA 375, já referidas. No entanto, o solo não pode ser considerado um depósito para descarte de resíduos de importância indefinida. Após a caracterização e entendimento do potencial agrícola e toxicológico do LETE, a aceitação pública passa a ser um nível importante para seu uso disseminado. No entanto, ela pode ser um fator regulador muito mais restritivo do que a legislação existente (USEPA, 1999, 2003; Dunn et al., 2000).

Investimentos em programas informativos e comunicação do risco podem evitar a rejeição e a aversão dos produtores rurais, trabalhadores e consumidores ao uso do LETE.

REFERÊNCIAS

Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol.* 2003;518:85-98.

Amann RP. Can the Fertility Potential of a Seminal Sample Be Predicted Accurately? *Journal of Andrology.* 1989;10(2):89-98.

Anahara R, Toyama Y, Mori C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Reprod Toxicol.* 2008 Feb;25(2):139-43.

Ashby J, Lefevre PA, Tinwell H, Odum J, Owens W. Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hershberger anti-androgen assay. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004 Apr;39(2):229-38.

Barbosa, GM de C, Tavares Filho J. Uso agrícola do lodo de esgoto: influência nas propriedades químicas e físicas do solo, produtividade e recuperação de áreas degradadas. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 27, n. 4, p. 565-580, out./dez. 2006.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies• Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology.* 2000;21(6):895-902.

Berton, RS, Camargo, O.A., Valadares, J.M.A.S.,. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta à adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas. *Rev Bras Ciênc Solo.* 1989 13,187-192.

Bettiol, W., Camargo, O.A.,. Impacto Ambiental do Uso Agrícola do Lodo de Esgoto. *Embrapa Meio Ambiente*, 2000 Jaguariúna. 312p.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj.* 1992 Sep 12;305(6854):609-13.

Ciereszko A, Dabrowski K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol Reprod.* 1995 May;52(5):982-8.

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

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

Chapin RE, Creasy DM. Assessment of circulating hormones in regulatory toxicity studies II. Male reproductive hormones. *Toxicol Pathol.* 2012 Oct;40(7):1063-78.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas: critérios para projeto e operação. São Paulo: CETESB, 1999. (Manual Técnico, Norma P4. 230).

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Caracterização físico-química, microbiológica, parasitológica e ecotoxicológica de lodos de estações de tratamento de esgoto do estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2009. (Relatório técnico

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. RESOLUÇÃO N 375 de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente, 2006.

Conscione A, Nogueira TAR, Pires A. Uso Agrícola de Lodo de Esgoto: Avaliação após a resolução Nº375 do CONAMA. FEPAF ed. Botucatu: FEPAF; 2010.

Da Ros, CO, Aita, C, Ceretta, C.A, Fries, M.R.,. Lodo de esgoto: efeito imediato no milho e residual na associação aveia-ervilhaça. *Rev Bras Ciênc Solo* 1993 17, 257-261.

de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl.* 1992 Sep-Oct;13(5):368-78.

de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl.* 1992 Sep-Oct;13(5):379-86.

Dhillon WS. Appetite regulation: an overview. *Thyroid.* 2007;17(5):433-45.

Dix TA, Aikens J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol.* 1993 Jan-Feb;6(1):2-18.

Dunn, JA, Reclamation Using Biossolids: a primer on economics and other concerns. In mining, forest and land symposium. Disponível on line: http://rmwea.org/tech_papers/mine_forest_land_2000/Dunn.pdf

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

Fernandez MF, Olmos B, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, et al. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect.* 2007 Dec;115 Suppl 1:8-14.

Foley GL. Overview of male reproductive pathology. *Toxicol Pathol.* 2001 Jan-Feb;29(1):49-63.

Friry-Santini C, Rouquie D, Kennel P, Tinwell H, Benahmed M, Bars R. Correlation between protein accumulation profiles and conventional toxicological findings using a model antiandrogenic compound, flutamide. *Toxicol Sci.* 2007 May;97(1):81-93.

Gonçalves, R.F., Nascimento, C.G., Ferrari, G.F., Muller, P.S.G.,. Lodo de lagoas de estabilização em operação no Espírito Santo: formação e características. In: XIX congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, Foz do Iguaçu, 1997 427-437.

Gray LE, Jr., Ostby J, Wilson V, Lambright C, Bobseine K, Hartig P, et al. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing: filling key data gaps. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:371-82.

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

Horak S, Polanska J, Widlak P. Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutat Res.* 2003 May 9;537(1):53-65.

Huang Y, Pai RK, Lau CW, Chan FL, Chen ZY, Yao XQ. Modulatory effect of protein kinase C activator on contractility of rat vas deferens. *Pharmacology.* 2001 Jan;62(1):2-9.

Huang YL, Tseng WC, Cheng SY, Lin TH. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. *Biol Trace Elem Res.* 2000 Sep;76(3):207-15.

Júnior CFC, Souza RA, Martins ER, Sampaio RA. Capacidade de Recuperação de Área Degradada pelo Gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott) sob Adubação com Lodo de Esgoto e Silicato. *Revista Brasileira de Biociências.* 2008;5(S1):pg. 480-2.

Kempinas WG, Klinefelter GR. The epididymis as a target for toxicants. In: McQueen CA, editor. *Comprehensive toxicology*. Oxford: AcademicPress; 2010.p. 149–66

Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr*. 1989 May;119(5):741-4.

Lanning LL, Creasy DM, Chapin RE, Mann PC, Barlow NJ, Regan KS, et al. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol Pathol*. 2002 Jul-Aug;30(4):507-20.

Lloyd DR, Carmichael PL, Phillips DH. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem Res Toxicol*. 1998 May;11(5):420-7.

Luvizutto JFL, Solano MLM, Passareli D, Franchi CDS, Umbuzeiro GA, Camargo JLV. Subchronic toxicity evaluation of a treated urban sewage sludge. *J Toxicol Environ Health A*.73(13-14):916-25.

Mangelsdorf I, Buschmann J, Orthen B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2003 Jun;37(3):356-69.

Mantovani A, Fucic A. Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action. *Reprod Toxicol*. Jun 17.

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

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

Massaad C, Entezami F, Massade L, Benahmed M, Olivennes F, Barouki R, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002 Jan 10;100(2):127-37.

Mendes JJA. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol*. 2002 Jun;40(6):781-8

Monosson E, Kelce WR, Lambright C, Ostby J, Gray LE, Jr. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health*. 1999 Jan-Mar;15(1-2):65-79.

OECD. Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties. In OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 115; OECD Publication Office: Paris, France, 2009.

Perobelli JE, Martinez MF, da Silva Franchi CA, Fernandez CD, de Camargo JL, Kempinas Wde G. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(13-14):991-1002.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Moore, P. K. Sistema reprodutor. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 2004 5a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 488-507.

Rouquie D, Friry-Santini C, Schorsch F, Tinwell H, Bars R. Standard and molecular NOAELs for rat testicular toxicity induced by flutamide. *Toxicol Sci*. 2009 May;109(1):59-65.

Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*. 1978 Sep;54(1):103-7.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. The classification and timing of spermatogenesis. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1990;1:41-58

Ruwanpura SM, McLachlan RI, Matthiesson KL, Meachem SJ. Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod*. 2008 Feb;23(2):403-11.

Schowanek D, David H, Francaviglia R, Hall J, Kirchmann H, Krogh PH, et al. Probabilistic risk assessment for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in sewage sludge used on agricultural soil. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007 Dec;49(3):245-59.

Sharpe RM. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *British medical bulletin*. 2000;56(3):630-42.

Sharpe RM, Franks S. Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue. *Nat Cell Biol*. 2002 Oct;4 Suppl:s33-40.

SHARPE, RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D.(Eds). *The physiology of reproduction* 1994. 2nd ed. New York: Raven, p.1363-1434,

Silva, F.C., Boaretto, A.E., Berton, R.S., Zotelli, H.B., Pexe, C.A., Bernardes, H.M., Efeito do lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. *Pesqui Agropec Bras*. 2001; 36, 831-840.

Skakkekebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* 2001; 16 (5):972-978.

Solano MLM, de Lima PL, Luvizutto JF, Silva PR, de Aragao Umbuzeiro G, de Camargo JL. In vivo genotoxicity evaluation of a treated urban sewage sludge sample. *Mutat Res.* 2009 May 31;676(1-2):69-73.

Steinberger E, Ficher M. Formation and metabolism of testosterone in testicular tissue of immature rats. *Endocrinology.* 1971 Sep;89(3):679-84.

Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Soder O. Endocrine disruptors and Leydig cell function. *J Biomed Biotechnol.*2010.

Teixeira ST, Melo WJ, Silva ET. Plant nutrients in a degraded soil treated with water treatment sludge and cultivated with grasses and leguminous plants. *Soil Biology and Biochemistry.* 2007;39(6):1348-54.

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

Tollefsson J. Raking through sludge exposes a stink. *Nature.* 2008;453/15:262-263

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

Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of andrology.* 2003;24(6):790-803.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1998a. Research Plan for Endocrine Disruptors. EPA/600/R-98/087. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. Available: <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/docs/edstac/exesum14.pdf> [acesso em 08/mar/2012]

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

USEPA (United States Environmental Protection Agency) 2007.Endocrine Disrupter Screening Program (EDSP) website

<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/index.htm> (acesso em 14/nov/2012).

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Environmental Regulations and Technology: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge (Including Domestic Septage) Under 40 CFR Part 503. 1999 (Revised July 2003). EPA, Washington.

van Pelt Am Fau - de Rooij DG, de Rooij DG. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. 1991(0013-7227 (Print)).

Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. Biochemistry. 1994 Apr 19;33(15):4449-53.

Wong Wy Fau - Thomas CM, Thomas Cm Fau - Merkus JM, Merkus Jm Fau - Zielhuis GA, Zielhuis Ga Fau - Steegers-Theunissen RP, Steegers-Theunissen RP. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. 2000a(0015-0282 (Print)).

Yamasaki K, Sawaki M, Takatsuki M. Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A. Environ Health Perspect. 2000 Dec;108(12):1147-50.

Younglai Ev Fau - Collins JA, Collins Ja Fau - Foster WG, Foster WG. Canadian semen quality: an analysis of sperm density among eleven academic fertility centers. 1998(0015-0282 (Print)).

Zirkin, B.R. What is the relationship between the various endocrine components of the male reproductive system? In: Robaire, B.; Pryor, J.L. & Trasler, J.M. (eds.) Handbook of andrology. São Francisco: American Society of Andrology, 1995

TABELAS

Tabela 1 Estudo A: Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Ganho de Peso (g)		
		Inicial	Final ¹	Ganho de peso ²
GI Controle negativo	10	161.4±7.9	409.0±30.9	247.6±27.3
GII 2.500 ppm	10	181.8±8.3*	421.2±21.2	239.4±17.5
GIII 5.000 ppm	10	186.1±8.7*	433.3±23.7	247.3±19.4
GIV 10.000 ppm	10	169.5±11.2	426.6±34.3	257.1±26.2
GV 20.000 ppm	10	180.7±8.7*	413.1.3±11	232.6±14.9

Valores apresentados na forma de média ± DP; ¹Dados não paramétricos; ² O ganho de peso representa: peso corpóreo final – peso corpóreo inicial; Teste de Tukey *p<0,05.

Tabela 2 Estudo A: Consumo médio de ração e água e ingestão de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Consumo de Água	Consumo de Ração	Consumo de Lodo
		ml/rato/dia	g/rato/dia	g/kg/day
GI Controle negativo	10	37.09±2.61	23.36±2.16	-
GII 2.500 ppm	10	38.96±4.88	25.59±2.68*	0.20±0.004
GIII 5.000 ppm	10	37.29±2.82	25.99±3.88*	0.40±0.004
GIV 10.000 ppm	10	38.64±2.99*	27.08±1.48*	0.84±0.003
GV 20.000 ppm	10	40.81±2.84*	26.95±1.93*	1.67±0.02

Valores apresentados na forma de média ± DP; Teste de Tukey *p<0,05.

Tabela 3 Estudo A: Peso relativo dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Fígado	Rins ^{1,2}	Adrenais ²	Testículos ²	Próstata Ventral	Vesícula seminal cheia	Epidídimos ²
GI Controle negativo	10	3.48±0.23	0.29±0.02	0.01±0.001	0.36±0.02	0.08±0.01	0.26±0.04	0.11±0.01
GII 2.500 ppm	10	3.63±0.17	0.29±0.02	0.01±0.001	0.37±0.03	0.09±0.01	0.23±0.04	0.11±0.01
GIII 5.000 ppm	10	3.47±0.42	0.30±0.01	0.01±0.001	0.36±0.03	0.07±0.03	0.23±0.07	0.10±0.01*
GIV 10.000 ppm	10	3.75±0.30	0.29±0.02	0.01±0.001	0.35±0.02	0.08±0.01	0.24±0.04	0.10±0.01*
GV 20.000 ppm	10	3.49±0.29	0.31±0.02*	0.01±0.001	0.37±0.02	0.07±0.01	0.22±0.02	0.11±0.01

Valores apresentados na forma de média ± DP; ¹Dados não paramétricos; ² Média dos órgão pares; teste de Dunnett's *p<0,05.

Tabela 4 Estudo A : Produção espermática diária, contagem de espermatozoides e tempo de trânsito espermático dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Número de espermatozoides no testículo ($\times 10^6$)	Produção espermática diária no testículo ($\times 10^6$ /testis/dia)	Produção relativa de espermatozoide no testículo ($\times 10^6$ /g testis/dia)	Número de espermatozoides cabeça/corpo do epidídimo ($\times 10^6$)	Tempo de trânsito espermático cabeça/corpo do epidídimo (dia)	Número de espermatozoides na cauda do epidídimo ($\times 10^6$)	Tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo (dia)
GI Controle negativo	10	176.57 $\pm$ 18.99	28.95 $\pm$ 3.11	21.71 $\pm$ 2.63	101.92 $\pm$ 13.63	3.54 $\pm$ 0.51	156.53 $\pm$ 18.86	5.43 $\pm$ 0.59
GII 2.500 ppm	10	180.46 $\pm$ 18.07	29.58 $\pm$ 2.96	20.73 $\pm$ 1.26	111.53 $\pm$ 12.41	3.79 $\pm$ 0.45	154.35 $\pm$ 17.54	5.28 $\pm$ 0.86
GIII 5.000 ppm	10	191.49 $\pm$ 21.40	31.39 $\pm$ 3.51	22.14 $\pm$ 1.91	98.05 $\pm$ 14.91	3.15 $\pm$ 0.53	139.98 $\pm$ 16.91	4.48 $\pm$ 0.42
GIV 10.000 ppm	10	178.87 $\pm$ 21.01	29.32 $\pm$ 3.44	21.72 $\pm$ 1.71	100.92 $\pm$ 18.98	3.48 $\pm$ 0.76	140.27 $\pm$ 15.21	4.85 $\pm$ 0.81
GV 20.000 ppm	10	180.99 $\pm$ 29.07	29.67 $\pm$ 4.77	20.79 $\pm$ 2.05	101.15 $\pm$ 12.92	3.47 $\pm$ 0.56	146.07 $\pm$ 23.18	5.03 $\pm$ 1.09

Valores apresentados na forma de média $\pm$ DP; Teste de Tukey * $p < 0,05$

Tabela 5 Estudo A: Análise da dinâmica do processo espermatogênico dos animais nos diferentes grupos experimentais

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Estádio I-IV	Estádio VII-VIII	Estádio IX-XIII	Estádio XIV ¹
GI Controle negativo	10	41.50±1.72	31.40±1.65	23.00±1.05	3.70±0.69
GII 2.500 ppm	10	39.90±1.52	33.30±1.83	22.80±1.48	4.20±0.92
GIII 5.000 ppm	10	40.90±1.91	33.10±2.28	22.50±1.43	4.70±0.48
GIV 10.000 ppm	10	42.30±1.42	31.70±0.95	21.80±1.55	4.10±0.74
GV 20.000 ppm	10	41.50±1.18	33.40±2.01	21.30±1.70	3.80±0.79

Valores apresentados na forma de média ± DP; ¹Dados não paramétricos; teste de Dunnett's *p<0,05.

Tabela 6 Estudo A: Motilidade espermática nos animais dos diferentes grupos experimentais

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Tipo A (%)	Tipo B (%)	Tipo C (%) ¹
GI Controle negativo	10	63.3±12.4	23.7±9.5	13.9±2.9
GII 2.500 ppm	10	48.1±12.1*	28.7±11.6	23.7±5.3*
GIII 5.000 ppm	8	61.7± 9.1	22.4±8.1	16.4±4.7
GIV 10.000 ppm	10	30.9±11.1*	41.5±13.2*	27.9±8.9*
GV 20.000 ppm	9	26.9± 9.3*	40.4±7.5*	33.0±9.6*

Valores apresentados na forma de média ± DP; ¹Dados não paramétricos; teste de Dunnett's *p<0,05. Tipo A: móvel, com trajeto progressivo; Tipo B: móvel, com trajeto não progressivo; Tipo C: imóvel

Tabela 7 Estudo A: Concentração hormonal plasmática dos animais dos diferentes grupos experimentais

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	DHT (pg/ml)	Testosterona (ng/ml)
GI Controle negativo	10	13.51 (12.18-14.41)	12.38 (9.92-27.75)	116.55 (6.8-194.17)	1.06 (0.76-2.49)
GII 2.500 ppm	10	10.02* (8.72-11.36)	6.14* (5.17-7.39)	142.16 (78.31-194.72)	2.15 (0.61-3.42)
GIII 5.000 ppm	10	9.43* (8.92-10.16)	7.63 (7.06-9.64)	139.57 (68.71-150.73)	1.35 (0.79-1.87)
GIV 10.000 ppm	10	10.04* (9.77-10.43)	8.33 (7.28-9.71)	83.82 (74.49-127.99)	0.96 (0.46-1.19)
GV 20.000 ppm	10	9.21* (8.72-10.02)	10.63 (6.67-11.85)	115.78 (82.91-131.52)	1.95 (1.05-4.39)

Valores apresentados na forma de mediana e intervalo interquartilico; *p<0,05.

Tabela 8 Estudo B: Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Ganho de Peso (g)		
		Inicial	Final	Ganho de peso ^{1,2}
GI -Controle negativo	10	45.4±5.41	104.8±12.74	59.4±7.78
GII - TP	10	48.4±4.81	120.1± 7.11 ^a	71.7±2.95 ^a
GIII - TP+FLU	10	43.2±7.16	109.3±10.05 ^b	66.1±3.35 ^b
GIV - TP+10.000	10	41.6±5.46	111.3±8.14	69.7±5.17
GV - TP+20.000	10	48.1±4.63	117.3±11.84	69.2±9.41

O animais tinham 21 dias de idade no início do tratamento; Valores apresentados na forma de média ± DP; ² Dados não paramétricos; Primeiro foram comparados os grupos GI - controle negativo e GII - TP (^ap<0.05) para garantir os efeitos androgênicos do Propionato de testosterona (TP). Uma segunda comparação foi feita entre os grupos GII - TP e TP + LETE ou Flutamida (FLU) ^bp<0.05)

Tabela 9 Estudo B: Consumo médio de ração e água e ingestão de lodo pelos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/ Tratamento	Número efetivo de ratos	Consumo de Água	Consumo de Ração	Consumo de Lodo
		ml/rato/dia	g/rato/dia	
GI -Control	10	17.13±4.87	10.43±3.38	-
GII - TP	10	19.63±5.69	11.41±3.34	-
GIII - TP+FLU	10	19.90±5.54	10.56±3.14	-
GIV - TP+10.000	10	16.75±3.77	10.17±3.26	0.91±0.02
GV - TP+20.000	10	17.83±4.25	10.83±3.40	1.85±0.04

Valores apresentados na forma de média ± DP; Teste de Tukey *p<0,05.

Tabela 10 Estudo B: Peso relativo dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais

Grupo/ Tratamento	Número efetivo de ratos	Peso Relativo (%)						
		Fígado ²	Rins	Adrenais ²	Testículos ²	Epidídimos ²	Próstata ²	Vesícula seminal cheia ²
GI -Controle negativo	10	5.06±0.28	0.5±0.04	0.02±0.03	0.36±0.02	0.04±0.003	0.04±0.004	0.02±0.003
GII - TP	10	5.28±0.15	0.5±0.03	0.01±0.001	0.17±0.01 ^a	0.05±0.005 ^a	0.07±0.01 ^a	0.1±0.04 ^a
GIII - TP+FLU	10	5.28±0.29	0.5±0.04	0.03±0.03	0.13±0.04 ^b	0.03±0.004 ^b	0.04±0.004 ^b	0.06±0.03 ^b
GIV - TP+10.000	10	5.22±0.30	0.5±0.03	0.01±0.003	0.16±0.02	0.05±0.007	0.08±0.01 ^b	0.1±0.03
GV - TP+20.000	10	5.18±0.56	0.5±0.06	0.01±0.001	0.19±0.03	0.05±0.008	0.07±0.02	0.09±0.04

O animais tinham 21 dias de idade no início do tratamento; Valores apresentados na forma de média ± DP; ² Dados não paramétricos; Primeiro foram comparados os grupos GI - controle negativo e GII - TP (^ap<0.05) para garantir os efeitos androgênicos do Propionato de testosterona (TP). Uma segunda comparação foi feita entre os grupos GII - TP e TP + LETE ou Flutamida (FLU) ^bp<0.05.

FIGURAS

Figura 3: Motilidade espermática dos animais dos diferentes grupos experimentais

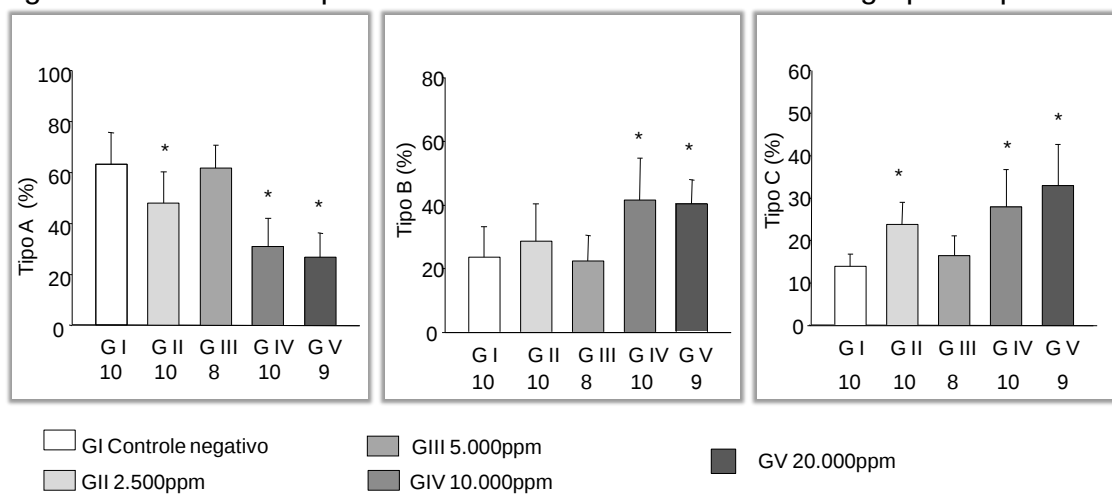
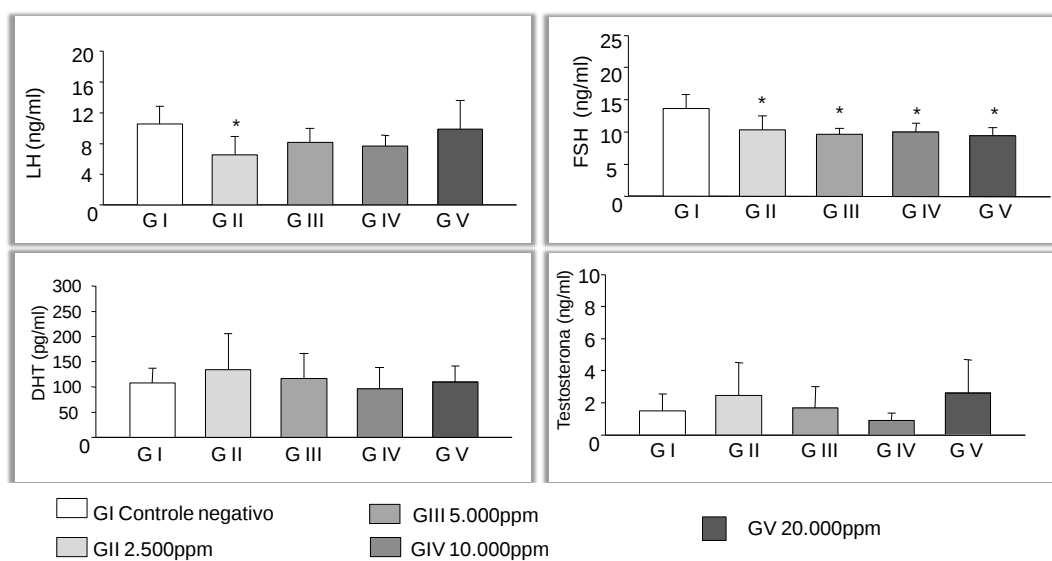


Figura 4: Concentração hormonal plasmática dos animais nos diferentes grupos experimentais





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



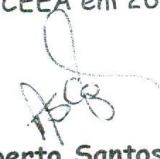
Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 775 sobre o projeto de pesquisa "Estudo do potencial desregulador endócrino do lodo de esgoto tratado (LETE) em ratos Wistar macho", de autoria de João Francisco Luvizotto, orientado pelo Prof. Titular João Lauro Viana de Camargo, 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 wistar", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 26/11/2009.


Profª Drª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA