

**ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE**

**EFEITOS DO PIRETRÓIDE DELTAMETRINA SOBRE O SISTEMA REPRODUTIVO  
DE RATOS MACHOS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E DURANTE A  
LACTAÇÃO**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo  
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia,  
do Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter**

**CURITIBA**

**2002**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela graça da vida e pela sua presença.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter pela orientação, estímulo, amizade e confiança.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR.

Aos meus colegas de laboratório Prof. Masahiko Ohi, Gladys Marques Santana e Samanta Luiza Araújo pelo companheirismo e ajuda.

Aos Funcionários do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Nogueira de Moraes pela amizade e pelo auxílio técnico na análise hormonal.

Aos meus colegas do Departamento de Biologia Celular da UFPR, Luis Fernando Bianchini e Gabriel Mathias Carneiro Leão pelo auxílio técnico na análise histológica.

Aos funcionários do Setor de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UFPR, particularmente à farmacêutica-bioquímica Gislaine Custódio Piovezan.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Frischmann Aisengart pelo apoio no início da minha carreira profissional.

À Aventis CropScience do Brasil pelo fornecimento da deltametrina.

À CAPES e a FUNPAR pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Guaracy e Alicia pelo incentivo e apoio.

À Simone Wichert Grande pelo amor e compreensão.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO .....	03
1.1.1 Anatomia funcional .....	03
1.1.2 Espermatogênese .....	05
1.1.3 Síntese de hormônios androgênicos .....	07
1.1.4 Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas .....	08
1.1.5 Diferenciação sexual masculina .....	09
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....	10
1.3 TESTES EM TOXICOLOGIA REPRODUTIVA .....	13
1.4 DELTAMETRINA .....	16
1.5 OBJETIVOS .....	20
1.5.1 Objetivo geral .....	20
1.5.2 Objetivos específicos .....	20
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
2.1 ANIMAIS .....	21
2.2 ACASALAMENTOS .....	21
2.3 DOSES E TRATAMENTO .....	21
2.4 DADOS DA PREENHEZ .....	22
2.5 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES .....	23
2.5.1 Parâmetros gerais do desenvolvimento .....	23
2.5.2 Parâmetros do desenvolvimento sexual masculino .....	23
2.5.3 Avaliação reprodutiva dos descendentes masculinos na puberdade e idade adulta .....	24

2.5.3.1 Determinação do peso absoluto e relativo de órgãos .....	25
2.5.3.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático .....	25
2.5.3.3 Morfologia espermática .....	26
2.5.3.4 Níveis plasmáticos de testosterona .....	27
2.5.3.5 Histologia testicular .....	28
2.6 TESTE DE FERTILIDADE E EFEITOS PATERNAIS .....	30
2.7 COMPORTAMENTO SEXUAL .....	31
2.8 TESTE UTEROTRÓFICO .....	33
2.9 TESTE DE HERSHBERGER .....	34
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>3 RESULTADOS</b> .....	37
3.1 DADOS DA PREENHEZ .....	37
3.2 DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE .....	38
3.3 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE .....	40
3.4 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MASCULINOS .....	41
3.4.1 Peso absoluto e relativo de órgãos .....	41
3.4.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático .....	42
3.4.3 Morfologia espermática .....	43
3.4.4 Níveis plasmáticos de testosterona .....	43
3.4.5 Histologia testicular .....	43
3.5 TESTE DE FERTILIDADE E EFEITOS PATERNAIS .....	45
3.6 COMPORTAMENTO SEXUAL .....	46
3.7 TESTE UTEROTRÓFICO .....	47
3.8 TESTE DE HERSHBERGER .....	47
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	49
4.1 DADOS DA PREENHEZ E DO DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE .....	50
4.2 PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE MASCULINA .....	50
4.3.1 Peso de órgãos sexuais e histologia testicular .....	51

4.3 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MASCULINOS NA PUBERDADE E NA IDADE ADULTA .....	51
4.3.2 Níveis plasmáticos de testosterona .....	52
4.3.3 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático .....	53
4.4 TESTE DE FERTILIDADE E EFEITOS PATERNALIS .....	55
4.5 COMPORTAMENTO SEXUAL .....	55
4.6 TESTE UTEROTRÓFICO E DE HERSHBERGER .....	57
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO TESTÍCULO .....	04
FIGURA 2 - GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS DE ROEDORES .....	05
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DA ESPERMATOGÊNESE .....	06
FIGURA 4 - EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO .....	09
FIGURA 5 - ESTRUTURA DA DELTAMETRINA .....	16
FIGURA 6 - SEPARAÇÃO PREPUCIAL EM RATOS .....	24
FIGURA 7 - CÁLCULO DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES E ESPERMÁTIDES .....	26
FIGURA 8 - MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE RATOS .....	27
FIGURA 9 - ASPECTO HISTOLÓGICO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS EM CORTES TRANSVERSAIS CORADOS COM HEMATOXILINA/EOSINA .....	29
FIGURA 10 - COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS .....	32
FIGURA 11 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O GANHO DE PESO (%) DAS PROGENITORAS TRATADAS DIARIAMENTE POR VIA ORAL DURANTE A PRENHEZ E A LACTAÇÃO .....	37
FIGURA 12 - CARACTERÍSTICAS DO DESENVOLVIMENTO GERAL DE RATOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA .....	39
FIGURA 13 - PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA .....	40
FIGURA 14 - RESPOSTA DA DELTAMETRINA AO TESTE UTEROTRÓFICO DE TRÊS DIAS UTILIZANDO RATAS IMATURAS .....	47
FIGURA 15 - RESPOSTA DA DELTAMETRINA AO TESTE DE HERSHBERGER DE SETE DIAS UTILIZANDO RATOS PRÉ-PÚBERES CASTRADOS .....	48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ÍNDICES REPRODUTIVOS DE RATAS TRATADAS POR VIA ORAL COM BAIXAS DOSES DE DELTAMETRINA DURANTE A GESTAÇÃO E A LACTAÇÃO .....	38
TABELA 2 - PESO AO NASCER E AO DESMAME DE RATOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA .....	39
TABELA 3 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O PESO ABSOLUTO DE ÓRGÃOS SEXUAIS E GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE RATOS MACHOS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO .....	41
TABELA 4 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O PESO RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS SEXUAIS E GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE RATOS MACHOS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO .....	42
TABELA 5 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO, TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO, NÍVEIS DE TESTOSTERONA, HISTOLOGIA TESTICULAR E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE RATOS MACHOS PÚBERES EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA .....	44
TABELA 6 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES CAUDA DO EPIDÍDIMO, TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO, NÍVEIS DE TESTOSTERONA, HISTOLOGIA TESTICULAR E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA .....	44
TABELA 7 - ÍNDICES REPRODUTIVOS CALCULADOS PARA RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA .....	45
TABELA 8 - ÍNDICES REPRODUTIVOS DE RATAS ACASALADAS COM RATOS ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA .....	45
TABELA 9 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO <i>IN UTERO</i> E LACTACIONAL À DELTAMETRINA NO COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS ADULTOS .....	46

## LISTA DE SIGLAS

ABP	- Androgen Binding Protein: Proteína de Ligação a Andrógenos
DDE	- Diclorodifeniltricloroetano
DDT	- Diclorodifenildicloroetileno
DEHP	- Di(etil) Hexil Ftalato
DES	- Dietilestilbestrol
EDSTAC	- Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisory Committee
FDA	- Food and Drug Administration
FSH	- Follicle Stimulating Hormone: Hormônio Folículo Estimulante
GABA	- Gama Aminobutiric Acid: Ácido Gama-aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	- Receptor do Ácido Gama-aminobutírico (subtipo A)
GnRH	- Gonadotrophin Releasing Hormone: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
LH	- Luteinizing Hormone: Hormônio Luteinizante
NOEL	- No Observed Effect Level
OECD	- Organization for Economic Co-operation and Development
SDN	- Sexual Dimorphic Nucleus: Núcleo Sexual Dimórfico
SINDAG	- Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas
SNC	- Sistema Nervoso Central
StAR	- Steroidogenic Acute Regulator: Proteína de Regulação Aguda da Esteroidogênese
TCDD	- 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
US EPA	- United States Environmental Protection Agency

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DL <sub>50</sub>	- dose letal 50%
DP	- desvio padrão
g	- gramas
h	- horas
ip	- intraperitoneal
kg	- quilogramas
mg	- miligramas
min	- minutos
mL	- mililitros
mm	- milímetros
n	- tamanho da amostra
ng	- nanogramas
n <sup>o</sup>	- número
p	- nível de significância estatístico
q.s.p	- quantidade suficiente para
s	- segundos
sc	- subcutânea
SD	- standard deviation
UI	- unidades internacionais
vo	- via oral
x g	- gravidade
μL	- microlitros
μm	- micrômetros
<sup>14</sup> C	- carbono 14
°C	- graus Celcius
<sup>125</sup> I	- Iodo 125
®	- marca registrada

## RESUMO

O comprometimento da função reprodutiva de seres humanos e de espécies animais tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. A crescente exposição a contaminantes químicos ambientais com potencial de afetar o sistema endócrino é apontada como um dos fatores responsáveis pelo aumento na incidência de distúrbios reprodutivos masculinos. Recentemente a possibilidade de distúrbios induzidos pela exposição a xenobióticos durante as fases pré e perinatal tem merecido atenção especial. A deltametrina é um pesticida piretróide sintético amplamente utilizado na agricultura, na medicina veterinária e na saúde pública. Os piretróides sintéticos são apontados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos como possíveis desreguladores endócrinos. O presente estudo avaliou os efeitos da deltametrina sobre a função reprodutiva de ratos machos expostos *in utero* e durante a lactação, assim como seus possíveis efeitos (anti)estrogênicos ou (anti)androgênicos em testes *in vivo* de curta duração. As progenitoras foram tratadas diariamente pela via oral do 1º dia da prenhez ao 21º dia da lactação. Foram utilizadas três doses de deltametrina: 1,0; 2,0 e 4,0 mg/kg, além do grupo controle tratado com veículo (óleo de canola). Os descendentes foram avaliados quanto a parâmetros gerais e sexuais de desenvolvimento. Na puberdade e na idade adulta foram avaliados parâmetros específicos do sistema reprodutivo masculino: peso de órgãos sexuais; produção espermática diária; número de espermatozóides na cauda do epidídimo; tempo de trânsito dos espermatozóides na cauda do epidídimo; testosterona plasmática; morfologia espermática e histologia testicular. Na idade adulta também foram realizados os testes de fertilidade e comportamento sexual. Os testes uterotrófico e de Hershberger foram utilizados para detectar os possíveis efeitos (anti)estrogênicos e (anti)androgênicos da deltametrina *in vivo*. As doses utilizadas não provocaram efeitos adversos sobre a prenhez e o desenvolvimento geral e sexual das progênies, indicando ausência de toxicidade materna e de desenvolvimento. Na idade adulta, no entanto, os descendentes expostos a maior dose de deltametrina apresentaram reduções no peso dos testículos e epidídimos (média  $\pm$  DP): testículos - 1,47 g  $\pm$  0,12 (controle); 1,31 g  $\pm$  0,13 (4,0 mg/kg); epidídimos - 563 mg  $\pm$  42 (controle); 509 mg  $\pm$  46 (4,0 mg/kg). Associada a redução no peso testicular, foi detectada uma redução de cerca de 12% na produção espermática diária desses animais. Nesse mesmo grupo foi detectada, ainda, uma redução no diâmetro médio dos túbulos seminíferos (média  $\pm$  DP): 265  $\mu$ m  $\pm$  9,31 (controle); 250  $\mu$ m  $\pm$  6,65 (4,0 mg/kg). Os resultados do teste de comportamento sexual mostraram que a ausência de ejaculação foi o principal efeito observado. O presente estudo indica que a exposição *in utero* e lactacional à deltametrina pode alterar o sistema reprodutivo de ratos machos na idade adulta, em doses que não causam toxicidade materna. Os resultados dos testes uterotrófico e de Hershberger indicam que, nas doses testadas, a deltametrina não possui atividade (anti)estrogênica e (anti)androgênica *in vivo*, sugerindo que os efeitos reprodutivos induzidos durante as fases diferenciação sexual resultam da interferência em outros mecanismos de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Palavras-chave: Deltametrina; toxicologia reprodutiva; prenhez; lactação; desreguladores endócrinos; uterotrófico; Hershberger.

## ABSTRACT

Environmental contaminants that interfere with reproduction and other endocrine-regulated functions have recently become the focus of significant interest in the context of human and wildlife health. The possibility of disturbances induced either during the prenatal or early postnatal period has attracted special attention. Deltamethrin is a synthetic pyrethroid pesticide widely used in agriculture, veterinary medicine and public health. Synthetic pyrethroids are listed by the United States Environmental Protection Agency (US EPA) as possible endocrine disruptor chemicals. The purpose of the present study was to elucidate whether deltamethrin poses reproductive hazards to male offspring rats exposed *in utero* and during lactation, as well as detect possible (anti)estrogenic or (anti)androgenic properties of this pesticide. The dams were treated daily by oral gavage with 0; 1,0; 2,0 and 4,0 mg deltamethrin/kg from day 1 of pregnancy to day 21 of lactation. Maternal and reproductive outcome data and male sexual development landmarks were assessed. Reproductive endpoints of the male offspring were examined at puberty and adulthood: organ weights; daily sperm production; sperm counts (cauda epididymis); sperm transit rate; testosterone levels; sperm morphology and testicular histology. At adulthood, fertility and sexual behavior were also assessed. Uterotrophic and Hershberger assays were performed in order to screen (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of deltamethrin. No signs of maternal toxicity were detected at the tested dose levels. Development landmarks were also unaffected. However, testicular and epididymal weights were significantly reduced on the adult male rats exposed to the highest dose of deltamethrin (mean  $\pm$  SD): testes - 1,47 g  $\pm$  0,12 (control); 1,31 g  $\pm$  0,13 (4,0 mg/kg); epididymis - 563 mg  $\pm$  42 (control); 509 mg  $\pm$  46 (4,0 mg/kg). In addition, daily sperm production at adulthood was decreased by 12% at this same dose level. This result is further supported by a significant reduction in the diameter of seminiferous tubules (mean  $\pm$  DP): 265  $\mu$ m  $\pm$  9,31 (control); 250  $\mu$ m  $\pm$  6,65 (4,0 mg/kg). Results from sexual behavior observations showed that absence of ejaculation was the main effect observed. In summary, the results indicate that *in utero* and lactational exposure to deltamethrin may induce reproductive hazards on adult male rats at dose levels that do not cause maternal toxicity. Results from uterotrophic and Hershberger assays indicate absence of *in vivo* (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of deltamethrin, at the tested dose levels, suggesting that the reproductive effects induced during critical periods of sexual development, may involve interference with other mechanisms that regulate the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Key-words: Deltamethrin; reproductive toxicology; pregnancy; lactation; endocrine disruptors; uterotrophic; Hershberger.

## 1 INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento tecnológico e industrial que ocorreu no século XX, especialmente após a 2ª guerra mundial, foi responsável pelo marcante crescimento na produção de medicamentos, pesticidas, aditivos alimentares e compostos químicos industriais. A produção anual de compostos orgânicos sintéticos passou de 450 mil toneladas em 1920 para mais de 90 milhões de toneladas no final da década de 80 (GALLO, 1996; THOMAS, 1996). Com a intensificação da exploração agrícola e pecuária a partir de 1960, houve um crescimento representativo da produção e utilização de pesticidas no combate a pragas da lavoura, assim como no combate de endo e ectoparasitas na área veterinária (ECOBICHON, 1996). Apesar de seus benefícios no aumento da produtividade agropecuária, o uso dos pesticidas também passou a representar um sério risco ao meio ambiente e à saúde humana e animal. Os pesticidas estão entre os contaminantes químicos ambientais que mais causam preocupação em função de sua ampla utilização e possibilidade de exposição através de resíduos presentes nos alimentos e na água. O Brasil, devido à ampla extensão territorial, clima apropriado para cultivos agrícolas e a necessidade da produção de alimentos, encontra-se atualmente entre os maiores consumidores de pesticidas do mundo. Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG) as vendas brasileiras de pesticidas aumentaram de US\$ 830 milhões em 1986 para US\$ 1,79 bilhões em 1996, sendo que, nesse mesmo ano, o Paraná ocupava a segunda posição nas vendas desses produtos (20,1%), atrás somente do estado de São Paulo (LARINI, 1999). Esse crescimento na produção, associado ao desenvolvimento constante de novas substâncias, contribuiu para a expansão dos estudos de avaliação dos efeitos adversos de pesticidas e outros contaminantes químicos ambientais sobre a saúde humana e animal. Originalmente, esses estudos concentraram-se nos efeitos agudos, neurotóxicos e carcinogênicos dos agentes químicos. Recentemente, no entanto, grande atenção também tem sido dada aos possíveis efeitos adversos sobre o comportamento, a reprodução e o desenvolvimento (NEUBERT e CHAHOUD, 1995).

O comprometimento da função reprodutiva de seres humanos e de espécies animais tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. Muitos fatores podem interferir com os componentes e com a função reprodutiva e ocasionar infertilidade e outras alterações funcionais e estruturais. Doenças, fatores psicológicos, estresse, variações hormonais e exposição a substâncias químicas, são alguns dos fatores que contribuem para o surgimento de distúrbios no sistema reprodutivo masculino e feminino (NEUBERT e CHAHOUD, 1995). Efeitos induzidos por substâncias químicas podem ocorrer pela interação direta da substância com componentes do sistema reprodutivo ou indiretamente pela interferência na regulação endócrina, uma vez que o desenvolvimento e a manutenção do sistema reprodutivo é particularmente dependente de uma série de interações hormonais (WHITLEY et al., 1994; NEUBERT e CHAHOUD, 1995).

As alterações reprodutivas induzidas por substâncias químicas podem ser desencadeadas em qualquer estágio do desenvolvimento, desde a vida fetal até a idade adulta. Os distúrbios induzidos ainda no útero ou logo após o nascimento (fases pré e perinatal) são caracterizados como graves porque normalmente são irreversíveis e porque muitas vezes manifestam-se somente na idade adulta, dificultando o reconhecimento da origem do problema (NEUBERT e CHAHOUD, 1995; COOPER et al., 1999). Nessas fases, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central, que estão se diferenciando sob influência hormonal, podem ser atingidos por substâncias químicas presentes no sangue materno através da passagem pela placenta ou através do leite no período de lactação. Além disso, organismos em desenvolvimento são normalmente mais suscetíveis a ação de substâncias químicas em função da menor capacidade metabólica (detoxificação) e da ausência de muitos mecanismos de retroalimentação ("feedback") do sistema endócrino (US EPA, 1997).

A saúde reprodutiva masculina tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. Muitos estudos sugerem que o possível aumento na incidência de infertilidade, neoplasias testiculares e anormalidades estruturais do sistema reprodutivo masculino, como hipospadias e criptorquidismo, poderia estar relacionado com a crescente exposição a pesticidas e outros contaminantes químicos ambientais capazes

de interferir no sistema endócrino (COLBORN et al., 1993; SHARPE e SKAKKEBAEK, 1993; JENSEN et al., 1995; TOPPARI et al., 1996;). Esta hipótese tem sido amplamente discutida pelas agências regulatórias internacionais (US EPA, OECD, FDA), assim como pela comunidade científica de diversos países (DASTON et al, 1997; GRAY et al., 1997).

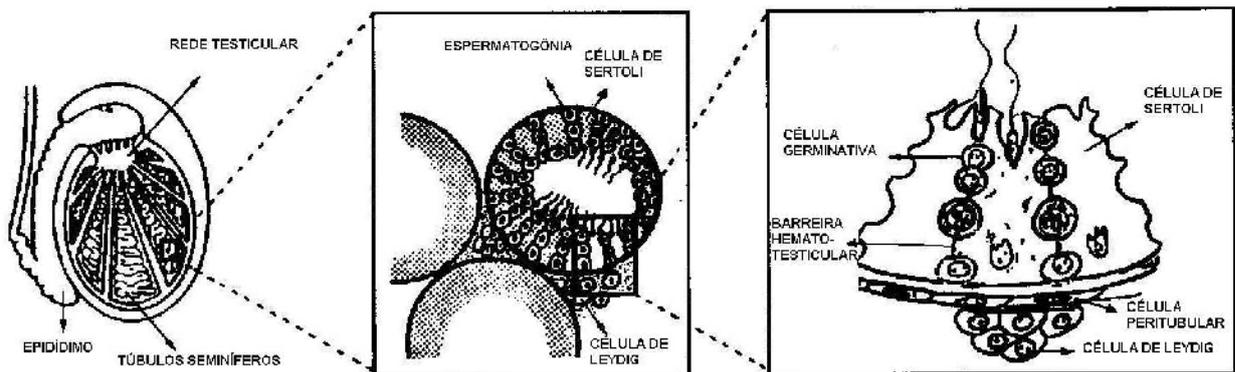
## 1.1 SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO

### 1.1.1 Anatomia funcional

O sistema reprodutivo masculino é constituído de diversos órgãos que atuam em conjunto para produzir espermatozóides e liberá-los no sistema reprodutivo da fêmea. Esse esforço conjunto envolve tanto o sistema neuroendócrino (hipotálamo e hipófise) quanto o genital, que é formado pelos testículos, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis. Na maioria dos mamíferos os testículos localizam-se fora da cavidade abdominal, suspensos numa bolsa músculo-cutânea (escroto). Cada testículo é envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso (túnica albugínea) e pela túnica vaginal. O testículo possui duas funções principais, a geração de gametas (função exócrina) e a produção de testosterona (função endócrina). A figura 1 ilustra esquematicamente a estrutura dos testículos. A maior parte do volume testicular é constituída por inúmeros túbulos enovelados (túbulos seminíferos), onde são formados os espermatozóides. Nesses túbulos localizam-se as células de Sertoli, que se estendem desde a membrana basal até a luz do túbulo e são responsáveis pela nutrição e sustentação das células germinativas. As células de Sertoli estão aderidas entre si por fortes junções de oclusão que dividem o túbulo seminífero em dois compartimentos: o compartimento basal que contém espermatogônias e espermatócitos primários; e o compartimento adluminal que contém células germinativas em estágios mais avançados da espermatogênese. Os complexos juncionais entre as células de Sertoli formam o principal componente da barreira hemato-testicular, que tem por função impedir que muitos compostos encontrados no sangue e no líquido intersticial entrem no compartimento adluminal.

Entre os túbulos seminíferos (espaço intersticial) localizam-se as células de Leydig que produzem os hormônios androgênicos responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias e pela manutenção da espermatogênese (ASHDOWN e HANCOCK, 1988; FOSTER, 1988; BRINSKO, 1999).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO TESTÍCULO

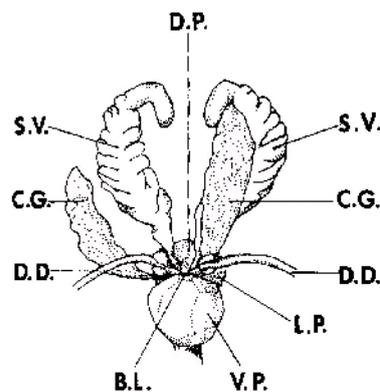


FONTE: ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: MELLO AIRES, M. de. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 878.

Um sistema de ductos genitais, formado pelos ductos eferentes, epidídimos, ductos deferentes e ducto ejaculatório, conecta os testículos com a uretra. Associadas a esse sistema de ductos estão as glândulas sexuais acessórias, que em roedores são formadas pela próstata, vesícula seminal, glândulas coaguladoras e glândula prepucial (figura 2). Os túbulos seminíferos do testículo esvaziam seu conteúdo na rede testicular que subsequentemente transporta os espermatozóides e o líquido tubular para os ductos eferentes e o epidídimo. Este é um ducto único altamente enovelado que pode ser dividido anatomicamente em três segmentos: cabeça ou capuz, corpo e cauda. O epidídimo desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do espermatozóide funcional, proporcionando um ambiente adequado e alguns produtos moleculares necessários à sua maturação. Quando os espermatozóides são liberados pelos testículos, sua mobilidade é pequena e são incapazes de fertilizar o ovócito. Ao passarem pelo epidídimo, no entanto, adquirem motilidade e capacidade de fertilização. Essas alterações são acompanhadas por alterações na membrana celular, como a

ligação de glicoproteínas na superfície dos espermatozoides (EDDY, 1988; WHITE, 1988; ROSS e ROMRELL, 1993). Juntamente com os espermatozoides, o sêmen ejaculado é composto principalmente de secreções das glândulas acessórias que acrescentam volume, nutrientes, íons e numerosas substâncias cujas funções exatas são muitas vezes desconhecidas. A contribuição de cada glândula acessória para o ejaculado varia com a espécie e é responsável pela variação no volume e na característica do ejaculado (BRINSKO, 1999).

FIGURA 2 – GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS DE ROEDORES



FONTE: THOMAS, J. A. Toxic responses of the reproductive system. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology**. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 555.

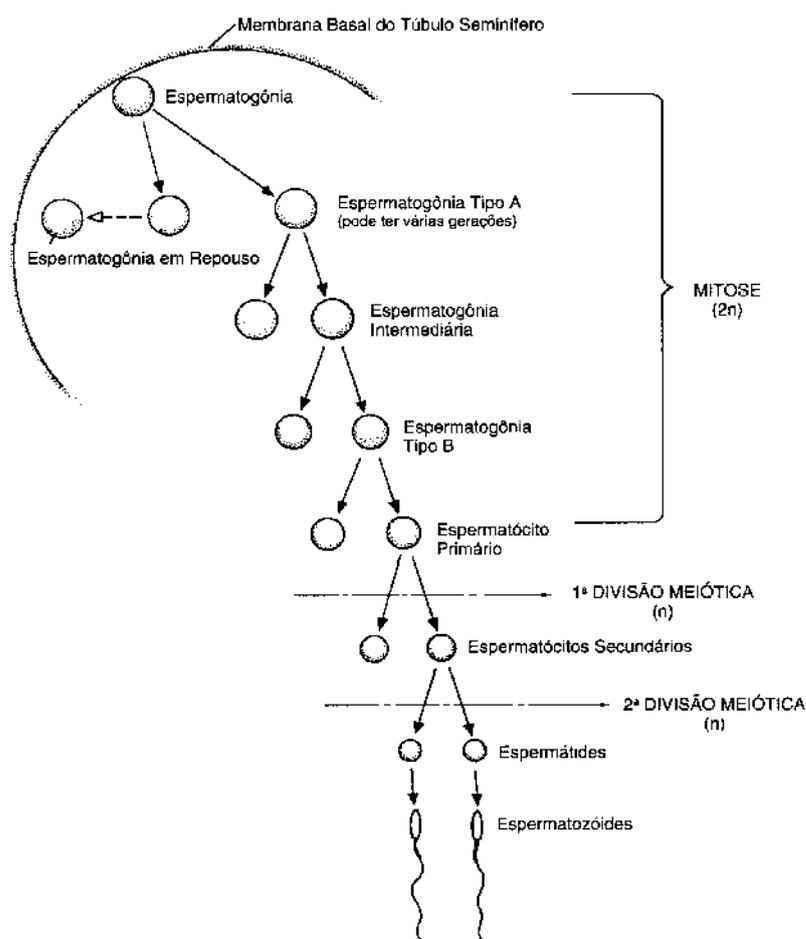
NOTAS: B.L., bexiga urinária; V.P., próstata ventral; L.P., próstata lateral; D.D., ducto deferente; C.G., glândula coaguladora; S.V., vesícula seminal; D.P., próstata dorsal.

### 1.1.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo dinâmico no qual células indiferenciadas diplóides (espermatogônias) dão origem a gametas haplóides altamente especializados (espermatozoides). Esse processo pode ser dividido em três eventos principais: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. A figura 3 ilustra esquematicamente esses processos. Na espermatocitogênese as espermatogônias primordiais (tipo A) sofrem proliferação contínua (divisões mitóticas) dando origem a outras células indiferenciadas para a manutenção de uma população constante de células primordiais. Uma fração dessas células, no entanto, transforma-se em espermatogônias do tipo B,

que se dividem por mitose para originar os espermatócitos primários que vão sofrer divisão meiótica. Na meiose I os cromossomos homólogos segregam-se e formam duas células haplóides com cromátides duplicadas (espermatócitos secundários). Essas células dividem-se para formar espermátides haplóides contendo uma única cromátide (meiose II). As espermátides recém formadas passam por um processo de diferenciação (espermiogênese) que envolve uma extensiva reorganização nuclear e citoplasmática de forma que as características comuns de células epiteliais são perdidas progressivamente até a diferenciação completa em espermatozóides (FOSTER, 1988; GARNER e HAFEZ, 1988; THOMAS, 1996; BRINSKO, 1999).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DA ESPERMATOGÊNESE



FONTE: BRINSKO, S. P. Fisiologia Reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 402.

### 1.1.3 Síntese de hormônios androgênicos

Os hormônios androgênicos, assim como os demais hormônios sexuais e adrenocorticais, são moléculas lipofílicas que contêm uma estrutura comum derivada do colesterol (hormônios esteroidais). Duas famílias de enzimas estão envolvidas na síntese desses hormônios: enzimas hidroxilases da família do citocromo P450; e as enzimas esteróide-desidrogenases. A biossíntese de um hormônio esteróide particular depende da presença de enzimas específicas nos tecidos produtores. O colesterol utilizado como precursor pode ser obtido por meio de sua síntese no interior da célula a partir de acetato; através de sua mobilização das reservas depositadas em gotículas intracelulares sob a forma de ésteres de colesterol; e a partir da captação de lipoproteínas plasmáticas (FOSTER, 1988; GRECO e STABENFELDT, 1999; ANTUNES-RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

A primeira etapa na síntese de hormônios esteróides envolve a clivagem da cadeia lateral do colesterol para formar a pregnenolona. Essa etapa ocorre nas cristas mitocondriais através da enzima 20,22 desmolase do sistema P450. As modificações subsequentes da molécula de esteróide ocorrem principalmente no retículo endoplasmático liso. A etapa limitante na síntese de esteróides parece envolver a mobilização de colesterol do citosol para as mitocôndrias através da proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR). Nos testículos, o principal hormônio sintetizado é a testosterona. Entretanto, outros compostos de menor atividade androgênica, como a desidroepiandrosterona, androstenediona e androstenodiol, também podem ser sintetizados (FOSTER, 1988; GRECO e STABENFELDT, 1999; ANTUNES-RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

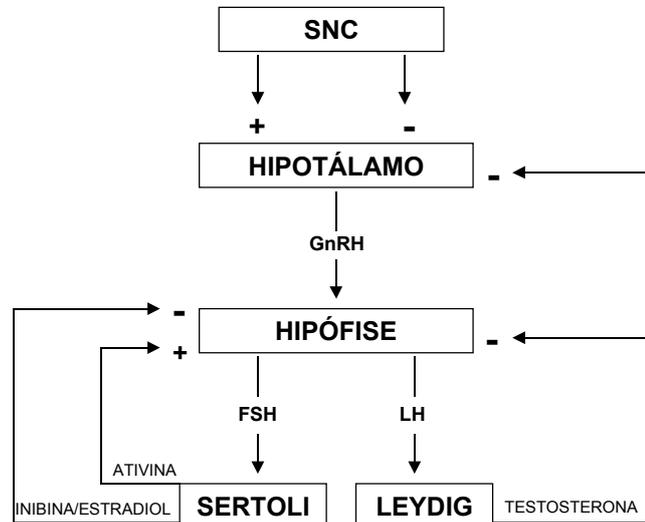
#### 1.1.4 Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas

O sistema reprodutivo dos mamíferos do sexo masculino é regulado pelo hipotálamo, que sintetiza e secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Liberado de modo pulsátil, o GnRH atua diretamente sobre a hipófise anterior estimulando a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). Dentro dos testículos o LH liga-se a receptores de membrana nas células de Leydig e estimula a síntese de testosterona a partir do colesterol. Altas concentrações de testosterona nos testículos são essenciais para a manutenção da espermatogênese. A proteína de ligação de androgênios (ABP), sintetizada pelas células de Sertoli, favorece o acúmulo de andrógenos nos túbulos seminíferos.

As células de Sertoli constituem o principal alvo para a ação do FSH. Juntamente com a testosterona o FSH estimula uma variedade de funções das células de Sertoli, incluindo a síntese e secreção da proteína de ligação de androgênios, a síntese de hormônios como a inibina, ativina, estradiol além de vários produtos envolvidos na nutrição das células germinativas, meiose, maturação de espermátócitos, liberação de espermatozoides na luz do túbulo seminífero (espermição) e função das células de Leydig. Estudos *in vitro* demonstraram que o FSH também pode alterar a forma e a morfologia das células de Sertoli (SHARPE, 1988; BRINSKO, 1999).

O controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas envolve uma série de mecanismos regulatórios (figura 4). Os hormônios esteróides gonadais regulam a síntese e a secreção de gonadotrofinas (FSH/LH) por retroalimentação negativa exercida tanto no hipotálamo quanto na hipófise. A inibina e a ativina são hormônios peptídicos sintetizados pelas células de Sertoli que podem, respectivamente, inibir e ativar a liberação de FSH pela hipófise, sem alterar a liberação de LH. Além disso, diversas influências neurais modulam a liberação de GnRH pelo hipotálamo (NEGRO-VILAR e VALENCA, 1988; US EPA, 1997; TERASAWA, 1998).

FIGURA 4 – EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO



FONTE: ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: MELLO AIRES, M. de. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. P. 878.

### 1.1.5 Diferenciação sexual masculina

A diferenciação sexual é um processo seqüencial que se inicia com o estabelecimento do sexo genético durante a fertilização, seguida pelo desenvolvimento do sexo gonadal e culmina com a diferenciação fenotípica. A gônada indiferenciada desenvolve-se em testículo pela influência do produto do gene SRY, localizado no braço curto do cromossomo sexual masculino. As células de Sertoli no testículo recém diferenciado produzem o fator inibidor mülleriano que promove a regressão dos ductos müllerianos que dariam origem aos ovidutos, útero e porção superior da vagina. Nesse estágio, as células de Sertoli também regulam o desenvolvimento das células de Leydig, que secretam testosterona para promover a diferenciação dos ductos de Wolff que dão origem ao epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente. A masculinização da genitália externa também é controlada pelos andrógenos e ocorre após a conversão da testosterona em  $5\alpha$ -dihidrotestosterona pela ação da enzima  $5\alpha$ -redutase nos tecidos alvos (US EPA, 1997; THOMAS, 1996; TOPPARI et al., 1996; DAVIDSON e STABENFELDT, 1999). A organização final do indivíduo em relação ao sexo vem com a

diferenciação do sistema nervoso central (SNC). A exposição a andrógenos nas proximidades do nascimento promove a masculinização do cérebro. Paradoxalmente, esse processo de masculinização depende da conversão de testosterona em estrógenos pela enzima aromatase no tecido nervoso (DAVIDSON e STABENFELDT, 1999). Em ratos, o período crítico para a diferenciação do SNC ocorre aproximadamente entre o 18º dia de gestação e o 7º – 10º dia pós-natal (McCARTHY et al., 1997). As modificações mediadas nesse período vão ser responsáveis pelo dimorfismo nas respostas comportamentais e fisiológicas aos hormônios sexuais na idade adulta. Muitas regiões do cérebro demonstram, além do dimorfismo funcional, diferenças significativas de volume. A região pré-óptica medial do hipotálamo, por exemplo, contém o núcleo sexual dimórfico (SDN), que em ratos é cerca de sete vezes maior nos machos em relação às fêmeas. Essa diferença está estritamente relacionada à exposição hormonal durante a fase crítica de diferenciação sexual (McCARTHY et al., 1997).

## 1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Agentes químicos capazes de interferir no sistema endócrino são chamados genericamente de “desreguladores endócrinos”. Essas substâncias podem atuar através de uma grande variedade de mecanismos. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) define os desreguladores endócrinos como agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (US EPA, 1997).

A diferenciação e o desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino são eventos particularmente sensíveis a substâncias que interferem na ação ou produção de hormônios sexuais (US EPA, 1996). Dados baseados em estudos animais indicam que alterações do desenvolvimento sexual podem resultar da exposição a pesticidas e contaminantes químicos ambientais capazes de mimetizar ou antagonizar hormônios naturais ou interferir com os mecanismos que regulam a disponibilidade desses

hormônios (GRAY, 1998a; BAKER, 2001). A interferência com a produção ou ação de hormônios androgênicos pode ocasionar diversos prejuízos no desenvolvimento do trato reprodutivo masculino. Compostos que se ligam aos receptores androgênicos sem ativá-los (antiandrógenos) podem causar efeitos similares aos observados em indivíduos que apresentam receptores androgênicos defeituosos (US EPA, 1997). Diversos contaminantes químicos ambientais como os fungicidas vinclozolin e procimidona, e o plastificante di(etil) hexil ftalato (DEHP), já foram identificados como antiandrógenos (GRAY et al., 1999; OTSBY et al., 1999; SANTANA et al., 2001). GRAY e colaboradores (1999) demonstraram que a administração de baixas doses de vinclozolin, durante o período de diferenciação sexual de ratos, pode provocar diversas alterações no trato reprodutivo masculino, como agenesia da próstata, redução da distância ano-genital, retenção de mamilos e redução na produção espermática. MABLY e colaboradores (1992) demonstraram que a exposição *in utero* e lactacional de ratos a baixas doses de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), pode alterar diversos parâmetros reprodutivos dependentes de andrógenos. Os descendentes masculinos expostos à TCDD apresentaram redução na distância ano genital, retardo na descida dos testículos à bolsa escrotal e redução do peso absoluto e relativo das glândulas sexuais acessórias. As dioxinas são substâncias químicas que ocorrem em baixas concentrações no meio ambiente, mas que podem causar diversos efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal. São formadas durante a combustão de lixo industrial ou doméstico, como produtos secundários na síntese de hidrocarbonetos ou durante a utilização de combustíveis contendo aditivos clorados (FOSTER, 1995).

Diversos estudos também têm relacionado a ocorrência de anormalidades no sistema reprodutivo masculino com a exposição pré e perinatal a compostos com atividade estrogênica (JENSEN et al., 1995; TOPPARI et al., 1996; DASTON et al., 1997). Esses compostos podem alterar o desenvolvimento reprodutivo masculino através da supressão da síntese e secreção do hormônio folículo estimulante (FSH), principal estímulo para a multiplicação das células de Sertoli (TOPPARI et al., 1996; SWEENEY et al., 2000). Em ratos, as células de Sertoli começam a se dividir no período final da gestação e param repentinamente o processo mitótico por volta do 18º

dia pós-natal, constituindo uma população fixa de células que dão suporte físico e bioquímico às células germinativas na idade adulta (ORTH, 1982). A redução do número de células de Sertoli formadas no período pré e perinatal pode, portanto, reduzir o tamanho testicular e a produção espermática na idade adulta. Acredita-se, ainda, que as substâncias estrogênicas possam inibir a multiplicação de células de Leydig e conseqüentemente reduzir a produção de testosterona (JENSEN et al., 1995).

Estudos bem documentados mostram que a exposição de diversas espécies animais a um ou mais compostos químicos estrogênicos é capaz de induzir uma gama de efeitos adversos como hermafroditismo, redução no tamanho dos testículos e comprometimento da função das células de Leydig (SHARPE, 1994). Talvez o exemplo mais bem documentado de efeitos ecológicos causados pela interferência na função endócrina tenha ocorrido com os crocodilos do Lago Apopka na Flórida, Estados Unidos (US EPA, 1997). Investigações indicam que o vazamento de uma mistura dos pesticidas diclorodifeniltricloroetano (DDT) e diclorodifenildicloroetileno (DDE), em 1980, foi responsável por uma variedade de efeitos adversos como a “desmasculinização” de crocodilos machos e “superfeminilização” de fêmeas. Outros efeitos incluíram prejuízos na capacidade de chocar ovos e nos níveis populacionais (US EPA, 1997).

O DDT é um pesticida organoclorado que apresenta atividade estrogênica e que foi amplamente utilizado após a 2ª guerra mundial (ECOBICHON, 1996). Embora seu uso seja atualmente proibido na maior parte dos países, o DDT ainda causa preocupação em função de sua alta persistência no meio ambiente e possibilidade de bioacumulação (SHARPE, 1994). Além disso, seu principal metabólito, o DDE, apresenta atividade antiandrogênica e pode contribuir na indução de efeitos adversos (KELCE, 1995; KELCE et al., 1997). DALSENTER e colaboradores (1999) demonstraram que exposição *in utero* e lactacional de ratos ao pesticida organoclorado endossulfano, reduz a produção espermática dos descendentes masculinos avaliados na puberdade e na idade adulta. Estudos *in vitro* demonstraram que o endossulfano, assim como o DDT, apresenta atividade estrogênica (SONNENSCHNEIN e SOTO, 1998). Os pesticidas piretróides sintéticos como a deltametrina também têm sido apontados como possíveis desreguladores endócrinos (US EPA, 1997). MONIZ e colaboradores (1999)

demonstraram que a exposição de ratas ao piretróide sintético fenvalerato (10 mg/kg/dia ip), no 18<sup>o</sup> dia de gestação e do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de lactação, foi capaz de reduzir significativamente a concentração plasmática de testosterona e o peso da vesícula seminal nos descendentes masculinos adultos. Também foram observadas alterações no comportamento sexual desses animais.

Em humanos, a exposição ao dietilelbestrol (DES) é o principal exemplo do potencial deletério de substâncias desreguladoras endócrinas sobre o sistema reprodutivo (SHARPE, 1994; GRAY, 1998a). Essa substância estrogênica foi utilizada terapeuticamente por mais de 5 milhões de mulheres grávidas entre o final da década de 40 e o início da década de 70 para prevenir abortos e complicações da gravidez (TOPPARI et al., 1996; DASTON et al., 1997). Seu uso foi abandonado depois de constatada a alta incidência de um raro tipo de câncer endocervical em adolescentes expostas *in utero*. Posteriormente também foram detectados elevados índices de anormalidades reprodutivas, incluindo baixa contagem de espermatozoides, nos descendentes masculinos expostos (TOPPARI et al., 1996; JENSEN et al., 1995). Embora existam evidências claras dos efeitos adversos decorrentes da exposição ao DES em humanos, na maior parte dos casos não é possível estabelecer uma ligação causal entre a exposição a um contaminante químico ambiental específico e efeitos adversos sobre a saúde reprodutiva humana (SHARPE, 1994; BAKER, 2001).

### 1.3 TESTES EM TOXICOLOGIA REPRODUTIVA

Após o trágico incidente ocorrido com a talidomida entre o final da década de 50 e início da década de 60, as agências regulatórias internacionais passaram a estabelecer protocolos para os estudos de toxicologia reprodutiva e de desenvolvimento. Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) estabeleceu três protocolos de estudos (THOMAS, 1996; GRAY et al., 1997):

- a) Segmento I: toxicidade crônica; avalia os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas tratados antes e durante os acasalamentos e durante a prenhez e a lactação (fêmeas);
- b) Segmento II: toxicidade pré-natal; avalia as alterações do desenvolvimento das progênes expostas durante a fase de organogênese (teratogenia). Normalmente são utilizadas duas ou mais espécies animais (rato, coelho e primatas). As progenitoras são sacrificadas no final da prenhez e os fetos avaliados quanto a alterações externas, viscerais e esqueléticas;
- c) Segmento III: toxicidade peri e pós-natal; avalia os efeitos sobre o desenvolvimento pós-natal de progênes expostas durante o desenvolvimento fetal (fase final da prenhez) e a lactação.

Os descendentes expostos durante a gestação e a lactação (segmentos I e III) podem ser avaliados quanto à função reprodutiva na idade adulta. Essa avaliação não se limita aos testes de fertilidade (acasalamentos), mas envolve diversos parâmetros reprodutivos como o peso e análise histológica de órgãos sexuais, avaliações espermáticas e comportamento sexual (NEUBERT e CHAHOUD, 1995; US EPA, 1996).

Além disso, diversas modificações e protocolos novos têm sido propostos. Nos testes de múltiplas gerações ocorre a exposição de machos e fêmeas (F0) antes e durante o acasalamento, e das fêmeas durante a gestação e a lactação. A geração F1 continua a ser exposta do desmame até a idade adulta. Machos e fêmeas F1 são acasalados, sendo que a exposição das fêmeas continua durante a gestação e a lactação. A geração F2, assim como ocorreu com F1, continua sendo exposta após o desmame. No caso de uma terceira geração ocorre o mesmo esquema de exposição das gerações F1 e F2. Diversos parâmetros reprodutivos e de desenvolvimento são avaliados nas diferentes gerações. Esses estudos permitem avaliar os efeitos da exposição no adulto (F0) bem como nas gerações expostas durante todos os estágios de desenvolvimento, desde o útero até a idade adulta. A exposição nesses testes pode ser feita através da ração, da água ou por intubação gástrica (COLLINS et al., 1999; KIMMEL e MAKRIS, 2001).

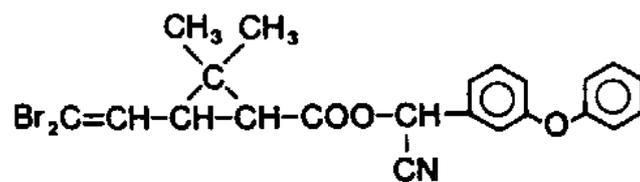
Roedores e coelhos são os animais mais adequados para os estudos de toxicologia reprodutiva (AMANN, 1982). O curto período de gestação e a facilidade de criação e manutenção nas condições de laboratório favorecem o uso desses animais. Entre os roedores, os ratos são preferencialmente utilizados em função do seu tamanho adequado, processos reprodutivos bem estabelecidos e uso geral em estudos toxicológicos. Os coelhos são utilizados como segunda espécie e apresentam algumas vantagens como a possibilidade de coleta de sêmen ejaculado (AMANN, 1982; ZENICK e CLEGG, 1989; COLLINS et al., 1999).

As agências regulatórias internacionais também vêm desenvolvendo protocolos para a detecção de substâncias que interferem no sistema endócrino. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) estabeleceu um comitê para o desenvolvimento de um programa de triagem e teste de substâncias desreguladoras endócrinas (EDSTAC, 1998). No seu relatório final, o comitê recomenda a realização de baterias de triagem, que têm a função de detectar substâncias ou misturas com potencial de interferir no sistema endócrino, e baterias de teste, que devem avaliar os riscos associados à exposição a essas substâncias (EDSTAC, 1998; GRAY, 1998b). As baterias de triagem contêm diversos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Os ensaios *in vitro* são particularmente adequados para a detecção de substâncias que atuam diretamente nos receptores hormonais, mas não levam em consideração os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos que ocorrem no organismo intacto. Os ensaios *in vivo*, por outro lado, podem detectar substâncias que atuam por mecanismos não diretamente relacionados aos receptores, como a interferência na síntese, metabolismo e liberação dos hormônios. O teste uterotrófico e o teste de Hershberger são os dois principais ensaios *in vivo* de curta duração utilizados na triagem de substâncias desreguladoras endócrinas (EDSTAC, 1998; BAKER, 2001).

#### 1.4 DELTAMETRINA

A deltametrina – (S)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil (1R, 3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato - é um pesticida piretróide sintético do tipo II ( $\alpha$  ciano substituído) sintetizado em 1974 e comercializado a partir de 1977 (figura 5). Apresenta-se sob a forma de um pó branco cristalino e inodoro com ponto de fusão entre 98 – 101°C. É praticamente insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como o xilol, a acetona e o etanol. Apresenta uma boa estabilidade química resistindo a degradação pelo calor, luz e ar atmosférico (IPCS, 1990; BARLOW et al., 2001).

FIGURA 5 – ESTRUTURA DA DELTAMETRINA



Os piretróides sintéticos foram produzidos a partir de modificações químicas na estrutura das piretrinas naturais encontradas nos extratos das flores secas do piretro e do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* e *C. cocineum*). A partir de 1960 diversos análogos estruturais foram sintetizados com o objetivo de melhorar as propriedades físicas e químicas e aumentar a atividade biológica desses compostos (IPCS, 1990). Baseados na estrutura química e nos sinais e sintomas de toxicidade em animais, os piretróides sintéticos podem ser divididos em duas classes: piretróides do tipo I e II. Em ratos, os compostos do tipo I provocam um quadro de agressividade, prostração, incordenação e tremores que é conhecido como “Síndrome T” (tremores). Esses compostos compartilham na sua estrutura química a ausência do substituinte  $\alpha$  ciano-3-fenoxibenzil (IPCS, 1990; ECOBICHON, 1996). Os piretróides da classe II, que contém o grupamento  $\alpha$  ciano substituído, provocam movimentos irregulares dos

membros, contorções, salivação profusa e convulsões que caracterizam a “Síndrome CS” (coreoatetose e salivação). Quanto ao mecanismo de ação, os piretróides atuam principalmente na membrana das fibras nervosas prolongando a abertura dos canais de sódio. Os piretróides do tipo I provocam apenas um aumento transitório na permeabilidade ao sódio resultando em descargas neuronais repetitivas. Os piretróides do tipo II promovem um prolongamento ainda maior da abertura dos canais de sódio levando a despolarização da membrana e bloqueio da condução nervosa em axônios sensoriais e motores e provocando disparos repetitivos em fibras musculares (IPCS, 1990; ECOBICHON, 1996; BARLOW et al., 2001). Além de seus efeitos sobre os canais de sódio os piretróides da classe II também podem atuar através de outros mecanismos como a inibição da  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ATPase, aumentando os níveis intracelulares de cálcio e a liberação de neurotransmissores, e a ação inibitória sobre os receptores do ácido gama-aminobutírico (IPCS, 1990; ECOBICHON, 1996; CLARK, 1997; FORSHAW et al., 2000).

Inicialmente os piretróides foram utilizados principalmente no controle de insetos domésticos. Mais recentemente muitos deles passaram a ser usados como inseticidas na agricultura em função de sua excelente atividade contra um amplo espectro de insetos, sua limitada persistência no meio ambiente e baixa toxicidade para mamíferos (ANADÓN et al., 1996; IPCS, 1990). A deltametrina é um dos principais piretróides em uso, sendo amplamente utilizada no combate de pragas de diversas culturas como algodão, soja, café, milho, trigo, hortaliças, frutas e em produtos armazenados. Também é empregada no controle de vetores de doenças na saúde pública e no combate a ectoparasitas na veterinária (IPCS, 1990; SHEETS et al., 1994). A organização mundial da saúde classifica a deltametrina como um produto moderadamente tóxico (IPCS, 1990). Quando administrada pela via oral é rapidamente absorvida, sendo que a taxa de absorção depende do veículo administrado. Formulações em pó ou suspensões aquosas são significativamente menos tóxicas que formulações oleosas ou que contenham solventes orgânicos, em função da menor absorção (IPCS, 1990). Uma vez absorvida a deltametrina é rapidamente metabolizada e excretada. As principais vias de metabolização envolvem reações de oxidação por

enzimas microssomais hepáticas, clivagem da ligação éster por esterases teciduais e a conversão da porção ciano em tiocianatos. Os ácidos carboxílicos e fenóis resultantes são conjugados com sulfatos, glicina e ácido glicurônico (IPCS, 1990; BARLOW et al., 2001). Após a administração oral de deltametrina marcada radioativamente ( $^{14}\text{C}$ ) em ratos machos (0,64 - 1,60 mg/kg), as porções ácido e álcool da molécula foram completamente eliminadas em dois a quatro dias, enquanto que a porção ciano foi eliminada mais lentamente com uma recuperação de 79% em oito dias. As concentrações residuais nos tecidos foram, em geral, muito baixas, com exceção do tecido adiposo onde foram ligeiramente mais elevadas (RUZO et al.<sup>1</sup>, citado por IPCS, 1990, p. 41). Embora sejam considerados inseticidas não persistentes, os piretróides sintéticos apresentam uma alta solubilidade em lipídios e podem ser transferidos para os lactentes através do leite (KAVLOCK et al.<sup>2</sup>, citado por TALTS et al., 1998, p. 545). Em humanos, as poucas evidências existentes sugerem que as vias metabólicas envolvidas na degradação da deltametrina são similares às vias utilizadas por roedores. A absorção, distribuição e excreção da deltametrina em humanos foram estudadas em três voluntários que receberam uma única dose de 3,0 mg de deltametrina marcada radioativamente com  $^{14}\text{C}$ . As concentrações plasmáticas máximas foram atingidas 1 - 2 horas após a administração e a meia vida plasmática aparente foi de 10 - 11,5 horas (IPCS, 1990).

Em um estudo com ratos machos adultos EL-AZIZ e colaboradores (1994) demonstraram que a administração oral de 1,0 e 2,0 mg de deltametrina/kg, durante 65 dias consecutivos, foi capaz de produzir efeitos adversos em diversos parâmetros reprodutivos, incluindo alterações no peso dos testículos e glândulas sexuais acessórias e redução do número de espermatozóides e dos níveis séricos de testosterona. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos aponta os pesticidas piretróides sintéticos como possíveis desreguladores endócrinos (US EPA,

---

<sup>1</sup> RUZO, L. O.; UNAI, T.; CASIDA, J. E. Dexamethrin metabolism in rats. **Journal of agriculture food and chemistry**, v. 26, p. 918-925, 1978.

<sup>2</sup> KAVLOCK, R. et al. Toxicity studies with dexamethrin, a synthetic pyrethroid pesticide. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v. 2, p. 751-765, 1979.

1997). Recentemente, GO e colaboradores (1999) demonstraram que alguns compostos piretróides como a sumitrina, o fenvalerato e a aletrina possuem propriedades estrogênicas *in vitro*. Além disso, SHEETS e colaboradores (1994) demonstraram uma diferença, idade dependente, na suscetibilidade de ratos à deltametrina. Ratos com 11 e 21 dias de idade foram, respectivamente, 16 e 7 vezes mais sensíveis à deltametrina em relação a animais adultos avaliados através do teste de dose letal 50% (DL<sub>50</sub>). Nesse estudo a insuficiência metabólica é apontada como o mecanismo mais provável para a maior suscetibilidade de animais imaturos à deltametrina (SHEETS et al., 1994).

Até o presente momento, no entanto, poucos estudos foram realizados na investigação dos efeitos reprodutivos de pesticidas piretróides sintéticos em indivíduos expostos durante fases críticas do desenvolvimento sexual (BARLOW et al., 2001). O propósito do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos adversos da deltametrina sobre o sistema reprodutivo de ratos machos púberes e adultos expostos *in utero* e durante a lactação. Diversos parâmetros reprodutivos bem estabelecidos e validados foram utilizados na avaliação dos efeitos da deltametrina, uma vez que os testes toxicológicos que se limitam às avaliações de fertilidade podem ser insuficientes para detectar prejuízos reprodutivos nas espécies animais usualmente utilizadas em toxicologia reprodutiva (NEUBERT e CHAHOUD, 1995). Além disso, foram realizados dois testes *in vivo* de curta duração para avaliar os possíveis efeitos (anti)estrogênicos e (anti)androgênicos desse pesticida.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos adversos da deltametrina sobre o sistema reprodutivo de ratos machos púberes e adultos expostos *in utero* e durante a lactação, fases consideradas críticas para o desenvolvimento do sistema reprodutivo.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Avaliação dos efeitos da deltametrina sobre a prenhez.
- Avaliação de parâmetros gerais e sexuais do desenvolvimento dos descendentes expostos.
- Investigação de parâmetros reprodutivos nos descendentes masculinos em dois períodos: puberdade e idade adulta.
- Avaliação da fertilidade e do comportamento sexual dos descendentes masculinos na idade adulta.
- Investigação dos possíveis efeitos (anti)estrogênicos e (anti)androgênicos da deltametrina através dos testes uterotrófico e de Hershberger, respectivamente.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos, *Rattus norvegicus* variedade Wistar, criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em salas com temperatura constante (20–24°C), obedecendo a uma fase claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 horas) e recebendo água e ração comercial Nuvilab CR-1 (Nuvital, Colombo/PR) *ad libitum*.

### 2.2 ACASALAMENTOS

Ratas Wistar (n=60) foram acasaladas com ratos machos adultos durante a fase escura do ciclo de luz (12 horas), na proporção de um macho para três fêmeas. Esfregaços vaginais diários, de cada fêmea, foram obtidos entre oito e nove horas da manhã para verificar a presença de espermatozoides e confirmar a cópula, sendo que o dia de detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado como dia zero da gestação (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977). Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos. As fêmeas prenhes foram mantidas em caixas coletivas de polipropileno (414 x 344 x 168 mm) até o 18º dia de gestação (seis ratas por caixa), quando foram separadas individualmente. O dia do parto foi designado como 1º dia pós-natal, e os filhotes desmamados no 21º dia de lactação.

### 2.3 DOSES E TRATAMENTO

Para o tratamento foi utilizada a deltametrina técnica – (S)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil (1R, 3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato - com 98,8% de pureza, fornecida pela Aventis CropScience Brasil Ltda (São Paulo/SP). O pesticida foi dissolvido diariamente em óleo de canola (veículo), uma hora antes da administração aos animais.

As fêmeas prenhes obtidas durante os acasalamentos foram randomicamente separadas em quatro grupos (10 - 12/grupo). Um grupo foi tratado apenas com o veículo e utilizado como controle. Os outros três grupos foram tratados com três diferentes doses de deltametrina: 1,0; 2,0; e 4,0 mg/kg de peso corporal. Os tratamentos foram realizados diariamente por via oral (gavage) do 1º dia de gestação ao 21º dia de lactação (desmame), utilizando um volume de administração igual a 5,0 mL/kg. As doses utilizadas foram baseadas na NOEL-dose (No Observed Effect Level) materna e de desenvolvimento, ou seja, a maior dose de deltametrina que não causa toxicidade materna e não afeta o desenvolvimento geral dos filhotes. Diferenças nos períodos de tratamento, linhagens de ratos e parâmetros de avaliação utilizados em diferentes estudos, dificultam o estabelecimento claro da NOEL-dose de uma substância. Para a deltametrina a NOEL-dose materna e de desenvolvimento varia de 1,0 a 3,3 mg/kg/dia (ICPS, 1990; US EPA, 2000; BARLOW et al, 2001).

#### 2.4 DADOS DA PRENHEZ

As progenitoras foram avaliadas quanto ao ganho de peso durante a gestação e a lactação, tempo da gestação e tamanho das ninhadas. O ganho de peso na gestação e lactação foi registrado percentualmente em relação ao peso do 1º dia de gestação e lactação, respectivamente. No 21º dia da lactação (desmame) as progenitoras foram sacrificadas por decapitação e o útero retirado para a contagem do número de implantes uterinos. A visualização dos pontos de implantação foi realizada diretamente após a remoção da gordura e vasos adjacentes aos cornos uterinos. Além disso, foram determinados as perdas pós-implantes, a razão sexual e os índices de parto, nascimento, viabilidade e desmame (US EPA, 1996):

- a) Perdas pós-implantes =  $\frac{n^{\circ} \text{ de implantes} - n^{\circ} \text{ de filhotes nascidos vivos}}{n^{\circ} \text{ de implantes}} \times 100$ .
- b) Razão sexual =  $\frac{n^{\circ} \text{ de filhotes machos}}{n^{\circ} \text{ de filhotes fêmeas}}$ .
- c) Índice de parto =  $\frac{n^{\circ} \text{ de fêmeas que pariram}}{n^{\circ} \text{ de fêmeas com espermatozoides no esfregaço vaginal}} \times 100$ .

- d) Índice de nascimento:  $n^{\circ}$  de filhotes nascidos vivos/ $n^{\circ}$  de filhotes nascidos x 100;
- e) Índice de viabilidade:  $n^{\circ}$  de filhotes vivos no 4<sup>o</sup> dia pós-natal/ $n^{\circ}$  de filhotes nascidos vivos x 100;
- f) Índice de desmame:  $n^{\circ}$  de filhotes vivos no desmame/ $n^{\circ}$  de filhotes nascidos vivos x 100.

## 2.5 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES

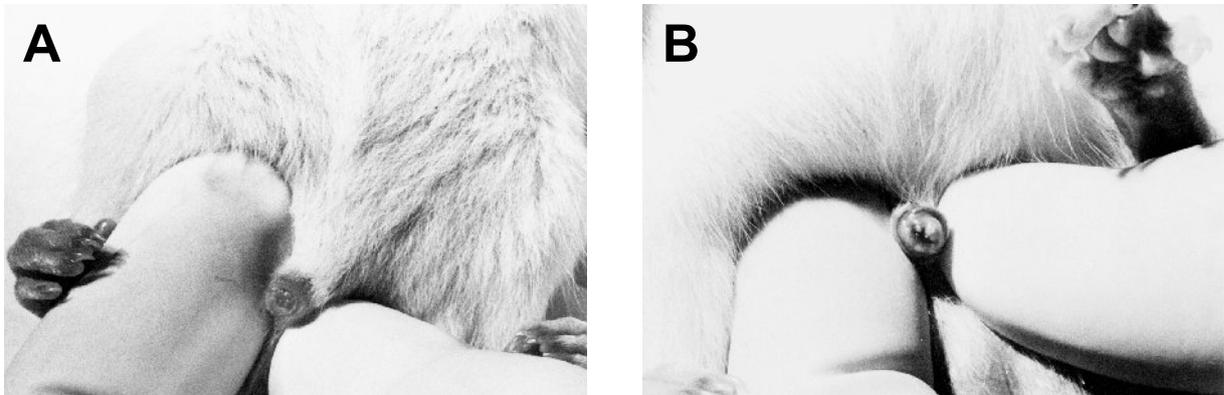
### 2.5.1 Parâmetros gerais do desenvolvimento

Foram determinados os pesos dos filhotes ao nascer e ao desmame e parâmetros gerais de desenvolvimento: período (dia) para descolamento bilateral dos pavilhões auriculares, surgimento de pêlos e abertura bilateral dos olhos. Essas variáveis foram investigadas em todos os filhotes (machos e fêmeas).

### 2.5.2 Parâmetros do desenvolvimento sexual masculino

Os descendentes masculinos foram avaliados quanto ao período (dia) para a descida dos testículos à bolsa escrotal e para a separação prepucial. O momento da descida dos testículos a bolsa escrotal foi investigado através da palpação diária da bolsa escrotal a partir do 15<sup>o</sup> dia pós-natal e subseqüentemente até que todos os descendentes apresentassem essa característica. A separação prepucial foi investigada diariamente a partir do 33<sup>o</sup> dia pós-natal, através da retração manual do prepúcio (figura 6), até que a separação prepucial estivesse completa em todos os descendentes.

FIGURA 6 – SEPARAÇÃO PREPUCIAL EM RATOS



NOTA: (A) separação prepucial incompleta; (B) separação prepucial completa.

### 2.5.3 Avaliação reprodutiva dos descendentes masculinos na puberdade e idade adulta

Após a investigação dos parâmetros de desenvolvimento sexual (descida dos testículos e separação prepucial), dois a quatro descendentes masculinos de cada ninhada foram randomicamente separados para a avaliação reprodutiva em dois períodos: puberdade (65 - 70 dias) e idade adulta (150 - 180 dias). Em cada um desses períodos, 16 animais de cada grupo foram sacrificados e avaliados quanto aos seguintes parâmetros: peso absoluto e relativo dos testículos, epidídimos, glândulas sexuais acessórias (próstata e vesícula seminal), fígado e rins; produção espermática diária; contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo; tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo; morfologia espermática; produção hormonal (testosterona); e avaliação histológica dos testículos.

Antes de serem sacrificados, os animais adultos foram avaliados quanto à fertilidade e comportamento sexual. No estudo da fertilidade os descendentes adultos (120 dias) foram acasalados com fêmeas não expostas ao pesticida. Uma semana após estes testes os mesmos animais foram submetidos à avaliação do comportamento sexual, sendo que o sacrifício para a investigação dos parâmetros reprodutivos nesses animais somente foi realizado sete dias após a avaliação comportamental para permitir o restabelecimento das reservas espermáticas na cauda do epidídimo (AMANN, 1982).

### 2.5.3.1 Determinação do peso absoluto e relativo de órgãos

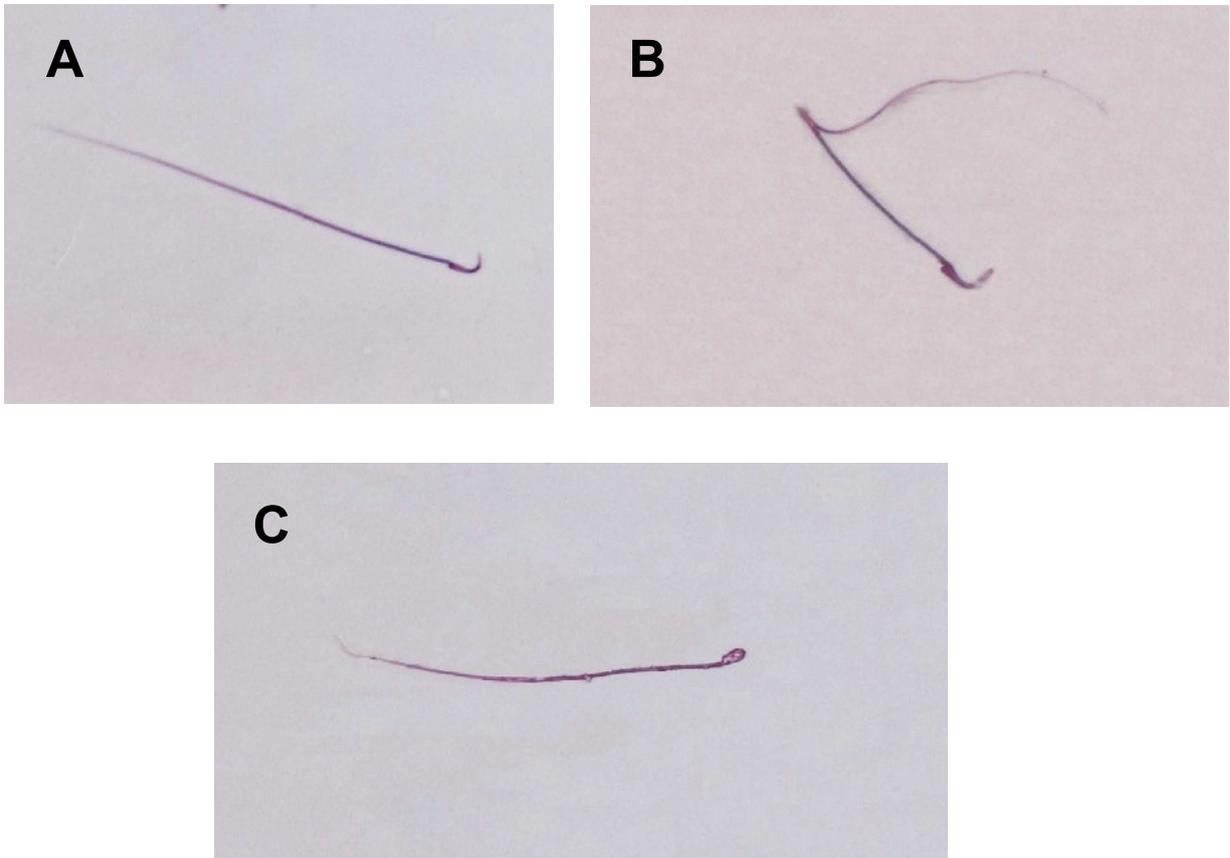
Foram determinados os pesos absolutos e relativos (peso do órgão/peso corporal x 100) dos testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal (com glândulas coaguladoras), fígado e rins. Para órgãos pares (testículos, epidídimos e rins) foi utilizada média entre os lados esquerdo e direito. A retirada e pesagem dos órgãos (balança analítica Gehaka BG 440, São Paulo/SP) foi realizada logo após o sacrifício dos animais por decapitação. A próstata foi pesada juntamente com a cápsula prostática enquanto a pesagem da vesícula seminal foi realizada após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem.

### 2.5.3.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático

Após a remoção da túnica albugínea, cada testículo foi homogeneizado em 10 mL de cloreto de sódio 0,9% (salina) contendo 0,5% de Triton X-100 em homogeneizador de tecidos (FISATOM 720) por 1 minuto. O homogeneizado foi diluído 10 vezes em salina para a contagem microscópica do número de espermátides resistentes a homogeneização (espermátides nos estágios 17 a 19), em câmara hemocitométrica (Bürker, Alemanha). O número de espermátides por animal, obtido pela soma das contagens do testículo esquerdo e direito, foi dividido por 6,1 dias para a conversão em produção espermática diária. Esse divisor (6,1) corresponde ao número de dias do epitélio seminífero em que as espermátides nos estágios 17 a 19 estão presentes (ROBB, 1978). Nos animais em que um dos testículos foi utilizado para a histologia testicular (seis animais/grupo), o número de espermátides contadas foi multiplicado por dois para estimar o número de espermátides por animal. Para a contagem do número de espermatozóides, as caudas dos epidídimos foram cortadas em pequenos pedaços, homogeneizadas e processadas da mesma forma que os testículos (figura 7). O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo foi obtido através divisão do número de espermatozóides pela produção espermática diária (AMANN, 1976).



FIGURA 8 – MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE RATOS



NOTAS: (A) espermatozóide normal; (B) espermatozóide com defeito de cauda (cauda quebrada); (C) espermatozóide com defeito de cabeça (cabeça arredondada).  
 Espermatozóides obtidos pela lavagem da luz do ducto deferente com salina, corados com eosina 2% (aumento 400x).

#### 2.5.3.4 Níveis de testosterona

Para a determinação dos níveis plasmáticos de testosterona, o sangue dos animais foi coletado por decapitação entre sete e oito horas da manhã, utilizando heparina como anticoagulante. Após centrifugação, o plasma foi separado e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. A concentração de testosterona foi medida por radioimunoensaio de duplo anticorpo (Testosterone DA kit - ICN pharmaceuticals Inc., Estados Unidos). Cinquenta microlitros das amostras de plasma e dos padrões foram incubados com 250  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo testosterona marcada com iodo

radioativo ( $^{125}\text{I}$ ) e 250  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo anticorpos anti-testosterona (1<sup>o</sup> anticorpo). Após duas horas de incubação em banho-maria ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de uma solução precipitante, contendo um 2<sup>o</sup> anticorpo (anticorpo anti-imunoglobulina, que se liga ao 1<sup>o</sup> anticorpo), foram adicionados aos tubos de ensaio que foram incubados por mais uma hora ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Após a incubação todos os tubos foram centrifugados (1000 x g) durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contado em contador de radiação gama (ICN Isomedic<sup>TM</sup>, Estados Unidos). Todas as amostras e padrões foram analisados em duplicata, sendo os coeficientes de variação intraensaios (duplicatas) e interensaios (mesma amostra analisada em diferentes dias) menores que 10%.

O princípio desse ensaio baseia-se na competição entre a testosterona presente no plasma dos animais e a testosterona marcada com iodo radioativo, por um número limitado de anticorpos específicos. Após um processo de separação, que utiliza um segundo anticorpo e centrifugação, a quantidade de testosterona marcada que se ligou aos anticorpos específicos é determinada pela contagem da radiação gama emitida (inversamente proporcional à quantidade de testosterona presente no plasma dos animais). A concentração de testosterona na amostra é determinada através de uma curva de calibração obtida pelo processamento de padrões com concentrações conhecidas de testosterona.

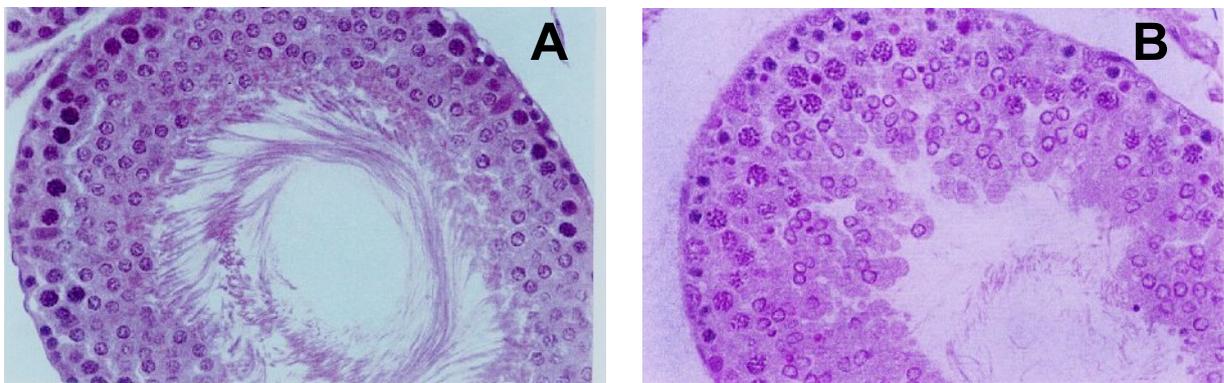
#### 2.5.3.5 Histologia testicular

Para a análise histológica dos testículos foram utilizados seis animais por grupo. Imediatamente após o sacrifício por decapitação um dos testículos foi retirado e, após a perfuração da túnica albugínea, fixado em solução de Bouin (ácido pícrico 77 mL; formol 20,5 mL; ácido acético glacial 2,5 mL) por seis horas. Transcorridas as duas primeiras horas de fixação, os testículos foram retirados da solução, seccionados transversalmente em cortes de aproximadamente 2,0 mm, e novamente colocados na solução de Bouin por mais quatro horas. Após a fixação os fragmentos foram mantidos em etanol 70%, e posteriormente desidratados com concentrações crescentes de

etanol e xilol: etanol 80% (1h30min); etanol 90% (1h30min); etanol 95% (1h30min); etanol absoluto (3 tempos de 30 min); xilol: etanol (1:1; 12h na geladeira); xilol absoluto (2 tempos de 20min e um tempo de 5 min). Após a desidratação as peças foram impregnadas em parafina (Histosec<sup>®</sup> - Merck, Alemanha) durante 3 horas a 56°C, e subseqüentemente emblocadas. Foram realizados cortes transversais de 3 µm de espessura (Micrótomo Leica RM 2145, Alemanha) que foram corados com hematoxilina/eosina para posterior análise histológica (BEÇAK e PAULETE, 1976).

Em cada testículo foi realizada a medida do diâmetro dos túbulos seminíferos (menor diâmetro) em 20 secções transversais de túbulos escolhidas ao acaso e apresentando contorno o mais circular possível. As medidas foram feitas com o auxílio de ocular micrométrica em aumento de 100x. Além disso, 100 secções de túbulos de cada testículo foram analisadas microscopicamente em aumento de 400x para determinar o percentual de túbulos com espermátides alongadas, isto é, túbulos nos estágios I – VIII e XII - XIV. Um estágio ou associação celular é definido como um conjunto de células germinativas que podem ser observadas numa secção transversal de túbulo. Em ratos foram definidas 14 associações celulares distintas (FOSTER, 1988). A figura 9 ilustra o aspecto de um túbulo seminífero com a presença de espermátides alongadas lineando a luz do túbulo (estágios VII - VIII) e um túbulo sem a presença de espermátides alongadas (estágio IX).

FIGURA 9 – ASPECTO HISTOLÓGICO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS EM CORTES TRANSVERSAIS CORADOS COM HEMATOXILINA/EOSINA



NOTA: (A) Presença de espermátides alongadas (estágios VII - VIII); (B) Ausência de espermátides alongadas (estágio IX). Aumento 400 x.

## 2.6 TESTE DE FERTILIDADE E EFEITOS PATERNAIS

Para o estudo de fertilidade e efeitos paternos os descendentes masculinos adultos (120 dias) foram acasalados com fêmeas não expostas durante o ciclo escuro de 12 horas na proporção de duas fêmeas para um macho. Esfregaços vaginais diários, de cada fêmea, foram obtidos entre oito e nove horas da manhã para verificar a presença de espermatozoides (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977). Os acasalamentos foram realizados durante seis dias ou até a detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal de uma das fêmeas. Para avaliação da fertilidade foram calculados os índices de cópula e prenhez (US EPA, 1996):

- a) Índice de cópula =  $n^{\circ}$  de machos que copularam/ $n^{\circ}$  total de machos acasalados x 100;
- b) Índice de prenhez =  $n^{\circ}$  de machos que tornaram fêmeas prenhes/ $n^{\circ}$  de machos que copularam x 100.

O número de machos que copularam corresponde ao número de machos em que a cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal de pelo menos uma das fêmeas acasaladas.

O dia da detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado como dia zero da gestação (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977). No 20<sup>o</sup> dia as progenitoras foram sacrificadas por deslocamento endocervical. A cavidade abdominal foi aberta para a retirada e contagem do número de fetos. Após a retirada dos fetos, o útero e os ovários foram retirados para a visualização dos pontos de implantação nos cornos uterinos e dos corpos lúteos nos ovários com auxílio de lupa. Foram registrados o número de corpos lúteos, número de implantes uterinos, número de reabsorções, perdas pré e pós-implantes, número e peso dos fetos, percentual de fetos vivos e a razão sexual (US EPA, 1996):

- a) Reabsorções =  $n^{\circ}$  de implantes –  $n^{\circ}$  de fetos vivos;
- b) Perdas pré-implantes =  $n^{\circ}$  de corpos lúteos –  $n^{\circ}$  de implantes/ $n^{\circ}$  de corpos lúteos x 100;
- c) Perdas pós-implantes =  $n^{\circ}$  de reabsorções/ $n^{\circ}$  de implantes x 100;
- d) Razão sexual =  $n^{\circ}$  de filhotes machos/ $n^{\circ}$  de filhotes fêmeas.

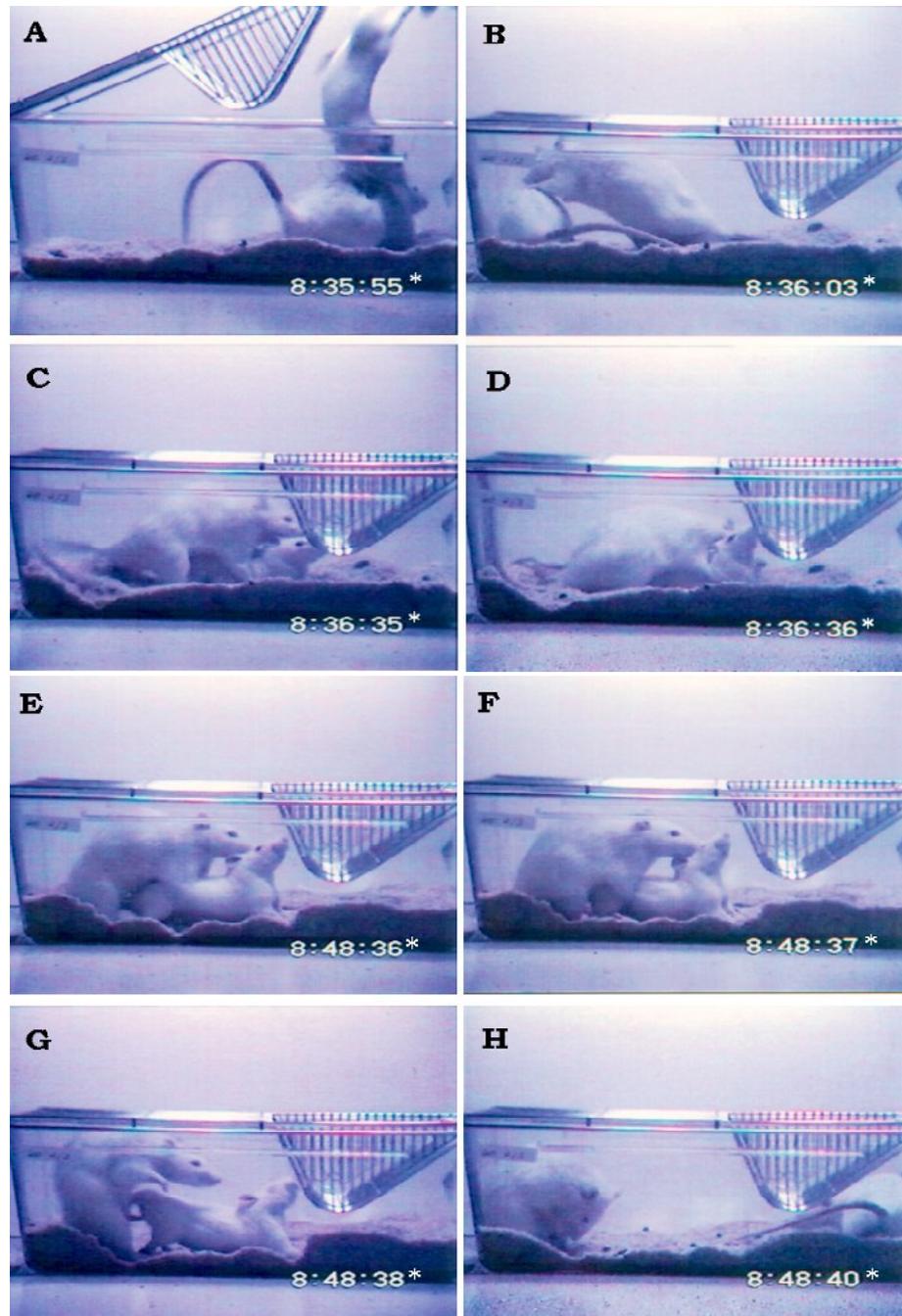
## 2.7 COMPORTAMENTO SEXUAL

Uma semana após o término dos acasalamentos para o estudo de fertilidade, os mesmos ratos foram utilizados na avaliação dos efeitos da exposição *in utero* e lactacional à deltametrina sobre o comportamento sexual. Esses animais, sexualmente experientes, foram acasalados com fêmeas em estro não expostas a deltametrina, sendo filmados durante 30 minutos na fase escura do ciclo de luz (19h30 às 23h30). As filmagens foram feitas sob iluminação vermelha (lâmpada de 15 watts), utilizando-se uma câmera de vídeo compacta (vídeo 8 handycam CCD-TR517, SONY®) e uma caixa coletiva transparente de polipropileno (414 x 344 x 245 mm). Dez minutos antes do início da filmagem cada macho foi colocado isoladamente na caixa de filmagens para evitar a interferência do comportamento exploratório no comportamento sexual. Somente fêmeas comprovadamente receptivas foram utilizadas nos testes, sendo a receptividade testada pela análise do esfregaço vaginal (fase de estro) de acordo com CHAHOUD e KWASIGROCH (1977) e pela presença do comportamento de lordose. A figura 10 ilustra as etapas do acasalamento de ratos, desde a introdução da fêmea na caixa até a ejaculação.

Os seguintes parâmetros foram avaliados no período de observação de 30 minutos (DALSENTER et al., 1997):

- a) Latência de monta: tempo (s) decorrido entre a introdução da fêmea na caixa de filmagem e a primeira monta (com ou sem penetração);
- b) Latência de penetração: tempo (s) decorrido entre a introdução da fêmea na caixa de filmagem e a primeira penetração do pênis na vagina;
- c) Latência de ejaculação: tempo (min) decorrido entre a primeira penetração e a ejaculação;
- d) Latência pós-ejaculação: tempo (min) decorrido entre a ejaculação e a primeira penetração após a ejaculação;
- e) Número de penetrações até a ejaculação;
- f) Frequência de penetrações: número de penetrações por minuto dentro dos 30 minutos de observação.

FIGURA 10 – COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS



FONTE: DALSENER, P. R. **Reproduktionstoxikologische und toxikokinetische Untersuchungen an männlichen Ratten, die gegenüber  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexan (lindan) während der Laktationsperiode exponiert waren.** Berlin, 1996. Tese (doutorado em medicina veterinária e toxicologia). Institute für Klinische Pharmakologie und Toxikologie - Freien Universität Berlin.

NOTAS: (A) Introdução da fêmea na caixa; (B) primeira monta; (C-D) primeira monta com penetração; (E) monta com penetração; (F-G) ejaculação; (H) limpeza do pênis.

Após os 30 minutos de filmagem foi obtido um esfregaço vaginal de cada fêmea para a detecção de espermatozoides e confirmação da ejaculação. Animais com latências de monta e/ou penetração superiores a cinco minutos foram considerados sexualmente inativos e retirados do teste.

## 2.8 TESTE UTEROTRÓFICO

O teste uterotrófico é um ensaio *in vivo* utilizado na triagem de substâncias com atividade estrogênica ou antiestrogênica, recomendado pelo comitê consultivo de teste e triagem de substâncias desreguladoras endócrinas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EDSTAC, 1998). O crescimento uterino em ratas imaturas é utilizado como indicador da ação estrogênica de uma substância, enquanto o bloqueio do efeito uterotrófico do estradiol é utilizado como indicador de antiestrogenicidade (ODUM et al., 1997; ASHBY et al., 1997; KANG et al., 2000).

No experimento foram utilizados a deltametrina técnica (Aventis, São Paulo/SP) e o hexahidrobenzoato de estradiol (Benzoginoestril® - Sarsa, Rio de Janeiro/RJ). O óleo de canola foi utilizado como veículo. A deltametrina foi dissolvida diariamente uma hora antes da administração aos animais. O hexahidrobenzoato de estradiol foi diluído no primeiro dia de tratamento e conservado em geladeira.

Ratas Wistar imaturas ( $21 \pm 1$  dia; 9 – 10/grupo) foram tratadas por via oral durante três dias consecutivos. A deltametrina foi administrada em duas diferentes doses (2,0 e 4,0 mg/kg/dia). O veículo (óleo de canola, 5,0 mL/kg/dia) e o hexahidrobenzoato de estradiol (0,4 mg/kg/dia) foram utilizados como controles negativo e positivo de estrogenicidade, respectivamente. Além disso, para avaliar o possível efeito antiestrogênico do pesticida, um quinto grupo de animais foi tratado com hexahidrobenzoato de estradiol (0,4 mg/kg/dia) e subseqüentemente com a maior dose de deltametrina (4,0 mg/kg/dia). O volume de administração utilizado foi de 5,0 mL/kg de peso corporal para todos os tratamentos (ANDRADE et al., 2002).

Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento endocervical. O útero foi retirado (seccionado logo acima de sua junção com a cérvix e na junção dos cornos uterinos com os ovários) e

dissecado cuidadosamente para retirar toda a gordura adjacente. Em seguida, o útero foi perfurado e colocado entre duas folhas de papel filtro para retirada do líquido retido. O peso do útero foi então determinado e registrado percentualmente em relação ao peso corporal (ANDRADE et al., 2002).

## 2.9 TESTE HERSHBERGER

O teste de Hershberger é um ensaio *in vivo* utilizado na detecção de substâncias androgênicas ou antiandrogênicas. Assim como o teste uterotrófico, este ensaio faz parte do protocolo de triagem de substâncias desreguladoras endócrinas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EDSTAC, 1998). O teste se baseia no crescimento de tecidos andrógeno-dependentes (próstata e vesícula seminal) em ratos machos castrados (androgenicidade); ou no bloqueio da ação trófica da testosterona (antiandrogenicidade) sobre esses órgãos (HERSHBERGER et al., 1953; ASHBY AND LEFEVRE, 2000; YAMADA et al., 2001).

Ratos pré-púberes (sete semanas de idade) foram castrados através de uma única incisão na bolsa escrotal. Os animais foram anestesiados com 75 mg de ketamina/kg (Vetanarcol<sup>®</sup> - Konig, Argentina) e 1,5 mg de xilazina/kg (Rompun<sup>®</sup> - Bayer, São Paulo/SP) pela via intraperitoneal. Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção subcutânea (0,1 mL/100g de peso corporal) de Agropen L.A.<sup>®</sup> (Virbac, França: penicilina G procaína 10.000.000 UI; penicilina G benzatina 10.000.000 UI; sulfato de dihidroestreptomicina 20 g; veículo q.s.p 100 mL). Os experimentos somente foram iniciados uma semana após a cirurgia para permitir a completa recuperação dos animais (ANDRADE et al., 2002).

No experimento foram utilizados a deltametrina técnica (Aventis, São Paulo/SP), ciprionato de testosterona (Deposteron<sup>®</sup> - Novaquímica, São Bernardo do Campo/SP) e flutamida (Galena, São Paulo/SP). O óleo de canola foi utilizado como veículo. A deltametrina foi dissolvida diariamente uma hora antes da administração aos animais. O ciprionato de testosterona e a flutamida foram diluídos no primeiro dia de tratamento e conservados em geladeira.

Os ratos machos castrados (n=8/grupo) foram tratados por via oral e subcutânea durante sete dias consecutivos. Na avaliação de antiandrogenicidade duas doses de deltametrina (2,0 e 4,0 mg/kg/dia) foram administradas por via oral (vo) a animais tratados com testosterona (0,25 mg/kg/dia) pela via subcutânea (sc). Para a detecção de androgenicidade, uma única dose de deltametrina (4,0 mg/kg/dia) foi administrada oralmente a animais tratados com veículo (1,0 mL/kg/dia sc). A administração conjunta de testosterona (0,25 mg/kg/dia sc) e veículo (5,0 mL/kg/dia vo) serviu como controle positivo de androgenicidade, e a administração de veículo por ambas as vias (5,0 mL/kg/dia vo e 1,0 mL/kg/dia sc) como controle negativo. A flutamida (10,0 mg/kg/dia sc), utilizada como controle positivo de antiandrogenicidade, foi administrada a animais tratados com testosterona (0,25 mg/kg/dia sc) e veículo (5,0 mL/kg/dia vo). A flutamida é um inibidor competitivo dos receptores da testosterona e dihidrotestosterona utilizado no tratamento do carcinoma prostático e do hirsutismo em mulheres (BUFSKY et al., 1997; MUDERRIS et al., 2000). Os volumes de administração utilizados foram de 5,0 mL/kg para via oral e 1,0 mL/kg para a via subcutânea (ANDRADE et al., 2002).

Vinte e quatro horas após o último tratamento os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento endocervical. A próstata e vesícula seminal (com glândulas coaguladoras) foram retiradas, fixadas por 24 horas em formalina 10% e pesadas após a remoção cuidadosa de gordura e tecidos adjacentes. A próstata foi pesada juntamente com a cápsula prostática e a vesícula seminal com o seu conteúdo. Os pesos foram registrados percentualmente em relação ao peso corporal (ANDRADE et al., 2002).

## 2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis com medidas intervalares e que apresentaram distribuição normal foram analisadas através de análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Tukey e Duncan. As variáveis com medidas ordinais ou aquelas que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias, foram analisadas através do teste Kruskal-Wallis. Neste caso, as diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Dunn. As variáveis

indicadas como índices ou percentuais foram analisadas pelos testes de qui-quadrado ou Fisher. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). O peso corporal dos filhotes/fetos e os parâmetros de desenvolvimento geral e sexual dos filhotes foram analisados utilizando as ninhadas como unidades estatísticas.

O ganho de peso das progenitoras durante a prenhez e a lactação foi analisado por análise de variância de duas vias. Os dados da prenhez (tamanho das ninhadas, duração da gestação e número de implantes uterinos, corpos lúteos e reabsorções) e os parâmetros de desenvolvimento geral e sexual das progênes foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Alguns parâmetros avaliados na puberdade e idade adulta (tempo de trânsito espermático e níveis de testosterona plasmática) e no estudo do comportamento sexual (número de penetrações por minuto e número de penetrações até a ejaculação) também foram analisados por Kruskal-Wallis.

Variáveis como peso corporal e de órgãos, produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo, diâmetro médio dos túbulos seminíferos e algumas variáveis do estudo do comportamento sexual (latências de monta, penetração, ejaculação e pós-ejaculação) foram analisadas por análise de variância de uma via.

Os índices de nascimento, viabilidade e desmame, bem como as perdas pré e pós-implante, a razão sexual e o percentual de túbulos com espermatogênese completa e de espermatozóides morfologicamente anormais, foram analisados pelo teste do qui-quadrado. Os índices de parto, cópula e prenhez e o percentual de animais que ejacularam no estudo do comportamento sexual foram analisados pelo teste de Fisher.

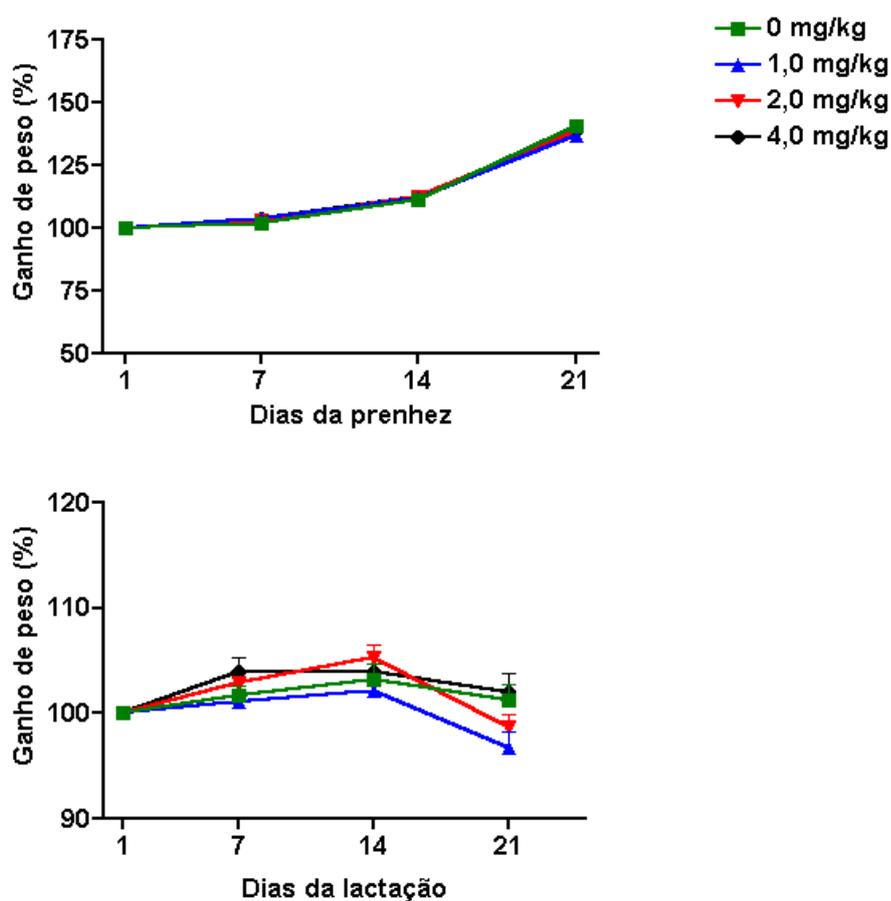
Para a análise estatística e a confecção dos gráficos utilizou-se o programa Graphpad Prism<sup>®</sup> versão 3.0.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 DADOS DA PRENHEZ

A exposição diária a baixas doses de deltametrina não alterou o desenvolvimento ponderal das progenitoras na gestação e lactação (figura 11). A duração da prenhez, o tamanho das ninhadas, a razão sexual dos filhotes e os índices de parto, nascimento, viabilidade e desmame também não foram afetados em nenhuma das doses testadas (tabela 1). As progenitoras expostas a 2,0 e 4,0 mg de deltametrina/kg apresentaram um número significativamente menor de implantes uterinos, mas também um menor percentual de perdas pós-implantes, quando comparadas ao controle (tabela 1).

FIGURA 11 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O GANHO DE PESO (%) DAS PROGENITORAS TRATADAS DIARIAMENTE POR VIA ORAL DURANTE A PRENHEZ E A LACTAÇÃO



NOTA: Foram avaliadas 12 progenitoras por grupo com exceção do grupo controle (n=10).

TABELA 1 – ÍNDICES REPRODUTIVOS DE RATAS TRATADAS POR VIA ORAL COM BAIXAS DOSES DE DELTAMETRINA DURANTE A GESTAÇÃO E A LACTAÇÃO

Parâmetros	Deltametrina (mg/kg/dia)			
	0	1,0	2,0	4,0
Número de progenitoras	10	12	12	12
Tamanho das ninhadas	11,1 ± 2,00	10,2 ± 1,80	9,3 ± 1,97	9,8 ± 1,34
Duração da prenhez (dias)	22,2 ± 0,63	22,2 ± 0,40	22,2 ± 0,62	22,1 ± 0,29
Nº de implantes <sup>(1)</sup>	13,0 ± 2,58	11,7 ± 1,30	9,6 ± 1,97 **	10,5 ± 1,17 *
Perdas pós-implantes (%) <sup>(2)</sup>	16,9	14,3	2,6 ***	7,1 *
Índice de parto (%)	93	87	93	93
Índice de nascimento (%)	97	98	100	99
Índice de viabilidade (%)	95	98	98	97
Índice de desmame (%)	94	96	96	97
Razão sexual (machos: fêmeas)	1,02: 1	0,88: 1	1,20: 1	0,73: 1

NOTAS: Os resultados expressam médias ± desvios padrões, exceto quando indicado de outra forma (%).

\* Difere significativamente do controle (\* p< 0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001).

(1) Kruskal-Wallis - Dunn.

(2) Qui-quadrado.

### 3.2 DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE

Os efeitos da deltametrina sobre o desenvolvimento geral dos descendentes expostos *in utero* e na lactação são ilustrados na tabela 2 e na figura 12. A exposição à deltametrina não alterou significativamente a idade média (dias) do surgimento das características de desenvolvimento geral investigadas (descolamento dos pavilhões auriculares, aparecimento de pêlos e abertura de olhos). O peso corporal dos filhotes expostos a 2,0 e 4,0 mg de deltametrina/kg foi significativamente maior ao nascer, mas não foi afetado ao desmame, quando comparado ao grupo controle (tabela 2).

TABELA 2 – PESO AO NASCER E AO DESMAME DE RATOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA

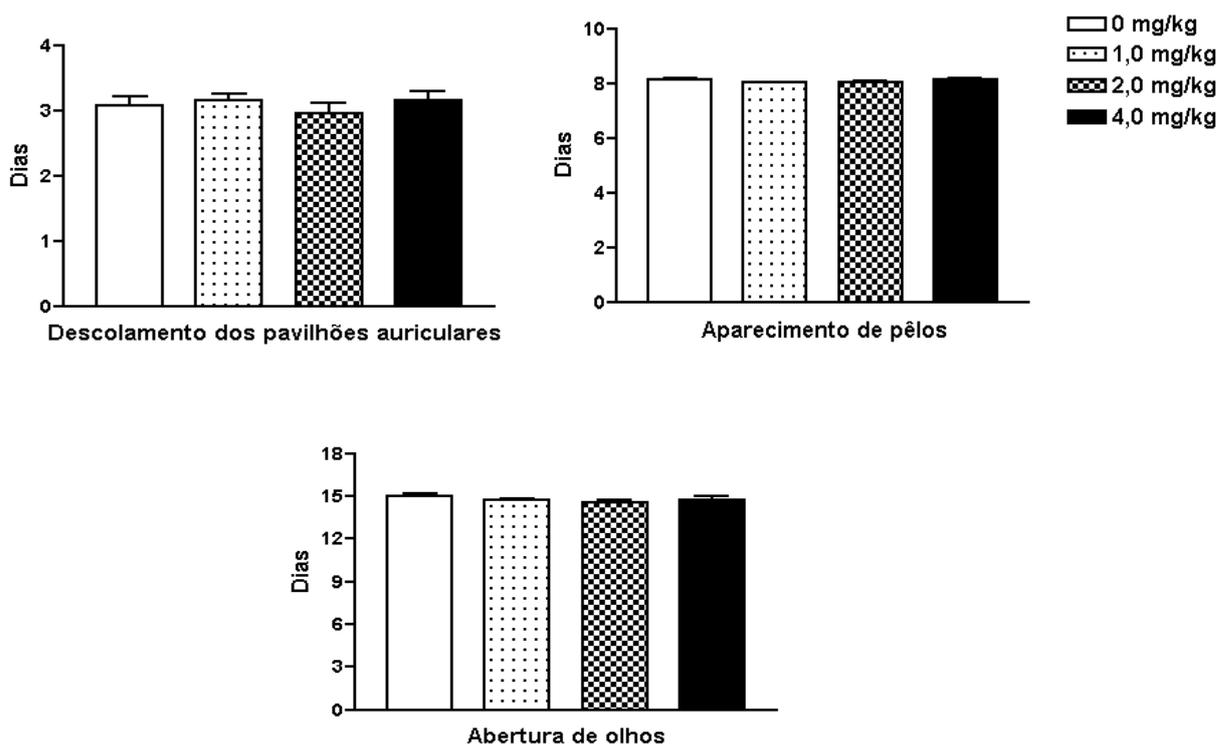
Dose (mg/kg/dia)	Número de ninhadas	Peso ao nascer (g)	Peso ao desmame (g)
0	10	5,34 ± 0,35	30,0 ± 5,34
1,0	12	5,69 ± 0,24	29,6 ± 4,55
2,0	12	5,96 ± 0,41**	32,8 ± 5,80
4,0	12	5,79 ± 0,44 *	28,9 ± 3,76

NOTAS: Os resultados expressam as médias ± desvios padrões.

As ninhadas foram utilizadas como unidades estatísticas.

\* Difere significativamente do controle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ANOVA - Tukey).

FIGURA 12 – CARACTERÍSTICAS DO DESENVOLVIMENTO GERAL DE RATOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA



NOTAS: Os resultados expressam as médias e erros padrões.

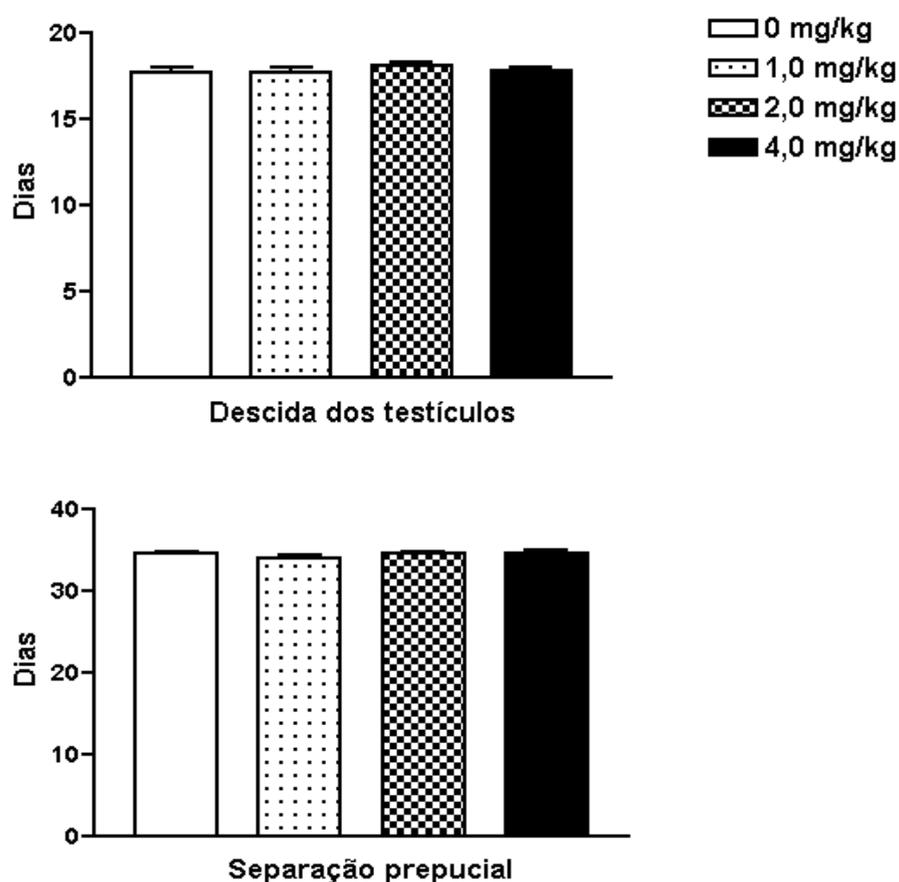
As ninhadas foram utilizadas como unidades estatísticas.

Foram utilizadas doze ninhadas por grupo com exceção do grupo controle (n = 10).

### 3.3 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE

A exposição *in utero* e lactacional à deltametrina não alterou o período médio (dias) para a descida dos testículos à bolsa escrotal e para a separação prepucial, em nenhuma das doses testadas (figura 13).

FIGURA 13 – PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA



NOTAS: Os resultados expressam as médias e erros padrões.  
As ninhadas foram utilizadas como unidades estatísticas  
Foram utilizadas doze ninhadas por grupo com exceção do grupo controle (n = 10).

### 3.4 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MASCULINOS

#### 3.4.1 Peso absoluto e relativo de órgãos

O peso absoluto dos testículos e epidídimos foi significativamente reduzido nos animais adultos expostos *in utero* e na lactação à maior dose de deltametrina, quando comparado ao controle (tabela 3). O peso absoluto e relativo das glândulas sexuais acessórias (próstata e vesícula seminal) não diferiu significativamente entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados (tabelas 3 e 4).

Com relação ao peso de fígado e rins, não foram observadas diferenças entre os grupos, com exceção de uma redução significativa no peso relativo dos rins dos animais púberes expostos a maior dose. Essa diferença, no entanto, não foi observada nos animais sacrificados na idade adulta (dados não apresentados).

TABELA 3 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O PESO ABSOLUTO DE ÓRGÃOS SEXUAIS E GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE RATOS MACHOS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

	Período	Deltametrina (mg/kg/dia)			
		0	1,0	2,0	4,0
Peso corporal (g)	Puberdade	241 ± 17	237 ± 15	239 ± 18	239 ± 22
	Adulto	361 ± 33	358 ± 25	366 ± 32	<sup>(1)</sup> 351 ± 42
Testículos (g)	Puberdade	1,24 ± 0,08	1,23 ± 0,08	1,24 ± 0,08	1,25 ± 0,10
	Adulto	1,47 ± 0,12	1,42 ± 0,11	1,47 ± 0,12	<sup>(1)</sup> 1,31 ± 0,13 **
Epidídimos (mg)	Puberdade	250 ± 36	250 ± 29	237 ± 27	241 ± 32
	Adulto	563 ± 42	543 ± 54	536 ± 43	<sup>(1)</sup> 509 ± 46 *
Próstata (mg)	Puberdade	183 ± 37	181 ± 37	159 ± 25	172 ± 38
	Adulto	526 ± 123	501 ± 95	470 ± 183	<sup>(1)</sup> 449 ± 145
Vesícula Seminal (mg)	Puberdade	278 ± 73	277 ± 53	257 ± 54	262 ± 63
	Adulto	706 ± 115	729 ± 92	687 ± 146	<sup>(2)</sup> 645 ± 115

NOTAS: Os resultados expressam as médias ± desvios padrões.

Foram avaliados 16 animais por grupo.

\* Difere significativamente do controle (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; ANOVA - Tukey).

(1) Número amostral = 15.

(2) Número amostral = 14.

TABELA 4 - EFEITOS DA DELTAMETRINA SOBRE O PESO RELATIVO (%) DE ÓRGÃOS SEXUAIS E GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE RATOS MACHOS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

Peso (%)	Período	Deltametrina (mg/kg/dia)			
		0	1,0	2,0	4,0
Testículos	Puberdade	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,03	<sup>(1)</sup> 0,52 ± 0,04	0,53 ± 0,05
	Adulto	0,41 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,04	<sup>(1)</sup> 0,38 ± 0,06
Epidídimos	Puberdade	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	<sup>(1)</sup> 0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
	Adulto	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01	<sup>(1)</sup> 0,14 ± 0,02
Próstata	Puberdade	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	<sup>(1)</sup> 0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	Adulto	0,15 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,04	<sup>(1)</sup> 0,13 ± 0,04
Vesícula Seminal	Puberdade	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02	<sup>(1)</sup> 0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02
	Adulto	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,03	<sup>(2)</sup> 0,18 ± 0,04

NOTAS: Os resultados expressam as médias ± desvios padrões.

Foram avaliados 16 animais por grupo.

(1) Número amostral = 15.

(2) Número amostral = 14.

### 3.4.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático

Os resultados da produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático dos animais púberes e adultos expostos *in utero* e na lactação à deltametrina são ilustrados nas tabelas 5 e 6. A concentração média de espermatozóides na cauda do epidídimo não foi significativamente afetada em nenhum dos períodos investigados (puberdade e idade adulta). No entanto, a produção espermática diária dos animais adultos expostos a maior dose de deltametrina (4,0 mg/kg) foi reduzida em cerca de 12% ( $p = 0,08$ ; teste de Duncan) quando comparada à produção espermática dos animais controles. O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo foi similar em todos os grupos.

### 3.4.3 Morfologia espermática

O percentual total de espermatozoides anormais (defeitos de cabeça e cauda) nos animais expostos à deltametrina não diferiu significativamente do percentual observado nos animais do grupo controle (tabelas 5 e 6).

### 3.4.4 Níveis de testosterona

A exposição *in utero* e lactacional à deltametrina não alterou significativamente os níveis plasmáticos de testosterona, medidos por radioimunoensaio em animais púberes e adultos, quando comparados ao grupo controle (tabelas 5 e 6).

### 3.4.5 Histologia testicular

Os resultados da avaliação histológica dos testículos dos animais púberes e adultos expostos *in utero* e na lactação a deltametrina, são ilustrados nas tabelas 5 e 6. O percentual de túbulos seminíferos com espermatogênese completa (túbulos com espermátides alongadas) não diferiu significativamente entre os grupos. No entanto, o diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi significativamente reduzido nos animais adultos expostos a maior dose de deltametrina (4,0 mg/kg), quando comparado ao grupo controle (tabela 6).

TABELA 5 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO, TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO, NÍVEIS DE TESTOSTERONA, HISTOLOGIA TESTICULAR E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE RATOS MACHOS PÚBERES EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA

Parâmetros	n <sup>(1)</sup>	Deltametrina (mg/kg/dia)			
		0	1,0	2,0	4,0
Produção espermática diária (x 10 <sup>6</sup> )	16	31,6 ± 5,4	29,2 ± 2,9	<sup>(2)</sup> 29,8 ± 5,2	30,6 ± 4,5
Nº espermatozóides (x 10 <sup>6</sup> )	16	60,1 ± 26,9	57,2 ± 15,0	<sup>(2)</sup> 50,1 ± 14,7	55,7 ± 22,5
Tempo de trânsito espermático (dias)	16	1,89 ± 0,76	1,97 ± 0,52	<sup>(2)</sup> 1,68 ± 0,44	1,82 ± 0,68
Testosterona plasmática (ng/mL)	16	1,00 ± 0,76	1,17 ± 1,13	<sup>(2)</sup> 0,69 ± 0,53	<sup>(2)</sup> 1,70 ± 1,58
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	06	254 ± 6,28	257 ± 13,2	<sup>(3)</sup> 256 ± 6,27	251 ± 7,21
Túbulos com espermátides alongadas (%)	06	92	93	<sup>(3)</sup> 91	91
Espermatozóides anormais (%)	10	1,6	1,5	1,4	1,3

NOTAS: Os resultados expressam médias ± desvios padrões, exceto quando indicado de outra forma (%).

(1) Número amostral.

(2) Número amostral = 15.

(3) Número amostral = 5.

TABELA 6 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO, TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO, NÍVEIS DE TESTOSTERONA, HISTOLOGIA TESTICULAR E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA

Parâmetros	n <sup>(1)</sup>	Deltametrina (mg/kg/dia)			
		0	1,0	2,0	4,0
Produção espermática diária (x 10 <sup>6</sup> )	16	42,8 ± 8,7	39,9 ± 6,22	40,0 ± 7,0	<sup>(2)</sup> 37,7 ± 7,1
Nº espermatozóides (x 10 <sup>6</sup> )	16	267 ± 61	274 ± 48	255 ± 64	<sup>(2)</sup> 242 ± 48
Tempo de trânsito espermático (dias)	16	6,45 ± 1,73	6,97 ± 1,37	6,49 ± 1,63	<sup>(2)</sup> 6,57 ± 1,60
Testosterona plasmática (ng/mL)	16	0,64 ± 0,61	1,07 ± 1,14	0,43 ± 0,21	<sup>(2)</sup> 0,58 ± 0,41
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	06	265 ± 9,31	261 ± 9,08	263 ± 5,69	<sup>(3)</sup> 250 ± 6,65 *
Túbulos com espermátides alongadas (%)	06	95	94	93	<sup>(3)</sup> 92
Espermatozóides anormais (%)	10	1,4	1,4	1,2	0,9

NOTAS: Os resultados expressam médias ± desvios padrões, exceto quando indicado de outra forma (%).

\* Difere significativamente do controle (\* p < 0,05; ANOVA - Tukey).

(1) Número amostral.

(2) Número amostral = 15.

(3) Número amostral = 5.

### 3.5 TESTE DE FERTILIDADE E EFEITOS PATERNAIS

Os índices reprodutivos calculados (cópula e prenhez) não revelaram efeitos adversos sobre a fertilidade dos ratos machos adultos expostos *in utero* e na lactação à deltametrina (tabela 7). O índice de cópula foi de 100% em todos os grupos enquanto o índice de prenhez variou de 92 a 100%. Também não foram observadas diferenças significativas nos índices reprodutivos calculados para as ratas acasaladas e suas progênes, indicando a ausência de efeitos paternos (tabela 8).

TABELA 7 - ÍNDICES REPRODUTIVOS CALCULADOS PARA RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA

Parâmetros	Deltametrina (mg/kg/dia)			
	0	1,0	2,0	4,0
Nº de machos acasalados	12	12	12	12
Nº de machos que copularam	12	12	12	12
Nº de machos que tornaram fêmeas prenhes	11	12	12	11
Índice de cópula (%)	100	100	100	100
Índice de prenhez (%)	92	100	100	92

TABELA 8 - ÍNDICES REPRODUTIVOS DE RATAS ACASALADAS COM RATOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO À DELTAMETRINA

Parâmetros	Deltametrina (mg/kg/dia)			
	0	1,0	2,0	4,0
Número de progenitoras	11	12	12	10
Nº de fetos	10,3 ± 1,19	10,9 ± 1,93	10,3 ± 2,19	10,8 ± 1,81
Peso dos fetos (g) <sup>(1)</sup>	4,17 ± 0,73	4,06 ± 0,87	4,06 ± 0,71	4,15 ± 0,75
Nº de corpos lúteos	11,4 ± 1,07	12,6 ± 1,21	11,7 ± 1,67	12,2 ± 1,48
Nº de implantes	10,6 ± 0,81	11,4 ± 2,19	10,9 ± 2,11	11,0 ± 1,70
Nº de reabsorções	0,36 ± 0,50	0,50 ± 0,67	0,67 ± 1,15	0,20 ± 0,42
Fetos vivos (%)	100	100	99,2	100
Perdas pré-implantes (%)	7,01	8,63	6,43	9,84
Perdas pós-implantes (%)	3,42	4,38	6,11	1,82
Razão sexual (machos: fêmeas)	1,13: 1	0,82: 1	0,91: 1	0,71: 1

NOTA: Os resultados expressam médias ± desvios padrões, exceto quando indicado de outra forma (%).  
(1) As ninhadas foram utilizadas como unidades estatísticas.

### 3.6 COMPORTAMENTO SEXUAL

Os resultados do estudo do comportamento sexual são ilustrados na tabela 9. Nos grupos expostos a deltametrina, o número de animais que ejacularam no período de 30 minutos de filmagem foi menor em relação ao grupo controle (não significativo estatisticamente). A ejaculação foi observada em 90% dos animais controles acasalados, em 70% dos animais expostos a 1,0 e 4,0 mg de deltametrina/kg e em apenas 50% dos animais expostos a 2,0 mg/kg. Além disso, dois animais do grupo exposto a maior dose não realizaram nenhuma investida (monta ou intromissão) durante os 30 minutos de acasalamento. Essa inatividade sexual também foi observada em um animal do grupo exposto a dose de 2,0 mg/kg, que apresentou uma latência de monta de 21 minutos, e em um animal do grupo exposto a menor dose (1,0 mg/kg), que apresentou uma latência de penetração de seis minutos, sendo que no grupo controle todos os animais apresentaram latências de monta e penetração inferiores a um minuto. Nas demais variáveis investigadas, no entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos.

TABELA 9 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL À DELTAMETRINA NO COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS ADULTOS

Parâmetros	Deltametrina (mg/kg/dia)			
	0	1,0	2,0	4,0
Nº de animais que ejacularam/nº de animais investigados	9/10 (90%)	7/10 (70%)	5/10 (50%)	7/10 (70%)
Latência de monta (s)	24,1 ± 12,3	24,4 ± 17,3	<sup>(1)</sup> 23,9 ± 17,9	<sup>(2)</sup> 17,9 ± 11,9
Latência de penetração (s)	33,1 ± 19,0	<sup>(1)</sup> 44,4 ± 30,5	<sup>(1)</sup> 42,2 ± 36,2	<sup>(2)</sup> 22,7 ± 13,4
Nº de penetrações por minuto	1,18 ± 0,38	<sup>(1)</sup> 1,04 ± 0,19	<sup>(1)</sup> 0,82 ± 0,30	<sup>(2)</sup> 1,18 ± 0,55
Latência de ejaculação (min)	16,1 ± 6,10	14,7 ± 6,93	15,1 ± 5,08	18,6 ± 5,57
Latência pós-ejaculação (min)	5,80 ± 0,82	6,30 ± 0,81	6,60 ± 1,01	6,56 ± 1,63
Nº de penetrações até a ejaculação	24,3 ± 6,08	19,3 ± 5,19	19,8 ± 12,7	28,0 ± 18,5

NOTA: Os resultados expressam as médias ± desvios padrões.

(1) Número amostral = 9.

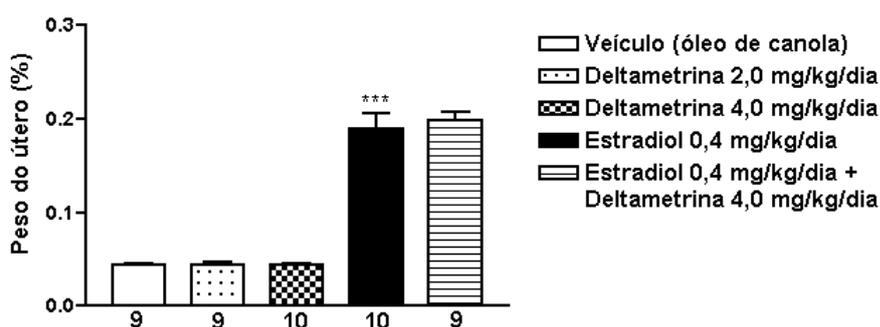
(2) Número amostral = 8.

### 3.7 TESTE UTEROTRÓFICO

A administração de baixas doses de deltametrina (2,0 e 4,0 mg/kg/dia) não induziu o crescimento uterino em ratas imaturas tratadas durante três dias por via oral (figura 14). O peso relativo do útero nos animais tratados com deltametrina foi similar ao peso do útero dos animais tratados somente com veículo. A administração de hexahidrobenzoato de estradiol (0,4 mg/kg/dia), no entanto, aumentou significativamente o peso relativo do útero em relação aos animais tratados com veículo.

O tratamento com deltametrina não foi capaz de bloquear o efeito uterotrófico do estradiol, não havendo diferença significativa entre o grupo tratado somente com estradiol e o grupo tratado com deltametrina e estradiol.

FIGURA 14 – RESPOSTA DA DELTAMETRINA AO TESTE UTEROTRÓFICO DE TRÊS DIAS UTILIZANDO RATAS IMATURAS



NOTAS: Os resultados expressam as médias e erros padrões.

O número de animais utilizados é indicado abaixo das colunas.

Todos os tratamentos foram feitos pela via oral.

Estradiol = hexahidrobenzoato de estradiol.

\*\*\* Difere significativamente do grupo tratado com veículo ( $p < 0,001$  – ANOVA – Tukey).

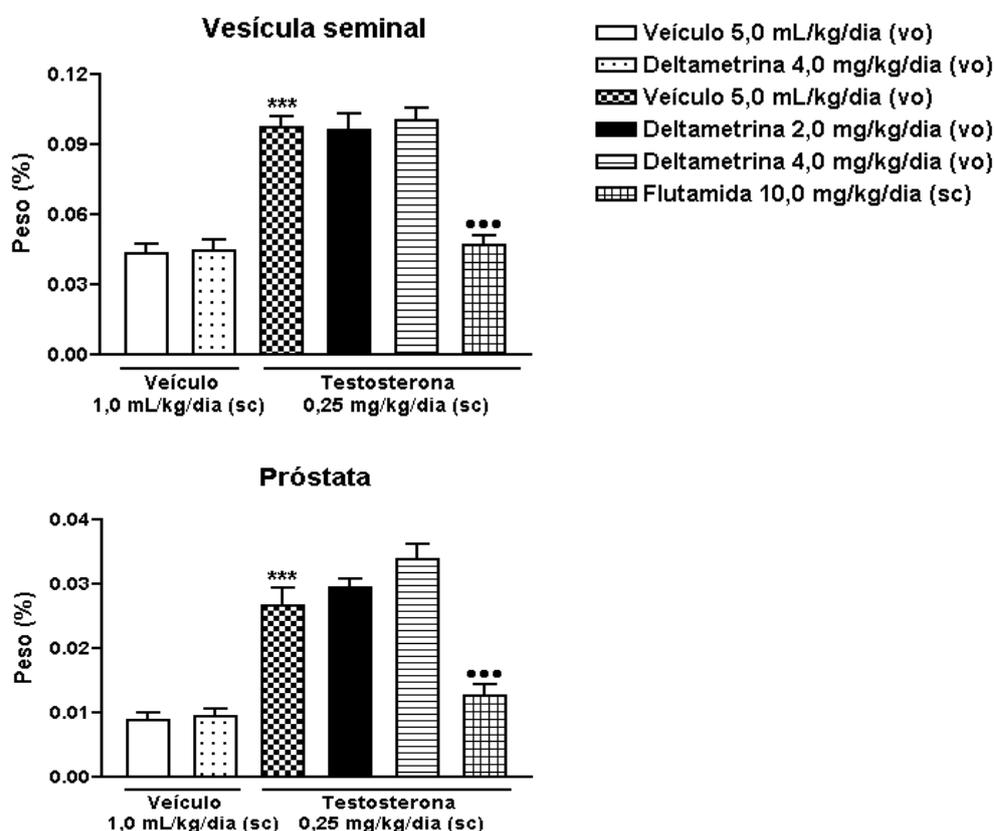
### 3.8 TESTE DE HERSHBERGER

A resposta da deltametrina ao teste de Hershberger de sete dias, utilizando ratos pré-púberes castrados, é ilustrada na figura 15. O peso relativo das glândulas sexuais acessórias (próstata e vesícula seminal) dos animais tratados oralmente com deltametrina (4,0 mg/kg/dia) foi similar ao peso das glândulas sexuais acessórias dos animais tratados somente com veículo. A administração subcutânea de cipionato de

testosterona (0,25 mg/kg/dia), no entanto, aumentou significativamente o peso relativo desses órgãos em relação aos animais tratados somente com veículo.

A administração de deltametrina não foi capaz de bloquear o efeito trófico da testosterona, não havendo diferença significativa entre o grupo tratado com testosterona e veículo e os grupos tratados com testosterona e deltametrina (2,0 e 4,0 mg/kg/dia). O crescimento da próstata e vesícula seminal induzido por testosterona, somente foi bloqueado pela administração subcutânea de flutamida (10 mg/kg/dia).

FIGURA 15 – RESPOSTA DA DELTAMETRINA AO TESTE DE HERSHBERGER DE SETE DIAS UTILIZANDO RATOS PRÉ-PÚBERES CASTRADOS



NOTAS: Os resultados expressam as médias e erros padrões.

Foram utilizados oito animais por grupo, tratados por via oral (vo) e subcutânea (sc). Os animais tratados com testosterona e flutamida, ambos pela via subcutânea, também foram tratados oralmente com o veículo (óleo de canola 5,0 mL/kg/dia).

Testosterona = cipionato de testosterona.

\*\*\* Difere significativamente do grupo tratado somente com veículo ( $p < 0,001$ ; ANOVA – Tukey).

●● Difere significativamente do grupo tratado com testosterona e veículo ( $p < 0,001$ ; ANOVA – Tukey).

## 4 DISCUSSÃO

O crescimento da indústria química a partir do século XX possibilitou o desenvolvimento de um amplo arsenal de substâncias para combater as pragas que reduzem a produtividade agrícola e pecuária. A crescente produção e utilização de pesticidas e outros compostos químicos industriais pode, no entanto, representar um sério risco ao meio ambiente e à saúde humana e animal. Substâncias capazes de alterar a função reprodutiva e outros processos regulados por hormônios têm causado grande preocupação nos últimos anos. Muitos estudos sugerem que após a segunda guerra mundial houve um aumento na incidência de distúrbios reprodutivos masculinos em seres humanos e animais (SHARPE, 1994; JENSEN et al., 1995; TOPPARI et al., 1996; US EPA, 1996). Recentemente grande atenção tem sido dada aos possíveis efeitos adversos decorrentes da exposição durante as fases pré e perinatal. A exposição a pesticidas e outras substâncias tóxicas durante essas fases, pode alterar componentes do sistema nervoso central e reprodutivo sem comprometer o crescimento e a viabilidade dos descendentes, mas causar alterações funcionais que se tornam aparentes posteriormente na idade adulta (NEUBERT e CHAHOUD, 1995; GRAY e OTSBY, 1998; FAQI et al., 1998).

Para a maior parte dos compostos químicos, no entanto, não existem dados suficientes para estabelecer uma relação entre os níveis de exposição e os efeitos adversos sobre a saúde reprodutiva humana. Dados obtidos a partir de exposições ocupacionais são normalmente inaccurados, e os níveis de exposição na população em geral são ainda mais difíceis de serem documentados (THOMAS, 1996). Dados obtidos a partir de estudos animais são, portanto, usualmente necessários para estudos em toxicologia reprodutiva. Esses dados, no entanto, devem levar em conta as possíveis diferenças interespecíficas. O sistema reprodutivo masculino de seres humanos parece ser mais suscetível a interferência química quando comparado ao de outros mamíferos (ZENICK e CLEGG, 1988, THOMAS, 1996).

A deltametrina é um pesticida piretróide bem caracterizado como um agente neurotóxico. No entanto, poucos estudos foram realizados no sentido de revelar possíveis efeitos adversos sobre a função reprodutiva, especialmente aqueles

decorrentes da exposição durante fases críticas do desenvolvimento. O presente estudo avaliou os efeitos da deltametrina sobre a função reprodutiva de ratos machos expostos *in utero* e durante a lactação, assim como seus possíveis efeitos (anti)estrogênicos ou (anti)androgênicos em testes *in vivo* de curta duração.

#### 4.1 DADOS DA PRENHEZ E DO DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE

A deltametrina não interferiu no ganho de peso das progenitoras bem como não provocou efeitos adversos sobre a prenhez e o desenvolvimento geral dos descendentes (período para descolamento dos pavilhões auriculares, surgimento de pêlos e abertura de olhos), indicando ausência de toxicidade materna e de desenvolvimento nas doses testadas. Estes resultados indicam que, para as condições experimentais e variáveis investigadas no presente estudo, a NOEL-dose materna e de desenvolvimento geral da progênie é estimada em 4,0 mg de deltametrina/kg. As diferenças observadas no número de implantes uterinos e nas perdas pós-implantes provavelmente refletem variações fisiológicas da espécie, uma vez que ocasionaram apenas pequenas diferenças nos tamanhos das ninhadas (não significativas). Tais diferenças, no entanto, podem explicar o aumento significativo no peso ao nascer dos filhotes expostos as doses de 2,0 e 4,0 mg/kg. Normalmente, o aumento de peso associado a ninhadas menores – como as observadas nestes grupos - não reflete um efeito adverso da substância testada (US EPA, 1996). O maior percentual de filhotes machos nascidos também pode ter contribuído para o aumento de peso no grupo exposto a dose de 2,0 mg/kg.

#### 4.2 PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE MASCULINA

A exposição *in utero* e lactacional à deltametrina também não alterou o período médio (dias) para a descida dos testículos à bolsa escrotal e para a separação prepucial. Estas variáveis são sinais externos do desenvolvimento sexual de ratos

machos e dependem da secreção de andrógenos (RAJFER e WALSH<sup>3</sup>, citado por DALSENTER et al., 1999, p. 587). Estes resultados são consistentes com a ausência de efeitos sobre os níveis plasmáticos de testosterona e sobre o peso das glândulas sexuais acessórias andrógeno-dependentes (próstata e vesícula seminal) dos descendentes masculinos púberes e adultos.

#### 4.3 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MASCULINOS NA PUBERDADE E NA IDADE ADULTA

##### 4.3.1 Peso de órgãos sexuais e histologia testicular

Alterações nos pesos absolutos ou relativos de órgãos reprodutivos provêm claras evidências para classificar um agente como potencialmente prejudicial ao sistema reprodutivo (ZENICK e CLEGG, 1989). Os animais adultos expostos *in utero* e durante a lactação a maior dose de deltametrina (4,0 mg/kg), apresentaram uma redução significativa nos pesos absolutos dos testículos e epidídimos quando comparados aos animais expostos ao veículo (controle). O peso absoluto dos testículos é preferencialmente utilizado em relação ao peso relativo porque em ratos machos adultos o peso dos testículos e o peso corporal são variáveis independentes (AMANN, 1982; ZENICK e CLEGG, 1989). Normalmente, o peso dos testículos apresenta apenas uma modesta variação dentro de uma espécie. Essa baixa variabilidade interanimal indica que a alteração no peso absoluto dos testículos é um marcador sensível e precoce de injúria gonadal (ZENICK e CLEGG, 1989; US EPA, 1996).

Na análise da histologia testicular, o percentual de túbulos seminíferos com espermatídes alongadas não diferiu significativamente entre os grupos. No entanto, o diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi significativamente reduzido nos animais adultos expostos a maior dose de deltametrina. Esse resultado é consistente com a redução do peso dos testículos observada nesses animais.

---

<sup>3</sup> RAJFER, J.; WALSH, P. C. Hormonal Regulation of testicular descent: experimental and clinical observations. **Journal of Urology**, v. 118, p. 985-999, 1977.

A exposição *in utero* e lactacional à deltametrina não alterou, no entanto, o peso das glândulas sexuais acessórias andrógeno-dependentes (próstata e vesícula seminal). Durante o desenvolvimento pré e perinatal, a exposição a hormônios androgênicos é essencial para que essas glândulas exibam uma responsividade adequada na idade adulta (MABLY et al., 1992; LOEFFLER e PETERSON, 1999). Substâncias que inibem a interação de hormônios sexuais masculinos com os receptores androgênicos (antiandrógenos), podem interferir na diferenciação sexual masculina resultando na redução das glândulas sexuais acessórias e em outras alterações estruturais e funcionais (OTSBY et al., 1999; LOEFFLER e PETERSON, 1999). No entanto, os resultados do teste de Hershberger indicam que, nas doses testadas, a deltametrina não possui atividade androgênica ou antiandrogênica *in vivo* (ANDRADE et al., 2002).

#### 4.3.2 Níveis plasmáticos de testosterona

Os níveis plasmáticos de testosterona, medidos por radioimunoensaio, não diferiram significativamente entre os grupos. O padrão pulsátil de liberação do hormônio luteinizante (LH) e a conseqüente produção pulsátil de testosterona podem explicar a alta variabilidade normalmente associada às medidas plasmáticas de testosterona. De fato, a determinação dos níveis de testosterona em uma única amostra é um fator limitante da análise do estado hormonal (SHARPE, 1988). Além disso, a função aparentemente normal das células de Leydig (ex. níveis normais de testosterona plasmática) está muitas vezes presente em situações de disfunção dos túbulos seminíferos como, por exemplo, na disfunção induzida pelo criptorquidismo bilateral em ratos. Nessa condição os animais apresentam concentrações plasmáticas normais de testosterona apesar das severas alterações histológicas dos túbulos seminíferos (SHARPE, 1988).

#### 4.3.3 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático

A concentração média de espermatozóides na cauda do epidídimo e o tempo de trânsito espermático não foram significativamente afetados em nenhum dos períodos investigados (puberdade e idade adulta). No entanto, a produção espermática diária dos animais adultos expostos a maior dose de deltametrina (4,0 mg/kg) foi reduzida em cerca de 12% ( $p = 0,08$ ; teste de Duncan) quando comparada à produção espermática dos animais controles. Essa alteração, associada à redução no peso absoluto dos testículos (11%) e no diâmetro médio dos túbulos seminíferos desses animais, constitui o principal efeito observado nos descendentes expostos. Essas variáveis, no entanto, não foram afetadas nos animais investigados na puberdade, sugerindo que os efeitos adversos decorrentes da exposição *in utero* e lactacional à deltametrina são detectados tardiamente, após a aquisição da maturidade sexual. DALSENTER e colaboradores (1997) demonstraram que a exposição de ratas ao lindano (1,0 mg/kg/dia), do 9º ao 14º dia de lactação, também resultou em reduções significativas no peso testicular (10%) e na produção espermática diária (13%) dos descendentes adultos.

O tamanho dos testículos e a produção espermática na idade adulta dependem do número de células de Sertoli formadas no período perinatal (SHARPE, 1994; JENSEN et al., 1995; TOPPARI et al., 1996). A exposição a contaminantes químicos ambientais com atividade estrogênica, nessas fases, pode reduzir a multiplicação dessas células através da supressão da síntese e secreção do hormônio folículo estimulante (TOPPARI et al., 1996; SWEENEY, 2000). Esse efeito pode ser irreversível, uma vez que as células de Sertoli não se dividem no rato adulto e constituem uma população fixa de células que dão suporte físico e bioquímico às células germinativas no processo de espermatogênese (ORTH, 1982). SWEENEY e colaboradores (2000) demonstraram que a exposição *in utero* aos compostos estrogênicos dietilestilbestrol (DES) e octilfenol, reduz significativamente os níveis de FSH em amostras de sangue fetal de ovinos. As ovelhas prenhes foram tratadas através de infusão intravenosa contínua de DES (50 µg/kg/dia) e octilfenol (1000 µg/kg/dia) entre os dias 110-115 de

prenhez. Os fetos foram cateterizados *in utero* e as amostras de sangue coletadas a cada oito horas entre os dias 109-115 de prenhez. Num segundo experimento SWEENEY e colaboradores (2000) demonstraram que a exposição materna ao DES (0,5 µg/kg/dia sc) e ao octilfenol (1000 µg/kg/dia sc), do 70º dia de prenhez ao nascimento (150º dia), reduz o peso testicular e o número de células de Sertoli nos cordeiros recém natos. Recentemente, GO e colaboradores (1999) demonstraram que alguns compostos piretróides como a sumitrina, o fenvalerato e a aletrina possuem propriedades estrogênicas *in vitro*. No entanto, no presente estudo os resultados do teste uterotrófico demonstraram que, nas doses testadas, a deltametrina não possui atividade estrogênica ou antiestrogênica *in vivo* (ANDRADE et al., 2002).

Alterações na secreção de gonadotrofinas (FSH/LH) e os conseqüentes prejuízos na função reprodutiva masculina (ex. redução do peso testicular e da produção espermática diária), também podem resultar da interferência na regulação do eixo neuroendócrino (US EPA, 1997). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ocupa um papel central na regulação da síntese e secreção de gonadotrofinas na vida fetal (BROOKS et al., 1996). O GnRH por sua vez, é regulado por diversos tipos de sinais de retroalimentação e por múltiplas influências neurais que incluem neurotransmissores clássicos (ex. noradrenalina, glutamato, ácido gama aminobutírico) e diversos neuropeptídeos (ex. opióides, neuropeptídeo Y). A interferência nessa regulação pode alterar o funcionamento normal do eixo neuroendócrino (US EPA, 1997; TERASAWA, 1998). Os pesticidas piretróides sintéticos como a deltametrina poderiam interferir nessa regulação através da interação com o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA), no sítio de ligação da picrotoxina, inibindo a neurotransmissão GABAérgica (IPCS, 1990; MONIZ et al., 1999). Esse efeito poderia prejudicar a liberação de GnRH e de gonadotrofinas, uma vez que o GABA parece desempenhar um papel estimulatório na liberação de GnRH durante as fases de desenvolvimento pré e perinatal (TERASAWA, 1998).

#### 4.4 TESTE DE FERTILIDADE E EFEITOS PATERNAIS

A exposição *in utero* e lactacional à deltametrina não provocou efeitos adversos sobre a fertilidade de ratos machos adultos, como demonstrado pelos índices de cópula e de prenhez, calculados após o acasalamento com fêmeas não expostas. Também não foram observados efeitos adversos sobre a gestação das ratas acasaladas e sobre suas progênes (efeitos paternos).

A ausência de efeitos sobre a fertilidade dos animais expostos à deltametrina não é, no entanto, inconsistente com a redução observada na produção espermática diária, uma vez que, em ratos, as avaliações de fertilidade são limitadas pela insensibilidade em detectar prejuízos reprodutivos (ZENICK e CLEGG, 1989; DALSETER, 1999). Em roedores, o número de espermatozoides produzidos é amplamente superior a quantidade necessária para determinar a fertilidade. Em algumas linhagens de ratos e camundongos a produção espermática pode ser reduzida em 90% sem comprometer a fertilidade. No entanto, reduções bem menos severas na produção espermática podem comprometer a capacidade reprodutiva na espécie humana, que funciona muito próxima do limite de produção necessária para assegurar uma performance reprodutiva adequada (ZENICK e CLEGG, 1989). Em função dessas diferenças interespecíficas, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 1996) passou a sugerir a investigação de outras variáveis reprodutivas além dos acasalamentos, como o peso de órgãos sexuais, produção espermática e níveis hormonais, para detectar possíveis efeitos adversos decorrentes da exposição a xenobióticos.

#### 4.5 COMPORTAMENTO SEXUAL

No presente estudo, os resultados do teste de comportamento sexual mostraram que a ausência de ejaculação foi o principal efeito observado nos descendentes masculinos expostos à deltametrina. A ejaculação foi observada em 90% dos animais controles acasalados, em 70% dos animais expostos a 1,0 e 4,0 mg deltametrina/kg e

em apenas 50% dos animais expostos a 2,0 mg/kg. Além disso, dois animais do grupo exposto a maior dose não realizaram nenhuma investida (monta ou intromissão) durante os 30 minutos de filmagem. Essa inatividade sexual também foi observada em um animal do grupo exposto a dose de 2,0 mg/kg, que apresentou uma latência de monta de 21 minutos, e em um animal do grupo exposto a menor dose (1,0 mg/kg), que apresentou uma latência de penetração de seis minutos, enquanto que no grupo controle todos os animais apresentaram latências de monta e penetração inferiores a um minuto. DALSENTER e colaboradores (1997) demonstraram que a exposição lactacional ao lindano, também resultou na redução do número de animais que ejacularam. A ejaculação foi observada em 85% dos animais controles e em apenas 55% dos animais expostos ao lindano. SILVA e colaboradores (1998) demonstraram que a exposição perinatal de ratos à picrotoxina resultou em alterações no comportamento sexual na idade adulta, como o aumento nas latências de monta e intromissão e a redução no número de ejaculações. MONIZ e colaboradores (1999) observaram um aumento no número de penetrações até a ejaculação e uma redução no número de ejaculações nos descendentes masculinos de ratas expostas ao piretróide sintético fenvalerato (10,0 mg/kg ip) no 18<sup>o</sup> dia de gestação e do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de lactação. Os autores sugerem que os efeitos da picrotoxina e do fenvalerato poderiam estar relacionados com a interferência na transmissão GABAérgica (SILVA et al., 1998; MONIZ et al., 1999). Ao contrário do seu efeito predominantemente inibitório sobre a neurotransmissão no adulto, o GABA constitui na verdade o principal estímulo excitatório no hipotálamo em desenvolvimento (McCARTHY et al., 1997). O GABA e o glutamato promovem o aumento do cálcio intracelular durante o período crítico de desenvolvimento sexual, contribuindo para o crescimento neuronal, a formação de sinapses e a masculinização permanente do sistema nervoso central (McCARTHY et al., 1997).

#### 4.6 TESTE UTEROTRÓFICO E DE HERSHBERGER

O controle endócrino da reprodução envolve uma série de interações do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, constituindo uma ampla variedade de sítios alvo para a ação de desreguladores endócrinos (US EPA, 1997). O teste uterotrófico e o teste de Hershberger são os dois principais ensaios *in vivo* de curta duração utilizados na triagem de substâncias (anti)estrogênicas e (anti)androgênicas, respectivamente (BAKER, 2001). Esses ensaios fazem parte de uma bateria de testes de triagem propostos pelo comitê consultivo de triagem e teste de desreguladores endócrinos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EDSTAC, 1998; GRAY, 1998b). No presente estudo a deltametrina não apresentou atividade (anti)estrogênica e (anti)androgênica *in vivo* nas doses testadas (ANDRADE et al., 2002). No entanto, esses ensaios de triagem podem ser insuficientes para caracterizar a ausência de atividade endócrina de uma substância, visto que o sistema endócrino é extremamente complexo e existe uma ampla variedade de mecanismos pelos quais as substâncias químicas podem desregulá-lo. Alguns desses mecanismos, como a interferência no controle central do eixo neuroendócrino, podem não ser detectados em testes de triagem de curta duração, como os utilizados no presente estudo (BAKER, 2001; ANDRADE et al., 2002).

Dessa forma, testes *in vitro* e *in vivo* de curta duração devem ser associados a testes reprodutivos de exposição crônica (ex. *in utero* e lactacional) para caracterizar o potencial toxicológico de substâncias com suspeitas de desregular o sistema endócrino. Somente a associação de vários protocolos pode elucidar o mecanismo de ação e indicar as possíveis injúrias que o sistema reprodutivo possa sofrer, quando da exposição crônica a determinados contaminantes químicos ambientais.

## 5 CONCLUSÕES

A exposição *in utero* e lactacional à deltametrina induz efeitos adversos no sistema reprodutivo de ratos machos adultos, em doses que não causam toxicidade materna e de desenvolvimento. Os principais efeitos observados incluíram reduções no peso dos testículos e epidídimos, na produção espermática diária e no diâmetro médio dos túbulos seminíferos dos animais adultos expostos a maior dose de deltametrina (4,0 mg/kg). Além disso, também foram detectadas alterações no comportamento sexual dos ratos expostos.

Os resultados dos testes uterotrófico e de Hershberger indicam que, nas doses testadas, a deltametrina não possui atividade (anti)estrogênica e (anti)androgênica *in vivo*. Os efeitos da deltametrina sobre o sistema reprodutivo de ratos expostos durante as fases de diferenciação e desenvolvimento sexual podem, no entanto, resultar da interferência em outros mecanismos de regulação endócrina do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a deltametrina, assim como outros compostos químicos suspeitos de atuarem como desreguladores endócrinos, pode induzir efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo de indivíduos expostos durante períodos críticos do desenvolvimento sexual. A utilização de protocolos já validados por agências regulatórias internacionais e pela comunidade científica, assim como a validação de novos protocolos para estudos em toxicologia reprodutiva é de fundamental importância na avaliação dos riscos que estes contaminantes ambientais apresentam ao meio ambiente e a saúde pública e animal.

## REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P. et al. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 586-592, 1976.
- AMANN, R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.2, n. 82, p. 13-25, 1982.
- ANADÓN, A. et al. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-OH-metabolite in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, p. 8-16, 1996.
- ANDRADE, A. J. M. et al. Screening for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, article in press, 2002.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: MELLO AIRES, M. de. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 877-917.
- ASHBY, J. et al. Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: Implications for lists of endocrine-disrupting chemicals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 96-101, 1997.
- ASHBY, J.; LEFEVRE, P. A. 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**, v. 31, p. 92-105, 2000.
- ASHDOWN, R. R.; HANCOCK, J. L. Anatomia funcional da reprodução masculina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1988. p. 7-31.
- BAKER, V. A. Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in vitro**, v. 15, p. 413-419, 2001.
- BARLOW, S. M.; SULLIVAN, F. M.; LINES, J. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 407-442, 2001.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
- BRINSKO, S. P. Fisiologia reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 399-405.

BROOKS, A. N. et al. Prenatal gonadotrophins in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 471-481, 1996.

BUFSKY, A. et al. Finasterine and flutamide as potency-sparing androgen-ablative therapy for advanced adenocarcinoma of the prostate. **Urology**, v. 69, p. 913-920, 1997.

CHAHOU, I.; KWASIGROCCH, T. E. Controlled breeding of laboratory animals. In: **Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977. p. 79-91.

CLARK, J. M. Insecticides as tools in probing vital receptors and enzymes in excitable membranes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 57, p. 235 – 254, 1997.

COLBORN, T.; VOM-SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378-384, 1993.

COLLINS, T. F. X. et al. Food and drug administration proposed testing guidelines for reproduction studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 29-38, 1999.

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; STOKER, T. E. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. **Toxicology and Industrial Health**, v.15, p. 26-36, 1999.

DALSENTER, P. R. **Reproduktionstoxikologische und toxikokinetische Untersuchungen an männlichen Ratten, die gegenüber  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexan (lindan) während der Laktationsperiode exponiert waren**. Berlin, 1996. Tese (doutorado em medicina veterinária e toxicologia). Institute für Klinische Pharmakologie und Toxikologie - Freien Universität Berlin.

DALSENTER, P. R. et al. Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. **Human and Experimental Toxicology**, v. 16, p. 146-153, 1997.

DALSENTER, P. R. et al. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Human and Experimental Toxicology**, v. 18, p. 583-589, 1999.

DASTON, G. P. et al. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 465 – 481, 1997.

DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. Controle do desenvolvimento das gônadas e dos gametas. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 353-360.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology**. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 643-689.

EDDY, E. M. Duct system and accessory glands of the male reproductive tract. In: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of male reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p. 35-69.

EL-AZIZ, A.; SAHLAB, A. M.; EL-KHALIL, A. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. **Dtsch. Tierärztl. Wschr**, v. 101, n. 6, p. 230-232, 1994.

ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING AND TESTING ADVISORY COMMITTEE (EDSTAC). **EPA/743/R-98/003**: Final Report. Washington, 1998.

FAQI, A. S. et al. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 150, p. 383 – 392, 1998.

FORSHAW, P. J.; LISTER, T.; RAY, D. E. The role of voltage-gated chloride channels in type II pyrethroid insecticide poisoning. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 163, p. 1-8, 2000.

FOSTER, P. M. D. Testicular organization and biochemical function. In: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of male reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p.7-34.

FOSTER, G. W. The reproductive toxicology of great lakes contaminants. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 63-69, 1995.

GALLO, M. A. History and scope of toxicology. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology**. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 3-11.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1988. p. 187-211.

GO, V. et al. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 3, p. 173-177, 1999.

- GRAY Jr, L. E. et al. Endocrine screening methods workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 5, p. 719-750, 1997.
- GRAY Jr., L. E. Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 331-335, 1998a.
- GRAY Jr., L. E. Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens, **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 677-680, 1998b.
- GRAY Jr, L. E.; OTSBY, J. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. **Toxicology and Industrial Health**, v. 14, n. 1/2, p.159-184, 1998.
- GRAY Jr, L. E. et al. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 48-64, 1999.
- GRECO, D; STABENFELDT, G. H. O sistema endócrino. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 310-350.
- HERSHBERGER, I.; SHIPLEY, E.; MEYER, R. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc. **Soc. Exp. Biol. Med**, v. 83, p. 175-179, 1953.
- IPCS - International Program on Chemical Safety. Environmental health criteria 97. Deltamethrin. **World Health Organization**, 1990.
- JENSEN, T. K. et al. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p.1896-1901, 1995.
- KANG, K. S. et al. Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprange-Dawley rats. **Toxicology Letters**, v. 118, p. 109-115, 2000.
- KELCE, W. R. et al. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. **Nature**, v. 375, n. 15, p.581-585, 1995.
- KELCE, W. R. et al. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 142, p. 192-200, 1997.

KIMMEL, C. A.; MAKRIS, S. L. Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. **Toxicology Letters**, v. 120, p. 73-82, 2001.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999.

LOEFFLER, K.; PETERSON, R. E. Interactive effects of TCDD and p',p'-DDE on male reproductive tract development in *in utero* and lactationally exposed rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 154, p. 28-39, 1999.

MABLY, T. A.; MOORE, R. W.; PETERSON, R. E. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 114, p. 97-107, 1992.

McCARTHY, M. M.; DAVIS, A. M.; MONG, J. Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 487-495, 1997.

MONIZ, A. C.; et al. Perinatal fenvalerate exposure: behavioral and endocrinology changes in male rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, n. 5, p. 611-618, 1999.

MUDERRIS, I. I.; BAYRAM, F.; GUVEN, M. A prospective, randomized trial comparing flutamide (250 mg/d) and finasteride (5 mg/d) in the treatment of hirsutism. **Fertility and Sterility**, v. 73, p. 984-987, 2000.

NEGRO-VILAR, A.; VALENCA, M. M. Male neuroendocrinology and endocrine evaluation of reproductive disorders. In: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of male reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p. 103-136.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrin. Chemic. Environ**, v.3, p. 24-52, 1995.

ODUM, J. et al. The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 176-188, 1997.

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical Record**, v. 203, p. 485-492, 1982.

OTSBY, J. et al. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 80-93, 1999.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 103-107, 1978.

- ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. 2<sup>a</sup> edição. **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993.
- SANTANA, G. M. et al. Determinação da atividade androgênica ou antiandrogênica do plastificante di(etil) hexil ftalato (DEHP) em ratos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 14, n. 2, p. 144, 2001.
- SHARPE, R. M. Endocrinology and paracrinology of the testis. In: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of male reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p. 71-102.
- SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **The Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.
- SHARPE, R. M. Could environmental, oestrogenic chemicals be responsible for some disorders of the human male reproductive development ? **Current Opinion in Urology** v. 4, p. 295-301, 1994.
- SHEETS, L. P. et al. Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 126, p. 186-190, 1994.
- SILVA, M. R. P. et al. Perinatal treatment with picrotoxin induces sexual, behavioral, and neuroendocrine changes in male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, p. 203-208, 1998.
- SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 65, n. n. 1-6, p.143-150, 1998.
- SWEENEY, T. et al. Maternal exposure to octylphenol suppresses ovine fetal follicle-stimulating hormone secretion, testis size and Sertoli cell number. **Endocrinology**, v. 141, p. 2667-2673, 2000.
- TALTS, U.; FREDRIKSSON, A.; ERIKSSON, A. P. Changes in behavior and muscarinic receptor density after neonatal and adult exposure to bioallethrin. **Neurobiology of Aging**, v. 19, n. 6, p. 545 – 552, 1998.
- TERASAWA, E. Cellular mechanism of pulsatile LHRH release. **General and comparative endocrinology**, v. 112, p. 283-295, 1998.
- THOMAS, J. A. Toxic Responses of the reproductive system. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology**. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 547-581.

TOPPARI, J. et. al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 4, p. 741-803, 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/009**: Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Washington, 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/012**: Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Washington, 1997.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA) – Federal Register Document. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1997/November/Day-26/p31103.htm>> Acesso em 22 de novembro de 2000.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk assessment approach. In: **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 275-309.

WHITE, I. G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1988. p. 212-228.

WHITLEY, R. J.; MEIKLE, A. W.; WATTS N. B. Endocrinology. In: ASHWOOD, E. R.; BURTIS C. A. **Tietz textbook of clinical chemistry**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. p.1645-1660.

YAMADA, T. et al. Dissection and weighting of accessory sex glands after formalin fixation, and a 5-day assay using young mature rats are reliable and feasible in the Hershberger assay. **Toxicology**, v. 162, p. 103-119, 2001.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)