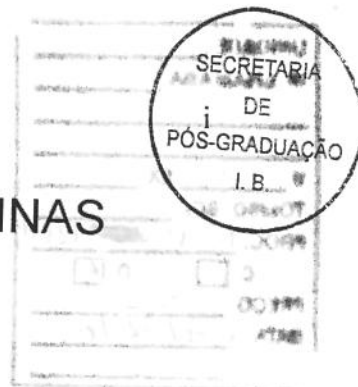


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Azize Cristina Capelli Nassr

**Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos
expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
AZIZE CRISTINA CAPELLI NASSR
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Mestre em Biologia
Celular e Estrutural na área de
Biologia Celular.

Orientadora: Profa.Dra. Wilma De Grava Kempinas

Campinas 2005

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

UNIVERSIDADE	BC
Nº CAMPUS	UNICAMP
	N188d
V	EX
TOMBO BC	66900
PROC.	16-P-0001230
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	09/02/06

Bib id 374912

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

N188d

Nassr, Azize Cristina Capelli

Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos
expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação / Azize
Cristina Capelli Nassr. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Wilma De Grava Kempinas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Inseticidas - Toxicologia. 2. Reprodução animal.
3. Rato. 4. Toxicologia reprodutiva. I. Kempinas,
Wilma De Grava. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Reproductive development of male rats exposed to fenvalerate *in utero* and lactation.

Palavras-chave em inglês: Insecticides - Toxicology; Animal reproduction; Rat; Reproductive toxicology.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Wilma De Grava Kempinas, Stephen Hyslop, Ana Lúcia Tozzi Spinardi Barbisan.

Data da defesa: 14/10/2005.

Campinas, 14 de outubro de 2005.

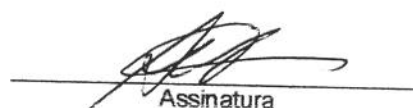
Banca Examinadora

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)



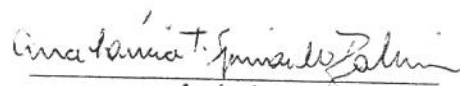
Assinatura

Prof. Dr. Stephen Hyslop



Assinatura

Profa. Dra. Ana Lúcia Tozzi Spinardi Barbisan



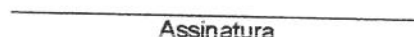
Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva



Assinatura

Profa. Dra. Michiko Sakate



Assinatura

200604036

... à minha vontade de continuar

*...Quando não houver caminho,
Mesmo sem amor, sem direção,
A sós ninguém está sozinho,
É caminhando que se faz o caminho.*

*Quando não houver desejo,
Quando não restar nem mesmo dor,
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós, aonde Deus colocou.*

*Enquanto houver sol, enquanto houver sol,
Ainda haverá...*

Sérgio Britto

Meus agradecimentos

- A Deus por ter possibilitado a minha história;
- Aos meus pais Georges e Zilda, pelo amor e por me ajudarem a concretizar meus sonhos;
- À Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas pela orientação, amizade, incentivo, ajuda e pelos ensinamentos;
- À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Mestrado;
- À Sumitomo Chemical pelo fornecimento do fenvalerato técnico;
- À Dra. Denise Z. Bissacot pela participação, amizade e pelos ensinamentos;
- À Profa. Dra Ana Lúcia T. Spinardi Barbisan pela participação, contribuições e pelos ensinamentos;
- À Profa. Dra. Eunice Oba pela atenção e por possibilitar as dosagens hormonais;
- Ao Dr. Antônio Francisco Godinho pela atenção, sugestões e conselhos em muitos momentos;
- Ao Prof. Dr. Oduvaldo C. M. Pereira, Maria Christina W. Avellar, Mary Anne Heidi Dolder, pela disponibilidade e contribuições dadas a este trabalho;
- Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela atenção e por ter aceitado fazer parte da banca de defesa;
- À Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva pela atenção, amizade e disponibilidade;
- À Profa. Dra. Michico Sakate pela disponibilidade e atenção;

- Ao Prof. Dr. Sérgio L. Felisbino, Profa. Dra. Cláudia H. Pellizzon, pela ajuda e sugestões dadas na utilização do analisador de imagens;
- Ao Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu pela acolhida e pelo uso das instalações para o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Departamento de Biologia Celular, I.B., UNICAMP pela oportunidade de realização da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural;
- Ao técnico do Laboratório de Embriologia, Depto de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu, José Eduardo pela amizade e colaboração no processamento de materiais histológicos.
- À Líliam A.S. Panagio, secretária da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, I.B., UNICAMP, pela imensa ajuda e amizade;
- Ao Fried pelo carinho, atenção, compreensão e ajuda. Obrigada por querer o melhor para mim;
- Às amigas do Laboratório de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento, I.B., UNESP, Botucatu, Fabíola, Carla, Glaura, Arielle, Suzana, Juliana Akinaga, Elaine, Juliana Perobelli, Marina, pela ajuda, companherismo, convivência, pelo bate papo e pelas risadas;
- Aos amigos Marcela, Gisele, Alberto, Tatiane, Flávia e Antonela, do Departamento de Biologia Celular e Estrutural do I.B., UNICAMP, pela acolhida, atenção, amizade e ótima convivência;
- Aos amigos André Jim, Luís Justulin, Danilo e Rinaldo, pela ajuda, atenção e amizade;
- A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	01
Abstract.....	03
Introdução.....	05
Justificativa e relevância da temática.....	11
Objetivo.....	11
Capítulo.....	12
Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao fenvalerato <i>in utero</i> e lactação.....	13
Resumo.....	15
Introdução.....	16
Materiais e Métodos.....	18
Resultados.....	27
Discussão.....	30
Referências.....	35
Tabelas.....	45
Legendas das figuras.....	50
Figuras.....	51
Conclusões Finais.....	54
Referências da Introdução.....	55

Resumo

O fenvalerato é um inseticida piretróide sintético usado na agricultura, pecuária e no controle de insetos domésticos, e seus efeitos reprodutivos são pouco conhecidos. Alguns estudos têm proposto que o fenvalerato seja um desregulador endócrino, atuando como um estrógeno ambiental. Estudos realizados com ratos adultos expostos a determinados piretróides mostraram a redução do número de espermatozóides e das concentrações plasmáticas de testosterona. Sabendo-se que o sistema reprodutor masculino de ratos é mais sensível ao efeito de substâncias tóxicas durante as fases fetal e neonatal, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tardios sobre o desenvolvimento reprodutivo na pré-puberdade (40 dias de idade), puberdade (60 dias) e maturidade sexual (90 dias), em ratos machos cujas mães foram expostas ao fenvalerato durante a prenhez e lactação. Adicionalmente, investigou-se o comportamento sexual, a fertilidade dos ratos adultos, a transferência do fenvalerato das mães para a prole, e a sua persistência no organismo dos descendentes machos. Para este estudo ratas prenhes (n=8) foram tratadas com fenvalerato técnico (96% de pureza), na dose diária de 40 mg/Kg, do 12º dia de prenhez até o final da lactação (período crítico de diferenciação do sistema reprodutor masculino da prole). Ratas controles (n=8) receberam óleo de milho (veículo), nas mesmas condições experimentais. O desenvolvimento reprodutivo foi avaliado através da idade da descida testicular e da separação prepucial, pesos dos órgãos reprodutores, concentração plasmática de testosterona, contagem de células germinativas no testículo e epidídimo, morfologia espermática, estudo do processo espermatogênico, número de células de Sertoli, do diâmetro dos túbulos seminíferos e altura de epitélio germinativo. Também foram avaliados o comportamento sexual e a fertilidade dos ratos adultos após acasalamentos naturais. A quantificação de resíduos de fenvalerato foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Precisão (CLAP) em amostras de órgãos e tecidos das

mães, fetos e filhotes. Os resultados da quantificação de fenvalerato revelaram que o piretróide foi transferido das mães para os fetos, pela placenta, e para os filhotes, pelo leite materno, respectivamente. O piretróide permaneceu no organismo dos filhotes até, pelo menos, 40 dias de idade, com destaque para o testículo e epidídimo. A exposição *in utero* e lactacional ao fenvalerato foi tóxica para o testículo, conforme mostrado pela diminuição dos pesos deste órgão nos grupos tratados e pela redução da produção espermática na puberdade, sem que tenha havido depleção androgênica ou diminuição da população de células de Sertoli. Os estudos morfológicos e morfométricos não mostraram danos sobre o aspecto histológico do testículo e o processo espermatogênico, sugerindo a ação do fenvalerato sobre a formação dos cordões seminíferos nos testículos fetais. Na idade adulta houve aumento significativo do peso da vesícula seminal e do número de ejaculações, embora os resultados dos testes de fertilidade tenham sido semelhantes entre os grupos controle e tratado. Esses achados podem ter sido uma consequência tardia de um desequilíbrio neuroendócrino durante o período crítico de diferenciação do sistema reprodutor masculino, quando ocorreu a exposição ao fenvalerato. Concluiu-se que o fenvalerato, diluído em óleo de milho, na dose de 40 mg/Kg, administrado para ratas do 12º. dia de prenhez até o final da lactação, foi transferido pela placenta e pelo leite materno, provocando efeitos tardios no desenvolvimento reprodutivo da prole masculina.

Abstract

Fenvalerate is a synthetic pyrethroid insecticide used in agriculture, cattle raising and in the control of domestic insects, and its reproductive effects are little-known. Some studies already have proposed that fenvalerate is an endocrine disruptor, acting as an environmental estrogen. Studies done with rats exposed to some pyrethroids showed reduction of sperm number and plasmatic testosterone concentration. Knowing that the male reproductive system of rats is more sensitive to the effects of toxic substances during fetal and neonatal phases, the objective of this work was to evaluate the possible late effects on the reproductive development at pre-puberty (aged 40 days), puberty (aged 60 days) and sexual maturity (aged 90 days) in male rats whose mothers were exposed to fenvalerate during gestation and lactation. Additionally, sexual behavior, fertility of adult rats, transference of fenvalerate from the mothers to the offspring and its persistence in the organism of the male descendents were investigated. For this study pregnant rats ($n=8$) were treated with technical fenvalerate (96% purity), in the dose of 40 mg/Kg, from gestational day 12 until the end of lactation (critical period for differentiation of the male reproductive system of the offspring). Control rats ($n=8$) received corn oil (vehicle), in the same experimental conditions. The reproductive development was evaluated through of the age when testicular descent and preputial separation occurred, weight of reproductive organs, plasmatic testosterone levels, numbers of germ cells in the testis and epididymis and sperm morphology. The spermatogenic process, the number of Sertoli cells, seminiferous tubule diameter and height of the germinative epithelium were also evaluated. The sexual behavior and fertility of adult rats were also evaluated by natural matings. Fenvalerate residues were quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in samples of organs and tissues of mothers, fetuses and pups. The results of the fenvalerate quantification revealed that the pyrethroid was transferred from the mothers to

the fetuses through the placenta, and to the pups by maternal milk, respectively. The pyrethroid remained in the organism of the pups until at least 40 days of age, especially in the testis and epididymis. *In utero* and lactational exposure to fenvalerate was toxic for the testis, as shown by the diminished weight of this organ in the treated groups and reduction of the sperm production at puberty, without androgen depletion or decrease of the Sertoli cell population. The morphological and morphometrical studies did not show injuries in the histological aspect of the testis or the spermatogenic process, suggesting the action of fenvalerate on the formation of seminiferous cords in the fetal testicle. At adult age there was a significant increase of the seminal vesicle weight and in the number of ejaculations, although the fertility test results were similar between control and treated groups. These effects can be a late consequence of a neuroendocrine dysregulation during the critical period of differentiation of the male reproductive system, when the exposure to fenvalerate occurred. It was concluded that fenvalerate, diluted in corn oil at the dose of 40 mg/Kg, administered to rats from the gestational day 12 until the end of lactation was transferred through the placenta and milk, provoking late effects in the reproductive development of the male offspring.

1. Introdução

Existem evidências de que a qualidade espermática humana e em outros animais tem diminuído (Jensen et al., 1995; Toppari et al., 1996; Jegou et al., 1999), paralelamente ao aumento dos problemas do trato reprodutor, tais como aumento da incidência de câncer de mama e de testículo, endometriose, criptorquidia e hipospadia. As causas para os problemas reprodutivos provavelmente são devidas a modificações ambientais que aconteceram nos últimos 50 anos, quando mudanças consideráveis ocorreram nos ambientes físico, químico, biológico e sócio-cultural. Dentre todas as possíveis causas, os agentes químicos têm sido o maior foco de atenção e, dentre estes, um grupo de compostos conhecidos como “desreguladores endócrinos” ou “xenohormônios”, assim chamados porque podem interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo (Kavlock et al., 1996). Em investigações laboratoriais esses compostos apresentaram atividades que mimetizam àquelas dos hormônios sexuais esteroidais, e que, portanto, tornam esses compostos fortes candidatos a agentes causadores da deteriorização da qualidade espermática e de desordens do trato reprodutivo (Sharpe e Skakkebaek, 1993).

Estudos animais têm relatado alterações no desenvolvimento sexual resultantes da exposição a praguicidas e químicos industriais capazes de causar desregulação do sistema endócrino por mimetismo ou bloqueio de hormônios naturais, ou por interferência em mecanismos que regulam a disponibilidade de hormônios para obtenção de resposta celular (Gray, 1998 a e b; Baker, 2001). A possibilidade da indução de distúrbios durante o período pré-natal e neonatal tem atraído especial atenção (Sharpe e Skakkebaek, 1993; Willians et al., 2001).

Inseticidas Piretróides

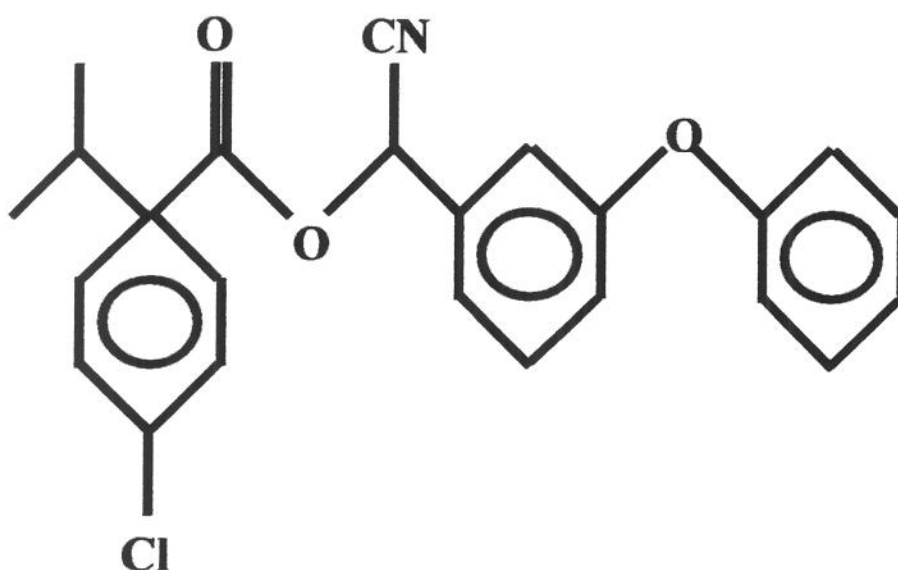
Nas últimas décadas houve um crescimento significativo na utilização de praguicidas no combate de pragas da lavoura e no combate de endo e ectoparasitas na área veterinária (Ecobichon, 1996). Apesar dos benefícios, como o aumento da produtividade agropecuária, o uso de praguicidas passou a representar um risco ao ambiente e à saúde humana e animal. Embora considerados de baixa toxicidade para o homem, em comparação a outras classes de inseticidas, a exposição aos inseticidas piretróides tem sido associada com efeitos reprodutivos agudos, bem como alterações crônicas no desenvolvimento (He et al., 1994; Miyamoto et al., 1995; Tanenbaum et al., 1998; Xiao et al., 2005).

As piretrinas naturais são ésteres de extrato seco de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Modificações físico-químicas nas estruturas das piretrinas melhoram sua estabilidade e propriedades, originando os inseticidas piretróides sintéticos (Soderlund et al., 2002). Várias formulações de praguicidas frequentemente combinam piretrinas e piretróides com outros químicos, conhecidos como sinergistas, para aumentar a potência e a persistência no ambiente. Os piretróides sintéticos podem ser divididos em dois grupos (IPCS, 1990a): do tipo I, o que não contém um radical ciano na posição alfa carboxil, como o aletrim, e os do tipo II que possuem um radical alfa ciano em sua molécula, como a cipermetrina, a deltametrina e o fenvalerato.

Os piretróides também são conhecidos por interferir com a condutância das membranas nervosas pelo prolongamento da corrente de sódio. Essa estimulação nervosa culmina em descargas repetidas causando uma hiper-excitabilidade em animais intoxicados. A Organização Mundial da Saúde (OMS) explica que piretróides têm ação neurotóxica em axônios periféricos e Sistema Nervoso Central pela interação com canais de sódio em mamíferos e/ou insetos. O modo como o organismo metaboliza essas

substâncias inclui dissolução de pontes de ésteres pela ação da esterase e oxidação de várias partes da molécula, além da indução de enzimas microsossomais hepáticas (OMS, 1990).

Os piretróides são absorvidos principalmente pelas vias oral, dérmica e inalatória. Entre eles o fenvalerato [(RS)- α -ciano-3-fenoxibenzil (RS)-2-(cloro-fenil)-3-metilbutirato] tem sido utilizado desde 1976, principalmente na agricultura, em aplicações domésticas e em programas de saúde pública (IPCS,1990b; Kolaczinski et al, 2004). A principal exposição humana ao fenvalerato se dá durante sua produção e aplicação, e, em doses baixas pelo consumo de alimentos que contenham resíduos do praguicida (IPCS, 1990b). Schettgen et al (2002) em experimento realizado em populações alemãs, demonstraram que a maior rota de exposição à piretróides, de maneira geral, ocorre via oral através da alimentação.



Fenvalerato: estrutura de piretróide tipo II.

Mandal et al. (1996) estudaram a cinética do fenvalerato em cabras após aplicação dérmica de 100 mL de uma solução 0,25% (peso/volume). O maior nível residual sanguíneo foi detectado 2 horas após aplicação (3,67 mg/L), que foi decrescendo gradualmente, sendo que 72 horas após a aplicação do produto foi detectado o menor valor residual (0,24 mg/L). Nesses mesmos animais, quatro dias após a aplicação, as maiores concentrações de fenvalerato foram encontradas na glândula adrenal, bíceps, omento, fígado, rim e cérebro, respectivamente. Bissacot & Vassilieff (1997) detectaram a presença dos inseticidas piretróides, cipermetrina, deltametrina e flumetrina, em amostras de sangue e leite de 40 vacas que foram previamente tratadas por aplicação dérmica com única dose terapêutica desses piretróides. Observou-se que os resíduos estiveram presentes no organismo dos animais até o 28º dia após as aplicações dos produtos.

Porém, são poucos os trabalhos que relatam a cinética dos piretróides no organismo. Croucher et al. (1985), em estudo com vacas lactantes, que receberam juntamente com a dieta doses orais de cipermetrina, mostraram que as maiores vias de excreção desse piretróide foram a urina e as fezes e, em menor quantidade, o leite. A persistência de piretróides no sangue e leite também foi relatada por Mandal et al. (1995) em cabras lactantes que receberam, por via intravenosa, doses únicas de cipermetrina (57 mg/kg) e fenvalerato (45 mg/kg).

Piretróides e Reprodução

São poucos os estudos que investigaram os efeitos dos piretróides sobre a reprodução e, além disso, as condições experimentais são diferentes, especialmente no que diz respeito à pureza e origem dos compostos utilizados para o tratamento dos animais (Xiao et al., 2005). Mani et al. (2002) relataram diminuição do peso dos testículos, da contagem espermática no epidídimo, da motilidade espermática e de enzimas

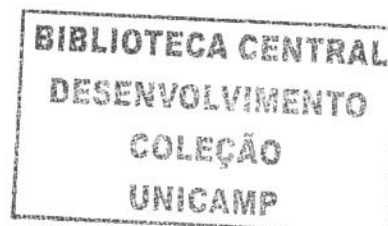
marcadoras testiculares para biossíntese de testosterona em ratos tratados com uma formulação contendo fenvalerato. Em experimento desenvolvido no nosso laboratório, ratos adultos tratados por 30 dias com fenvalerato técnico (96% de pureza), na dose diária de 40 mg/kg, apresentaram redução no peso dos órgãos reprodutores e na produção de espermatozóides pelo testículo e número de espermatozóides no epidídimo (Arena et al., 2003). Abd El-Aziz et al. (1994) demonstraram que a administração oral de 1,0 e 2,0 mg/kg de deltametrina, para ratos adultos, durante 65 dias, provocou efeitos adversos em vários parâmetros reprodutivos, tais como redução no número de espermatozóides e nos níveis plasmáticos de testosterona. Resultados semelhantes foram obtidos por Elbetieha et al. (2001) em ratos adultos tratados com cipermetrina, por 12 semanas.

No rato, o período crítico de desenvolvimento e diferenciação sexual do sistema reprodutor masculino vai do 12º. dia de gestação até o final da lactação (Sommer et al., 1996; Peterson et al., 1997; McIntyre et al., 2003). O piretróide deltametrina administrado em diferentes doses que não causaram toxicidade materna provocou, na prole masculina de ratos exposta *in utero* e durante a lactação, diminuição do peso do testículo e epidídimo e da produção espermática, sem alterar as concentrações plasmáticas de testosterona (Andrade et al., 2002). Moniz et al. (1999) demonstraram que a exposição de ratas a 10 mg/kg de fenvalerato no 18º dia de gestação e do 1º ao 5º dia de lactação, que abrange o período crítico de diferenciação sexual do cérebro, reduziu significativamente os níveis plasmáticos de testosterona e os pesos da vesícula seminal e do ducto deferente dos descendentes machos na idade adulta. Foi observado também prejuízo do comportamento sexual desses animais, indicando assim a interferência do fenvalerato na fisiologia reprodutiva de ratos machos.

Puberdade no rato macho

A puberdade é um período importante do desenvolvimento sexual, pois ocorre uma cascata de processos que levam à maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, tornando o indivíduo capaz de iniciar o ciclo reprodutivo da espécie. Durante a puberdade ocorrem mudanças no perfil hormonal, na síntese e secreção de esteróides em resposta ao aumento da pulsatilidade do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e ao aumento da síntese e secreção de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante). Esse conjunto de alterações fornece ambiente adequado para que se inicie e se estabeleça o processo da espermatogênese, levando à produção do gameta masculino (Ojeda e Urbanski, 1994). Assim, qualquer alteração nos eventos característicos desse período pode acarretar sérios prejuízos para a reprodução do indivíduo. Ainda segundo esses autores, os mecanismos que governam o início da puberdade no rato são muito melhor compreendidos nas fêmeas do que nos machos. Nos machos, as inter-relações entre o eixo hipotálamo-hipófise e as gônadas já são funcionantes desde antes do nascimento, e durante as primeiras semanas de vida pós-natal os vários processos iniciam sua sincronização.

A puberdade do rato macho tem início entre os 40 e 50 dias de idade. Aos 40 dias de idade aparecem as primeiras espermátides maduras no interior do testículo e aos 50 dias são observados espermatozóides na cauda do epidídimo. Aos 75 dias ocorre a máxima produção de gametas pelo testículo e aos 100 dias de idade é observada a máxima concentração de espermatozóides armazenados na cauda epididimária. No período compreendido entre os 75 e 100 dias de idade os animais atingem a plena maturidade sexual (Robb et al., 1978; Zanato et al., 1994).



2. Justificativa e relevância da temática

Recentemente, vários estudos *in vitro* e *in vivo* investigaram as atividades estrogênicas e anti-androgênicas de diversos piretróides. Alguns estudos demonstraram que o fenvalerato, entre outros piretróides, possui atividade estrogênica *in vitro* (Eil e Nissula, 1990; Garey e Wolff, 1998; Go et al., 1999). Em contrapartida, outros pesquisadores concluíram que os piretróides, em baixas doses, não possuem efeitos estrogênicos nem anti-androgênicos *in vitro* (Gaido et al., 1997; Nishihara et al., 2000; Saito et al., 2000 a, b; Sumida et al., 2001a, b). Kunimatsu et al. (2002), testando as doses de 20, 40 ou 80 mg/kg/dia de fenvalerato em ratos com 9 semanas de idade não encontraram atividades hormonais *in vivo*.

Assim, o tema do presente projeto, além de atual, tem uma importância aplicada grande, pois a preocupação com os danos que o homem vem causando no ambiente vem crescendo, e um dos aspectos que mais vem sofrendo com esse fato é a reprodução dos organismos, responsável pela manutenção das espécies. Um outro aspecto que justifica a realização desse trabalho é o fato de além de existirem poucos trabalhos sobre o assunto, os resultados são, algumas vezes, discrepantes.

3. Objetivo

Sabendo-se que o sistema reprodutor masculino de ratos é mais sensível ao efeito de substâncias que interferem com o controle endócrino durante as fases fetal e neonatal, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desenvolvimento reprodutivo na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual, em ratos expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação. Adicionalmente, investigou-se o comportamento sexual e a fertilidade dos ratos

adultos e a transferência do fenvalerato das mães para a prole, bem como a sua persistência no organismo dos descendentes machos.

4. Capítulo

Este trabalho deu origem ao artigo **“Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação”** que, depois de versado para o inglês, deverá ser submetido para o periódico “Reproductive Toxicology”.

Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação

Azize CC Nassr¹, Fabíola C Toledo², Carla DB Fernandez¹, Arielle C Arena¹, Suzana M Matsuoka², Ana Lúcia T Spinardi-Barbisan³, Denise Z Bissacot⁴, Wilma DG Kempinas²

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. ²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

⁴Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

Agradecimentos: À Sumitomo Chemical pelo fornecimento do fenvalerato técnico. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Mestrado para Azize CC Nassr, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelas bolsas de Iniciação Científica (IC) para Suzana M Matsuoka e de Produtividade em Pesquisa para Wilma G Kempinas. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelas bolsas de Fabíola C Toledo (IC), Carla DB Fernandez (Mestrado) e Arielle C Arena (Doutorado). À Dra. Eunice Oba, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, SP, Brasil, por ter possibilitado a realização das dosagens de testosterona.

Autor para correspondência:

Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP

Caixa Postal 510

18618-000, Botucatu, SP, Brazil

Tel: + 55 14 3811 6264; Fax: + 55 14 3811 6264

e-mail: kempinas@ibb.unesp.br

Título curto: Fenvalerato e desenvolvimento reprodutivo

Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação

Resumo

Os efeitos reprodutivos do piretróide fenvalerato, um possível desregulador endócrino, são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento reprodutivo na pré-puberdade, puberdade e idade adulta de ratos machos cujas mães foram expostas ao fenvalerato durante a prenhez e lactação. Ratas prenhes foram divididas em dois grupos de n=8 e tratadas com doses diárias de 40 mg/kg de fenvalerato ou óleo de milho (veículo), do 12º dia de prenhez até o final da lactação. O fenvalerato foi tóxico para o testículo, conforme mostrado pela diminuição dos pesos deste órgão e pela redução da produção espermática na puberdade. Na idade adulta ocorreu um aumento da concentração de testosterona plasmática, que pode ter sido uma consequência tardia de um desequilíbrio neuroendócrino durante o período crítico de diferenciação do sistema reprodutor masculino, quando ocorreu a exposição ao fenvalerato. Concluiu-se que o fenvalerato, nessas condições experimentais, provocou efeitos tardios no desenvolvimento reprodutivo de ratos machos.

Palavras-chave: desenvolvimento reprodutivo, fenvalerato, testículo, produção espermática, inseticidas piretróides, toxicologia reprodutiva masculina, puberdade, rato

Introdução

Nas últimas décadas houve um crescimento significativo na utilização de praguicidas no combate de pragas da lavoura e no combate de endo e ectoparasitas na área veterinária [1]. Apesar dos benefícios, como o aumento da produtividade agropecuária, o uso de praguicidas passou a representar um risco ao ambiente e à saúde humana e animal. Embora sejam considerados de baixa toxicidade para o homem, em comparação a outras classes de inseticidas, a exposição aos inseticidas piretróides tem sido associada com efeitos reprodutivos agudos, bem como alterações crônicas no desenvolvimento [2-5].

O fenvalerato é um inseticida piretróide sintético do tipo II, e seus efeitos reprodutivos são pouco conhecidos [5]. Além disso, os dados experimentais disponíveis são conflitantes, em parte devido às diferentes procedências e purezas do fenvalerato utilizado nos experimentos e das diferentes substâncias utilizadas como veículo de administração para os animais. Mani et al. [6] relataram diminuição do peso dos testículos, da contagem espermática no epidídimo, da motilidade espermática e de enzimas marcadoras testiculares para biossíntese de testosterona em ratos tratados com uma formulação contendo fenvalerato. Em experimento desenvolvido no nosso laboratório, ratos adultos tratados por 30 dias com fenvalerato de grau técnico, na dose diária de 40 mg/kg, apresentaram redução no peso dos órgãos reprodutores e na produção de espermatozóides pelo testículo e número de espermatozóides no epidídimo [7]. Abd El-Aziz et al. [8] demonstraram que a administração oral de 1,0 e 2,0 mg/kg de deltametrina, para ratos adultos, durante 65 dias, provocou efeitos adversos em vários parâmetros reprodutivos, tais como redução no número de espermatozóides e nos níveis plasmáticos de testosterona. Resultados semelhantes foram obtidos por Elbetieha et al. [9] em ratos adultos tratados com cipermetrina, por 12 semanas.

No rato, o período crítico de desenvolvimento e diferenciação sexual do sistema reprodutor masculino vai do 12º. dia de gestação até o final da lactação [10-12]. Estudos com animais de laboratório têm relatado alterações no desenvolvimento sexual resultantes da exposição a praguicidas e químicos industriais capazes de desregulação do sistema endócrino por mimetismo ou bloqueio de hormônios naturais, ou por interferência em mecanismos que regulam a disponibilidade de hormônios para obtenção de resposta celular [13-15]. A possibilidade da indução de distúrbios durante o período pré-natal e neonatal tem atraído especial atenção [16,17].

Recentemente, vários estudos *in vitro* e *in vivo* investigaram as atividades estrogênicas e anti-androgênicas de diversos piretróides. Alguns estudos demonstraram que o fenvalerato, entre outros piretróides, possui atividade estrogênica *in vitro* [18-20]. Em contrapartida, outros pesquisadores concluíram que os piretróides, em baixas doses, não possuem efeitos estrogênicos nem anti-androgênicos *in vitro* [21-26]. Kunimatsu et al. [27] testando as doses de 20, 40 ou 80 mg/kg/dia de fenvalerato em ratos, não encontraram atividades hormonais *in vivo*. Os resultados discrepantes levaram, em 2005, o Instituto para o Ambiente e Saúde do Reino Unido a classificar o fenvalerato como pertencente a um grupo de substâncias com fracas evidências de desregulação endócrina [28].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desenvolvimento reprodutivo na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual, em ratos expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação. Adicionalmente, investigar o comportamento sexual e a fertilidade dos ratos adultos e a transferência do fenvalerato das mães para a prole, bem como a sua persistência no organismo dos descendentes machos.

Materiais e Métodos

Animais e obtenção de fêmeas prenhes

Ratos machos Wistar adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300 g) e fêmeas adultas (60 dias de idade, pesando aproximadamente 200g), provenientes do Centro Multi-disciplinar para Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP, Campinas, SP, Brasil), foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro), temperatura (média de 23°C), umidade relativa próxima de 55% e receberam água e ração para roedores à vontade. Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (DG 0) determinado pela presença de espermatozóides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro. As ratas prenhes ou lactantes foram pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume de fenvalerato a ser administrado e a investigação de sinais clínicos de toxicidade materna. Durante o período experimental foram registrados os dados de consumos de água e ração das mães. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, mantendo-se, preferencialmente, os do sexo masculino.

Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (protocolo 094/03).

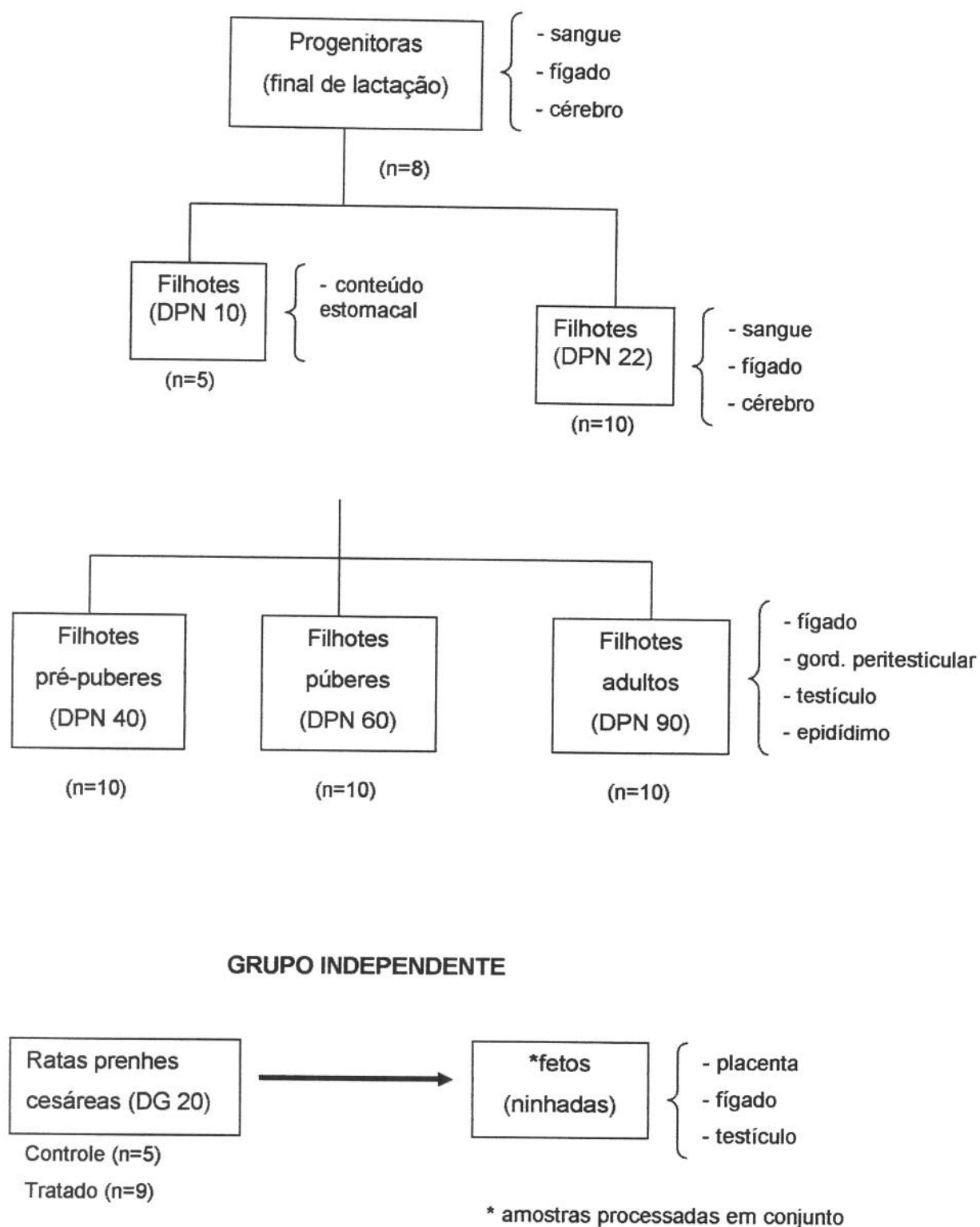
Droga, dose e via de administração

As ratas prenhes do grupo tratado (n=8) receberam fenvalerato técnico (96% de pureza, Sumitomo Chemical, Japão) na dose de 40 mg/kg/dia (2 mL/kg/dia) via oral

(gavage), do DG 12 até o dia pós-natal 21 (DPN 21). As ratas controle (n=8) receberam óleo de milho (veículo), sob mesmas as condições experimentais. Segundo Kunimatsu et al. [27], que utilizaram em seus experimentos fenvalerato, via oral, da mesma procedência, diluído no mesmo excipiente, essa dose corresponde a $1/5$ da dose letal para ratas ($DL_{50} = 200\text{mg/kg}$).

Quantificação de resíduos de fenvalerato

A presença de resíduos de fenvalerato foi investigada em diferentes tecidos e órgãos das progenitoras, fetos e filhotes, pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Precisão (Cromatógrafo Líquido modelo 480C, Instrumentos Científicos CG Ltda - SP, Brasil). Os resíduos do pesticida foram extraídos das amostras utilizando-se ácido clorídrico e acetonitrila (solvente orgânico), e purificação em coluna cromatográfica com Florisil®, n-hexano e éter dietílico. As análises cromatográficas foram obtidas por medidas quantitativas feitas pela técnica do padrão externo e pelas áreas dos picos dos cromatogramas. Os cálculos foram determinados utilizando-se a equação de regressão linear [29]. O limite de detecção do método é $0,001\mu\text{g/g}$ (μg de fenvalerato por grama de tecido analisado). Os materiais analisados foram os seguintes (Quadro1): sangue total, fígado e cérebro das progenitoras ao final da lactação (n=8, controle; n=8, tratado); placenta, fígado e testículos de fetos, retirados de ratas prenhes (n=5, controle; n=9, tratado) que foram sacrificadas no DG 20, especialmente para esse fim; conteúdo estomacal (leite) de um grupo de filhotes sacrificados no DPN 10 (n=5, controle; n=9, tratado); sangue, fígado e cérebro de filhotes no DPN 22 (n=10, controle; n=10, tratado); fígado, gordura peritesticular, testículo e epidídimo de filhotes no DPN 40, DPN 60 e DPN 90. Os órgãos foram processados separadamente, com exceção dos órgãos fetais que, devido ao tamanho reduzido, tiveram que ser processados em conjuntos, por ninhadas.



Quadro 1. Amostras analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Precisão.

Avaliação do desenvolvimento reprodutivo da prole masculina

O desenvolvimento reprodutivo foi avaliado em diferentes idades, em grupos de 10 ratos cada, sendo um a dois por ninhada: pré-puberdade (Grupo I) filhotes machos de ratas tratadas com veículo ou fenvalerato e sacrificados no DPN 40; puberdade (Grupo II), no DPN 60 e maturidade sexual (Grupo III) no DPN 90.

A fim de se confirmar a idade da instalação da puberdade, investigou-se, em 10 ratos por grupo experimental (um a dois por ninhada), a partir do DPN 15, o dia em que ocorreu a descida testicular através de palpação do escroto. A separação prepucial foi investigada nos mesmos filhotes, a partir do DPN 33, por retração manual do prepúcio.

Nas idades previstas para a eutanásia, os animais dos grupos I a III foram anestesiados com éter etílico e mortos por decapitação, entre as 7 e 10 horas da manhã, procedendo-se à coleta de sangue para posterior separação do plasma e dosagens de testosterona. O testículo e epidídimo direitos foram removidos e pesados, sendo que no caso dos grupos II e III foram congelados a -4°C para serem processados para a contagem de células germinativas. Também foram removidas e pesadas a vesícula seminal (cheia, sem a glândula coaguladora) e a próstata ventral, e em seguida descartadas. Nos três grupos experimentais o testículo e epidídimo esquerdos foram removidos e imersos em mistura fixadora de Alfac (85% de álcool 80°, 10% de formol e 5% de ácido acético) e seguiram processamento de rotina para coloração com hematoxilina e eosina (HE). Posteriormente, foram analisadas secções de 7 μm transversais do testículo e longitudinais do epidídimo.

Foram também coletados e pesados o fígado e os rins, que tiveram fragmentos fixados em formalina tamponada 10% e processados para inclusão em parafina e coloração com HE.

Determinação das concentrações plasmáticas de testosterona

O sangue dos ratos dos grupos I a III, sendo 10 ratos controles e 10 ratos tratados, um a dois por ninhada, foram coletados em tubos com heparina sódica. As amostras foram centrifugadas a 2400 rpm por 20 minutos a 4°C, o plasma foi separado e preservado à -20°C. As concentrações de testosterona plasmática foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio de duplo-anticorpo, utilizando-se o Kit Coat-A-Count Total Testosterone (DPC, Los Angeles, CA). A variação intra-ensaio foi 1,75%, e a variação inter-ensaio foi 20%.

Contagens espermáticas no testículo e epidídimo

Os números de espermátides resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) foram determinados nos testículos dos ratos púberes (DPN 60) e adultos (DPN 90) de acordo com o método descrito por Robb et al. [30], com as seguintes adaptações: o parênquima testicular foi homogeneizado em 5mL de uma mistura (STM) contendo 0,9% de cloreto de sódio, 0,05% de Triton X 100 e 0,01% de Thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Para o cálculo da produção diária de espermatozóides por testículo (PDE) o número de espermátides 19 foi dividido por 6,1, que é o número de dias que essas espermátides estão presentes no epitélio seminífero. Posteriormente, a PDE por grama de testículo foi calculada, a fim de se determinar a eficiência do processo [31]. As porções epididimárias cabeça/corpo e cauda foram processadas conforme descrito para o testículo, utilizando-se a proporção de 1mL de STM para cada 200mg de cabeça/corpo e 1mL para cada 100mg de cauda. O tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo foi calculado dividindo-se o número de espermatozóides em cada porção pela PDE.

Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia dos espermatozóides, o interior do canal deferente esquerdo dos ratos sacrificados aos 90 dias foi lavado, com auxílio de seringa e agulha, com 1,5mL de solução salina e, em seguida foram preparadas lâminas histológicas. Duzentos espermatozóides por animal foram analisados sob microscópio com contraste de fase (aumento final de 400 vezes) quanto à morfologia da cabeça e cauda [32].

Técnicas morfométricas

Os estudos morfométricos foram realizados em ensaio cego, sem que o investigador soubesse a origem do material. Para a morfometria de células de Sertoli foram obtidos cortes de testículo com 5 μ m de espessura.

Número de células de Sertoli por túbulo seminífero

Para avaliar os possíveis efeitos da exposição ao fenvalerato sobre o processo de proliferação das células de Sertoli foram contados os núcleos de células de Sertoli em cortes histológicos de testículo de ratos aos 90 dias, em 20 túbulos seminíferos por rato no estágio VII da espermatogênese, classificados de acordo com Leblond e Clermont [33].

Avaliação do processo espermatogênico

Com o objetivo de se avaliar o grau de maturação do epitélio seminífero 100 secções transversais de túbulos seminíferos por animal dos grupos I, II e III foram avaliadas ao acaso e classificadas de acordo com o tipo celular mais avançado presente no epitélio [34]: grau 1: espermátides jovens de núcleo arredondado (estágios 1 ao 8 da espermiogênese); grau 2: espermátides em fase de maturação, com núcleos ovóides ou alongados (estágios 9 ao 14 da espermiogênese); grau 3: espermátides em fase de maturação, com núcleos alongados (estágios 15 ao 18 da espermiogênese); grau 4:

espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em pequena quantidade; grau 5: espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em média quantidade e grau 6: espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em máxima quantidade. Ao final, o número de túbulos classificados em cada grau de maturidade foi multiplicado pelo grau respectivo, sendo os valores resultantes somados e posteriormente divididos por 100, resultando no “grau médio”.

Diâmetro dos túbulos seminíferos e espessura do epitélio germinativo

Nos ratos pertencentes aos grupos I a III foram determinados os diâmetros dos túbulos seminíferos e a espessura do epitélio germinativo em 10 secções de túbulos seminíferos no estágio IX da espermatogênese por animal. Para tanto foi utilizado um microscópio Leica DMLB, aumento de 200 X, e o programa Leica QWin Standard V 3.1.0 (Copyright Leica Microsystems, Imaging Solutions, United Kingdom).

Comportamento sexual

Aos 100 dias de idade (maturidade sexual), machos oriundos de ninhadas tratadas (n=10) e controles (n=10), sendo 1 a 2 por ninhada, foram avaliados quanto ao comportamento sexual. Os ratos foram colocados individualmente em uma caixa de polipropileno que permite perfeita visualização dos animais. Antes do início da avaliação cada macho foi introduzido na caixa por 10 minutos, para adaptação ao ambiente. Logo em seguida, foi introduzida uma fêmea em estro, previamente comprovado através de análise de esfregaço vaginal. O procedimento para quantificação do comportamento sexual foi baseado no método descrito por Ahlenius & Larsson [35], avaliando-se os seguintes parâmetros: presença ou não de monta nos 10 minutos subseqüentes; número de ejaculações num intervalo de 30 minutos contados a partir da primeira intromissão; latências para a primeira monta, primeira intromissão, primeira ejaculação e primeira

intromissão pós-ejaculação; número de intromissões até a primeira ejaculação. Os animais que não apresentaram monta nos 10 minutos iniciais de observação foram considerados sexualmente inativos e não foram mais testados. As fêmeas inseminadas durante o teste foram colocadas com o respectivo macho por três horas adicionais para possibilitar um número maior de ejaculações, e esse dia foi designado DG 0. A evolução da prenhez foi acompanhada até o DG 20, quando foram realizadas laparotomias, conforme descrito no item a seguir, para se avaliar a performance reprodutiva.

Testes de Fertilidade

Os ratos que não foram sexualmente ativos durante o teste de comportamento sexual foram pareados, nos dias subseqüentes, até no máximo 5 dias, com outras fêmeas receptivas. As fêmeas que apresentaram cabeças de espermatozóides no esfregaço vaginal (DG 0) foram submetidas à eutanásia e laparotomia no DG 20, para avaliação dos ovários e útero: número de corpos lúteos, implantes, reabsorções, fetos vivos e mortos, peso do útero com fetos, peso dos fetos, e posterior determinação da *taxa de gestação*: $\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes} / \text{n}^\circ \text{ de fêmeas inseminadas} \times 100$; *potencial de fertilidade*: $\text{sítios de implantação/corpos lúteos} \times 100$; *taxa de perdas pré-implantação*: $\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações} / \text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} \times 100$; *taxa de perdas pós-implantação*: $\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos} / \text{n}^\circ \text{ de implantações} \times 100$; *razão sexual*: $\text{n}^\circ \text{ de fetos machos} / \text{n}^\circ \text{ de fetos fêmeas} \times 100$.

Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM) do número de ratos usados. Para a comparação dos resultados entre os grupos controle e tratado foram utilizados o teste "t" de Student e o teste de Mann-Whitney, dependendo da

natureza da distribuição dos dados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Não foram observadas alterações de sanidade nas ratas prenhes e lactantes tratadas com 40mg/kg de fenvalerato. Da mesma forma, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado quanto à evolução do peso corporal durante o período de tratamento, e o mesmo foi observado em relação aos consumos de água e ração (resultados não mostrados). No que se refere aos sinais físicos externos do desenvolvimento sexual dos descendentes machos não houve diferença estatisticamente significativa em relação à idade média, em dias, de descida dos testículos ao escroto (ratos controles= $19,7 \pm 0,21$ e tratados= $20,3 \pm 0,21$, $n=10$, média $\pm$ Erro Padrão da Média) e da separação prepucial (ratos controles= $43,6 \pm 0,60$ e tratados= $43,3 \pm 0,37$, $n=10$).

A aplicação da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Precisão revelou a presença de resíduos de fenvalerato em amostras de tecidos e órgãos de mães, fetos e filhotes (tabela 1). A idade máxima em que foram encontrados resíduos do piretróide nos filhotes machos foi 40 dias de idade (pré-puberdade); os animais aos 60 dias de idade (puberdade) e aos 90 dias de idade (maturidade sexual) não apresentaram resíduos do piretróide. Os animais do grupo controle, cujas mães receberam óleo de milho, também não apresentaram resíduos de fenvalerato detectáveis pela metodologia utilizada, cujo limite de detecção é de $0,001 \mu\text{g/g}$ (microgramas de fenvalerato por grama de tecido).

As determinações das concentrações de testosterona no plasma, avaliadas em diferentes momentos do desenvolvimento reprodutivo, não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre animais controles e tratados, embora o valor médio para a idade de 90 dias tenha sido maior no grupo tratado em relação ao respectivo controle (figura 1). Por outro lado, houve redução dos pesos dos testículos nos grupos tratados nas três idades estudadas, embora as diferenças tenham sido estatisticamente significativas apenas aos 40 e 60 dias de idade (tabela 2). Também no grupo tratado o

peso do epidídimo foi significativamente menor aos 60 dias, e aos 90 dias houve aumento do peso da vesícula seminal. Os pesos da próstata e os pesos corporais dos ratos controles e tratados foram semelhantes nas três idades estudadas (tabela 2). O fígado e os rins dos ratos controles e tratados com fenvalerato apresentaram pesos semelhantes (resultados não mostrados).

A avaliação do processo espermatogênico em diferentes momentos do desenvolvimento reprodutivo mostrou que a exposição ao fenvalerato *in utero* e lactação não provocou diferenças significativas quanto ao grau médio de maturação das células germinativas nos túbulos seminíferos. O mesmo aconteceu em relação aos diâmetros dos túbulos seminíferos e às espessuras do epitélio germinativo. Esses resultados são apresentados na tabela 2. A morfometria das células de Sertoli no estágio VII da espermatogênese nos ratos aos 90 dias de idade revelou número semelhante entre os grupos: controle= $15,55 \pm 0,11$; tratado= $15,31 \pm 0,19$, $n=10$.

Os resultados das contagens espermáticas estão expressos na tabela 3. Aos 60 dias de idade ocorreu diminuição estatisticamente significativa da produção espermática diária (PED) por testículo e do número de espermatozóides na cabeça-corpo do epidídimo nos ratos expostos ao fenvalerato *in utero* e lactação. O cálculo da PED/g de testículo, entretanto, resultaram em valores semelhantes nos grupos controle e tratado. Aos 90 dias de idade não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

A análise morfológica dos espermatozóides extraídos do canal deferente dos ratos com 90 dias de idade mostrou que a porcentagem de formas normais (controle= 96,5%; tratados=95,5%) e anormais foram semelhantes entre os grupos.

O comportamento sexual, avaliado aos 100 dias de idade, revelou diminuição estatisticamente significativa do tempo de latência para a 1ª intromissão pós-ejaculação e aumento do número médio de ejaculações no grupo tratado (tabela 4). Em relação à performance reprodutiva, foi verificado que a taxa de gestação foi de 100% para os

grupos controle e tratado. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado em qualquer dos parâmetros avaliados (tabela 5).

A avaliação histopatológica de fígados e rins dos ratos nas diferentes fases do desenvolvimento reprodutivo não mostrou alterações que pudessem ser atribuídas à exposição ao fenvalerato. O mesmo aconteceu com relação ao aspecto morfológico do testículo e epidídimo (figuras 2 e 3).

Discussão

Há mais de 30 anos os inseticidas piretróides, dentre eles o fenvalerato, têm sido amplamente utilizados no controle de pragas domésticas e da lavoura, por serem muito potentes e, apesar da sua neurotoxicidade, serem considerados de baixa toxicidade para os mamíferos [36]. Os inseticidas piretróides respondem por cerca de $\frac{1}{4}$ do comércio mundial de inseticidas. Seres humanos e outros animais podem estar expostos ao fenvalerato durante a sua manufatura ou uso. Nos últimos anos os estudos sobre os seus efeitos reprodutivos têm se intensificado [5, 15, 37- 40].

O período crítico de diferenciação sexual em ratos ocorre, aproximadamente, entre o 12º dia de gestação até o final da lactação [10-12]. As ratas tratadas com fenvalerato durante esse período não exibiram sinais de toxicidade materna que poderiam ter interferido com o desenvolvimento da prole. As análises realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Precisão revelaram que os descendentes foram expostos ao fenvalerato através da placenta e leite materno. Em geral, as substâncias químicas com pesos moleculares menores que 600 g/mol atravessam a placenta, enquanto aquelas com pesos moleculares maiores que 1000 g/mol não o fazem [41]. Os praguicidas orgânicos têm pesos moleculares menores que 400 g/mol e podem atravessar a placenta sem dificuldade [42,43], inclusive o fenvalerato, cujo peso molecular é 419,9 (g/mol). A transferência de piretróides pelo leite, em vacas, já havia sido demonstrada por Bissacot & Vassilieff [44], por 28 dias, após única exposição dermal. Da et al. [45], em experimento com ratos, demonstrou que o piretróide cialotrina atravessa a placenta e pode causar retardo do desenvolvimento dos filhotes. A persistência do fenvalerato na prole em várias amostras de tecidos e órgãos até, pelo menos, os 40 dias (pré-puberdade), especialmente

no testículo e epidídimo, pode ter contribuído para os efeitos reprodutivos discutidos mais adiante.

A diminuição do peso dos testículos mostrou que o fenvalerato foi tóxico para esse órgão, embora os resultados das análises morfológicas e morfométricas não tenham revelado danos aparentes ao epitélio seminífero e interstício tubular. Da mesma forma, a produção espermática diária (PDE) por testículo dos ratos púberes expostos ao fenvalerato foi menor que nos controles, mas a PDE/g, que tem sido utilizada como um parâmetro mais sensível [31] foi igual nos dois grupos. Esse resultado é consistente com a ausência de efeitos sobre o número de células de Sertoli, cuja proliferação compreende, aproximadamente, do DG 16 até os DPN 14 -16 [46]. Segundo a literatura, a exposição de machos em desenvolvimento a estrógenos ambientais pode reduzir a multiplicação das células de Sertoli pela inibição da síntese e secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise fetal [47,48]. Sabe-se que a quantidade de células de Sertoli é fator determinante da produção máxima de espermátides na idade adulta [49]. Esses resultados sugerem que a exposição ao fenvalerato durante o período crítico da diferenciação sexual tenha interferido com o desenvolvimento normal das estruturas testiculares, inclusive com a formação dos cordões sexuais, precursores dos túbulos seminíferos. Alterações nos cordões seminíferos fetais foram descritas após a exposição *in utero* a fitalatos [50]. Ainda segundo esse autor, a síndrome da disgenesia testicular (i.e., desenvolvimento uterino anormal do testículo) tem sido apontada como causa do aumento, ao longo dos séculos, de distúrbios reprodutivos na espécie humana, como diminuição de parâmetros espermáticos, aumento da incidência de criptorquidia e hipospadia, e do câncer de testículo. Os testículos dos ratos adultos, controles e tratados, produziram números semelhantes de espermatozóides. Os testículos continuam a aumentar de tamanho após a puberdade [51], e é possível que a vasta produção de espermatozóides pelo testículo do rato adulto [52] possa ter compensado eventuais danos

estruturais da gônada. Andrade et al. [53] já haviam relatado redução do peso do testículo em ratos adultos expostos *in utero* e durante a lactação à deltametrina. A diminuição do peso do testículo e da produção de espermatozoides tem sido descrita em ratos adultos expostos ao fenvalerato [9,37].

Sabe-se que alguns piretróides podem ligar-se amplamente a membranas biológicas com sítio de ligação não-específico. O fenvalerato parece interagir com membranas biológicas localizando-se próximo da região da cauda hidrofóbica da cadeia lipídica, perturbando a estrutura ordenada e tornando a membrana mais fluida, o que indica que o fenvalerato pode afetar a atividade das proteínas de membrana [54, 55]. Além disso, o fenvalerato, segundo Xiao et al. [5], pode causar alterações em canais de Ca^{+2} de células germinativas, perturbando a homeostase da membrana plasmática e o fluxo de Ca^{+2} , provavelmente prejudicando o processo espermatogênico.

A determinação da concentração plasmática de testosterona, assim como as análises de peso dos órgãos sexuais, são parâmetros que permitem correlações morfofuncionais e a avaliação da integridade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, auxiliando na determinação do potencial tóxico de determinada substância química sobre o sistema reprodutor masculino. As concentrações de testosterona plasmática dos animais aos 40, 60 e 90 dias não diferiram significativamente entre controles e tratados, do ponto de vista estatístico. Entretanto, não se pode ignorar, na idade adulta, o aumento da concentração de testosterona no grupo tratado, que foi consistente com o aumento do peso da vesícula seminal e do melhor desempenho no teste de comportamento sexual. Esses resultados sugerem um efeito tardio, na idade adulta, devido a possíveis alterações neuroendócrinas provocadas pela exposição ao fenvalerato durante o período crítico do desenvolvimento reprodutivo. Andrade et al. [53], em trabalho realizado com ratos machos expostos à deltametrina em condições experimentais semelhantes, relataram efeitos prejudiciais do piretróide somente na idade adulta.

Esses resultados diferem dos obtidos por Moniz et al. [56] que observaram diminuição das concentrações plasmáticas de testosterona, do peso úmido da vesícula seminal sem secreção e do número de ejaculações em ratos adultos expostos a 10 mg/kg de fenvalerato, diluído em solução salina, no DG 18 e DPN 1–5, que corresponde ao período crítico de diferenciação sexual do cérebro [57]. Sabe-se que esse processo é dependente da metabolização da testosterona, originando estrógeno no SNC [58]. A secreção da testosterona é dependente das gonadotrofinas, cuja produção e liberação são reguladas pelo GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas [59, 60]. Piretróides sintéticos do tipo II, como a deltametrina e o fenvalerato, podem interagir com o sítio de picrotoxina do complexo receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), inibindo a neurotransmissão GABAérgica. Este efeito prejudicaria a liberação de GnRH e de gonadotrofinas, alterando o balanço hormonal do desenvolvimento masculino, pois o GABA, ao contrário do seu papel como um neurotransmissor predominantemente inibitório no cérebro adulto, exerce uma ação excitatória para o desenvolvimento do hipotálamo do recém-nascido [61].

No presente trabalho a exposição *in utero* e lactacional ao fenvalerato não interferiu com a “masculinização” dos filhotes, ou seja, a instalação de características típicas de macho. Nos mamíferos, o período perinatal é um momento de intenso crescimento e diferenciação do sistema reprodutor e também de outros órgãos, como a hipófise e o hipotálamo, que regulam o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutores masculinos. A exposição aos desreguladores endócrinos durante esse período crítico pode afetar a proliferação celular e alterar a citodiferenciação, morfogênese, responsividade hormonal, expressão gênica e função dos órgãos reprodutores masculinos [11].

A idade da descida testicular ao escroto e a separação prepucial são indicativas do início da puberdade e dependentes da secreção de andrógenos [62, 63]. A exposição

in utero e lactacional ao fenvalerato não provocou diferenças nas idades em que esses sinais físicos externos do desenvolvimento sexual aconteceram, concordando com as concentrações normais de testosterona. Resultados semelhantes foram registrados por Andrade et al. [53] em ratos expostos, em condições parecidas, à deltametrina.

A exposição *in utero* e lactacional ao fenvalerato não alterou a fertilidade dos ratos adultos. Esses resultados devem estar relacionados com a ausência de efeitos sobre a produção espermática e a morfologia dos espermatozóides.

Concluiu-se que o fenvalerato, diluído em óleo de milho, na dose de 40 mg/kg, administrado para ratas do 12º. dia de prenhez até o final da lactação, foi transferido pela placenta e pelo leite materno, provocando efeitos tardios no desenvolvimento reprodutivo da prole masculina. O fenvalerato foi tóxico para o testículo, e pode ter interferido com o desenvolvimento inicial deste órgão, provocando diminuição da produção de espermatozóides na puberdade sem, no entanto, interferir com a eficiência do processo espermatogênico. Na idade adulta houve aumento significativo do peso da vesícula seminal com secreção e do número de ejaculações, devido a possíveis alterações neuroendócrinas provocadas pela exposição ao fenvalerato durante o período crítico do desenvolvimento reprodutivo. Estudos adicionais precisam ser realizados para se elucidar os mecanismos pelos quais o fenvalerato exerce a sua ação tóxica sobre o testículo e os seus efeitos tardios sobre o desenvolvimento reprodutivo de ratos.

Referências

- [1] Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen, C. D. Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. New York: McGraw-Hill. 1996;643-89.
- [2] He F. Synthetic pyrethroids. Toxicology. 1994;17,91(1):43-9.
- [3] Miyamoto J, Kaneko H, Tsuji R, Okuno Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. Toxicol Lett. 1995;82-83:933-40.
- [4] Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;26,95(11):5998-6003.
- [5] Xiao H, Zhang XC, Zhang L, Dai XQ, Gong W, Cheng J, Gao R, Wang X. Fenvalerate modifies T-type Ca^{2+} channels in mouse spermatogenic cells. Reprod Toxicol. 2005; [Epub ahead of print]
- [6] Mani U, Islam F, Prasad AK, Kumar P, Suresh Kumar V, Maji BK, Dutta KK. Steroidogenic alterations in testes and sera of rats exposed to formulated Fenvalerate by inhalation. Hum Exp Toxicol. 2002;21(11):593-7.
- [7] Arena AC, Terneux E, Kempinas WG. Parâmetros reprodutivos de ratos adultos expostos ao inseticida piretróide fenvalerato. In: Resumos do Congresso de Integração em Biologia da Reprodução; Ribeirão Preto, SP; resumo RMA.03. 2003; 258.

- [8] Abd el-Aziz MI, Sahlab AM, Abd el-Khalik M. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1994;101(6):230-2.
- [9] Elbetieha A, Da'as SI, Khamas W, Darmani H. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001;41(4):522-8.
- [10] Sommer RJ, Ippolito DL, Peterson RE. In utero and lactational exposure of the male Holtzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;140(1):146-53.
- [11] Peterson RE, Cooke PS, Kelce WR, Gray LE Jr. Environmental endocrine disruptors. In: Boekelheide K, Chapin RE, Hoyer PB, Harris C, editors. *Comprehensive Toxicology*, Vol. 10: Reproductive and Endocrine Toxicology. New York: Pergamon, 1997:181.
- [12] McIntyre BS, Vancutsem PM, Treinen KA, Morrissey RE. Effects of perinatal loratadine exposure on male rat reproductive organ development. *Reprod Toxicol.* 2003;17(6):691-7.
- [13] Gray LE Jr. Xenoendocrine disruptors: laboratory studies on male reproductive effects. *Toxicol Lett.* 1998a;28,102-103:331-5.
- [14] Gray LE Jr. Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol Lett.* 1998b;28,102-103:677-80.

- [15] Baker VA. Endocrine disrupters-testing strategies to assess human hazard. *Toxicol In Vitro*. 2001;15(4-5):413-9.
- [16] Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993;29,341(8857):1392-5.
- [17] Williams K, McKinnell C, Saunders PT, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe M. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update*. 2001;7(3):236-47.
- [18] Eil C, Nisula BC. The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. *J Steroid Biochem*. 1990;35(3-4):409-14.
- [19] Garey J, Wolff MS. Estrogenic and antiprogestagenic activities of pyrethroid insecticides. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;29,251(3):855-9.
- [20] Go V, Garey J, Wolff MS, Pogo BG. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Health Perspect*. 1999;107(3):173-7.

- [21] Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;143(1):205-12.
- [22] Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J Health Sci.* 2000;46:282-98.
- [23] Saito K, Sumida N, Ohe N, Tomigahara Y, Isobe N, Nakatsuka I, Kaneko H. Evaluation of agonistic and antagonistic effects of several chemicals, mainly pyrethroid insecticides, using three in vitro assays with human estrogen, androgen or progesterone receptor mediated mechanisms. *Toxicologist* 2000a;54:274.
- [24] Saito K, Tomigahara Y, Ohe N, Isobe N, Nakatsuka I, Kaneko H. Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms. *Toxicol Sci.* 2000b;57(1):54-60.
- [25] Sumida K, Ooe N, Nagahori H, Saito K, Isobe N, Kaneko H, Nakatsuka I. An in vitro reporter gene assay method incorporating metabolic activation with human and rat S9 or liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001a;12,280(1):85-91.
- [26] Sumida K, Saito K, Ooe N, Isobe N, Kaneko H, Nakatsuka I. Evaluation of in vitro methods for detecting the effects of various chemicals on the human progesterone receptor, with a focus on pyrethroid insecticides. *Toxicol Lett.* 2001b;3,118(3):147-55.

- [27] Kunimatsu T, Yamada T, Ose K, Sunami O, Kamita Y, Okuno Y, Seki T, Nakatsuka I. Lack of (anti-) androgenic or estrogenic effects of three pyrethroids (esfenvalerate, fenvalerate, and permethrin) in the Hershberger and uterotrophic assays. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2002;35:227-37.
- [28] IEH (2005) Chemicals Purported to be Endocrine Disrupters: a Compilation of Published Lists (Web Report W20), Leicester, UK, MRC Institute for Environment and Health, available at <http://www.le.ac.uk/ieh/>
- [29] Bissacot DZ, Vassiliev I. HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin, and cyhalothrin residues in the milk and blood of lactating dairy cows. *J Anal Toxicol*. 1997;21(5):397-402.
- [30] Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*. 1978;54(1):103-7.
- [31] Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci*. 2003;74(1):129-38.
- [32] Filler Ron. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: Chapin RE, Jerrold JH, editors. *Male Reproductive Toxicology. Methods in Toxicology*: Academic Press. 1993;3:334-43.

- [33] Leblond CP, Clermont Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am J Anat.* 1952 Mar;90(2):167-215.
- [34] Lamano Carvalho TL, Guimarães MA, Kempinas WG, Petenunci SO, Rosa e Silva AAM. Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats. *Andrologia* 1996;28:117-22.
- [35] Ahlenius S, Larsson K. Apomorphine and haloperidol-induced effects on male rat sexual behavior: no evidence for actions due to stimulation of central dopamine autoreceptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 1984;21(3):463-6.
- [36] Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect.* 2005;113(2):123-36.
- [37] Hu JY, Wang SL, Zhao RC, Yang J, Chen JH, Song L, Wang XR. Effects of fenvalerate on reproductive and endocrine systems of male rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2002;8(1):18-21.
- [38] Chen JF, Chen HY, Liu R, He J, Song L, Bian Q, Xu LC, Zhou JW, Xiao H, Dai GD, Wang XR. Effects of fenvalerate on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Biomed Environ Sci.* 2005;18(2):108-16.

- [39] Moniz AC, Cruz-Casallas PE, Salzgeber SA, Varoli FM, Spinosa HS, Bernardi MM. Behavioral and endocrine changes induced by perinatal fenvalerate exposure in female rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2005;27(4):609-14.
- [40] Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Song L, Wang XR. Androgen receptor activities of p,p'-DDE, fenvalerate and phoxim detected by androgen receptor reporter gene assay. *Toxicol Lett*. 2005 Aug 24; [Epub ahead of print]
- [41] Mirkin BL. Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther*. 1973;14(4):643-7.
- [42] Benjaminov O, Hoffer E, Taitelman U, Urbach J, Brandes JM. Parathion transfer and acetylcholinesterase activity in an in-vitro perfused term human placenta. *Vet Hum Toxicol*. 1992;34(1):10-2.
- [43] Klys M, Kosun J, Pach J, Kamenczak A. Carbofuran poisoning of pregnant woman and fetus per ingestion. *J Forensic Sci*. 1989;34(6):1413-6.
- [44] Bissacot DZ, Vassilieff I. Pyrethroid residues in milk and blood of dairy cows following single topical applications. *Vet Hum Toxicol*. 1997;39(1):6-8.
- [45] Gomes Mda S, Bernardi MM, Spinosa Hde S. Pyrethroid insecticides and pregnancy: effect on physical and behavioral development of rats. *Vet Hum Toxicol*. 1991;33(4):315-7.
- [46] Marty MS, Chapin RE, Parks LG, Thorsrud BA. Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003;68(2):125-36.

- [47] Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect.* 1996;104 Suppl 4:741-803.
- [48] Sweeney T, Nicol L, Roche JF, Brooks AN. Maternal exposure to octylphenol suppresses ovine fetal follicle-stimulating hormone secretion, testis size, and sertoli cell number. *Endocrinology.* 2000;141(7):2667-73.
- [49] Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E & Neill JD. *The Physiology of Reproduction*, 2nd, New York: Raven Press. 1994;1363-434.
- [50] Foster PM. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl.* 2005; [Epub ahead of print]
- [51] Setchell BP. Spermatogenesis. In: *The Mammalian Testis*. Ithaca: Cornell University Press. 1978;181-232.
- [52] Blazak WF, Ernst TL, Stewart BE. Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1985;5(6 Pt 1):1097-103.

- [53] Andrade AJ, Araujo S, Santana GM, Ohi M, Dalsenter PR. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2002;36(3):310-7.
- [54] Lombet A, Mourre C, Lazdunski M. Interaction of insecticides of the pyrethroid family with specific binding sites on the voltage-dependent sodium channel from mammalian brain. *Brain Res*. 1988;30,459(1):44-53.
- [55] Sarkar SN, Balasubramanian SV, Sikdar SK. Effect of fenvalerate, a pyrethroid insecticide on membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta*. 1993;8,1147(1):137-42.
- [56] Moniz AC, Cruz-Casallas PE, Oliveira CA, Lucisano A, Florio JC, Nicolau AA, Spinosa HS, Bernardi MM. Perinatal fenvalerate exposure: behavioral and endocrinology changes in male rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1999;21(5):611-8.
- [57] Yasuhara F, Kempinas WG, Pereira OC. Reproductive and sexual behavior changes in male rats exposed perinatally to picrotoxin. *Reprod Toxicol*. 2005;19(4):541-6.
- [58] Rhoda J, Corbier P, Roffi J. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 beta-estradiol. *Endocrinology*. 1984;114(5):1754-60.
- [59] Baram T, Koch Y, Hazum E, Fridkin M. Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science*. 1977;21,198(4314):300-2.

- [60] Kacsoh B, Nagy G, Veress Z, Toth BE, Kanyicska B, Csemus V, Koves K. Data suggesting that milk of early lactation period might be involved in sexual differentiation of rat brain. *Endocrinol Exp.* 1986;20(2-3):155-66.
- [61] McCarthy MM, Davis AM, Mong JA. Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Res Bull.* 1997;44(4):487-95.
- [62] Rajfer J, Walsh PC. Hormonal regulation of testicular descent: experimental and clinical observations. *J Urol.* 1977;118(6):985-90.
- [63] US Environmental Protection Agency (EPA) 1996. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009 Washington DC.

Tabela 1. Quantificação de resíduos de fenvalerato por Cromatografia Líquida de Alta Precisão em amostras de órgãos e tecidos de ratos expostos ao fenvalerato.

Amostras (µg/g)	^A Fetos (DG 20)	Progenitoras (DPN 22)	Filhotes (DPN 10)	Filhotes (DPN 22)	Filhotes pré-puberes (DPN 40)
Placentas	0,018	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sangue	n.a.	0,014 ± 0,006 (5/8)	n.a.	0,004 ± 0,002 (9/10)	n.a.
Fígado	0,006	0,011 ± 0,004 (7/8)	n.a.	0,659 ± 0,445 (6/10)	0,009 ± 0,002 (5/10)
Cérebro	n.a.	0,084 ± 0,035 (6/8)	n.a.	0,089 ± 0,060 (5/10)	n.a.
Conteúdo estomacal (leite)	n.a.	n.a.	0,083 ± 0,036 (4/5)	n.a.	n.a.
Gordura peritesticular	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,570 ± 0,095 (5/10)
Testículo	0,145	n.a.	n.a.	n.a.	0,102 ± 0,046 (6/10)
Epidídimo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,465 ± 0,048 (2/10)

Os números entre parênteses indicam a proporção de amostras que apresentaram níveis detectáveis do piretróide e o número total de amostras analisadas. O limite de detecção do método foi de 0,001 µg/g. Valores expressos pela média ± EPM, com exceção dos ^Aresultados fetais, que foram obtidos através do processamento de conjuntos de órgãos. n.a.= amostra não avaliada.

Tabela 2. Peso corpóreo final, peso absoluto dos órgãos reprodutores, diâmetro dos túbulos seminíferos, altura e grau médio de maturação do epitélio seminífero, durante o desenvolvimento reprodutivo de ratos machos, controles e tratados com fenvalerato *in utero* e lactação.

	40 dias (n=10)		60 dias (n=10)		90 dias (n=10)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Peso corpóreo (g)	159,70 ± 4,49	145,8 ± 4,36	267,00 ± 6,63	257,50 ± 5,68	346,30 ± 8,91	357,90 ± 8,53
Testículo (g)	0,831 ± 0,01	0,753 ± 0,03*	1,561 ± 0,04	1,422 ± 0,04*	1,841 ± 0,03	1,709 ± 0,07
Epidídimo (mg)	78,00 ± 4,42	80,00 ± 4,22	252,20 ± 6,05	230,90 ± 8,10*	472,82 ± 12,61	453,27 ± 11,64
Próstata (mg)	53,00 ± 5,17	54,00 ± 3,40	135,00 ± 7,83	127,10 ± 6,12	233,90 ± 10,36	238,36 ± 15,83
Vesícula seminal (mg)	38,00 ± 4,90	29,00 ± 1,79	362,80 ± 17,74	327,22 ± 16,53	781,35 ± 36,04	948,50 ± 52,16*
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	204,1 ± 5,89	207,0 ± 4,07	251,1 ± 5,19	243,8 ± 3,90	310,8 ± 21,45	298,0 ± 21,39
Altura de epitélio seminífero (µm)	58,51 ± 2,01	61,21 ± 1,28	71,92 ± 1,19	68,95 ± 1,16	93,05 ± 7,24	87,67 ± 6,99
Grau médio da espermatogênese	2,03 ± 0,03	1,92 ± 0,09	3,30 ± 0,07	3,29 ± 0,05	3,67 ± 0,07	3,57 ± 0,03

Valores expressos pela média ± EPM. * $p < 0,05$, Teste "t" de Student.

Tabela 3. Produção espermática diária (absoluta e relativa), número de espermatozóides no testículo e epidídimo e tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo, de ratos aos 60 dias (puberdade) e 90 dias de idade (maturidade sexual), controles e tratados com fenvelerato *in utero* e durante a lactação.

	60 dias (n=10)		90 dias (n=10)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Testículo				
Produção espermática diária (X 10 ⁶) /testículo	28,64 ± 0,55	24,22 ± 0,65**	38,96 ± 1,02	38,12 ± 0,99
Produção espermática diária (X 10 ⁶) /g testículo	19,03 ± 0,45	18,39 ± 0,61	25,49, ± 0,50	27,90 ± 1,25
Número de espermatozóides (X 10 ⁶) / testículo	174,74 ± 3,37	147,77 ± 3,96**	237,65 ± 6,20	228,72 ± 6,71
Cabeça/corpo do epidídimo				
Número de espermatozóides (X 10 ⁶)	53,78 ± 4,67	38,67 ± 2,46*	109,96 ± 6,69	102,91 ± 9,89
Número de espermatozóides (X 10 ⁶) / g	341,00 ± 21,55	278,63 ± 18,50*	503,81 ± 26,54	480,83 ± 42,66
Trânsito espermático (dias)	1,9 ± 0,19	1,62 ± 0,14	2,86 ± 0,21	2,72 ± 0,28
Cauda do epidídimo				
Número de espermatozóides (X 10 ⁶)	32,33 ± 2,73	24,73 ± 2,46	214,07 ± 14,91	208,70 ± 20,67
Número de espermatozóides (X 10 ⁶) /g	419,75 ± 31,05	358,00 ± 32,23	1112,0 ± 27,02	1142,5 ± 133,14
Trânsito espermático (dias)	1,14 ± 0,09	1,02 ± 0,09	5,50 ± 0,36	5,46 ± 0,50

Valores expressos pela média ± EPM. * p < 0,05, ** p < 0,01, Teste "t" de Student.

Tabela 4. Comportamento sexual em ratos machos aos 100 dias de idade, controles e expostos ao fenvelerato *in utero* e durante a lactação.

	CONTROLE	TRATADO
Latência da 1ª monta	135,90 ± 35,74 (10/10)	80,20 ± 9,60 (10/10)
Latência da 1ª intromissão	121,90 ± 32,68 (10/10)	171,90 ± 35,93 (10/10)
Número de intromissões	34,30 ± 6,11 (10/10)	23,40 ± 2,70 (10/10)
Latência da 1ª ejaculação	1155,75 ± 130,26 (8/10)	898,55 ± 113,24 (9/10)
1ª intromissão pós-ejaculação	1376,14 ± 117,15 (7/10)	1168,55 ± 114,54 (9/10)
Latência da 1ª intromissão pós-ejaculação	308,71 ± 13,16 (7/10)	270,00 ± 11,36* (9/10)
Número de intromissões pós- ejaculação	18,43 ± 3,82 (7/10)	14,56 ± 1,65 (9/10)
Número de ejaculações	1,63 ± 0,32 (8/10)	2,89 ± 0,35* (9/10)

Os valores estão expressos em média ± EPM. *p < 0,05, Teste "t" de Student. Os tempos de latência estão expressos em segundos. Os números entre parênteses indicam a relação entre o número de ratos que apresentaram o comportamento e o número total de ratos.

Tabela 5. Testes de fertilidade realizados com ratos machos adultos (100 dias) controles e expostos ao fenvelerato *in utero* e durante a lactação.

	CONTROLE (n=10)	TRATADO (n=10)
Peso final da rata (g)	325,15 ± 5,01	334,64 ± 7,28
Peso do útero com fetos (g)	52,69 ± 2,87	57,59 ± 2,21
Número de corpos lúteos	12,40 ± 0,40	12,70 ± 0,34
Número de implantes	11,50 ± 0,54	12,30 ± 0,37
Número de reabsorções	1,33 ± 0,33	1,33 ± 0,21
Número de fetos vivos	10,8 ± 0,61	11,60 ± 0,43
Peso dos fetos (g)	2,82 ± 0,01	2,86 ± 0,04
^A Razão sexual (%)	77,38	50,00
^A Potencial de fertilidade (%)	88,69	92,31
^A Perdas pré-implantação (%)	11,31	7,69
^A Perdas pós-implantação (%)	10,00	9,10

Os valores estão expressos em média ± EPM. Teste "t" de Student (p>0,05). ^ATeste de Mann-Whitney, valores expressos em mediana.

Legendas

Figura 1. Concentrações de testosterona plasmática em ratos com 40, 60 e 90 dias de idade, pertencentes aos grupos controle (n=10 por idade) e tratado (n=10 por idade), cujas mães foram expostas ao fenvalerato do 12º dia de prenhez até o final da lactação. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $p > 0,05$, Teste "t" de Student.

Figura 2. Fotomicrografias ilustrativas de cortes transversais de túbulos seminíferos de ratos. **A:** 40 dias de idade (pré-puberdade), onde se observa **a:** epitélio germinativo em fase de maturação apresentando espermatídes jovens de núcleo arredondado; **B:** 60 dias de idade (puberdade) onde se observa **b:** epitélio germinativo com espermatídes maduras em média quantidade; **C:** 90 dias de idade (maturidade sexual) onde se observa **c:** epitélio germinativo com espermatídes maduras em espermição. Aumento 200X, coloração H.E.

Figura 3. Fotomicrografias ilustrativas de cortes longitudinais da região da cauda do epidídimo de ratos. **A:** (200X) 40 dias de idade (pré-puberdade) onde se observa **a:** ducto epididimário sem células germinativas; **B:** (200X) 60 dias de idade (puberdade) onde se observa **b:** ducto epididimário com espermatozóides na luz; **C:** (100X) 90 dias de idade (maturidade sexual) onde se observa **c:** ducto epididimário com grande quantidade de espermatozóides. Coloração H.E.

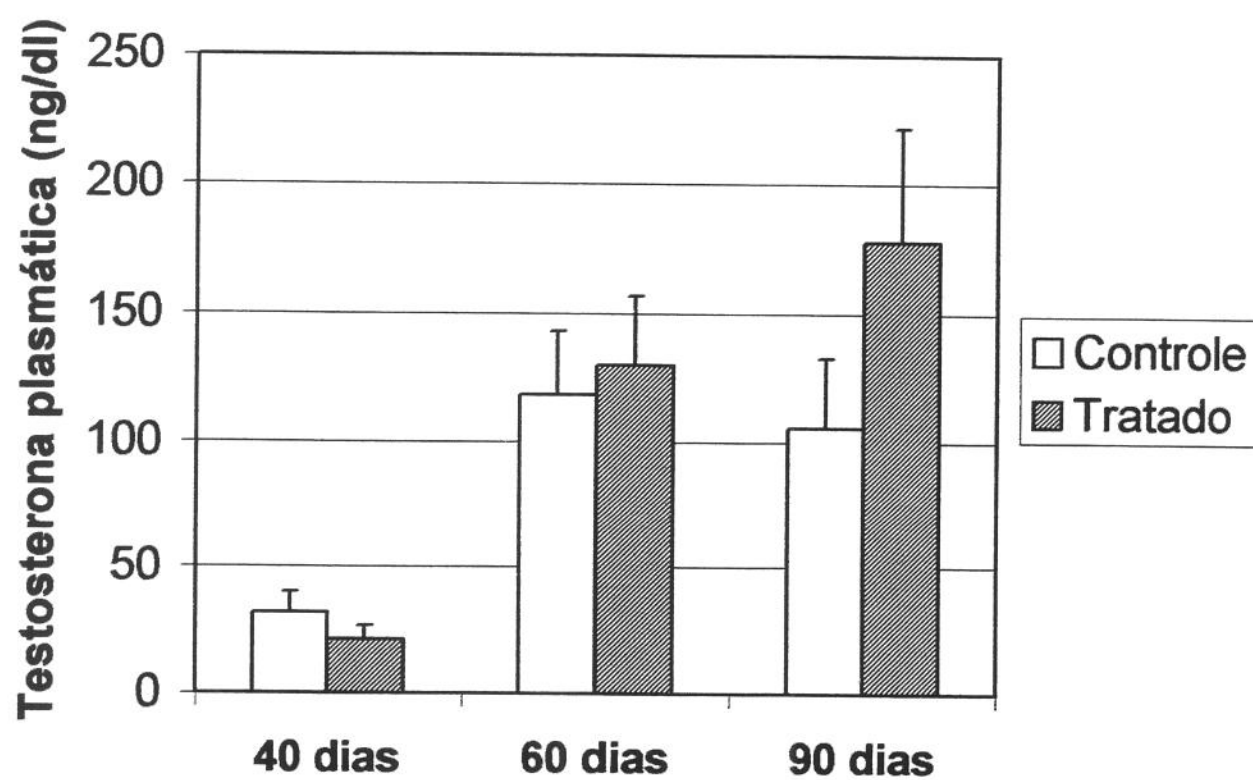
Figura 1

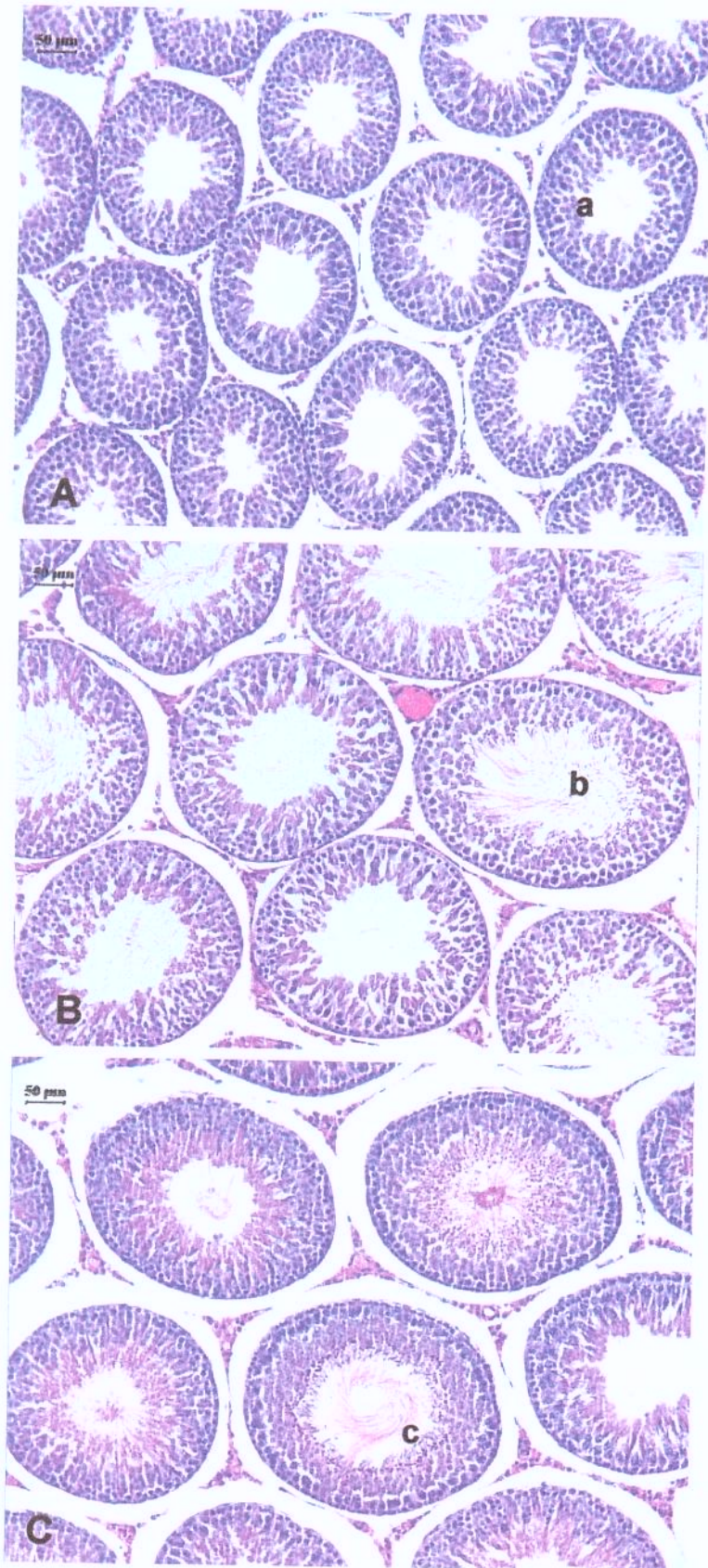
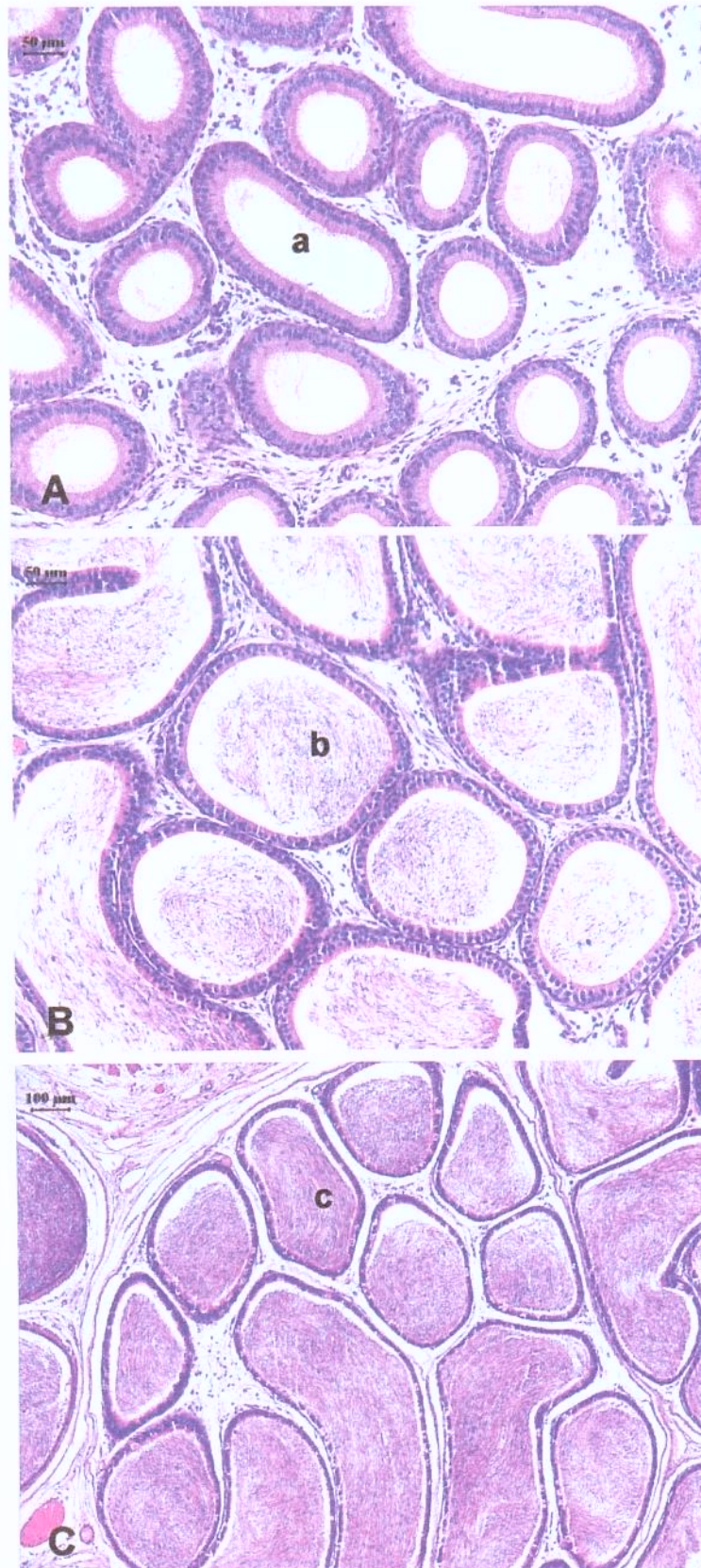
Figura 2

Figura 3

Conclusões Finais

Concluiu-se que o fenvalerato, diluído em óleo de milho, na dose de 40 mg/Kg, administrado para ratas do 12º. dia de prenhez até o final da lactação, foi transferido pela placenta e pelo leite materno, provocando efeitos tardios no desenvolvimento reprodutivo da prole masculina. O fenvalerato foi tóxico para o testículo e pode ter interferido com o desenvolvimento inicial deste órgão, provocando diminuição da produção de espermatozóides na puberdade sem, no entanto, interferir com a eficiência do processo espermatogênico. Na idade adulta houve aumento significativo do peso da vesícula seminal e do número de ejaculações, que podem ter sido conseqüências de uma interferência do fenvalerato com mecanismos neuroendócrinos na fase de maior sensibilidade do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino.

Referências da Introdução

Abd El-Aziz MI, Sahlab AM, Abd el-Khalik M. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1994;101(6):230-2.

Andrade AJ, Araujo S, Santana GM, Ohi M, Dalsenter PR. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2002;36(3):310-7.

Arena AC, Temeux E, Kempinas WG. Parâmetros reprodutivos de ratos adultos expostos ao inseticida piretróide fenvalerato. In: *Resumos do Congresso de Integração em Biologia da Reprodução*; Ribeirão Preto, SP; resumo RMA.03. 2003;258.

Baker VA. Endocrine disrupters: testing strategies to assess human hazard. *Toxicol in vitro.* 2001;15:413-9.

Bissacot DZ, Vassilieff I. HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin, and cyhalothrin residues in the milk and blood of lactating dairy cows. *J Anal Toxicol.* 1997;21(5):397-402.

Croucher A, Hutson DH, Stoydin G. Excretion and residues of the pyrethroid insecticide cypermethrin in lactating cows. *Pestic Sci.* 1985;16:287-301.

Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen, C. D. Casarett & Doull's *Toxicology. The Basic Science of Poisons.* New York: McGraw-Hill. 1996;643-89.

Eil C, Nisula BC. The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. *J Steroid Biochem.* 1990;35(3-4):409-14.

Elbetieha A, Da'as SI, Khamas W, Darmani H. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001;41(4):522-8.

Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;143(1):205-12.

Garey J, Wolff MS. Estrogenic and antiprogestagenic activities of pyrethroid insecticides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;29,251(3):855-9.

Go V, Garey J, Wolff MS, Pogo BG. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Health Perspect.* 1999;107(3):173-7.

Gray LE Jr. Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects. *Toxicol Lett.* 1998a;28,102-103:331-5.

Gray LE Jr. Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol Lett.* 1998b;28,102-103:677-80.

He F. Synthetic pyrethroids. *Toxicology*. 1994;17,91(1):43-9.

IPCS-International Program on Chemical Safety. Environmental health criteria 97. Deltamethrin. Geneva; World Health Organization. 1990a.

IPCS-International Program on Chemical Safety. Environmental health criteria 95. Fenvalerate. Geneva; World Health Organization. 1990b.

Jégou B, Auger J, Multigner L. The saga of the sperm count decrease in humans and wild and farm animals. In: *The Male Gamete: from Basic to Clinical Applications*. Chapter 41. Gagnon (Ed) Cache River Press. 1999;445-54.

Jensen TK, Toppari J, Keiding N, Skakkebaek NE. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin Chem*. 1995;41:1896-901.

Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 1996;104 Suppl 4:715-40.

Kolaczinski JH, Curtis CF. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(5):697-706.

Kunimatsu T, Yamada T, Ose K, Sunami O, Kamita Y, Okuno Y, Seki T, Nakatsuka I. Lack of (anti-) androgenic or estrogenic effects of three pyrethroids (esfenvalerate, fenvalerate, and permethrin) in the Hershberger and uterotrophic assays. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2002;35:227-37.

Mandal TK, Chakraborty AK, Bhattacharya A. Disposition kinetics of cypermethrin and fenvalerate in black bengal goats. *Pestic Sci* 1995;45:215-9.

Mandal TK, Chakraborty AK, Bhattacharya A, Ghosh RK, Majumder S. The disposition kinetics and residues of fenvalerate in tissues following a single dermal application to black Bengal goats. *Vet Res Commun*. 1996;20(3):265-72.

Mani U, Islam F, Prasad AK, Kumar P, Suresh Kumar V, Maji BK, Dutta KK. Steroidogenic alterations in testes and sera of rats exposed to formulated Fenvalerate by inhalation. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(11):593-7.

McIntyre BS, Vancutsem PM, Treinen KA, Morrissey RE. Effects of perinatal loratadine exposure on male rat reproductive organ development. *Reprod Toxicol*. 2003;17(6):691-7.

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

Moniz AC, Cruz-Casallas PE, Oliveira CA, Lucisano A, Florio JC, Nicolau AA, Spinosa HS, Bernardi MM. Perinatal fenvalerate exposure: behavioral and endocrinology changes in male rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1999;21(5):611-8.

Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J Health Sci.* 2000;46:282-98.

Ojeda SR, Urbanski HF. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press 1994:363-409.

Peterson RE, Cooke PS, Kelce WR, Gray LE Jr. Environmental endocrine disruptors. In: K, Boekelheide K, Chapin RE, Hoyer PB, Harris C, editors. *Comprehensive Toxicology*, Vol. 10: Reproductive and Endocrine Toxicology. New York: Pergamon, 1997:181.

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

Saito K, Sumida N, Ohe N, Tomigahara Y, Isobe N, Nakatsuka I, Kaneko H. Evaluation of agonistic and antagonistic effects of several chemicals, mainly pyrethroid insecticides, using three in vitro assays with human estrogen, androgen or progesterone receptor mediated mechanisms. *Toxicologist* 2000a;54:274.

Saito K, Tomigahara Y, Ohe N, Isobe N, Nakatsuka I, Kaneko H. Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms. *Toxicol Sci.* 2000b;57(1):54-60.

Schettgen T, Heudorf U, Drexler H, Angerer J. Pyrethroid exposure of the general population-is this due to diet. *Toxicol Lett.* 2002;5,134(1-3):141-5.

Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993;29,341(8857):1392-5.

Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. 2002;1,171(1):3-59.

Sommer RJ, Ippolito DL, Peterson RE. In utero and lactational exposure of the male Holtzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;140(1):146-53.

Sumida K, Ooe N, Nagahori H, Saito K, Isobe N, Kaneko H, Nakatsuka I. An in vitro reporter gene assay method incorporating metabolic activation with human and rat S9 or liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001a;12,280(1):85-91.

Sumida K, Saito K, Ooe N, Isobe N, Kaneko H, Nakatsuka I. Evaluation of in vitro methods for detecting the effects of various chemicals on the human progesterone receptor, with a focus on pyrethroid insecticides. *Toxicol Lett*. 2001b;3,118(3):147-55.

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;26,95(11):5998-6003.

Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect.* 1996;104 Suppl 4:741-803.

Williams K, McKinnell C, Saunders PT, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe M. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update.* 2001;7(3):236-47.

World Health Organization (OMS). d-Phenothrin. *Environmental Health Criteria.* Geneva 1990.

Xiao H, Zhang XC, Zhang L, Dai XQ, Gong W, Cheng J, Gao R, Wang X. Fenvalerate modifies T-type Ca(2+) channels in mouse spermatogenic cells. *Reprod Toxicol.* 2005; [Epub ahead of print]

Zanato VF, Martins MP, Anselmo-Franci JA, Petenusci SO, Lamano-Carvalho TL. Sexual development of male Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(5):1273-80.