

FABIANE FERNANDES TRAMUJAS

AVALIAÇÃO DE
EFEITOS REPRODUTIVOS
DE DOSES SUBLETAIS DE
DELTAMETRINA
EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*).

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

Orientador: Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis.

CURITIBA
2005

AGRADECIMENTOS

À Deus por me sustentar e suprir em todas as necessidades.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e incentivo durante toda a minha trajetória.

A Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis pela orientação, paciência, apoio e estímulo para finalizar o trabalho.

Aos meus funcionários e clientes que entenderam a minha ausência na clínica.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia pela contribuição que me deram.

Ao Professor Luis Fernando Favaro do Departamento de Biologia Celular da UFPR pela amizade, paciência e ajuda.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram com apoio, compreensão e amizade.

EPIGRAFE

**“ Sou grato para com aquele que me fortaleceu, Cristo Jesus, nosso Senhor”
I Tm 1: 12a**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SIGLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 SISTEMA NEUROENDÓCRINO	04
1.1.1 Endocrinologia do Sistema Reprodutivo de Peixes	05
1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS GÔNADAS DE PEIXES TELEÓSTEOS	13
1.2.1 Machos	13
1.2.2 Fêmeas	14
1.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	16
1.4 PIRETRÓIDES	18
1.4.1 Deltametrina	20
1.5 ESPÉCIE PROPOSTA PARA O ESTUDO	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAS E MÉTODOS	25

3.1 ANIMAIS E MANUTENÇÃO	25
3.2 PRÉ-TESTE	27
3.3 DOSES E TRATAMENTO	27
3.4 PARÂMETROS OBSERVADOS	28
3.4.1 Sobrevivência	28
3.4.2 Comportamento dos Peixes Adultos	28
3.4.3 Número dos Ovos	28
3.4.4 Avaliação de Eclosões	31
3.4.5 Tamanho e Morfologia das Gônadas	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS	33
4.1 PRÉ-TESTE	33
4.2 SOBREVIVÊNCIA E COMPORTAMENTO DOS ADULTOS	34
4.3 NÚMERO DE OVOS	35
4.4 AVALIAÇÃO DE ECLOSÕES	36
4.5 TAMANHO E MORFOLOGIA DAS GÔNADAS	37
5 . DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA GtHII NOS TESTÍCULOS DOS TELEÓSTEOS	08
FIGURA 2 -	ESQUEMA DE CONTROLE NEUROENDÓCRINO DA REPRODUÇÃO EM MACHOS.....	09
FIGURA 3 -	ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA GtHII NO OVÁRIO DE TELEÓSTEOS	11
FIGURA 4 -	ESQUEMA DE CONTROLE NEUROENDÓCRINO DA REPRODUÇÃO EM FÊMEAS	12
FIGURA 5 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA DELTAMETRINA	20
FIGURA 6 -	EXEMPLAR DE ANIMAIS PEIXE-ZEBRA (<i>Danio rerio</i>) UTILIZADOS NO EXPERIMENTO	26
FIGURA 7 -	EXEMPLAR DE AQUÁRIO UTILIZADO NO EXPERIMENTO ..	26
FIGURA 8 -	MATERIAIS UTILIZADOS NA COLETA E CONTAGEM DOS OVOS	30
FIGURA 9 -	EXEMPLAR DE MATERNIDADE	30
FIGURA 10 -	NÚMERO DE OVOS COLETADOS DE <i>Danio rerio</i> DURANTE OS 14 DIAS DE EXPERIMENTO DE CADA CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA ANALISADOS	35
FIGURA 11 -	NÚMERO DE OVOS DE <i>Danio rerio</i> ECLODIDOS COLETADOS DURANTE OS 14 DIAS DE EXPERIMENTO DE CADA CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA ANALISADOS	36
FIGURA 12 -	ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO DAS FÊMEAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS DO GRUPO CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA	37

FIGURA 13 - ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO DOS MACHOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS DO GRUPO CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DETAMETRINA	38
FIGURA 14 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE FÊMEA DA ESPÉCIE <i>Danio rerio</i> DO GRUPO CONTROLE	39
FIGURA 15 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE FÊMEA DA ESPÉCIE <i>Danio rerio</i> EXPOSTA A CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/l	39
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DE UM CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE <i>Danio rerio</i> DO GRUPO CONTROLE	41
FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE <i>Danio rerio</i> EXPOSTO A CONCENTRAÇÃO DE 6 µg/l.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DAS FASES OVOCITÁRIAS PARA <i>Danio rerio</i>	15
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA DELTAMETRINA	21
TABELA 3 - ÍNDICE DE MORTALIDADE DOS PEIXES DURANTE A EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA	33

LISTA DE SIGLAS

- EDSTAC - *Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisory Committee* : Comitê Consultivo de Testes e Triagem dos Desreguladores Endócrinos.
- GnRH - *Gonadotrophin Releasing Hormone*: Hormônio Regulador de Gônadotrofinas
- GtHI - Hormônio Gonadotrofina tipo 1
- GtHII - Hormônio Gonadotrofina tipo 2
- IGS - Índice Gônado Somático
- IPCS - *International Program on Chemical Safety*: Programa Internacional em Segurança Química.
- OCDE - Organização para a Cooperação no Desenvolvimento e Economia
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- SCTEE - *Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment* : Comitê Científico para Toxicologia, Ecotoxicologia e Ambiente.
- USEPA - *United States Environmental Protection Agency*: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.

|

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cm	-	Centímetros
cm ³	-	Centímetros cúbicos
CL100	-	Concentração letal 100% dos animais
CL50	-	Concentração letal 50% dos animais
°C		Graus Celsius
h	-	Horas
HE	-	Hematoxilina/eosina
g	-	Gramas
l	-	Litros
mg	-	Miligramas
ml	-	Mililitros
pH	-	Potencial hidrogeniônico
w	-	Watts

RESUMO

Um grande número de substâncias químicas têm sido usado no ambiente, como também algumas substâncias naturais, que podem alterar o sistema endócrino de humanos e animais. São substâncias persistentes, bioacumulativas que incluem os pesticidas (fungicidas, herbicidas e inseticidas), substâncias químicas industriais, outros produtos sintéticos e alguns metais. Entre outros pesticidas, a deltametrina está listada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como possível desregulador endócrino, podendo, portanto, interferir no sistema reprodutivo. Essa substância é um piretróide sintético, com potente ação inseticida, toxicidade relativamente baixa para mamíferos e persistência limitada no meio ambiente, mas de alta toxicidade para organismos aquáticos. Além disso, é empregada nas medicinas humana e veterinária para tratamento e profilaxia de doenças parasitárias. O presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações endócrinas na reprodução do peixe zebra (*Danio rerio*) seguindo o protocolo da USEPA (2002) “Teste da reprodução de peixes de curta duração” (Short-term (14-day) Fish Reproductive Screen). Após determinação das concentrações subletais, o experimento foi realizado utilizando-se 16 aquários com 4 replicatas para cada concentração (6 µg/l e 10 µg/l da deltametrina técnica, com 98,8% de pureza), um grupo controle e um grupo acetona. Parâmetros como número de ovos, eclosão, tamanho e histologia de gônadas foram avaliados. O experimento durou 14 dias consecutivos e a cada 24 horas foram sifonados 4 litros de água de cada aquário, coletando-se os ovos. Após contagem do número de ovos, estes, foram colocados na maternidade. Após 96 horas contou-se o número de alevinos eclodidos dentro da maternidade. No 14º dia, depois da coleta e contagem dos ovos, uma fêmea e um macho de cada aquário foram pesados, sacrificados e as gônadas coletadas, pesadas e fixadas em solução de Alfac para avaliação histológica. A média e o erro padrão do número de ovos das quatro replicatas do controle foi de 2195 ± 381 , da acetona 2895 ± 189 , da concentração de 6 µg/l 1727 ± 214 e da concentração de 10 µg/l 1562 ± 306 , enquanto a média e erro padrão de ovos eclodidos do controle foi de 1077 ± 144 , da acetona 783 ± 45 , da concentração de 6 µg/l de 827 ± 201 e da concentração de 10 µg/l de 840 ± 253 . Não foi possível observar nenhuma diferença significativa dos parâmetros avaliados entre os grupos. Com este protocolo utilizado, a deltametrina não alterou a reprodução da espécie estudada. Porém, as substâncias desreguladoras endócrinas podem atuar afetando o sistema nervoso central e/ou o sistema endócrino e estas alterações podem apresentar-se tanto nos progenitores como na progênie em diferentes etapas do desenvolvimento. De acordo com o protocolo utilizado, somente efeitos nos progenitores são avaliados, porém vemos a necessidade de utilização de mais de um protocolo proposto pelas agências de proteção ambiental para avaliar as substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino.

Palavra-chave: Deltametrina, *Danio rerio*, desregulador endócrino, reprodução

ABSTRACT

A great number of chemical substances have been used in the environment, as well as some natural substances, that could alter the endocrine system of animals, including humans. They are persistent and bioaccumulative substances as the pesticides (fungicides, herbicides and insecticides), industrial chemical substances, other synthetic products and some metals. Among other pesticides, the deltamethrin is listed for the Environmental Protection Agency of the United States (USEPA) as a possible endocrine disruptor, being able to interfere in the reproductive system. This substance is a synthetic pyrethroid, with potent insecticide action, relatively low toxicity in mammals and limited persistence in the environment, but high toxic to aquatic organisms. Besides, it is used in the human and veterinary medicines for treatment and prophylaxis of parasitic diseases. The present study aimed to evaluate possible endocrine alterations in the reproduction of the zebrafish (*Danio rerio*) following the protocol for USEPA (2002) "Shorts-term (14-day) Fish Reproductive Screen". After determination of the sublethal's concentrations, the experiment was carried out using 16 aquariums with 4 replicates for each concentration (6 µg/l and 10 µg/l of the technical deltamethrin, with 98,8% of purity), a control and an acetone group. Parameters as number of eggs, hatching, size and histology of the gonads were evaluated. The experiment lasted 14 consecutive days and every 24 hours 4 liters of water were taken off of each aquarium to collect the eggs. The number of the eggs were counted and put at the maternity. After 96 hours the number of embryo hatched were counted. On the fourteenth day after the exposure, a female and a male of each aquarium were weighted, sacrificed and the gonad collected, weighted and fixed in Alfac solution for histological analyses. The mean and the standard error of the number of eggs of the water control group was 2195 ± 381 , of the acetone 2895 ± 189 , of the 6 µg/l 1727 ± 214 and of 10 µg/l 1562 ± 306 . The mean and standard error embryo hatching of the water control group was of 1077 ± 144 , of the acetone 783 ± 45 , of the 6 µg/l of 827 ± 201 and of 10 µg/l of 840 ± 253 . It was not observed any significant difference of the evaluated parameters among the groups. The concentrations used of deltamethrin didn't show alterations in the reproduction of the zebrafish. However, the endocrine disruptor substances can affect the central nervous system and/or the endocrine system and the alterations can appears in the progenitors or in the progeny in different stages of the development. According to the used protocol only the progenitors effects are observed, but we see the necessity to use more than one protocol – proposed by the environmental protection agency to evaluate the substances with potential to disrupt the endocrine system.

Key-words: Deltamethrin, *Danio rerio*, endocrine disruptors, reproduction

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, por causa do aumento da população mundial, tornou-se necessário aumentar a produtividade agrícola, visando à produção de alimentos. Em consequência, após a 2ª Guerra Mundial (1939-1945), passou-se a utilizar, cada vez mais, não só fertilizantes, como também pesticidas, incluindo os inseticidas, herbicidas e fungicidas, para defender as lavouras de insetos, ervas daninhas e fungos (BONACELLA, 1990). No final da guerra, o mundo ocidental passava por um período de reconstrução e de recuperação econômica, durante o qual as prioridades do desenvolvimento ficaram centradas no incentivo à produção, na garantia dos postos de trabalho, na satisfação das necessidades alimentares e na promoção das condições de conforto e bem-estar social. O desenvolvimento era prioritário e, sendo ainda pouco conhecidos os potenciais efeitos prejudiciais dos pesticidas para a saúde humana, não existia a preocupação de que tal desenvolvimento fosse sustentável. A utilização exagerada e sem critérios dessas substâncias vem, desde então, comprometendo seriamente o meio ambiente (REYS, 2001).

Embora o desenvolvimento mundial seja indispensável, causaram-se danos ao meio ambiente, em decorrência da falta de conhecimento e planejamento, o que gerou até mesmo uma certa despreocupação com as consequências futuras. Dentre algumas, podemos exemplificar com o uso indevido de alguns pesticidas organoclorados, altamente tóxicos e de alta persistência no meio ambiente, os quais contaminaram fontes de água próximas aos locais de aplicação, além de terem causado toxicidade ou morte às espécies residentes (RAND et al., 1995).

Em 1962, a naturalista Rachel Carson alertou o mundo para os perigos do emprego de pesticidas na agricultura por causa dos efeitos desses compostos na reprodução das aves. Por ter sugerido essa relação da nocividade dos pesticidas em aves, bem como nos outros componentes do ecossistema, ela é considerada pioneira dos movimentos ecológicos em prol da defesa do meio ambiente.

No âmbito da farmacologia, algo semelhante se passou com o caso do dietilestilbestrol, que viria reforçar essa noção de toxicidade para o sistema

endócrino. Em 1970, levantou-se a hipótese de a utilização deste fármaco em grávidas estar relacionada com a etiopatogenia de um tipo raro de cancro vaginal nas suas filhas adolescentes. Mais tarde, também houve suspeitas de outras manifestações patológicas, em médio prazo, na descendência das mulheres tratadas com o referido estrogênio sintético durante as primeiras semanas de gestação (DASTON et al., 1997).

Os compostos tóxicos naturais ou antropogênicos são chamados de xenobióticos. Com o início das investigações epidemiológicas, foi-se confirmando a hipótese de muitos xenobióticos serem perigosos para seres vivos, bem como para a respectiva descendência, exercendo efeitos tóxicos em curto, médio ou longo prazo (REYS, 2001). Essas substâncias, por serem persistentes no ambiente, acabavam por ser absorvidas e acumuladas pelos seres vivos, produzindo efeitos tóxicos em vários órgãos e sistemas. Com isso, percebeu-se que a utilização de compostos químicos, desacompanhada da avaliação dos riscos para o ecossistema, constituía uma potencial ameaça para a saúde de pessoas, animais e vegetais. A partir de então, iniciou-se o desenvolvimento de estudos das novas substâncias introduzidas na biosfera, bem como seus respectivos produtos de degradação, com intuito de minimizar os danos ambientais (USEPA, 1997).

A hipótese de certos compostos ambientais serem perigosos para os seres vivos e para sua respectiva descendência criou uma nova área de investigação em toxicologia ambiental, dedicada ao estudo de substâncias susceptíveis a produzir alterações endócrinas nos seres vivos. Estes compostos são correntemente designados de desreguladores endócrinos (USEPA, 2002). Originalmente esses estudos concentraram-se nos efeitos agudos, neurotóxicos e carcinogênicos dos agentes químicos. Recentemente, no entanto, passou-se a dar igual atenção aos possíveis efeitos adversos sobre o comportamento, a reprodução e o desenvolvimento (NEUBERT e CHAHOUD, 1995). Assim, alguns protocolos foram propostos com o objetivo de analisar a função reprodutiva, avaliando-se aspectos como o de sobrevivência, comportamento durante o acasalamento, fecundidade, fertilização, concentrações hormonais sexuais e morfologia gonadal.

Em vários países, criaram-se grupos de trabalho nos órgãos responsáveis pela proteção do meio ambiente, com o objetivo de investigar as questões da toxicologia ambiental e definição de normas preventivas. Entre eles temos, por exemplo, o Programa Internacional em Segurança Química (IPCS - International Program on Chemical Safety) — cujo órgão executivo é a Organização Mundial de Saúde (OMS) —, a Organização para a Cooperação no Desenvolvimento e Economia (OCDE) e o Comitê Científico para Toxicologia, Ecotoxicologia e Ambiente (SCTEE - Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment), no âmbito da Comissão Européia (REYS, 2001). Em 1996, o Congresso dos Estados Unidos instituiu a Ação de Proteção de Qualidade de Alimentos para autorizar a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA - Environmental Protection Agency) a implantar um programa de avaliação da água e de alimentos, quanto à presença de praguicidas e outros elementos químicos com o potencial de afetar o sistema endócrino (USEPA, 2002).

1.1 SISTEMA NEUROENDÓCRINO

O sistema endócrino é um dos componentes indispensáveis do processo de adaptação do organismo humano às mudanças nos meios internos e externos. As mudanças são percebidas por células endócrinas específicas, geralmente agrupadas em glândulas, que secretam substâncias químicas denominadas de hormônio (BERNE e LEVY, 1990). É um sistema diverso e complexo, com mecanismos variados e sofisticados que controlam a síntese, a liberação e a ativação hormonais, o transporte na circulação, bem como o metabolismo e a distribuição para a superfície ou o interior das células nas quais atuam.

A princípio, o hormônio foi definido como uma substância elaborada por um tipo celular específico carreando um sinal por meio da corrente sangüínea até as células-alvo distantes. Na função endócrina, o sinal é transportado até o alvo distante pela corrente sangüínea. Na função neurócrina, o sistema hormonal origina-se de um neurônio e, após o transporte axônico para a corrente sangüínea, é levado até uma célula-alvo distante. Além dessas funções tradicionais do sistema, deve-se considerar uma visão mais ampla da ação hormonal. Muitas ações dos hormônios ocorrem nas formas autócrinas ou parácrinas, em cuja circulação os hormônios não entram na circulação. Na função autócrina, o sinal hormonal atua sobre a célula de origem ou sobre células adjacentes idênticas. Na função parácrina, o sinal hormonal é transportado por curtas distâncias pelo líquido intersticial até uma célula-alvo adjacente (BAXTER, 2000; BERNE e LEVY, 1990; STABENFELDT, 1992a).

O sistema endócrino pode atuar independentemente ou de forma integrada com o sistema nervoso, que é o outro componente indispensável no processo de adaptação do organismo a mudanças internas e externas. Apesar de o sistema endócrino responder com mais freqüência a estímulos químicos, e o sistema nervoso, na maioria das vezes, a estímulos físicos ou mecânicos, existe considerável sobreposição entre ambos.

A secreção dos hormônios está relacionada às suas funções na manutenção da homeostasia. Por conseguinte, a retroalimentação negativa (feedback negativo)

constitui o mecanismo dominante de regulação. Se a ação do hormônio A consistir em elevar a concentração plasmática do substrato B, a ocorrência de diminuição do substrato B irá estimular a secreção de hormônio A, enquanto o aumento do substrato B vai suprimir a secreção do hormônio A. Assim, as condições fisiológicas que exigem a ação de um hormônio também estimulam a sua liberação; as condições ou produtos decorrentes da ação hormonal anterior suprimem a liberação do hormônio. Também se pode observar uma retroalimentação positiva, quando um produto de ação hormonal vai estimular a maior secreção do hormônio. Quando o produto atinge as concentrações apropriadas, pode passar a exercer retroalimentação negativa sobre a secreção do hormônio (BERNE e LEVY, 1990).

O sistema neuroendócrino é desenvolvido em animais mamíferos, vertebrados não mamíferos (como peixes, anfíbios, répteis e pássaros) e invertebrados (como caracóis, lagostas, insetos e outras espécies) (USEPA, 2002).

1.1.1 Endocrinologia do Sistema Reprodutivo de Peixes

Os processos reprodutivos normalmente apresentam ritmos endógenos estimulados por sinais ambientais, de modo que o período da reprodução ocorre em uma época ambiental favorável ao desenvolvimento de larvas e alevinos. Alterações de fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura, são detectadas por receptores específicos, transmitidas ao cérebro e, depois, para o hipotálamo, alterando a sua produção e liberação de hormônios. Variações do fotoperíodo alteram a glândula pineal, que funciona como um fotorreceptor em peixes. Conforme o fotoperíodo, a secreção de melatonina e serotonina por esta glândula varia. Esses hormônios atuam no hipotálamo, promovendo alterações no seu funcionamento, modificando a reprodução do peixe (BALDISSEROTTO, 2002; VAZZOLER, 1996).

As interações entre a genética e a alteração de fatores ambientais, como temperatura, ou da posição social, podem determinar o sexo. Por exemplo, em algumas espécies de peixes coral, a presença de um macho dominante pode provocar uma reversão do sexo em alguns machos recessivos. Antes da

diferenciação gonadal, células germinais ainda indiferenciadas podem dar origem a testículos ou ovários, dependendo das substâncias liberada pelo peixe: andrógenos ou estrógenos. Se houver administração de andrógenos durante a fase larval, o peixe tenderá a desenvolver um fenótipo masculino, independentemente da sua carga genética (ARCAND-HOY e BENSON, 1997).

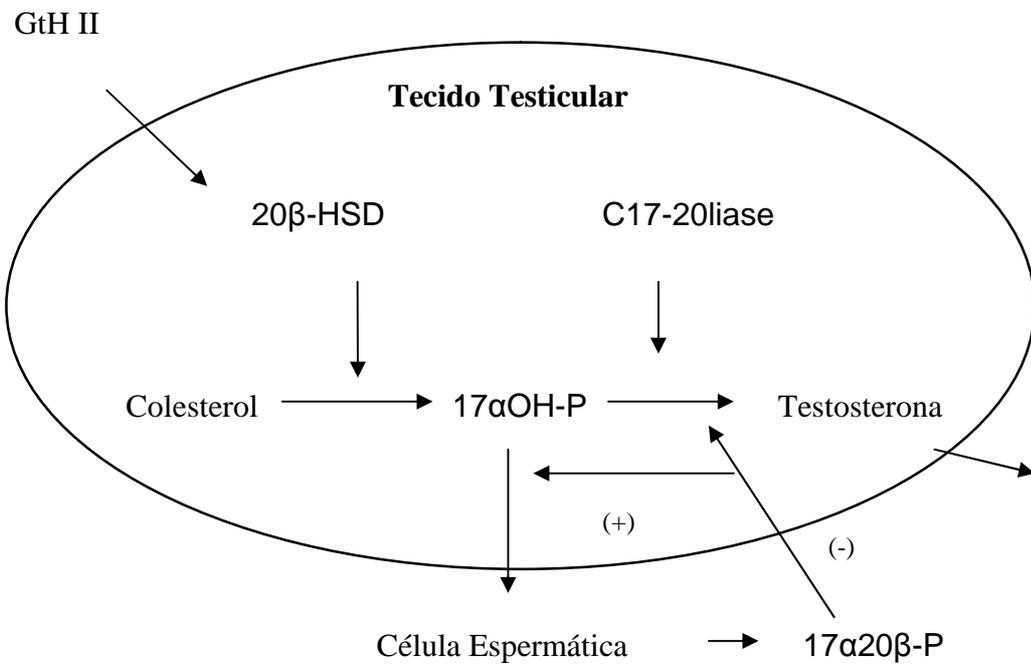
O hipotálamo localiza-se na base do cérebro e produz, entre outros, o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e a dopamina. O GnRH estimula a liberação das gonadotrofinas pela hipófise, enquanto a dopamina inibe a liberação dessas gonadotrofinas, de modo direto ou indireto (inibindo o efeito estimulativo do GnRH). As gonadotrofinas estimulam a maturação gonadal e a liberação de hormônios esteróides das gônadas. Os hormônios esteróides e os hipofisários determinam o desenvolvimento de vários caracteres sexuais e influenciam no cortejo. Quando os hormônios gonadais aumentam seu nível no plasma, exercem um efeito inibitório sobre a liberação das gonadotrofinas, de modo que há sempre uma oscilação. Aparentemente esses efeitos inibitórios dos esteróides sobre as gonadotrofinas podem dever-se ao efeito estimulativo dos esteróides sobre a liberação de dopamina, ou por meio de uma inibição da secreção de GnRH (BALDISSEROTTO, 2002; CONNAUGHTON e AIDA, 1999; REDDING e PATIÑO, 1993).

Nos teleósteos, existem duas gonadotrofinas: gonadotrofina I (GtH I) e gonadotrofina II (GtH II). A GtH I estimula o crescimento gonadal, a gametogênese e a entrada de vitelogenina no ovócito. A GtH II é importante para a maturação final dos ovócitos e desova. Essas gonadotrofinas atuam nas gônadas, estimulando a síntese e liberação dos hormônios esteroidais. Os esteróides gonadais atuam na diferenciação e manutenção dos tecidos somáticos (ductos gonadais), na gametogênese, estimulam as características sexuais secundárias e o comportamento reprodutivo (REDDING e PATIÑO, 1993).

Os testículos contêm as células germinativas, que atuam em sincronia ou em diferentes estágios de desenvolvimento; as células de Sertoli, que são responsáveis pela sustentação e nutrição das células germinativas, e também as células de Leydig, cuja função primária é produzir esteróides necessários para a

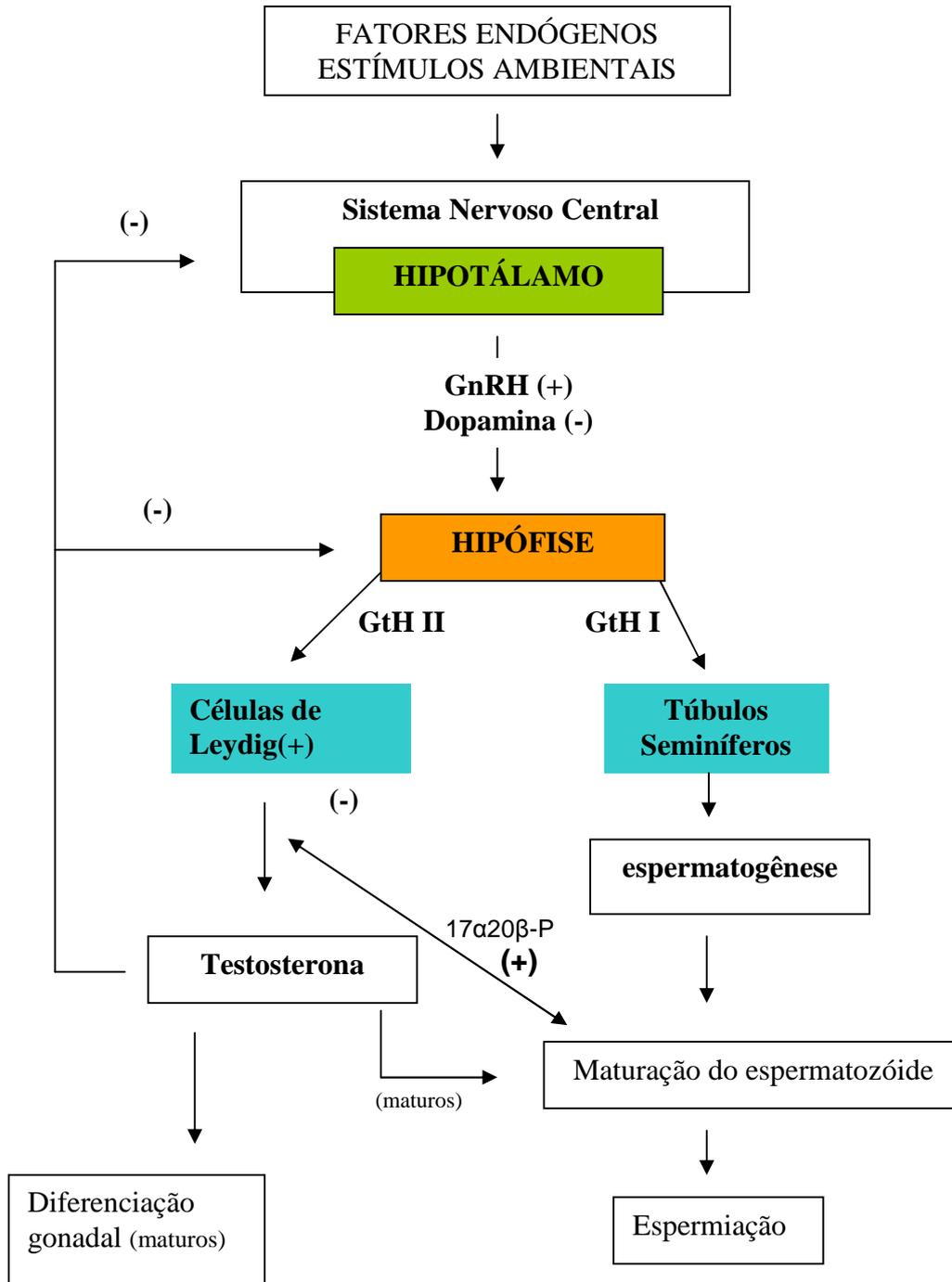
espermatogênese e o desenvolvimento das características secundárias. Nos testículos há a produção dos seguintes hormônios: testosterona, 11-cetotestotona e androstenodiona. Além disso, os testículos de alguns peixes podem também produzir progesterona, 17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α OH-P), 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α 20 β -P), 11-diesticorticosterona e talvez pequenas quantidades de estrogênio. Nos machos, a GtH II age nos testículos, aumentando a atividade da enzima 20 β -HSD (20 β -hidroxisteroide dehidrogenase), que atua na conversão do colesterol em 17 α OH-P. Como a 17 α OH-P é precursora da testosterona, um aumento na sua produção faz com que aumente a formação da testosterona através da atuação da enzima C17-20liase. Este aumento na síntese de 17 α OH-P e da testosterona leva ambas as substâncias a se difundirem para fora do tecido testicular. Ao atingir as células espermáticas, a 17 α OH-P funciona como substrato para a formação da 17 α 20 β -P. A 17 α 20 β -P é secretada nas células espermáticas e inibe a enzima C17-20liase no tecido testicular, de modo que a 17 α OH-P já não seja utilizada na produção da testosterona. Com isso, aumenta a difusão dessa substância para as células espermáticas, aumentando ainda mais a produção da 17 α 20 β -P e reduzindo drasticamente a produção de testosterona. Portanto, inicialmente, há uma elevação dos níveis de testosterona para promover a maturação gonadal e, no final do processo, um aumento da 17 α 20 β -P, mais ligado à fase final da reprodução. A 17 α 20 β -P é produzida nas células espermáticas, principalmente próximo da época da espermição. Este sistema está esquematizado nas Figuras 1 e 2 (BALDISSEROTTO, 2002; REDDING e PATIÑO, 1993; STABENFELDT, 1992b; TEPPERMAN, 1977b).

FIGURA 1 - ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA GtH II NOS TESTÍCULOS DOS TELEÓSTEOS



Nota: Esquema baseado em BALDISSEROTTO, 2002. (+) estimulação; (-) inibição.

FIGURA 2 - ESQUEMA DE CONTROLE NEUROENDÓCRINO DA REPRODUÇÃO EM MACHOS



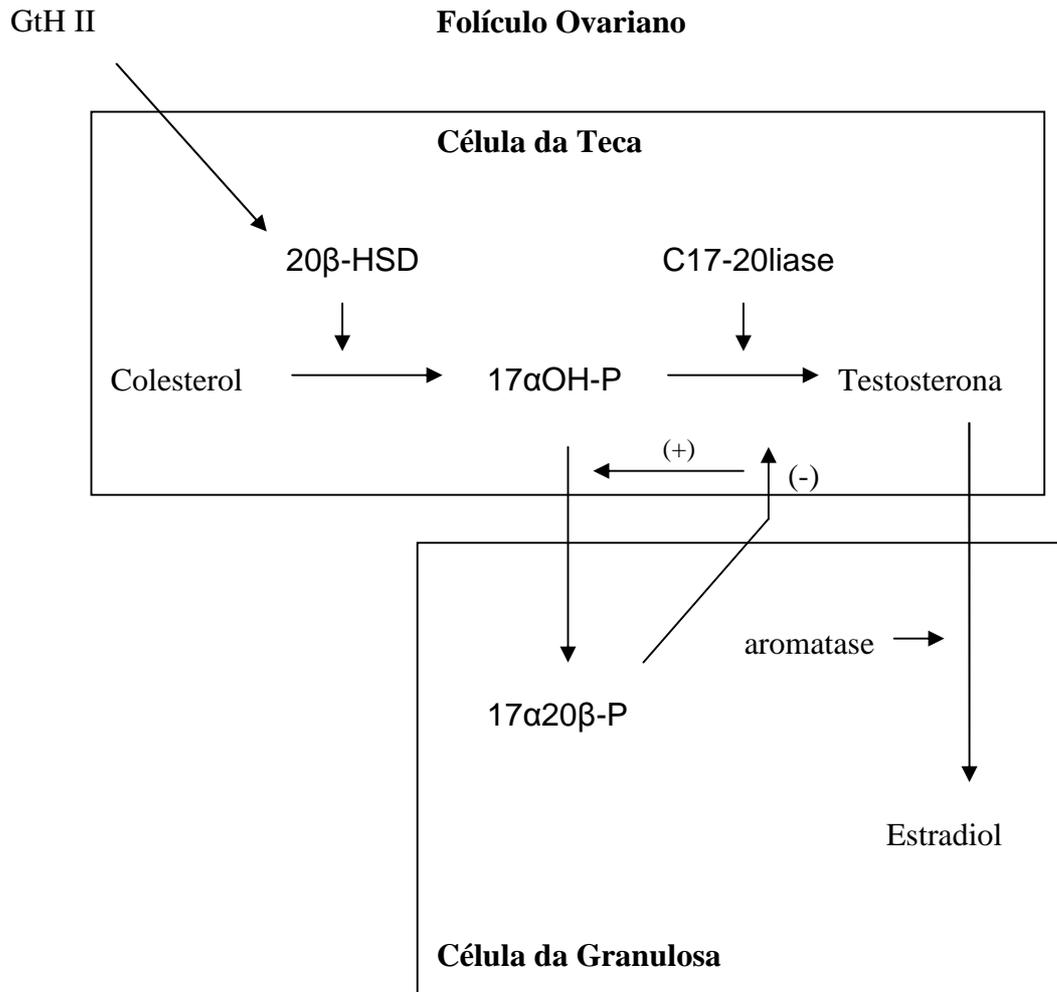
NOTA: Esquema baseado em BALDISSEROTTO, 2002. (+) estimulação; (-) inibição.

Nas fêmeas, as células teca e granulosa do folículo ovariano produzem, principalmente, 17β -estraiol, estrona, 17α -hidroxi-4-pregnen-3-ona (17α OH-P), e todos os esteróides mencionados anteriormente para os testículos, dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento. A GtH II estimula a produção da substância indutora da maturação de ovócitos, a 17α 20 β -P (17α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona), nas células do folículos ovarianos, por meio de um processo dividido em duas etapas.

Na primeira etapa, a GtH II estimula a síntese da 17α OH-P a partir do colesterol nas células teca. Na segunda etapa, também sob influência da GtH II, a 17α OH-P é convertido nas células da granulosa em 17α 20 β -P. Uma parte da 17α OH-P produzida nas células da teca é convertida em testosterona, a qual se difunde para as células da granulosa e, sob a ação da enzima aromatase, é transformada em estradiol. Portanto, no início da liberação da GtH II, tanto a 17α 20 β -P como o estradiol são formados e secretados nas células da granulosa. Parte da 17α 20 β -P formada difunde-se para as células da teca e, do mesmo modo que nos testículos, inibe a enzima C17-20liase, reduzindo a produção de testosterona e aumentando a quantidade de 17α OH-P disponível para a formação da 17α 20 β -P. Como resultado, há um aumento na produção da 17α 20 β -P e uma redução da produção de estradiol nas células da granulosa (BALDISSEROTTO, 2002; CONNAUGHTON e AIDA, 1999; VAZZOLER, 1996; RESSING e PATIÑO, 1993). Existem outros hormônios além dos liberados pelas gônadas que podem participar da reprodução, como os hormônios tireoidianos. Esses hormônios (principalmente o T_3) potencializam a ação das GtH I e II no início do desenvolvimento ovariano. Com o aumento dos ovários, aumenta a secreção do 17β -estraiol, o qual inibe a liberação dos hormônios tireoidianos. Deste modo, a energia disponível no peixe seria para o crescimento gonadal e não para o crescimento corporal. Contudo, em algumas espécies, os hormônios tireoidianos aumentam novamente no final da vitelogênese, na maturação gonadal e na desova, indicando que as reservas corporais são suficientes para a conclusão da maturação gonadal. O hormônio de crescimento (GH) e a somatolactina, ambos liberados na hipófise, estimulam a liberação de esteróides nos testículos e ovários, mas têm uma potência menor do que as GtH I e II (BALDISSEROTTO, 2002; CONNAUGHTON e

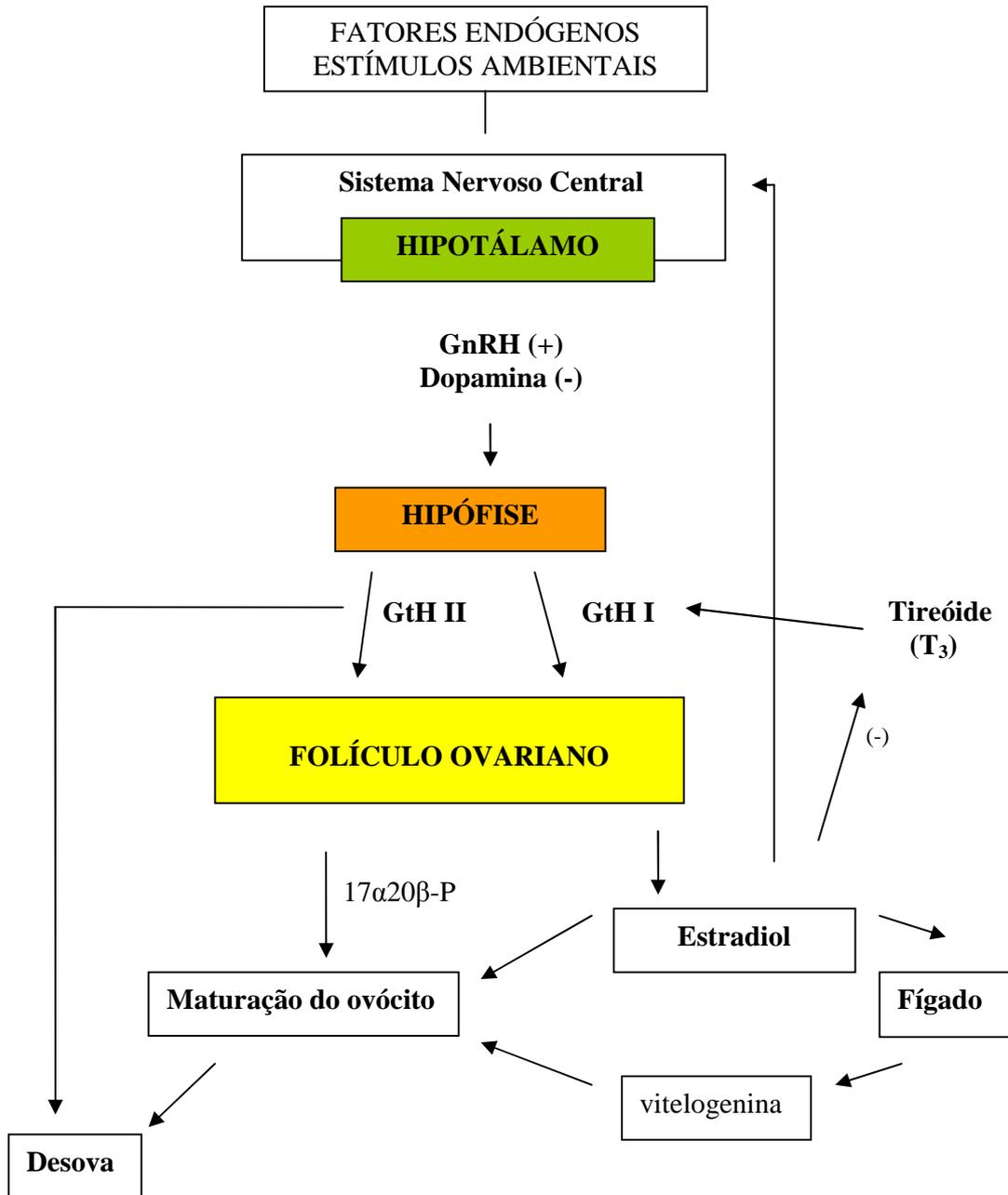
AIDA,1999; ARCAND-HOY e BENSON, 1997; TEPPERMAN, 1977b). O processo reprodutivo das fêmeas está representado nas Figuras 3 e 4.

FIGURA 3 - ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA GtH II NO OVÁRIO DE TELEÓSTEOS



Nota: Esquema baseado em BALDISSEROTTO, 2002. (+) estimulação; (-) inibição.

FIGURA 4 - ESQUEMA DE CONTROLE NEUROENDÓCRINO DA REPRODUÇÃO EM FÊMEAS



NOTA: Esquema baseado em BALDISSEROTTO, 2002; REDDING e PATIÑO, 1993. (+) estimulação; (-) inibição.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS GÔNADAS DE PEIXES TELEÓSTEOS

Tal como outros vertebrados, os peixes têm reprodução sexuada e, na maioria dos casos, a fertilização é externa e tem lugar em meio aquático. A reprodução nos teleósteos também é complexa, o que se reflete na grande variedade de estruturas constituintes da gônada. No entanto, a morfologia das células germinativas e os elementos somáticos constituintes do tecido da gônada são semelhantes nas várias espécies. Todas essas estruturas desenvolvem-se no sentido de produzir gametas férteis (ovócitos e esperma) necessários para a reprodução (HOAR et al., 1983).

O desenvolvimento das células germinativas femininas e masculinas denomina-se gametogênese e decorre de processos meióticos, que se designam, respectivamente, por ovogênese e espermatogênese (COSTA, 2004).

À semelhança de outros teleósteos ovíparos, os indivíduos *Danio rerio* nadam em conjunto, liberando para a água os produtos sexuais. A emissão de esperma dos machos deve ser imediatamente seguida da liberação dos ovócitos pelas fêmeas, pois estes se tornam inviáveis rapidamente no contato com a água. No ovócito, encontram-se as informações genéticas e as reservas metabólicas necessárias para o desenvolvimento embrionário e conseqüentemente a sobrevivência da larva até a sua fase de vida livre.

1.2.1 Machos

Os testículos do *Danio rerio* são órgãos pares localizados na cavidade celômica e sustentados dorsalmente pelo mesórquio. Apresentam uma porção central e contínua que se comunica com o ducto espermático, o qual se abre no exterior através da papila urogenital. A forma, o volume, a coloração e a irrigação sangüínea também variam nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo.

Durante a espermatogênese, as células germinais primordiais (espermatogônias) sofrem mitoses, originando os espermatócitos, os quais se dividem meioticamente, originando as espermatídes, que, ao sofrer transformações, darão origem às células reprodutoras masculinas: os espermatozóides (COSTA, 2004).

Histologicamente, os testículos são revestidos pela túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo, fibras elásticas, nervos e vasos, a qual emite septos para o interior do órgão, delimitando lóbulos que são preenchidos por túbulos seminíferos, constituídos de cistos (RIBEIRO, 2005).

1.2.2 Fêmeas

Os ovários de *Danio rerio*, quanto à morfologia, são órgãos pares, saciformes e sustentados dorsalmente na cavidade celômica pelo mesovário. Os ovários direito e esquerdo unem-se na extremidade caudal para formar o ducto ovariano, que se comunica com a papila urogenital. A forma, o volume, a coloração e a irrigação sangüínea dos ovários variam nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (COSTA, 2004).

Os folículos ovarianos compreendem o ovócito, as células foliculares e a membrana vitelina. A ovogênese, em teleósteos, inicia-se com a proliferação e diferenciação de ovogônias por meio do processo mitótico. Essas células germinativas primordiais podem apresentar-se em ninhos ou isoladamente. Caracterizam-se por apresentar citoplasma escasso, núcleo grande com nucléolo proeminente e originam ovócitos jovens, pré-vitelogênicos e vitelogênicos. Os folículos ovarianos desenvolvem-se por processos meióticos até o completo desenvolvimento. Os folículos pós-ovulatórios são estruturas remanescentes nos ovários pós-ovulação, tendo a parede constituída por células foliculares e tecido conjuntivo.

Durante o processo de maturação do folículo ovariano, podem-se observar mudanças na sua morfologia tanto quanto na constituição química, que caracteriza as cinco fases distintas no seu desenvolvimento. Essas fases estão descritas na Tabela 1 (SCHULTZ et al., 2002).

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DAS FASES OVOCITÁRIAS PARA *Danio rerio*

FASES	DESCRIÇÃO
I (Ovogônia)	Células pequenas, em ninhos; o citoplasma é reduzido; o núcleo é grande com nucléolo único, basófilo e central.
II	Células foliculares pavimentosas envolvem o ovócito e permanecem dessa forma durante todo o processo. O ovócito apresenta um tamanho maior, o citoplasma se torna mais volumoso, mas ainda reduzido em relação ao núcleo, que começa a sofrer fragmentação nucleolar.
III	Surgem vesículas citoplasmáticas na periferia do ovócito (sem afinidade por HE) e a membrana vitelina (envolvendo o ovócito). O citoplasma é mais volumoso e menos basófilo. Os nucléolos se encontram periféricos ao núcleo.
IV	Caracterizada pela presença de dois tipos de inclusões citoplasmáticas no ovócito: as vesículas citoplasmáticas e os grânulos de vitelo; a membrana vitelina sofre um espessamento, com estriações transversais evidentes.
V	O ovócito sofre um aumento de volume; o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos de vitelo acidófilos; o núcleo apresenta o seu contorno irregular contendo diversos nucléolos basófilos na periferia; a membrana vitelina permanece inalterada.

Histologicamente os ovários são revestidos pela túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo, fibras musculares lisas e vasos sanguíneos. Essa túnica emite septos em direção ao lume, formando lamelas ovulíferas, nas quais se encontram os folículos ovarianos (RIBEIRO, 2005).

1.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os agentes químicos capazes de interferir no sistema endócrino foram chamados de substâncias químicas endócrino-ativas (EACs), expressão adaptada para a língua portuguesa como “desreguladores endócrinos” (EDSTAC, 1998). Essas substâncias podem atuar por meio de uma grande variedade de mecanismos. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) define os desreguladores endócrinos como agentes exógenos que interferem na síntese, na secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pela homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (USEPA, 1997). Alguns produtos químicos sintéticos têm a capacidade de interferir no mecanismo de ação dos hormônios, principalmente os esteróides (que regulam o colesterol: hormônios sexuais, adrenocortical, ácidos biliares, entre outros) e os da tireóide. Alguns estudos levam a crer que é mais importante o tempo do que a dose de exposição a esses agentes químicos, além do período em que o indivíduo foi exposto (mais susceptível em determinadas fases do crescimento e do desenvolvimento). Os mecanismos prováveis de ação desses agentes são os seguintes:

- a) Mimetizando o próprio hormônio, ou seja, interagindo com o receptor específico para desencadear as alterações que seriam provocadas pelo hormônio naquele sítio de atuação. Os agentes químicos de ação estrogênica agem por este mecanismo;
- b) Bloqueando a ação do hormônio ao ocupar os receptores que seriam destinados especificamente a ele, impedindo, dessa forma, que sua função seja exercida. Assim agem os agentes químicos que interferem na ação do hormônio masculino, impedindo a sua ação androgênica. Como exemplo, há o DDE (metabólito do DDT);
- c) Causando danos no metabolismo dos hormônios, isto é, na sua síntese ou na sua destruição e eliminação fisiológica ou natural. Os

organoclorados, como o DDE, por exemplo, podem alterar, dessa forma, o metabolismo dos estrogênios;

- d) Afetando o Sistema Nervoso Central (o cérebro), onde está o principal controle de produção hormonal, hipófise, que, por sua vez, é regulada principalmente pelo hipotálamo. Todos os hormônios são regulados também por mecanismos de retroalimentação, isto é, são produzidos de acordo com os níveis detectados na corrente sangüínea, constantemente monitorados pelo hipotálamo. Por isso, uma interferência em nível central afeta o controle de diversos hormônios. Esse mecanismo de controle pode estar alterado tanto por receber informação errada quanto a níveis sangüíneos (por conta do mimetismo, por exemplo), como por ações deletérias sofridas diretamente pelo próprio sistema nervoso central (WWF, 2000).

Diversos estudos têm relacionado as anormalidades no sistema reprodutivo masculino e feminino como conseqüência à exposição a compostos com atividade estrogênica (DASTON et al., 1997; GOTZ et al., 2001; KIM et al., 2002). A exposição de diferentes espécies animais a um ou mais compostos químicos estrogênicos tem resultado em vários efeitos adversos ao sistema reprodutivo, como hermafroditismo, hipospádia¹, criptorquidismo², redução no tamanho do pênis ou testículos, comprometimento da função das células de Leydig, redução da qualidade e quantidade de espermatozóides e alteração do ciclo estral (SHARPE, 1994; OHI et al., 2004).

A toxicologia aquática é responsável pelo estudo quantitativo e qualitativo de processos bioquímicos e fisiológicos em organismos aquáticos expostos a xenobióticos. Com isso, procura-se preservar a saúde e sobrevivência das espécies aquáticas. Os ecossistemas aquáticos são receptores temporários ou finais de

¹ Hipospádia: anomalia de desenvolvimento em que a uretra masculina se abre no lado inferior do pênis ou no períneo.

² Criptorquidismo: ausência do testículo na bolsa escrotal, em razão da retenção na cavidade abdominal.

poluentes em diferentes quantidades e de diferentes qualidades, mesmo quando inicialmente são lançados ao ar, no solo, ou diretamente na água (OECD, 1981).

Um exemplo de impacto ambiental causado por interferência na função endócrina ocorreu em 1980, na Flórida (Estados Unidos), no lago Apoka. Investigações indicam que o vazamento de uma mistura dos pesticidas dicofol, diclorodifeniltricloroetano (DDT) e diclorodifenildicloroetileno (DDE), foi responsável por uma variedade de efeitos adversos como a desmasculinização de crocodilos machos e a superfeminilização de fêmeas, que mostraram alterações na capacidade de chocar os ovos (USEPA, 1997).

1.4 PIRETRÓIDES

Pesticidas, praguicidas, defensivos agrícolas, biocidas, xenobióticos, agrotóxicos e fitossanitários são vários nomes usados para designar uma série de compostos químicos utilizados no controle de insetos, ácaros, fungos, ervas daninhas e outras formas de vida animal ou vegetal.

No início do século passado, os compostos organoclorados eram os mais utilizados na agricultura; em razão, porém, da sua alta toxicidade e persistência, foram substituídos pelos organofosforados, que também apresentaram toxicidade. No intuito de substituir esses compostos por substâncias menos agressivas ao homem e ao meio ambiente, por volta de 1977, os piretróides começaram a ser utilizados (BARLOW et al., 2001). Os piretróides são considerados relativamente menos tóxicos para mamíferos do que os outros inseticidas (CASIDA e QUISTAD, 1998).

O termo piretróide é usado para designar inseticidas sintéticos, que são derivados estruturais de piretrinas naturais, obtidas das flores de *Chrysanthemum cinaerarifolium*. O piretro é um inseticida instável à luz e no ar, o que limita sua efetividade na proteção de lavouras e no controle de insetos. O desenvolvimento de piretróides sintéticos é resultado de tentativas de modificar a estrutura das piretrinas

naturais, no sentido de diminuir a fotossensibilidade, retendo a potente e rápida atividade de inseticida e a toxicidade aguda relativamente baixa do piretro para mamíferos (SODERLUND et al., 2001).

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 do tipo II (WHO, 1990). Em ratos, os compostos do tipo I provocam um quadro de agressividade, prostração, incoordenação e tremores, conhecido como “Síndrome T” (tremores). Esses compostos compartilham na sua estrutura química a ausência do substituinte α -ciano-3-fenoxibenzil (ECOBICHON, 1996). Os piretróides da classe II, que contêm o agrupamento α -ciano substituído, provocam movimentos irregulares dos membros, contorções, salivações profusas e convulsões, que caracterizam a “Síndrome CS” (ECOBICHON, 1996; SODERLUND et al., 2001).

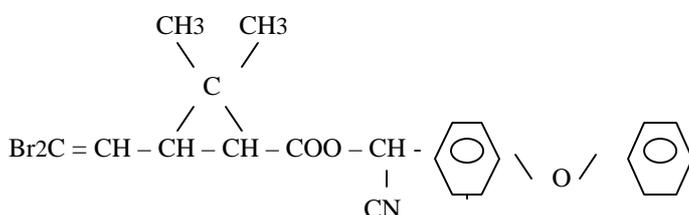
A ação inseticida dos piretróides deriva de sua neurotoxicidade, e ambos os tipos atuam interferindo na abertura de canais de sódio durante a geração e propagação do impulso nervoso. Os piretróides do tipo I prolongam moderadamente a abertura dos canais, resultando em descargas repetidas, enquanto os do tipo II promovem um prolongamento maior da abertura dos canais de sódio, levando à despolarização da membrana e bloqueio do potencial de ação, sem causar disparos repetitivos (WHO, 1990; BARLOW et al., 2001).

Apesar de sua baixa toxicidade para mamíferos e pássaros, os piretróides são tóxicos para peixes, invertebrados aquáticos e abelhas. Estudos também revelam que invertebrados aquáticos e peixes são extremamente sensíveis aos efeitos neurotóxicos desses inseticidas quando em contato com a água (REDDY et al., 1994; MIAN et al., 1992), os quais se têm mostrado mais tóxicos para peixes do que para mamíferos e aves na mesma concentração (BRADBURY e COATES, 1989; EDWARDS et al., 1986; EELLS et al. 1993).

1.4.1 Deltametrina

Dentre os piretróides, a deltametrina foi o composto químico originado da inclusão do agrupamento substituinte α -ciano-3-fenoxibenzil, atribuindo-lhe maior potência inseticida que o composto anterior sintetizado, a permetrina (SODERLUND et al., 2001) (Figura 5). Foi desenvolvida a partir de modificações químicas na estrutura das piretrinas naturais encontradas nos extratos das flores secas do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* e *C. coccineum*). Sua comercialização iniciou-se a partir de 1977. Está classificada como tipo II, é um isômero de oito estereoisômeros ésteres do análogo dibromo do ácido crisantêmico, ou seja, (S)- α -ciano-3fenoxibenzil(1R,3R)3(2,2dibromovinil)2,2dimetilciclopropanocarboxilato.

FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA DELTAMETRINA



NOTA: Disponível em: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/deltamethrin-ext.html>. Acesso em: 03 mar. 2004.

A deltametrina é amplamente utilizada no controle de pragas de diversas culturas, como: algodão, café, milho, trigo, hortaliças, frutas e em produtos armazenados e no combate de insetos domésticos. Além disso, é empregada nas medicina humana e veterinária para tratamento e profilaxia de pediculose (piolho), ftíriase (chato), escabiose (sarna) e infestações por carrapatos (DEF, 2001; SHEETS et al., 1994; WHO, 1990). O amplo uso da deltametrina justifica-se por sua potente ação inseticida, toxicidade relativamente baixa em mamíferos e persistência limitada no meio ambiente (WHO, 1990). Suas características físicas e químicas estão

descritas na Tabela 2. A deltametrina ativa é achada em uma variedade de inseticidas comerciais como: Butoflin, Butox, Cresus, Decis, Decis-Prime, K-Othrin e K-Otek.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA DELTAMETRINA

Estado físico	pó cristalino
Cor	sem cor
Odor	sem odor
Densidade (20°C)	0,5g/cm ³
Massa Molecular Relativa	505,24
Ponto de fusão	98 – 101°C
Ponto de ebulição	acima de 300°C
Solubilidade em água (20°C)	< 0,002mg/l
Solubilidade em solventes orgânicos	Solúvel
Acetona	500g/l

FONTE: WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 97 – Deltamethrin. Geneva: International Program on Chemical Safety - IPCS, 1990.

Entre outros pesticidas, a deltametrina está listada como desregulador endócrino (GRAY e OTSBY, 1998) podendo, portanto, interferir com o sistema reprodutivo. A USEPA (Agência de Proteção Ambiental) também cita a deltametrina como uma substância com potencial de atuar como um desregulador endócrino. Um estudo feito por Moore e Waring (2001) avaliou a habilidade de peixes machos da espécie *Salmon salar L.* em produzir resposta olfatória ao feromônio PGF₂ α (Prostaglandina 2 α), liberado pela fêmea durante a exposição dos ovos. No teste, usou-se o piretróide cipermetrina, durante cinco dias, a uma concentração de 0,004 μ g/l. Concluiu-se que a resposta olfatória ao feromônio foi reduzida ou inibida nos machos. Além disso, diminuiu significativamente a fertilização dos ovos. Em outra pesquisa, realizada por Görgel e Nagel (1990), usaram-se ovos fertilizados de *Danio rerio* em contato com três pesticidas diferentes: lindane, atrazine e deltametrina. Analisou-se eclosão dos ovos, anormalidades no desenvolvimento (deformações, edema) e mortalidade durante a exposição por 35 dias. Verificou-se que houve redução na eclosão dos ovos apenas na concentração de 0,8 μ g/l de deltametrina.

Com base nesses achados, concluiu-se que a deltametrina é uma substância com potencial de desregulador do sistema neuroendócrino, porém não existem estudos que avaliem seus efeitos na exposição maternal de *Danio rerio*. Neste trabalho pretende-se avaliar os efeitos reprodutivos da deltametrina utilizando um protocolo proposto pela USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) com exposição de 14 dias.

1.5 ESPÉCIE PROPOSTA PARA O ESTUDO

Há três espécies de peixes consideradas as mais promissoras para avaliação de desreguladores endócrinos, entre elas: Fathead minnow (*Pimephales promelas*), Japanese medaka (*Oryzias latipes*) e Peixe-zebra (*Danio rerio*). O cultivo e o controle dessas três espécies têm sido muito bem documentados durante anos. Todas elas toleram uma variação na qualidade e temperatura da água, requerem pouco espaço para o cultivo e produzem o número necessário de ovos para os testes. A espécie Fathead minnow é mais usada nos Estados Unidos, enquanto o Peixe-zebra é mais freqüente entre os europeus (USEPA, 2002). Estudos comprovam a semelhança quanto à sensibilidade nessas duas espécies — ambas da família *Cyprinidae* —, fato esperado no que se refere aos efeitos tóxicos quanto à sobrevivência. Em média, espécies da mesma família são toxicologicamente muito mais semelhantes do que entre famílias diferentes (BERTOLETTI e DOMINGUES, 1991).

Para animais testes, selecionaram-se peixes da espécie *Danio rerio*, com nome popular de Paulistinha ou Peixe-zebra. A espécie é facilmente identificada entre outras do mesmo gênero (*B. albolineatus*, *B. nigrofasciatus* e *B. frankei*) pela sua coloração característica, dois pares de barbelas e ausência de linha lateral. No início da década de 1970, o doutor George Streisinger, da Universidade de Oregon (USA), iniciou suas pesquisas utilizando a espécie *Danio rerio* como modelo experimental. Em pouco tempo ele já determinaria a potencialidade da utilização dessa espécie como um promissor modelo experimental, principalmente para

estudos de desenvolvimento e genética de vertebrados. Desde então, embriões de *Danio rerio* se tornaram muito populares em todo o mundo como sinônimo para o entendimento não apenas dos peixes, mas de todos os vertebrados, incluindo o ser humano (UNIVERSITY OF OREGON, 2004).

Esta resistente espécie é facilmente mantida em condições controladas de laboratório, não necessita de cuidados excessivos e está disponível em lojas comerciais. Os adultos são nadadores rápidos, que chegam ao comprimento de até 4 a 5 centímetros. Alcançam maturidade sexual com 10 a 12 semanas, e o pico de desova ocorre de 5 a 10 dias — cada fêmea produzindo, em média, 150 a 400 ovos. Os ovos, transparentes e pequenos, são fertilizados externamente. Também têm a característica de não serem adesivo. A eclosão dos ovos se dá entre 48 e 96 horas. Para garantir bons resultados na reprodução, separe duas fêmeas para um macho. O acasalamento ou cortejo, é uma “corrida”, onde o casal nada emparelhado, de um lado para o outro do aquário. Ainda em movimento, a fêmea libera os ovos não aderentes que são fecundados pelo sêmen do macho e, por serem mais pesados que a água, depositam-se no fundo do aquário, tendo este uma proteção que impede o acesso dos peixes adultos (WESTERFIELD, 2000).

Os machos são finos e em forma de torpedo, usualmente dourados no abdômen, com nadadeiras ventrais, pélvicas e peitorais. As fêmeas são maiores, quando cheias de ovos e podem ou não apresentar regiões douradas. As listras peculiares que ocorrem ao longo do corpo e das nadadeiras deram o nome a essa espécie.

As características biológicas que os tornam semelhantes ao ser humano, que incluem tanto o seu genoma, como os processos de desenvolvimento, anatomia, fisiologia e comportamento, têm direcionado o seu uso como modelo experimental em estudos neurológicos, genéticos e de desenvolvimento (LINNEY et al., 2004); modelo de doenças humanas (SUMANAS e LIN, 2004), além de estudos para descoberta e validação de novos fármacos (LINNEY et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos reprodutivos de doses subletais de deltametrina em Peixe-zebra (*Danio rerio* - adulto), utilizando o protocolo da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para estudos de substâncias químicas com capacidade de desregular o sistema endócrino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar possíveis alterações no número de ovos;
- Estudar possíveis alterações no número de eclosões;
- Estudar possíveis alterações no tamanho e morfologia das gônadas dos peixes adultos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E MANUTENÇÃO

Os animais utilizados foram os peixes da espécie *Danio rerio*, adquiridos em loja de aquários, todos adultos com mais de oito meses de idade. Um total de 16 aquários foram montados para formar os grupos controle, acetona e experimentais (4 replicatas para cada grupo). Todos os aquários foram equipados com uma rede interna que servia de proteção para os ovos que se depositavam no fundo (Figura 6).

Seguindo o protocolo da USEPA (2002), utilizaram-se aquários de 16 litros, com água filtrada, desclorada e aeração constante. A temperatura manteve-se controlada em 25°C, o pH entre 6,5 a 7 e fotoperíodo de 16/8 dia/noite (Figura 7). Os peixes foram alimentados com ração comercial Tetraphyll duas vezes ao dia.

FIGURA 6 - EXEMPLAR DE ANIMAIS PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) UTILIZADOS NO EXPERIMENTO



FIGURA 7 - EXEMPLAR DE AQUÁRIO UTILIZADO NO EXPERIMENTO



3.2 PRÉ-TESTE

Para obter as concentrações subletais de deltametrina usadas no experimento definitivo, fez-se um pré-teste baseado nas citações de Viran et al. (2003). Utilizaram-se seis concentrações de deltametrina, a partir de uma solução-mãe de 10 mg/100 ml, dos quais 0,2 ml foi de acetona, utilizada previamente como solvente de deltametrina. As concentrações testadas foram de 4, 6, 8, 10, 12, 15 µg/l de deltametrina. Outros dois grupos foram utilizados, sendo um controle e outro acetona. Em cada aquário foram colocados oito peixes adultos machos e avaliados em 96 horas (VIRAN et al., 2003). Esse pré-experimento foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos comportamentais e a sobrevivência dos animais, a fim de obter as concentrações subletais.

3.3 DOSES E TRATAMENTO

Para o experimento definitivo, utilizou-se a deltametrina técnica, com 98,8% de pureza, fornecida pela Aventis CropScience Brasil Ltda. (São Paulo-SP).

Após a definição das concentrações subletais, separaram-se dois machos e quatro fêmeas por aquário. Os peixes foram expostos à concentração de 6 µg/l e 10 µg/l, um grupo controle e um grupo acetona. Realizaram-se-se 4 replicatas para cada concentração, controle e acetona. O ensaio foi semi-estático, ou seja, a cada 24 horas foram retirados 4 litros de água dos aquários. Essa mesma quantidade foi repostada, já com a substância-teste nas respectivas concentrações de cada aquário.

O tempo de duração foi de 14 dias. A exposição à substância somente se iniciou após a verificação de que em todos os aquários havia produção normal de ovos durante pelo menos 48 horas.

3.4 PARÂMETROS OBSERVADOS

3.4.1 Sobrevivência

Os peixes foram avaliados diariamente durante o período do teste, observando-se alterações externas como hemorragia e descoloração. Em caso de morte, os peixes deveriam ser retirados do aquário.

3.4.2 Comportamento dos Peixes Adultos

Comportamentos anormais (em relação ao controle) deveriam ser anotados, como sinais gerais de intoxicação — hiperventilação, natação incoordenada, falta de equilíbrio, inquietude e alteração na alimentação.

3.4.3 Número de Ovos

A coleta dos ovos foi feita no início da tarde, durante os 14 dias de exposição. Por meio de sifonagem, os ovos foram retirados juntamente com possíveis deposições de alimentos, segundo o protocolo de Westerfield (2000). Esse procedimento manteve os aquários limpos e a concentração do tóxico reposta. Inicialmente os ovos coletados ficavam em recipientes pretos, para melhor visualização (Figura 8). Para contagem, utilizou-se lente de aumento e focos de luz. Os ovos contados foram coletados e colocados em recipientes menores. Após a lavagem por meio de um filtro, eram colocados na maternidade, feita com garrafas plásticas de dois litros, viradas com a ponta para baixo. Na tampa da garrafa, internamente, acoplou-se uma pedra porosa, responsável pela agitação e

oxigenação da água. Esse procedimento evitava a formação de fungos nos ovos (Figura 9). As garrafas foram mantidas em um aquário maior, todas separadas e identificadas por concentrações e dias, com temperatura por volta de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para cada aquário, haviam cinco maternidades, onde os ovos permaneciam por 72 horas.

FIGURA 8 - MATERIAIS UTILIZADOS NA COLETA E CONTAGEM DOS OVOS



FIGURA 9 - EXEMPLAR DE MATERNIDADE



3.4.4 Avaliação de Eclosões

A eclosão foi obtida através da contagem do número de ovos eclodidos. Após 72 horas, toda a água de cada garrafa foi coletada e depositada em recipiente branco (com capacidade de um litro). Com o auxílio de pipeta plástica, contou-se o número de alevinos, que foram descartados em dois aquários separados (contaminados e não contaminados).

3.4.5 Tamanho e Morfologia das Gônadas

Avaliou-se o tamanho das gônadas por meio do cálculo do índice gonadossomático. No décimo quarto dia, depois da última coleta e contagem dos ovos, uma fêmea e um macho de cada aquário foram sacrificados e pesados, seguindo o protocolo da USEPA (USEPA, 2002). Depois de sacrificados, as gônadas foram retiradas e pesadas. Com esses resultados, calculou-se o índice gonadossomático por meio da fórmula:

$$\text{IGS} = 100 \times \text{peso da gônada} / \text{peso total}$$

A análise morfológica das gônadas deu-se através da histologia. Após a pesagem, as gônadas foram fixadas em solução de Alfac por 16 horas. Posteriormente, foram desidratadas em álcoois (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, sendo este um processamento de rotina para confecção de lâminas histológicas. Após o material ser cortado em micrótomo manual na espessura de 5 μ m, o mesmo foi corado com Hematoxilina-Eosina (HE). Posteriormente, as lâminas histológicas foram analisadas em microscopia de luz para descrição morfológica das diferentes fases de desenvolvimento dos folículos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis obedeceram à distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni, para comparação entre os grupos. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizados por meio do programa Graphpad Prism[®] versão 3.0.

4 RESULTADOS

4.1 PRÉ-TESTE

Durante o pré-teste realizado para se obterem as concentrações subletais, observou-se que, nas concentrações de 12 µg/l e 15 µg/l, os peixes apresentaram incoordenação natatória, dificuldade respiratória, nado em parafuso e nado de decúbito ventral. Dentro das primeiras 24 horas, nessas concentrações, todos os peixes morreram, enquanto nas outras concentrações não houve alteração comportamental, nem mortalidade (Tabela 3). Com base nesse resultado, foram escolhidas para o experimento definitivo as concentrações subletais da deltametrina de 6 µg/l e 10 µg/l.

TABELA 3 - ÍNDICE DE MORTALIDADE DOS PEIXES DURANTE A EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA

Concentração de Deltametrina (µg/l)	Número inicial de peixes	Número de peixes mortos por período de observação (h)			
		24	48	72	96
Controle	8	0	0	0	0
Acetona	8	0	0	0	0
4	8	0	0	0	0
6	8	0	0	0	0
8	8	0	0	0	0
10	8	0	0	0	0
12	8	8	-	-	-
15	8	8	-	-	-

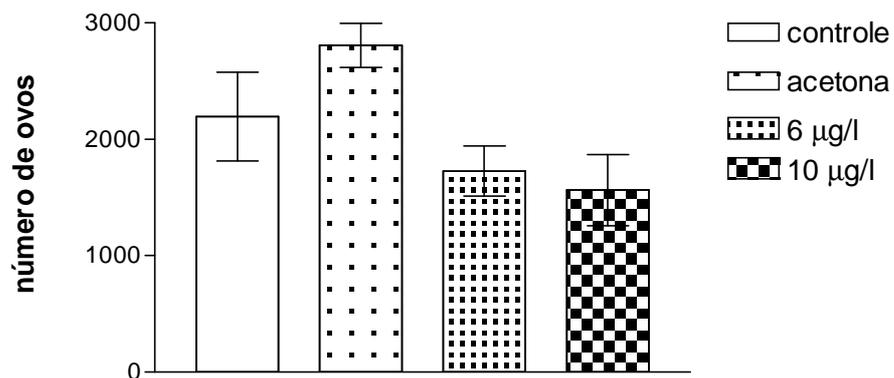
4.2 SOBREVIVÊNCIA E COMPORTAMENTO DOS ADULTOS

No teste definitivo, todos os indivíduos do grupo controle, da acetona e das concentrações de deltametrina mantiveram-se vivos durante os 14 dias do experimento. Não apresentaram alterações externas como hemorragia ou descoloração. Também não se observaram sinais gerais de intoxicação, como hiperventilação, natação incoordenada, falta de equilíbrio, inquietude e alteração na alimentação.

4.3 NÚMERO DE OVOS

Quanto ao número total de ovos coletados durante os 14 dias, não houve diferença significativa entre o controle, a acetona e as concentrações de deltametrina. A média e o erro padrão do número de ovos das quatro replicatas do controle foi de 2.195 ± 381 , da acetona 2.895 ± 189 , da concentração de $6\mu\text{g/l}$ 1.727 ± 214 e da concentração de $10\mu\text{g/l}$ 1.562 ± 306 . Os dados estão representados graficamente na Figura 10.

FIGURA 10 - NÚMERO DE OVOS COLETADOS DE *Danio rerio* DURANTE OS 14 DIAS DE EXPERIMENTO DE CADA CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA ANALISADOS

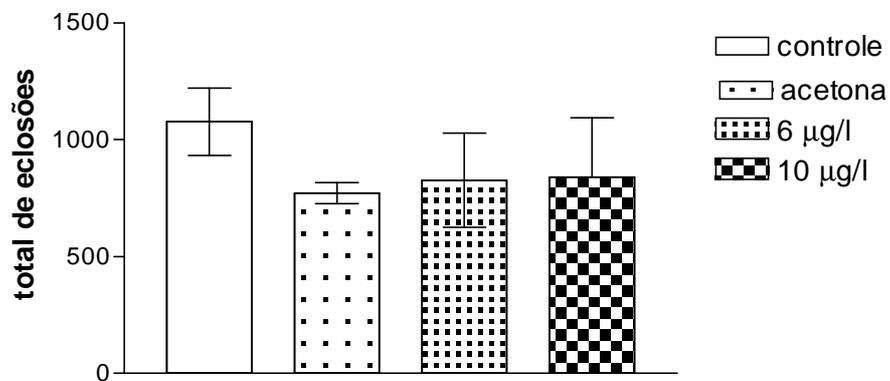


NOTA: As barras indicam a média e o erro padrão nas quatro replicatas.

4.4 AVALIAÇÃO DE ECLOSÕES

Pode-se observar, na Figura 11, a contagem do número de alevinos (número de ovos eclodidos). A média e erro padrão de ovos eclodidos do controle foi de 1.077 ± 144 , da acetona 783 ± 45 , da concentração de $6 \mu\text{g/l}$ de 827 ± 201 e da concentração de $10 \mu\text{g/l}$ de 840 ± 253 . Não houve diferença significativa entre os grupos.

FIGURA 11 - NÚMERO DE OVOS DE *Danio rerio* ECLODIDOS COLETADOS DURANTE OS 14 DIAS DE EXPERIMENTO DE CADA CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA ANALISADOS



NOTA: As barras indicam a média e o erro padrão nas quatro replicatas.

4.5 TAMANHO E MORFOLOGIA DAS GÔNADAS

O tamanho das gônadas avaliado pelo IGS (Índice Gonadossomático) não apresentou diferença significativa entre os grupos tanto nas fêmeas (Figura 12), como nos machos (Figura 13).

FIGURA 12 - ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO DAS FÊMEAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS DO GRUPO CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA

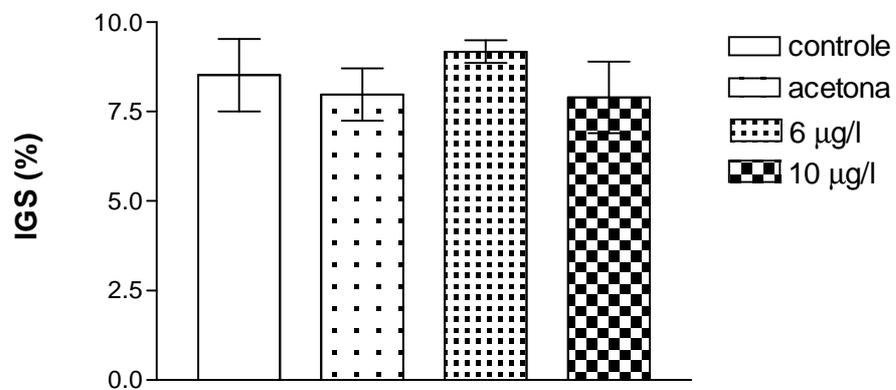
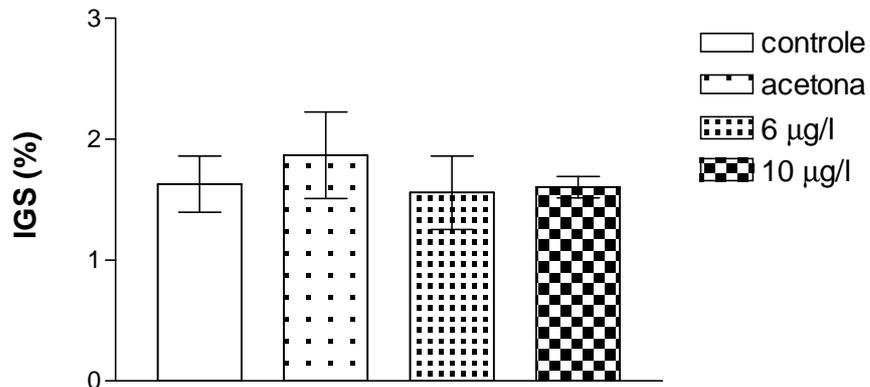


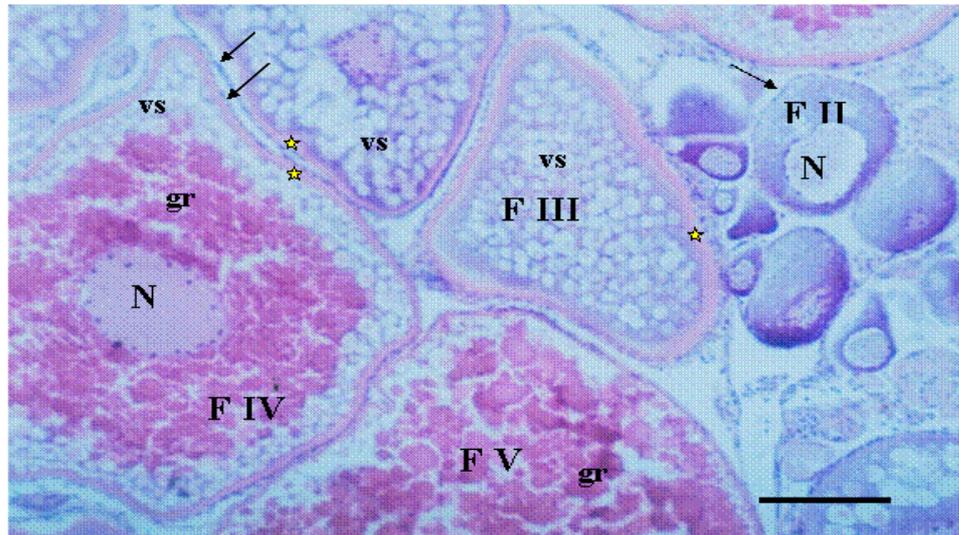
FIGURA 13 - ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO DOS MACHOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS DO GRUPO CONTROLE, ACETONA E CONCENTRAÇÕES DE DELTAMETRINA



A morfologia das gônadas das fêmeas, feita por meio das análises histológicas, caracterizou as cinco fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos (ovogênese) para *Danio rerio*, conforme Schultz et al. (2002), descritas na Tabela 1. Folículo atrésico e vazios não foram considerados como fase de desenvolvimento no processo de ovogênese.

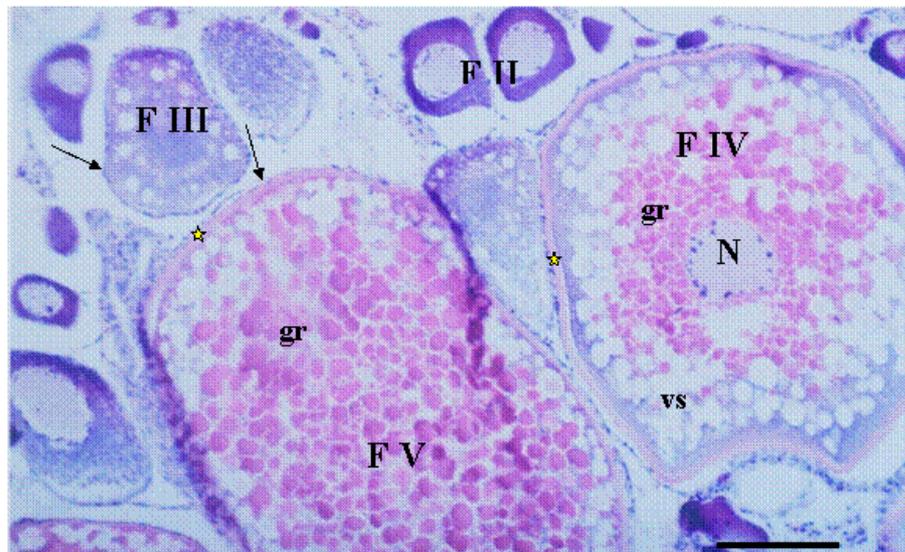
Não se observou nenhuma alteração entre as gônadas do controle, acetona e concentrações de deltametrina. Todos os cortes histológicos das gônadas mostraram o mesmo desenvolvimento e estruturas quanto a organização da gônada, morfologia das células foliculares, espessura da membrana vitelina, inclusões citoplasmáticas (vesículas citoplasmáticas e grânulos de vitelo) e afinidade por corantes. Observaram-se folículos vazios em ovários controles e contaminados, indicando que o grau de contaminação exposto não interferiu na eliminação dos ovócitos (Figuras 14 e 15).

FIGURA 14 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE FÊMEA DA ESPÉCIE *Danio rerio* DO GRUPO CONTROLE



NOTA: Fases de maturação da gônada II, III, IV e V (**FII**, **FIII**, **FIV**, **FV**, respectivamente), núcleos (**N**), vesículas citoplasmáticas (**vs**), grânulos de vitelo (**gr**), células foliculares (†), membrana vitelina (★). Escala = 90µm. Aumento = 20x. Coloração H.E.

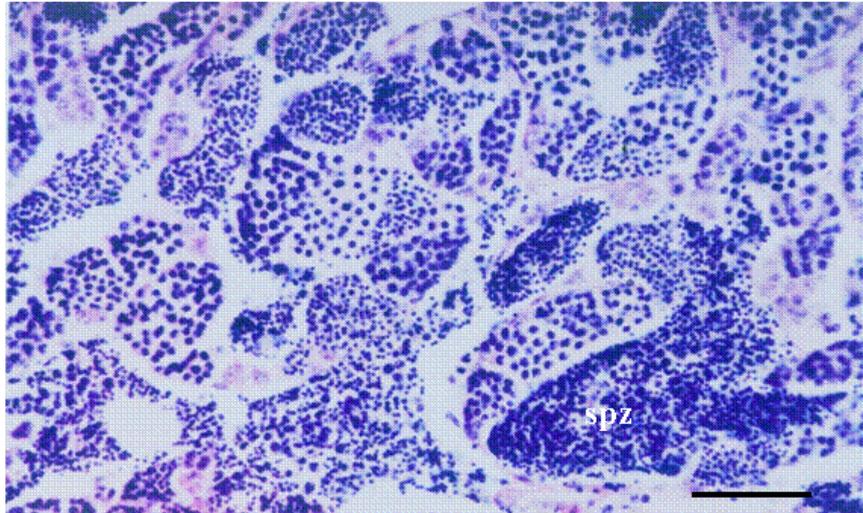
FIGURA 15 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE FÊMEA DA ESPÉCIE *Danio rerio* EXPOSTA À CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/l



NOTA: Fases de maturação da gônada II, III, IV e V (**FII**, **FIII**, **FIV** e **FV**, respectivamente), núcleos (**N**), vesículas citoplasmáticas (**vs**), grânulos de vitelo (**gr**), células foliculares (†), membrana vitelina (★). Escala = 90 µm. Aumento = 20x. Coloração H.E.

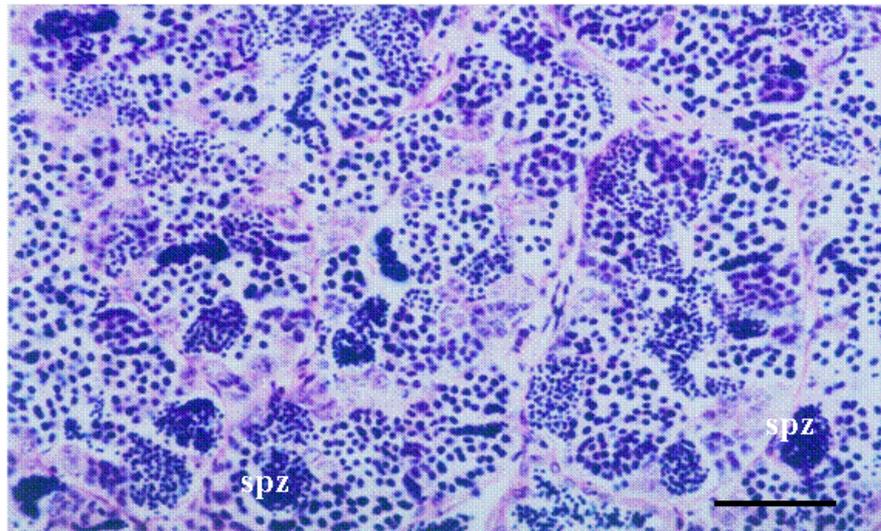
A análise histológica das gônadas masculinas, dos grupos expostos nas duas concentrações de deltametrina, revelou ausência de alteração nas células da linhagem espermática quando comparadas com o grupo controle e acetona (Figuras 16 e 17), indicando que as concentrações utilizadas não causaram alterações microscópicas entre os grupos.

FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DE UM CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE *Danio rerio* DO GRUPO CONTROLE



NOTA: Espermatozóide (**spz**). Escala: 45 μ m. Aumento = 40x. Coloração H.E.

FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE *Danio rerio* EXPOSTO À CONCENTRAÇÃO DE 6 μ g/l



NOTA: Espermatozóide (**spz**). Escala: 45 μ m. Aumento = 40x. Coloração H.E.

5 DISCUSSÃO

A crescente produção e utilização de pesticidas e outros compostos químicos industriais pode representar sérios riscos ao meio ambiente e à saúde humana e animal. A presença de resíduos de agrotóxicos na água e alimentos leva à exposição crônica, das diversas formas de vida, a uma grande variedade de compostos. Os peixes têm-se mostrado alvos sensíveis a essas substâncias que entram em contato com a água, seja pela chuva, por despejo de esgoto ou de indústrias.

Nesse estudo optou-se por utilizar o peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo experimental, por apresentar-se como um organismo teste de fácil adaptação em laboratório, por ter uma reprodução contínua e com número de ovos suficiente para os testes propostos. Também apresentou-se sensível a deltametrina. Conforme SCALZO e LEVIN (2004) esta espécie apresenta algumas vantagens para estudos científicos. O *Danio rerio* é transparente na sua primeira fase de desenvolvimento, o que torna fácil identificar e estudar a estrutura nervosa e malformações. Essa característica também facilita o estudo com substâncias fluorescente para visualizar a formação esquelética. Os embriões se desenvolvem rapidamente, com sistema nervoso completo em 24 horas após a fertilização. O *Danio rerio* tem sido utilizado como espécie modelo para vários estudos farmacológicos e toxicológicos.

Através do pré-teste realizado com várias concentrações de deltametrina verificou-se que a CL100 (concentração que matou 100% dos animais) está acima de 12µg/l. Em estudos com tilápias (*Oreochromis niloticus* L. 1758) usando ciflutrin, um pesticida piretróide, foi estimada uma CL100 e 89 µg/l e a CL50 (concentração que mata 50% dos animais) igual a 26 µg/l (BENLI, 2005). YILMAZ (2004) pesquisou o pesticida cipermetrin em *Poecilia reticulata* (lebiste) em 96 horas, verificando uma CL100 de 14 µg/l e CL50 de 9,45 µg/l. Um outro estudo de VIRAN et al. (2003) com *Poecilia reticulata* (lebiste), foi estimada a CL50 em teste agudo de 48 horas no valor de 5,13 µg/l. Com esses estudos, observa-se uma grande variabilidade de

concentração letal 50 e 100 % para os diferentes piretróides entre as espécies de peixes. Neste experimento não foi calculado exatamente a CL50, pois o objetivo era expor os peixes a concentrações subletais de deltametrina. Até a concentração de 10 µg/l durante as 72 horas de observação, os peixes não apresentaram alterações comportamentais, nem mortalidade. Mesmo durante os 14 dias de exposição ao pesticida, em concentrações de 6 µg/l e 10 µg/l de deltametrina, os animais não mostraram alterações na coloração, na natação e no cortejo. Sugerindo assim, que essas concentrações de deltametrina são subletais para a espécie em questão.

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; FAQI et al., 1998; GRAY e OTSBY, 1998).

ANDRADE et al. (2002) estudou os efeitos da deltametrina em ratos machos expostos intra-uterina e durante lactação, e também avaliou as progenitoras durante a gestação e lactação. Verificou-se que a duração da prenhez, o tamanho da ninhada, a razão sexo dos filhotes e os índices de parto, nascimento e desmame não foram afetadas nas doses testadas. Assim como neste trabalho, não observou-se diferença significativa no número de ovos e no número de ovos eclodidos entre o controle, acetona e as duas concentrações de deltametrina. Isso implica que não houve efeito da deltametrina nas concentrações utilizadas. Apesar de que nos dados analisados, pode-se observar uma tendência à diminuição do número de ovos nos grupos expostos à deltametrina, essa diferença não foi significativa.

Um possível efeito da deltametrina pode, porém, se manifestar na progênie adulta, que não foi avaliado neste trabalho. No que se refere ao índice gonadosomático dos animais expostos ou não a deltametrina variou de acordo com os dados na literatura. Conforme USEPA (2002) o IGS de *Danio rerio* varia de 8 a 13% para fêmeas e de 1 a 2% para machos. No estudo, todos os índices calculados, encontravam-se dentro dessas médias propostas pela USEPA, tanto das fêmeas

quanto dos machos. ANDRADE et al. (2002) mostrou o efeito da deltametrina na progênie, na maior dose testada (4 mg/kg). Houve redução no peso absoluto dos testículos e epidídimo e produção espermática diária quando comparados com o controle. Neste trabalho foi seguido o protocolo da USEPA para testes de substâncias com potencial de desregulador do sistema endócrino de 14 dias, o qual não inclui teste de progênie. Os descendentes na fase adulta foram reservados em aquários separados, como citados no item 3.6 (COLETA E CONTAGEM DOS ALEVINOS) para posteriores avaliações. Assim não se descarta a hipótese de que os descendentes na fase adulta possam ter alguma alteração reprodutiva.

Os agentes químicos podem atuar por múltiplos mecanismos, bem como a exposição a múltiplos agentes bloqueadores ou desreguladores da ação hormonal pode ter ação não só acumulativa, mas potencializada. Alguns estudos levam a crer que é mais importante o tempo do que a dose de exposição a esses agentes químicos, além do período em que o indivíduo foi exposto. Como já dito anteriormente, os mecanismos prováveis de ação desses agentes podem ser: Mimetizando o próprio hormônio; bloqueando a ação do hormônio ao ocupar os receptores que seriam destinados especificamente a ele, impedindo, dessa forma, que sua função seja exercida; causando danos no metabolismo dos hormônios, isto é, na sua síntese ou na sua destruição e eliminação fisiológica ou natural; ou afetando o Sistema Nervoso Central, onde está o principal controle de produção hormonal (WWF, 2000).

Apesar de neste estudo não ter sido observado alterações nos parâmetros avaliados, a deltametrina pode ser responsável por alterações em outros órgãos e em outras vias de exposição. Muitos estudos revelam que a deltametrina é um pesticida piretróide bem caracterizado como um agente neurotóxico.

NICARETA (2004) estudou os efeitos de doses subletais da deltametrina administradas via intracelomática em peixes *Ancistrus multispinis* (cascudos) através de biomarcadores bioquímicos como os níveis de citocromo P450 total (CYP450), a atividade da enzima EROD (etoxiresorufina- O – deetilase), a atividade da Na⁺K⁺-ATPase e a atividade da colinesterase (ChE). Após 96 horas de exposição, verificou-se a inibição da atividade da Na⁺K⁺-ATPase das brânquias, coração e esôfago e

indução da quantidade total do citocromo P450, bem como da atividade da EROD pela deltametrina. Geralmente a família do citocromo envolvida nesta indução é a CYP1A1. Porém não se descarta a possibilidade de outras sub-famílias estarem induzidas.

KAZETO et al. (2004) estudou alterações no citocromo P450 em relação ao sistema reprodutivo de *Danio rerio*. O citocromo P450 aromatase (CYP19) é a enzima estrogênica fundamental para conversão de andrógeno em estrógeno, com uma importante atuação na fase crítica de diferenciação sexual e no ciclo reprodutivo dos vertebrados adultos. Sabe-se que estrogênios, principalmente o 17 β -estradiol (E₂), tem papel importante no desenvolvimento, crescimento, diferenciação sexual e na reprodução; incluindo a vitelogenina, síntese da proteína da membrana dos ovos, gametogênese, desenvolvimento das células germinais e gonodais, e no comportamento reprodutivo. Está claro que a síntese desse hormônio dever ser apropriada para o sucesso reprodutivo e que alterações nos genes que codificam a enzima estrogênica pode alterar negativamente a produção de E₂. Nos peixes teleósteos o CYP19 resulta em duas estruturas diferentes, CYP19A1 e CYP19A2. CYP19A1 é encontrada no ovário e tem importante participação na dimorfismo sexual, na gametogênese, no tecido nervoso como cérebro, retina e hipófise. Acredita-se que CYP19A2 está envolvida com o desenvolvimento do sistema nervoso central e comportamento sexual. Além disso, tem-se sugerido o envolvimento da “aromatase cerebral” na fisiologia reprodutiva através do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas nos peixes. No estudo, foi observado que o composto estrogênico nonilfenol e o etinilestradiol (EE), induziram a expressão do CYP19A2, em doses dependentes. A exposição ao benzo[a]pireno (BaP), que é um contaminante ambiental também aumentou significativamente a transcrição do CYP19A2. Em contra partida, o CYP19A1 foi resistente ao tratamento com substâncias com potencial de desreguladores endócrinos, mas quando exposto a EE em altas concentrações a expressão diminuiu. Os dados sugerem que muitas classes de desreguladores endócrinos podem afetar o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em peixes através de uma diferente transcrição do gene CYP19.

Estudos mais profundos sobre as substâncias - propostas como desreguladoras endócrinas e suas ações no sistema neuroendócrinoreprodutivo são necessários. Primeiramente estudos em laboratório devem ser realizados com uma única substância para tentar se conhecer o mecanismo de ação e os efeitos da mesma, porém estudos com misturas de substâncias devem ser processados. Algumas substâncias com efeitos sinérgicos aos piretróides são utilizadas nas próprias formulações destes compostos comercializados. Os piretróides são metabolizados rapidamente tanto por processos de hidrólise como oxidativos Assim, nas formulações são utilizadas substâncias inibidoras do citocromo P450 para que haja um retardo na metabolização dos piretróides, que permanecerão por mais tempo no organismo animal (VALENTINE, 1990). Deste modo, poderá haver diferença de efeitos com o uso de substâncias puras das formulações comerciais. Além disso, quando os estudos são realizados no ambiente aquático pode haver contaminação de várias substâncias que podem levar a efeitos sinérgicos ou antagônicos.

A utilização de protocolos já validados por agências internacionais, assim como novos protocolos para estudos em toxicologia reprodutiva é de fundamental importância na avaliação dos riscos que estes contaminantes ambientais apresentam ao meio ambiente, a saúde pública e animal.

6 CONCLUSÕES

Nas condições descritas e com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A deltametrina, nas concentrações testadas e no tempo utilizado, na espécie *Danio rerio*, não produziu alteração significativa na reprodução da espécie;
- Quanto à histologia das gônadas dos machos e das fêmeas, não houve alteração significativa entre os grupos.

A partir dos resultados obtidos, vemos a necessidade de mais estudos sobre as substâncias propostas como desreguladores endócrinos e suas ações no sistema reprodutivo.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.J.M.; SANTANA, G.M.; ARAÚJO, S.L.; OHI, M.; DALSENTER, P.R. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Reproductive toxicology**, 2002.
- ARCAND-ROY, L.D.; BENSON, W. H. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 17, p. 49-57, 1997.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia dos peixes aplicada à piscicultura. **Editora UFSM**, p. 110-138, 2002.
- 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.
- BAXTER, J.D. Introdução à endocrinologia. IN: GREENSPAN, F.S; STRELULER, G.J. **Endocrinologia Básica e Clínica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5° edição, p. 417-427, 2000.
- BENLI, A. C. K. Investigation of acute toxicity of cyfluthrin on tilapia fry (*Oreochromis niloticus* L. 1758). **Environmental toxicology and pharmacology**. Vol. 20. pg. 13-34, 2005.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N. PRINCÍPIOS GERAIS DE FISIOLOGIA ENDÓCRINA. IN: BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **PRINCÍPIOS DE FISIOLOGIA**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 417-427, 1990.
- BERTOLETTI, E.; DOMINGUES, D.F. Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. Volume II-Testes crônicos com peixes. São Paulo, **CETESB. Relatório Técnico**, p.19, 1991.
- BONACELLA, P. H. A poluição das águas. **Coleção Desafio**. Moderna- SP, p. 28-30, 1990.
- BRADBURY, S.P.; COATES, J.R. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.108, p. 133-177, 1989.
- CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annu. Rev. Entomol**, v.43, p.1-16, 1998.
- CONNAUGHTON, M. A; AIDA, K. Female reproductive system, fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego, Academic Press, v. 2, p. 365-372, 1999.

COSTA, A. M. Análise histológica de gônadas de Carapau (*Trachurus trachurus Linnaeus*): morfogênese e escala de maturação. **Relat. Cient. Técn IPIMAR**, série digita, no. 16, p. 17, 2004.

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.

DEF – Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. Ed. Jornal Brasileiro de Medicina, 2001/02.

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

EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee). Final Report. **EPA/743/R-98/003**. U.S Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1998.

EDWARDS, R.; MILLBURN, P.; HUTSON, D.H. Comparative toxicity of cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v.84, p.512-522, 1986.

EELLS, J.T.; RASMUSSEN, J.L.; BANDETTINI, P.A.; PROPP, J. M. Differences in the neuroexcitatory actions of pyrethroid insecticides and sodium channel-specific neurotoxins in rat and trout brain synaptosomes. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v.123, p. 107-119, 1993.

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.

GÖRGEL, G.; NAGEL, R. Toxicity of lindane, atrazine and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.20, p. 246-255, 1990.

GOTZ, F.; THIEME, S.; DORNER, G. Female infertility-effects of perinatal xenoestrogen exposure on reproductive functions in animals and humans. **Folia Histochem Cytobiol**, v.39, Suppl 2, p.40-43, 2001.

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.

HOAR, W.S.; RANDALL D.J; DONALDSON E.M. In: HOAR, W.S.Fish physiology reproduction. Part A- Endocrine Tissues and Hormones, **Academic Press**, p. 223-275, New York, 1983.

KAZETO, Y.; PLACE, A.R.; TRANT, J.M. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. **Aquatic Toxicology**. v.69, p. 25-34, 2004.

KIM, K. R. et al. Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3 day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. **Reprod. Toxicol**, v.16, n.3, p.259-268, 2002.

LINNEY, E.; UPCHURCH, L.; DONERLY, S. Zebrafish as a neurotoxicological model. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 26, p.709-718, 2004.

MIAN, L.S.; MULLA, M.S. Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. **Journal Agric. Entomol**, v.9, p.73-98, 1992.

MOORE, A.; WARING, C.P. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmon salar L.*). **Aquatic Toxicology**, v.52, 2001.

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.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinis***. Dissertação (Mestrado em Farmacologia, Orientadora professora doutora Helena C. da Silva de Assis) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT). Effects on biotic systems. IN: OECD. **Guidelines for testing of chemicals**. Paris: OECD, 1981.

OHI, M. et al. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicol Lett**, v. 146, n.2, p.121-127, 2004.

RAND, G.M.; WELLS. P.G.; McCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Washington, D.C.: Taylor & Francis, p.3-67, 1995.

REDDING, J.M; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D. H. **The Physiology of Fishes**. CRC Press, p. 503-534, 1993.

REDDY, P.M.; PHILIP, G.H. In vivo inhibition of AchE and ATPase activities in the tissue of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.52, p.619-626, 1994.

REYS, L. L dos. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **RFML**, Grupo de Medicina Preventiva e Ciências Sociais. Faculdade de Medicina de Lisboa. Série III; p.213-225, 2001.

RIBEIRO, D.C.J. Biologia reprodutiva do Pirá (*Conorhynchus conirostris*) Valenciennes, 1840 (Pisces: Pimelodidae) do Rio São Francisco, região de Pirapora, Minas Gerais. Disponível em: <http://www.sfrancisco.bio.br/html/arquivos/RibeiroD001.pdf> Acesso: 30 janeiro de 2005.

SCALZO, F.M; LEVIN, E.D. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as a model system in neurobehavioral toxicology. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 26, p. 707-708, 2004.

SHARPE, R. M. Could environmental estrogenic 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 susceptibility of rats to deltamethrin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.126, p.186-190, 1994.

SCHULTZ, Y.D.; FAVARO, L.F.; SPACH, H.L. Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revist. Bras. Zool.**, n.19, p. 65-76, 2002.

SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, D.; WEINER, M.L. Mechanisms of Pyrethroid Neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, n.1, p.3-59, 2001.

STABENFELDT, G.H. Endocrinologia. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Michigan, Editora Guanabara, cap. 5, p. 259-273, 1992a.

STABENFELDT, G.H. Reprodução/Lactação. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Michigan, Editora Guanabara, cap. 6, p. 299-326, 1992b.

SUMANAS, S; LIN, S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. **DDT: targets**. v.3, n.3, p.89-96, 2004.

TEPPERMAN, J. Endocrinologia da reprodução no sexo masculino. In: TEPPERMAN, J. **Fisiologia Endócrina e Metabólica**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 3ª edição, p.69-87, 1977a.

TEPPERMAN, J. Endocrinologia da reprodução no sexo feminino. In: TEPPERMAN, J. **Fisiologia Endócrina e Metabólica**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 3ª edição, p. 88-113, 1977b.

UNIVERSITY OF OREGON. Institute of neuroscience. **Zebrafish frequently question**. Disponível em: <http://www.neuro.uoregon.edu>. Acesso: 23 de outubro de 2004.

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

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **EPA/68-W-01-023**: Fish screening assays for endocrine disruption, Ohio, 2002.

VALENTINE, W. Pyrethrin and Pyrethroid Insecticides 1990. In: **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**- v. 20, 2- 375-382, 1990.

VAZZOLER, A.E.A.M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática. **EDUEM**, Maringá, p.169, 1996.

VIRAN, R.; ERKOÇ, F.U.; POLAT,H.; KOÇAK,O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 55, p. 82-85, 2003.

YILMAZ, M; ERBASH, A.G.K. Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859).**Chemosphere**, v.56, p. 381-385, 2004.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book: Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), **University. of Oregon**, 4th Ed ,Eugene, 2000. Disponível em: http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html. Acesso: 20 de janeiro de 2003.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Deltamethrin, environmental health criteria, 97. **Geneva: World health organization**. IPCS, 1990.

WWFCANADA. The endocrine sistem. Disponível em:<[http:// www.wwfcanada.org](http://www.wwfcanada.org) >. Acesso em 31/05/2000.