

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA VERGARA

CLORPIRIFÓS NA GESTAÇÃO: RISCOS PARA A FERTILIDADE DOS
DESCENDENTES?

CURITIBA

2015

FERNANDA VERGARA

CLORPIRIFÓS NA GESTAÇÃO: RISCOS PARA A FERTILIDADE DOS
DESCENDENTES?

Projeto de pesquisa apresentado como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão II na Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

Coorientador: Prof. Me. Jonas Golart da Silva

CURITIBA

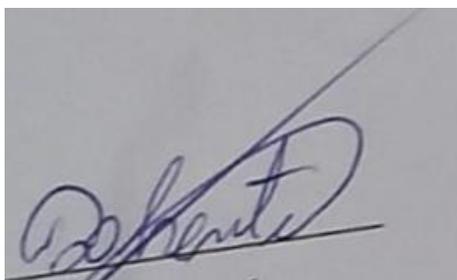
2015

TERMO DE APROVAÇÃO

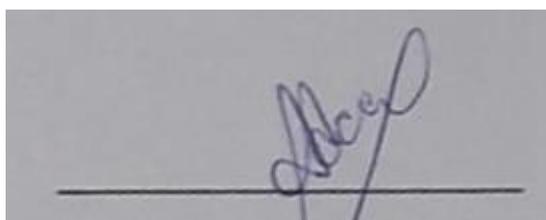
FERNANDA VERGARA

CLORPIRIFÓS NA GESTAÇÃO: RISCOS PARA A FERTILIDADE DOS
DESCENDENTES?

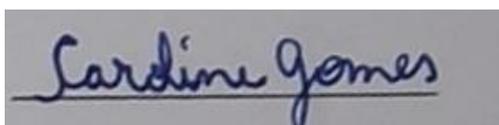
Projeto de pesquisa apresentado como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão II na Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Doutor Paulo Roberto Dalsenter
Orientador - Setor de Ciências Biológicas da UFPR.



Prof. Dr. Alexandra Acco
Setor de Ciências Biológicas da UFPR.



Me. Caroline Gomes
Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Curitiba, 26 de junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Paulo Roberto Dalsenter, por ter aceitado o convite de ser meu orientador, pelo acompanhamento, orientação e amizade durante todo o tempo que estagiei no laboratório.

Ao meu co-orientador Prof. Jonas Golart da Silva por me fornecer animais do seu projeto de doutorado e me auxiliar durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Angela e Renato por estarem sempre ao meu lado, pela presença em todos os momentos da minha vida e por me passarem sabedoria e a noção do que é certo e o que é errado. Por acreditarem que eu sou capaz. Nem todas as palavras do mundo conseguiriam expressar a gratidão, o amor e a admiração que tenho por vocês.

Ao meu irmão Ramon e ao meu namorado André por me aturarem nos momentos que pressão e ao apoio que me deram durante todo esse período.

RESUMO

Os desreguladores endócrinos são substâncias presentes de forma livre ou associados no ambiente, capazes de interferir em diversos estados fisiológicos, dentre eles o sistema endócrino tanto de humanos quanto de outros seres vivos. Eles podem causar interferência com a determinação do sexo masculino e a diferenciação sexual. Alguns exemplos são fitoestrógenos, pesticidas, metais pesados e medicamentos. O clorpirifós é um composto organofosforado usado para o combate de insetos na agricultura, conhecido classicamente pela sua capacidade de bloquear a ação da enzima acetilcolinesterase e é conhecido como um desregulador endócrino. Estudos já comprovaram a relação do clorpirifós com a alteração da fertilidade em ratos e camundongos. O projeto teve como objetivo avaliar possíveis alterações na fertilidade das proles de ratos Wistar machos onde as mães foram expostas com doses consideradas baixas de clorpirifós para gerar o efeito clássico sobre a enzima acetilcolinesterase. As ratas foram tratadas com quatro doses de clorpirifós (0,01, 0,1; 1 e 10mg/kg) mais o grupo controle veículo. O período de tratamento foi entre o 14º e o 20º dia de gestação. Dados coletados indicam não haver modificações estatísticas relevantes em ganho de peso corporal e nos pesos relativos dos órgãos avaliados (fígado, baço, rins, testículos, vesículas seminais e próstata). O fígado, o baço e órgãos reprodutivos dos animais de todos os grupos apresentaram aspecto e morfologia normais, indicando que o clorpirifós não induziu efeitos adversos. A distância anogenital e espermograma também não apresentaram diferença entre os grupos controle e tratados com clorpirifós. Os machos da prole não apresentaram alteração no espermograma. Conclui-se que com os protocolos utilizados não houve alteração na fertilidade dos ratos Wistar adultos.

Palavras-chave: Clorpirifós, Infertilidade, Organofosforado, Ratos Wistar

ABSTRACT

Endocrine disrupters are freeform substances or associated in the environment, able to interfere in various physiological states, including the endocrine system of both humans and other living beings. They may interfere with the determination of male and sexual differentiation. Some examples are phytoestrogens, pesticides, heavy metals and drugs. Chlorpyrifos is an organophosphate compound used to combat insects in agriculture, classically known for its ability to block the action of the enzyme acetylcholinesterase and is known to be an endocrine disrupter. Studies have proven the chlorpyrifos's relationship with the impairment of fertility in rats and mice. This project objective was to evaluate the possible fertility alteration of young male Wistar rats where the mothers have been exposed to chlorpyrifos doses considered low to generate the classic effect over the acetylcholinesterase enzyme. The rats were treated with four doses of chlorpyrifos (0.01, 0.1, 1 and 10 mg / kg) plus the vehicle control group. The treatment period was between the 14th and the 20th day of gestation. Data collected indicate no significant statistical changes in body weight gain and relative weights of the evaluated organs (liver, spleen, kidneys, testes, seminal vesicles and prostate). The liver, spleen and reproductive organs of animals in all groups showed normal appearance and morphology, indicating that chlorpyrifos did not induce adverse effects. The anogenital distance and semen analysis also showed no difference between groups control and treated with chlorpyrifos. The offspring of the males showed no change in sperm. We conclude that with the used protocols no change in the fertility of adult Wistar rats.

Keywords: Chlorpyrifos, Infertility, organophosphate, Wistar

Sumário

1. Introdução.....	8
2. Revisão de Literatura.....	10
2.1 Desreguladores Endócrinos	10
2.2 Clorpirifós	13
2.3 Eixo Hipotálamo – Pituitário – Gonadal.....	16
2.4 Sistema Reprodutor Masculino	18
2.5 Espermatogênese	19
3. Objetivos:.....	20
3.1 Objetivo geral:	20
3.2 Objetivos específicos:.....	20
4. Materiais e Métodos.....	21
4.1 Escolha da substância.....	21
4.2 Animais.....	21
4.3 Acasalamentos.....	21
4.4 Período de gestação e lactação	22
4.5 A formação dos grupos e tratamento	23
4.6 Avaliação da distância urogenital e Separação Prepucial	24
4.7 Peso relativo dos órgãos.....	24
4.8 Produção espermática diária, contagem de espermatozoides e a taxa de trânsito espermático.....	25
4.9 Morfologia espermática	25
4.10 Análise estatística.....	26
5. Resultados.....	26
6. Discussão	29
7. Conclusões	30
8. Referências.....	31

1. Introdução

Nos últimos anos, as descobertas e a conscientização sobre diversas moléculas tanto naturais quanto sintéticas são lançadas no meio ambiente pelos seres humanos. Há dúvidas se eles estão interferindo ou não no funcionamento normal dos organismos. Depois da Revolução Industrial houve um aumento no consumo dos recursos naturais e o despejo das substâncias químicas produzidas no ambiente. Com isso, elas começaram a ser estudadas nos meios acadêmicos.

Dessas substâncias liberadas no ambiente, aquelas que influenciam no funcionamento dos organismos em quaisquer fases dos seus ciclos de vida, são as que mais interessam a área científica. Chamadas de desreguladores endócrinos, essas substâncias são capazes de influenciar no desenvolvimento e funcionamento orgânico tanto de seres humanos quanto de outros seres vivos.

O termo “desreguladores endócrinos” é usado para descrever atualmente substâncias que tenham potencial para interferir com o sistema endócrino, seja modificando a capacidade das glândulas em produzir ou liberar seus hormônios, ou interferir na ligação dos hormônios com seus receptores ou ainda influenciar no funcionamento interno das células alvo destes hormônios (Jugan *et al.*, 2010).

Atualmente, um ponto que causa maior preocupação em relação à exposição de humanos e outros animais aos desreguladores endócrinos são se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações.

O clorpirifós é um dos mais comuns inseticidas usados em todo o mundo (Eaton *et al.*, 2008). Sua ação tóxica clássica é relacionada com a inibição da atividade da enzima colinesterase desregulando funções colinérgicas do sistema nervoso (Rosario and Purisch, 2011). Na última década, o aumento a respeito dos riscos associados às subdoses tóxicas tem sido observado. No Brasil, os organofosforados são os pesticidas mais utilizados de forma incorreta, e entre eles, o clorpirifós está em terceiro lugar entre as amostras mais insatisfatórias de uso irregular (ANVISA, 2011).

Estudos em mamíferos têm demonstrado que a função reprodutiva pode ser afetada por compostos de origem naturais e industrial (Waring e Harris, 2005). Uma das principais áreas de preocupação em relação aos desreguladores endócrinos é a interferência com a determinação do sexo masculino e a diferenciação sexual (Sharpe, 2006). A diferenciação sexual é determinada através de três formas ou vias,

sendo elas: geneticamente; forma gonadal, diferenciação de testículo e ovário do cume genital sexualmente indiferente, e este processo é independente do hormônio da gônada ainda não formado e não tenha adquirido a capacidade de fazer hormônios; e pela diferenciação sexual e masculinização, onde há dependência de hormônios (Hughes, 2001; Sandler, 2013). Além disso, os desreguladores endócrinos podem alterar ou diminuir a quantidade de espermatozoides, causando infertilidade.

Diante disso, esse projeto tem a finalidade de investigar os efeitos do clorpirifós na fertilidade de uma prole cuja mãe foi tratada com esse pesticida.

2. Revisão de Literatura

Classicamente os desreguladores endócrinos eram vistos apenas por seus efeitos exclusivos em mecanismos genômicos, atuando como agonistas de esteroides através da ligação ao receptor. Entretanto, há evidências de que alguns desreguladores endócrinos não agem através dos receptores hormonais, portanto, sem ação genômica (Waring e Harris, 2005).

Estudos em mamíferos têm demonstrado que a função reprodutiva pode ser afetada por compostos de origem naturais e industriais (Waring e Harris, 2005). Uma das principais áreas de preocupação em relação aos desreguladores endócrinos é a interferência com a determinação do sexo masculino e a diferenciação sexual. (Sharpe, 2006). A diferenciação sexual é determinada através de três formas ou vias, sendo elas: geneticamente; forma gonadal, diferenciação de testículo e ovário do cume genital sexualmente indiferente, e este processo é independente do hormônio da gônada ainda não formado e não tenha adquirido a capacidade de fazer hormônios; e pela diferenciação sexual e masculinização, onde há dependência de hormônios (Hughes, 2001; Sandler, 2013).

O Clorpirifós é um dos mais comuns inseticidas usados em todo o mundo (Eaton *et al.*, 2008). Sua ação tóxica clássica é relacionada com a inibição da atividade da colinesterase desregulando funções colinérgicas do sistema nervoso (Rosario and Purisch, 2011). Na última década, o aumento a respeito dos riscos associados às subdoses tóxicas tem sido observado.

Estudos apontam que esse organofosforado diminui a motilidade espermática tanto nos túbulos seminíferos, testículos e ducto deferente em ratos adultos, o que torna esses espermatozoides incapazes de fertilizar os óvulos (Suresh *et al.*, 2007; Farag *et al.*, 2010).

2.1 Desreguladores Endócrinos

Químicos chamados de desreguladores endócrinos possuem habilidade para reagir direta ou indiretamente com a estrutura do hormônio para alterar suas funções, modificar as suas vias de síntese, ou modular a expressão de receptores e suas afinidades por moléculas específicas (Chapin *et al.*, 1997).

Eles foram definidos pelo Conselho Europeu Comissão como "uma substância exógena ou mistura, que altera função (s) do sistema endócrino e tem, conseqüentemente efeitos adversos na saúde de um organismo intacto ou seus

descendentes ou (sub) população. Eles podem ser de ocorrência natural, tal como os flavonoides antioxidantes, que são encontrados em frutas e legumes, ou podem ser produtos químicos industriais, tais como alguns tipos de plastificante, que atuam como os contaminantes ambientais (Waring, 2005).

De acordo com a “Environmental Protection Agency” (EPA), um desregulador endócrino é definido como um “agente exógeno que interfere com síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (EPA, 1997).

Essas substâncias químicas vão atuar sobre o aparelho reprodutor masculino. Este envolve o funcionamento de uma série de importantes órgãos com a finalidade de reprodução humana e que dependem da inter-relação criteriosa entre componentes do sistema endócrino.

O aumento na incidência de infertilidade, as neoplasias testiculares, as anormalidades estruturais do sistema reprodutivo e as alterações neurológicas (motoras e comportamentais), podem ser relacionadas com a exposição aos pesticidas e a outros contaminantes químicos ambientais capazes de interferir no sistema endócrino e nervoso (Colborn *et al.*, 1993).

Os pesticidas são muito conhecidos pelo seu uso no controle de pragas agrícolas e de endemias como a malária. Muitos deles como os organoclorados foram banidos devido aos seus efeitos à saúde humana e da vida selvagem (Colborn, 2002).

Os organofosforados inibem a acetilcolinesterase e exercem sua ação, fazendo com que o acúmulo de neurotransmissor acetilcolina em sinapses mediadas por este último. Assim, tanto em insetos e mamíferos (Colborn, 2002).

Seu mecanismo de ação envolve a inibição de colinesterases: tanto a acetilcolinesterase (AChE) quanto a butirilcolinesterase (BChE) (Mood e Mood, 2008).

Os organofosforados incluem uma grande variedade de compostos capazes de alterar o funcionamento fisiológico, dentre eles o com maior incidência é o clorpirifós (Wang *et al.*, 2013).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor.

Em 2010, foram realizadas coletas de amostras, segundo o plano de amostragem estabelecido pelo programa, por diversos estados brasileiros. O PARA monitorou dezoito alimentos, a escolha das culturas baseou-se nos dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na disponibilidade destes alimentos nos supermercados das diferentes unidades da Federação e no uso intensivo de agrotóxicos nestas culturas.

Dentre todos os agrotóxicos pesquisados, os organofosforados foram os que alcançaram o maior índice de amostras insatisfatórias, como mostrado na figura 2. O clorpirifós foi o que apareceu em terceiro lugar na quantidade de amostras insatisfatórias (138 amostras), perdendo apenas para o metamidofós (141 amostras) e para o carbendazim (179 amostras), como mostrado na figura 1.

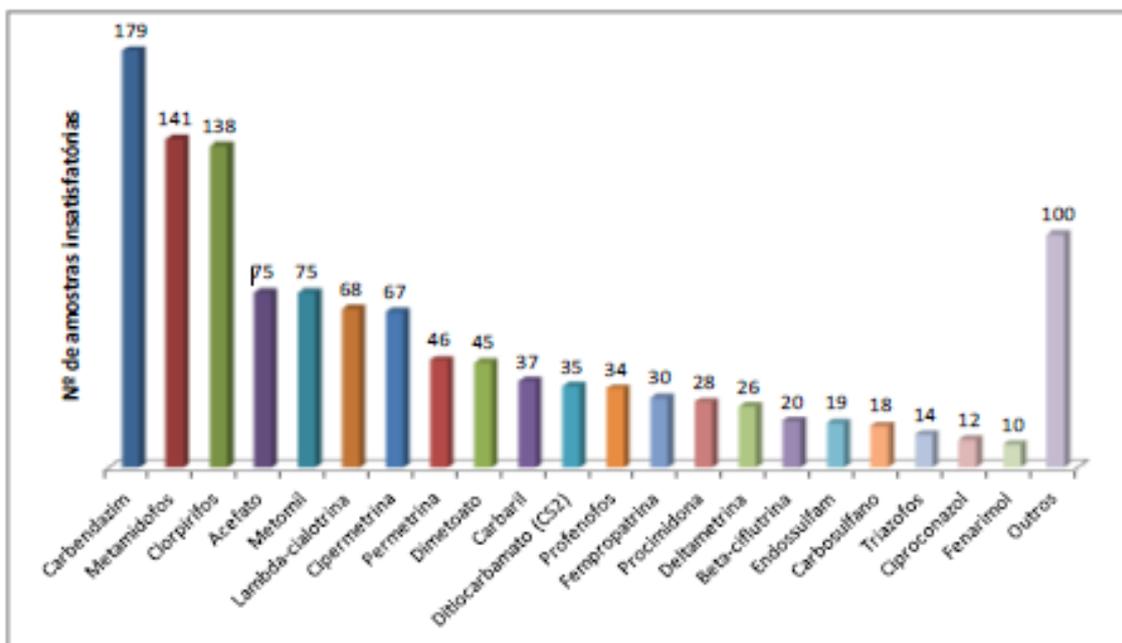


Figura 1 – Principais Amostras Insatisfatórias com uso irregular detectado – PARA, (2011)

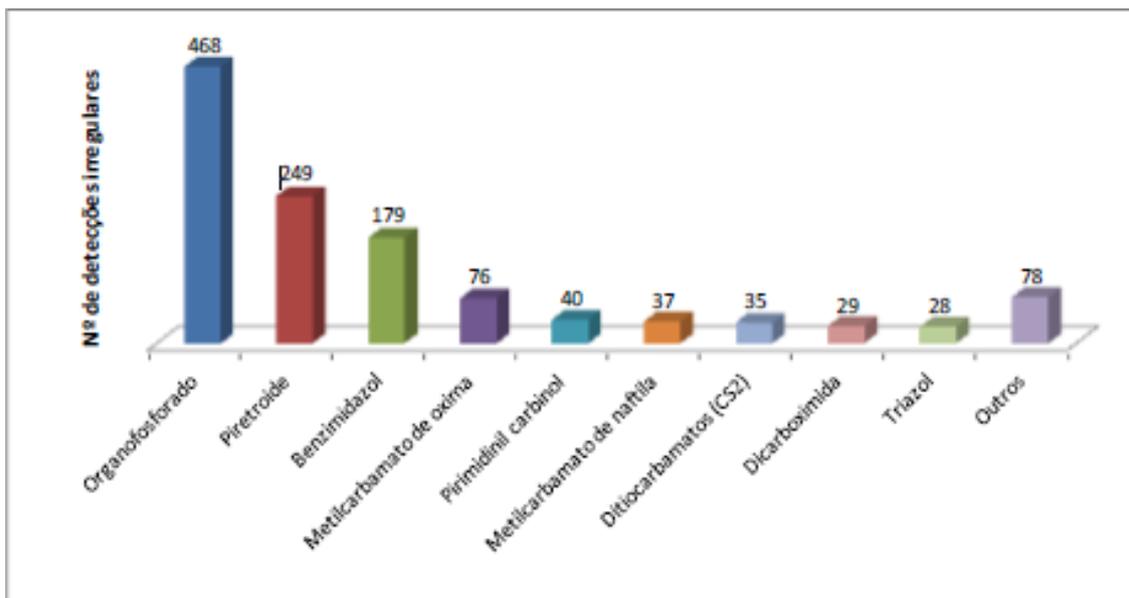


Figura 2 – Principais Grupos Químicos com amostras Insatisfatórias com uso irregular detectado – PARA, (2010)

2.2 Clorpirifós

O Clorpirifós (figura 3), quimicamente é um éster do ácido fosfórico ou de ácidos derivados desse. Possui a nomenclatura IUPAC de O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridina-2-yl fosforotioato, pertence ao grupo químico dos organofosforados, da classe dos inseticidas, formicidas e acaricidas, classificação toxicológica classe II (muito tóxico), com aspecto cristalino com pouca solubilidade em água. Sua função prioritária é sobre o sistema nervoso.

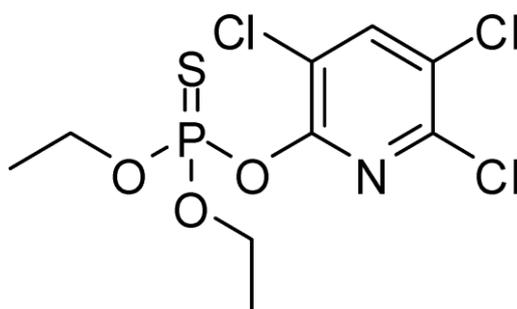


Figura 3- Molécula estrutural do Clorpirifós – Eaton 2010

Ele é utilizado em forma fosforotioato ($P = S$), que é convertido in vivo em fosfato ou um Oxon ativa ($P = O$) éster, que tem uma ação forte em colinesterase (Córdoba, 2001). No adulto humano esta transformação ocorre no fígado, principalmente da enzima mediada CYP3A4, a principal isoforma do citocromo P450 (CYP) (Dai *et al*, 2001).

O clorpirifós foi introduzido no mercado em 1965, usado primeiramente para controlar pragas como folhagens e insetos transmitidos através do solo em uma variedade de alimentos e rações culturas (Smegal, 2000). Seu uso como controle de pragas domésticas foi abolido em 2001 nos Estados Unidos e está em fase de término desde 2006 na Europa (Eaton *et al.*, 2008).

No Brasil de acordo com a Resolução-RDC nº 206 de 23/08/04, DOU de 24/08/04, determinou-se a suspensão do registro, bem como a não concessão de novos registros, de produtos saneantes domiciliares à base do ingrediente ativo clorpirifós, excluindo-se desta determinação somente aqueles registros destinados ao uso em iscas para combate de baratas, em embalagens porta iscas dotadas de dispositivo de segurança para evitar a exposição de crianças (ANVISA, PARA 2010).

Na natureza, o clorpirifós apresenta um alto grau de volatilidade (1.9×10^{-5} mmHg/ 25°C) o que o faz altamente dispersivo pelo ambiente. Sua degradação e de seus metabólitos no solo se dá principalmente por foto catálise, com meia vida que pode variar de 60 – 120 dias (White, 1992), e em presença de radicais hidroxila atmosféricos sua meia vida cai para seis horas (Dixon *et al.*, 2002). Como mostrado na figura 8, existem diversas vias de degradação no meio ambiente.

Sua metabolização ocorre por dessulfurização oxidativa do grupo P=S e assim oxidando para a forma de clorpirifós-oxon (CPO), o qual é considerado como o principal metabólito tóxico. Está reação é catalisada pelo grupo de enzimas do citocromo P450, principalmente no fígado (Estevan *et al.*, 2013).

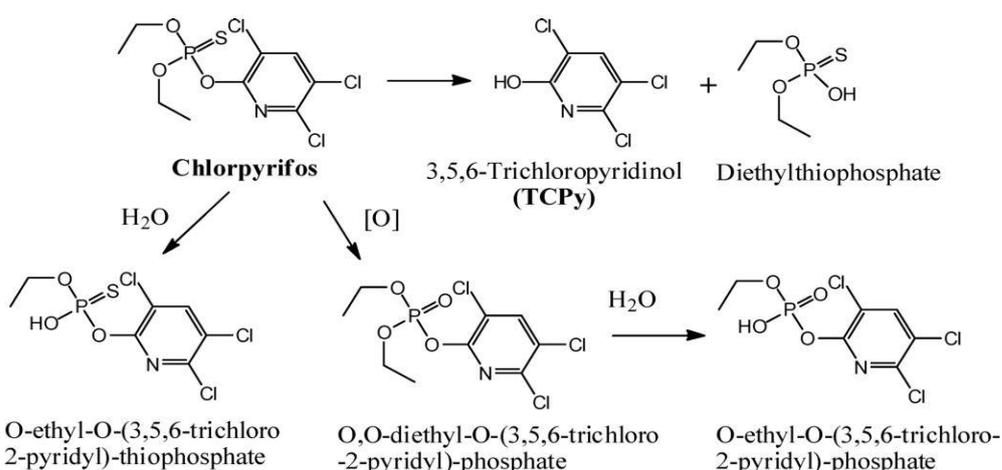


Figura 4- Vias ambientais degradação do Clorpirifós – Eaton 2010

O clorpirifós e seus metabólitos agem sobre a AChE (efeito clássico). O clorpirifós-oxon também pode sofrer processo de oxidação e, neste caso, será

formado o dietilfosfato e o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy). Esses metabólitos são indicadores de toxicidade por clorpirifós e são passíveis de serem avaliados por exames de urina (figura 5).

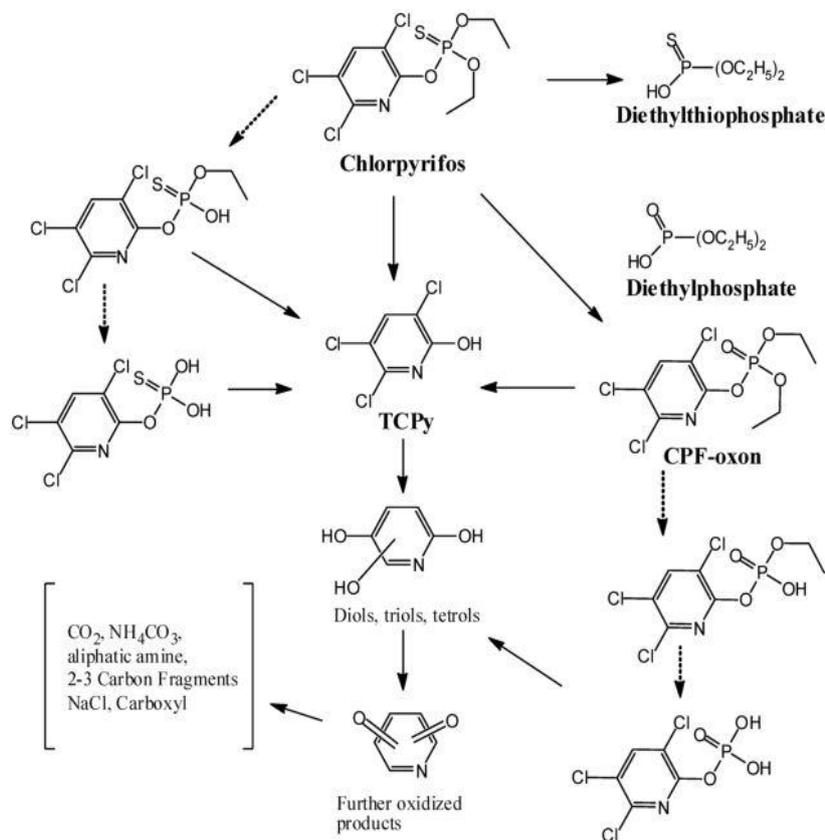


Figura 5 - Vias fisiológicas de degradação do Clorpirifós – Eaton 2010

Os experimentos em baixas doses têm comumente refletido as condições de exposição humana (Fliers *et al.*, 2006; Evans, 2007). No entanto, acredita-se ser possível, que o desenvolvimento do sistema nervoso no período gestacional pode ser relativamente mais susceptível ao clorpirifós do que o sistema nervoso mais desenvolvido encontrado em lactentes e crianças. Assim, é razoável considerar mulheres grávidas como uma subpopulação potencialmente suscetível (Eaton *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2012).

Gore, em 2002, demonstrou que o clorpirifós altera a expressão do gene GnRH e a sua biossíntese. Uma vez que o eixo reprodutivo consiste em hipotálamo, hipófise e elementos gonadais, qualquer um ou todos desses níveis são metas adequadas para uma perturbação endócrina. Por conseguinte, a observação de que o clorpirifós age diretamente sobre as células de GnRH indica que ele é um desreguladores endócrinos.

Estudos com camundongos adultos provaram que o clorpirifós diminuiu significativamente a taxa reprodutiva, contagem de espermatozoides e espermátides, motilidade espermática de machos tratados em grupos de 15 e 25mg/kg (Farag *et al*, 2010).

Em um estudo onde ratos machos e fêmeas foram tratados antes da monta, e as fêmeas durante a gestação com doses de 0, 1, 10 e 100 mg/kg, com avaliação no 91º dia de vida, demonstrou que houve uma supressão de estrogênio, androgênio e T4 com a dose-dependência. Na dose de 100 mg/kg houve disfunção reprodutiva como redução de fertilidade e número de implantações. A diminuição do número de espermatozoides e do peso da próstata observados são indicadores do nível reduzido de testosterona provocado pela intoxicação por clorpirifós (Jeong *et al*, 2006). Farag *et al*, 2010, demonstrou que o pesticida clorpirifós causa infertilidade em ratos, assim como diminuição nos níveis de testosterona.

2.3 Eixo Hipotálamo – Pituitário – Gonadal

O hipotálamo é uma pequena região do encéfalo localizada abaixo do tálamo, é o principal integrador entre os sistemas nervoso e endócrino por receber estimulação de diversas áreas tanto do encéfalo (sistema límbico, córtex cerebral e tálamo) quanto dos órgãos internos e da retina (Hall, 2011). Os axônios que saem dos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo e chegam na hipófise, formam um feixe ou eixo hipotálamo-hipofisária. A circulação porta-hipofisária é o principal meio de transporte dos hormônios do hipotálamo até a hipófise (Lent, 2010).

A hipófise, que pode ser chamada de pituitária, tem aproximadamente 1cm de diâmetro, pesa de 0,5 a 1 gramas e situa-se na sela túrcica, cavidade óssea na base do crânio e está ligada ao hipotálamo pelo pedúnculo hipofisário (Hall, 2011). Sua porção anterior secreta dois hormônios especiais para o desenvolvimento e para a função sexual normal tanto em homens quanto em mulheres: o LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante). Esses hormônios também são chamados de gonadotropinas (Bear, 2007). O hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) ou LHRH, hormônio liberador do hormônio luteinizante, causará liberação de FSH e LH. Essa liberação do hipotálamo é influenciada por diversos fatores psicológicos e ambientais, como apresentado na figura 6 (Bear, 2007).

Nas gônadas masculinas, o FSH agirá na espermiogênese, sendo que em sua etapa final participa também a testosterona, esteroide masculino produzido pelas células intersticiais de Leydig, localizadas nos testículos, sob estímulo do LH.

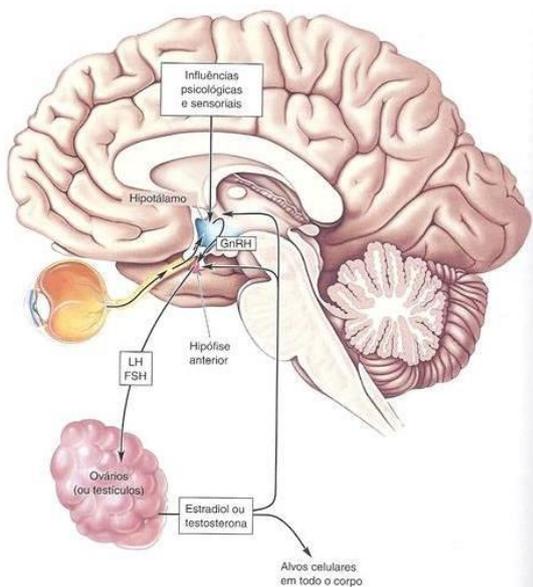


Figura 6. Eixo Hipotálamo Pituitária Gonadal (Bear, Mark, 2007)

As gonadotropinas tem sua secreção controlada por hormônios trópicos liberados pelo hipotálamo. A testosterona, principal hormônio androgênico masculino, é produzida nas células de Leydig, e sua secreção é regulada pelo LH (hormônio luteinizante), que é produzido pela hipófise (figura 7) (Aires, 2008).

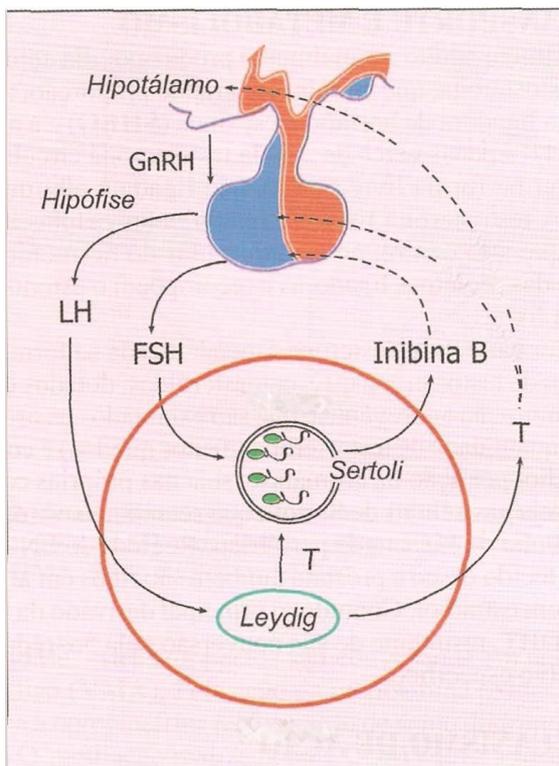


Figura 7. Eixo hipotálamo-hipófise-testículo. Linhas cheias representam secreção de hormônios; linhas tracejadas indicam retro controle negativo. T = testosterona; GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas; LH = hormônio luteinizante; FSH = hormônio folículo-estimulante (Aires, 2008).

2.4 Sistema Reprodutor Masculino

Uma gônada indiferenciada está presente em ambos os fetos do sexo masculino e do sexo feminino. Na quinta semana de vida fetal, a gônada indiferenciada começa a se desenvolver quando uma área engrossada do epitélio celômico (epitélio germinativo) aparece no aspecto médio dos mesonéfrs (Zhu e McGinley, 2009).

As células germinativas não aparecem nas cristas genitais até a sexta semana. Elas se originam no epiblasto, migram através da linha primitiva e, por volta da terceira semana, residem entre as células endodérmicas encontradas na parede da vesícula vitelínica. Durante a quarta semana, elas migram e chegam as gônadas primitivas e invadem as cristas genitais na sexta semana (Sandler, 2013). Se elas não chegarem as cristas, as gônadas não se desenvolvem.

As cristas urogenitais, os precursores comuns dos sistemas urinário e genital, começam a se desenvolver aproximadamente quatro semanas pós-fecundação do embrião humano como um espessamento dos mesonéfrs mesodérmicos cobertos de epitélio celomático. Cada cume urogenital divide-se em um urinário e uma cume

adreno-gonadal. O cume adreno-gonadal é o precursor comum das gônadas e glândulas adrenais (Rey e Grinspon, 2011). A crista gonadal é bipotencial e pode tornar-se um dos ovários ou um testículo.

As gônadas indiferenciadas possuem duas estruturas: o ducto de Muller e o ducto de Wolff. Quando o feto é macho, possui cromossomo Y e um gene SRY, testosterona será produzida e o ducto de Wolff irá se desenvolver como sistema reprodutor masculino interno, concomitantemente, o ducto de Muller será impedido de se desenvolver por um hormônio chamado de fator inibidor mulleriano (Imperato-McGinley, 1983; Sandler, 2013).

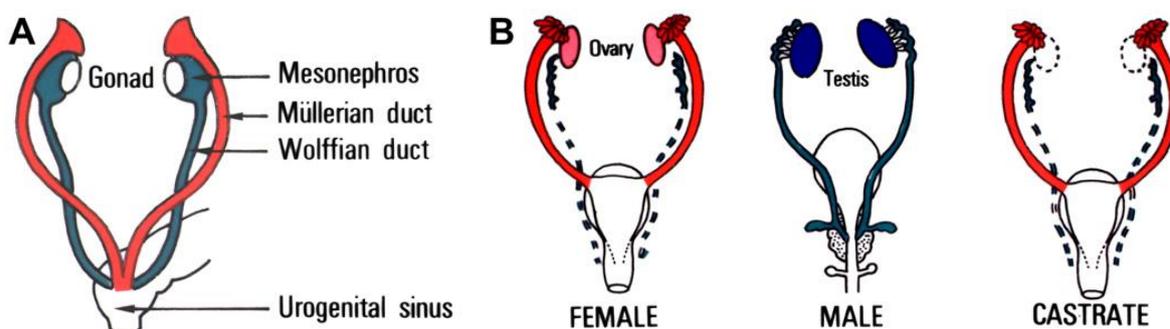


Figura 8 – Diferenciação sexual. A- Indiferenciada. B- Diferenciada (Rey e Grinspon, 2011).

2.5 Espermatogênese

Espermatogênese é o processo de formação dos espermatozoides, células haploides a partir de células diploides – espermatogônias, com o objetivo de reprodução. Esse processo começa no compartimento basal do epitélio do túbulo seminífero com espermatogônias em mitose e em diferenciação em espermatócitos. Depois esses espermatócitos primários entrarão em meiose (Aires, 2008).

A partir da divisão meiótica, o espermatócito primária forma dois espermatócitos secundários. Poucos dias depois, eles também se dividirão e formarão as espermátides, que passarão por processo de espermiogênese e formarão os espermatozoides (Hall, 2011).

A espermiogênese causa as mudanças como a formação do acrossomo, que cobre metade de toda a superfície nuclear e contém as enzimas que auxiliam na penetração no ovócito e suas camadas durante a fecundação, a condensação do núcleo, a formação do colo, da porção média e da cauda e a perda da maior parte do citoplasma e dos corpos residuais que são fagocitados pelas células de Sertoli (Sandler, 2013).

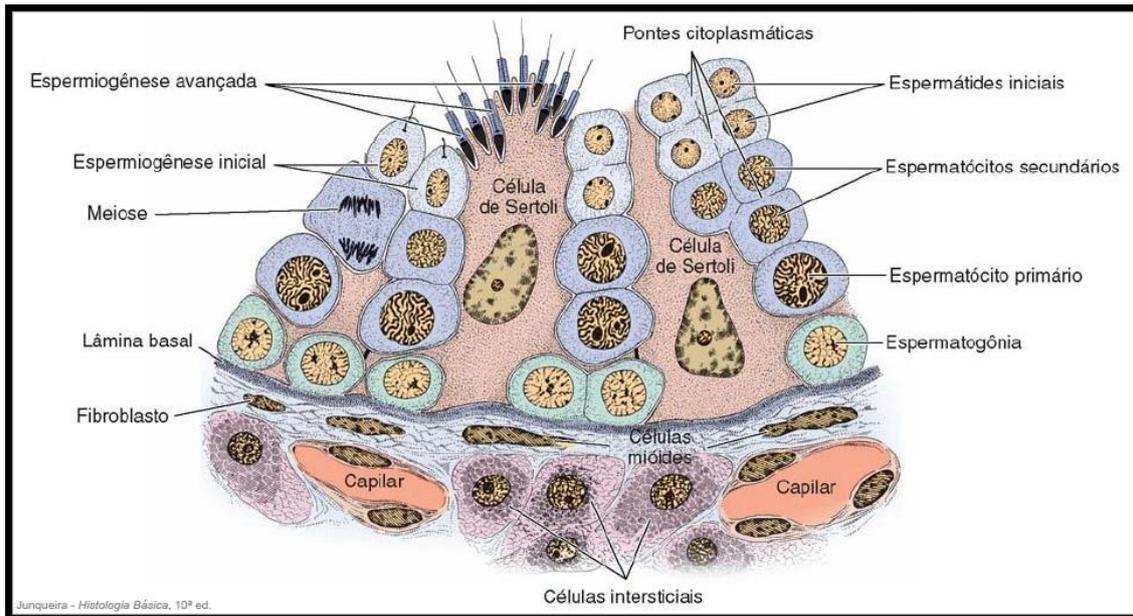


Figura 9- Espermiogênese – Junqueira (2004)

3. Objetivos:

3.1 Objetivo geral:

Determinar os efeitos do clorpirifós durante o período fetal, e a consequente influência sobre as funções reprodutivas dos machos da prole.

3.2 Objetivos específicos:

Após a exposição ao clorpirifós durante a gestação, os filhotes machos com 90 dias, foram utilizados para:

- Avaliar a mãe durante a prenhez até desmame.
- Avaliar o peso dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal) após noventa dias de vida.
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas de espermátides e espermatozoides no início da sua vida reprodutiva.
- Comparar e observar a distância ano-genital da prole.

4. Materiais e Métodos

Os animais utilizados nesse projeto foram aprovados pelo Comitê Setorial de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e estão sob o protocolo CEUA de número 758.

4.1 Escolha da substância

As doses selecionadas para formação dos grupos de estudo foram definidas com base no valor de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,01 mg/kg/dia, de acordo com o relatório monográfico C20 da ANVISA. O experimento foi conduzido com quatro doses de clorpirifós mais o grupo controle em que será administrado apenas o veículo.

Dose Controle: solução salina – 3 ml/kg

Dose 1: 0,01 mg/kg – IDA para humanos

Dose 2: 0,1 mg/kg – IDA x 10 para humanos

Dose 3: 1 mg/kg – IDA X 100 = IDA para ratos

Dose 4: 10 mg/kg – IDA X1000 (fator de segurança)

Todas as administrações de doses foram feitas contendo uma solução (clorpirifós mais solução salina) previamente manipulada para cada grupo com concentração adequada para que o volume utilizado não ultrapasse 3 ml/kg de volume total a ser ingerido por gavagem.

4.2 Animais

Os animais utilizados nos procedimentos experimentais foram ratos da variedade Wistar. Machos com paternidade comprovada (n=30, com 300 ± 50 gramas de massa corporal e 100 ± 20 dias de vida) e fêmeas virgens (n=90, com 250 ± 50 gramas de massa corporal e 100 ± 20 dias de vida) foram requisitados para o biotério da UFPR. Os filhotes advindos dos acasalamentos foram mantidos junto à mãe até o final do período de lactação (21º dia pós-natal). Após o período de lactação dos filhotes, as mães foram sacrificadas para coleta de material. Os animais foram mantidos em salas com temperatura constante (22 ± 3 °C), em ciclo de claro e escuro de 12 horas. A alimentação e a água foram os padrões fornecidos pelo biotério.

4.3 Acasalamentos

Ratas Wistar foram acasaladas com ratos machos adultos durante a fase escura do ciclo de luz (12 horas), na proporção de um macho para três fêmeas. Tais

ratas formaram os grupos de mães para cada dose. Para a comprovação da gestação realizou-se esfregaços vaginais diários, de cada fêmea, para verificar a presença de espermatozoides e confirmar a cópula, sendo que o dia de detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado como dia zero da gestação. O esfregaço foi realizado com o auxílio de uma micropipeta, através da lavagem vaginal com 50 µL de água destilada e posterior avaliação, a fresco, em microscopia ótica (aumento 40x). Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos (15 fêmeas por grupo). As fêmeas prenhas foram mantidas em caixas coletivas de polipropileno (414 x 344 x 168 mm), em número de no máximo três por caixa (uma caixa para cada grupo dose), e separadas individualmente no 20º dia de gestação quando terminou o período de exposição ao clorpirifós. A diferenciação dos animais nas caixas foi feita através de marcas coloridas na base da cauda. O dia do parto foi considerado como primeiro dia pós-natal, e os filhotes foram desmamados no 21º dia de lactação.

4.4 Período de gestação e lactação

O dia em que foram encontrados os espermatozoides no esfregaço vaginal, confirmando assim a gestação, foi considerado o dia zero da gestação (GD0). O tratamento com a administração de clorpirifós nas ratas prenhas foi iniciado no 14º da gestação (GD14) e aconteceu até o 20º (GD21). No terceiro dia pós-natal (PND3) foi feita a sexagem dos filhotes e foram mantidos todos na mesma caixa com a progenitora. A sexagem foi feita pela visualização da distância anogenital, que foi repetida até o 20º dia, com o auxílio de um paquímetro (Figura 10). A distância anogenital é uma medida antropométrica muito útil para avaliar a influência de substâncias androgênicas ou estrogênicas, tanto em animais quanto em humanos (Liu *et al*, 2014). A massa corporal da progenitora foi registrada a cada dia desde o início da gestação (GD1) até o fim da lactação, 21º dia pós-natal; durante esse período anotou-se a presença de algum sinal que indicasse toxicidade (perda de peso, piloereção, tremores, salivação, diarreia, convulsões, etc.).

Para obtenção de dados da gestação e da lactação foram registrados: o número de filhotes nascidos, a proporção de filhotes nascidos vivos (índice de nascimento), a sobrevivência durante a lactação (índices de viabilidade e desmame) e os filhotes excedentes foram eutanasiados com anterior sedação tendo como critério

os que apresentaram menor peso dentre os da prole, deixando apenas 8 filhotes por mãe. No dia do desmame, as progenitoras foram eutanasiadas por sedação seguida de decapitação. Das mães foram extraídos e pesados os órgãos (fígado e rins) para avaliação dos pesos relativos e o útero extraído para a contagem do número de implantações uterinas e registro de perdas pós-implantação. A partir do 18º dia de gestação (GD18) cada fêmea foi examinada diariamente (início da manhã e no final da tarde) para averiguar o nascimento dos filhotes, registrando o tempo de gestação.

As progenitoras que não pariram até o 26º dia de gestação foram sacrificadas e feita a avaliação do útero para a presença de implantações uterinas.

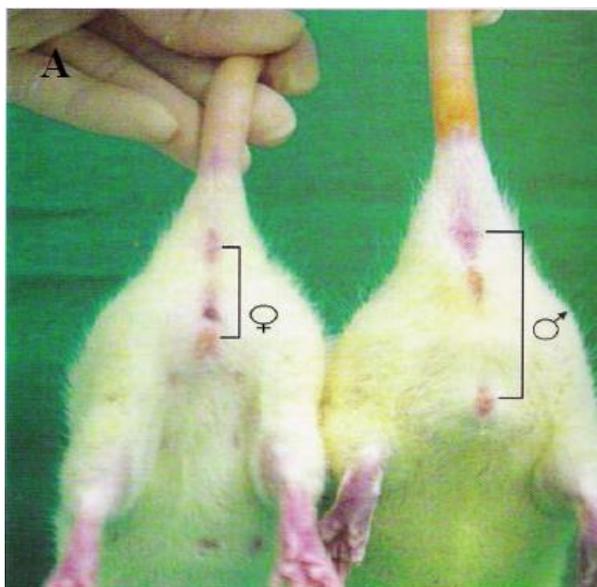


Figura 10 – Avaliação da distância anogenital entre machos (a direita) e fêmeas (a esquerda) para a sexagem de ratos. Apostila do Curso de Manipulação Animal da UFPR (2013).

4.5 A formação dos grupos e tratamento

As influências do composto clorpirifós sobre a atividade reprodutiva nos machos foram avaliadas na idade de 90 dias. O projeto foi composto por grupos de filhotes das mães que receberam clorpirifós nas doses estabelecidas no item 4.1, entre o 14º e o 20º dia de gestação, diariamente sempre o mesmo momento do dia, via oral por gavagem. Tal período foi estipulado pelo fato da atividade do eixo HPG, dos filhotes em gestação, ter início no 16º dia. Assim foram separados grupos de machos pelas doses que as mães receberam.

4.6 Avaliação da distância anogenital e Separação Prepucial

A distância anogenital (DAG) começou a ser avaliada no 3º dia pós-natal com auxílio de um paquímetro digital e continuou sendo medida de quatro em quatro dias até o 19º. Durante o crescimento dos filhotes, foi registrado o dia em que ocorreu a completa separação do prepúcio de cada animal (Figura 11).



Figura 11- Retração manual do prepúcio de um rato com separação prepucial completa. Imagem do autor (2014).

4.7 Peso relativo dos órgãos

A toxicidade sistêmica causada por uma substância pode ser avaliada por meio da determinação das massas relativas de órgãos, que por sua vez estão relacionadas aos efeitos na massa corporal animal. Alterações na massa absoluta dos órgãos indicam possíveis efeitos tóxicos morfofuncionais, causados pelo composto suspeito, no caso o clorpirifós.

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a retirada e determinação da massa dos órgãos. Foram determinadas as massas absolutas e relativas (expressos percentualmente em relação à massa corporal) dos testículos, próstata, vesícula seminal. Os órgãos foram pesados sem gorduras adjacentes. Para os testículos, foi utilizada a média entre o lado esquerdo e direito. A próstata foi pesada juntamente com a cápsula prostática, enquanto a pesagem da vesícula seminal foi realizada após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem.

4.8 Produção espermática diária, contagem de espermatozoides e a taxa de trânsito espermático

Após a pesagem, cada testículo teve sua túnica albugínea removida, e homogeneizado em 10 ml de cloreto de sódio 0,9% (salina) contendo 0,5% de Triton X-100 em homogeneizador de tecidos (FISATOM 720) por 1 minuto. O homogeneizado foi diluído 10 vezes em salina para a contagem microscópica do número de espermátides resistentes a homogeneização, em câmara hemocitométrica (Bueker, Alemanha). O número de espermátides por animal, obtido pela soma das contagens do testículo esquerdo e direito, foi dividido por 6,1 (correspondente ao número de dias em que as espermátides em estágios 17 a 19 estão presentes no epitélio seminífero) para a conversão em produção espermática diária (Robb, 1978). Para a contagem do número de espermatozoides, as caudas dos epidídimos foram cortadas em pequenos pedaços, homogeneizadas e processadas da mesma forma que dos testículos. A taxa de trânsito espermático foi obtida pela divisão do número de espermatozoides pela produção espermática diária (Amann, 1982).

4.9 Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia espermática (espermatozoides morfológicamente anormais) (figura12), foram coletados espermatozoides do ducto deferente por meio de uma lavagem da luz do ducto deferente, com 0,5ml de cloreto de sódio 0,9% (solução salina). Uma gota dessa suspensão (15µl) foi misturada com uma gota de solução de eosina 1% para a confecção de um esfregaço.

Foram analisados 200 espermatozoides por animal, em cada esfregaço, sob microscopia ótica em aumento de 400x, sendo registrado o número total de espermatozoides sem defeito de cauda e cabeça (Laboratório de Toxicologia Reprodutiva com modificações).

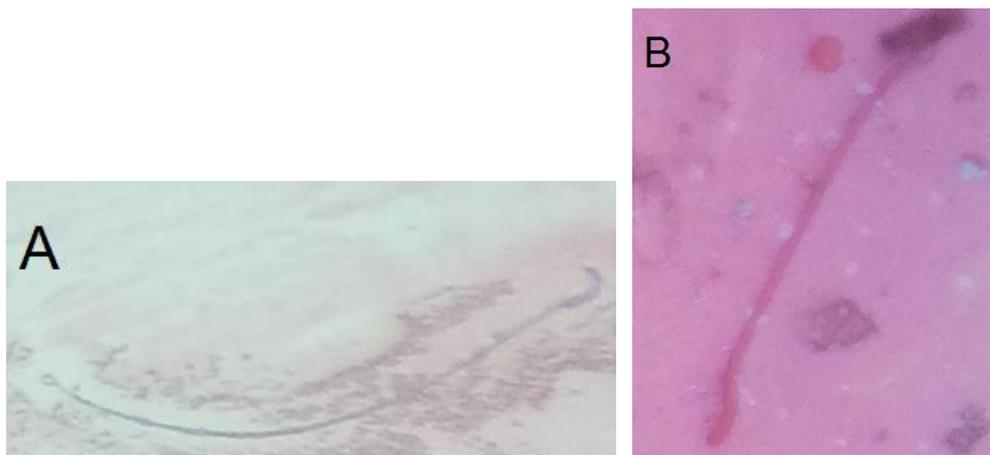


Figura 12 – Morfologia espermática (A- normal, B – Cabeça irregular). Imagem do autor (2014).

4.10 Análise estatística

Para este projeto foram consideradas como sendo unidades estatísticas as ninhadas geradas, e todos os animais machos destinados as avaliações. As variáveis com medidas intervalares e que apresentarem distribuição normal foram analisadas pela análise de variância de uma via (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste Bonferroni. As variáveis com medidas ordinais ou aquelas que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias, foram analisadas através do teste Kruskal-Wallis e as variâncias foram analisadas pelo teste Dunn. O nível de significância estatística utilizado é de 5 % ($p < 0,05$).

Todas as análises estatísticas e os gráficos foram confeccionados utilizando o programa Graphpad Prism®, versão 6.0; e o programa Microsoft Office Excel®, versão 2013.

5. Resultados

Os resultados mostrados a seguir são referentes a dados preliminares, visto que para uma análise estatística mais concisa seria necessário um aumento do número amostral de alguns dos grupos.

O ganho de peso das ratas prenhas durante o tratamento teve diferença entre o grupo de maior dose (10mg/kg) e o grupo controle (gráfico 1).

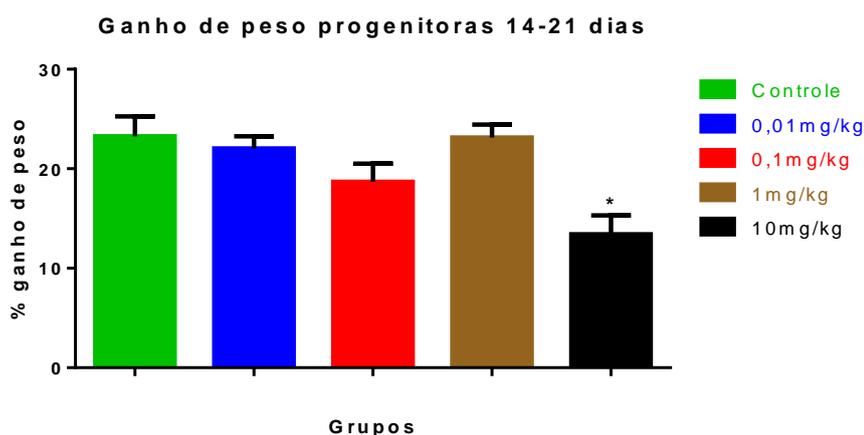


Gráfico 1. Ganho de peso das progenitoras durante tratamento com diferentes doses de clorpirifós entre os dias 14^o-21^o. * = $p < 0,05$ (ANOVA, seguido pelo pós teste de Bonferroni).

A medida da distância anogenital, marcadora das regulações androgênicas e estrogênicas não apresentou diferença estatística entre os filhotes do grupo controle e filhotes dos grupos doses (gráfico 2). O mesmo acontecendo com a separação prepucial não apresentando diferença estatística como indicado no gráfico 3.

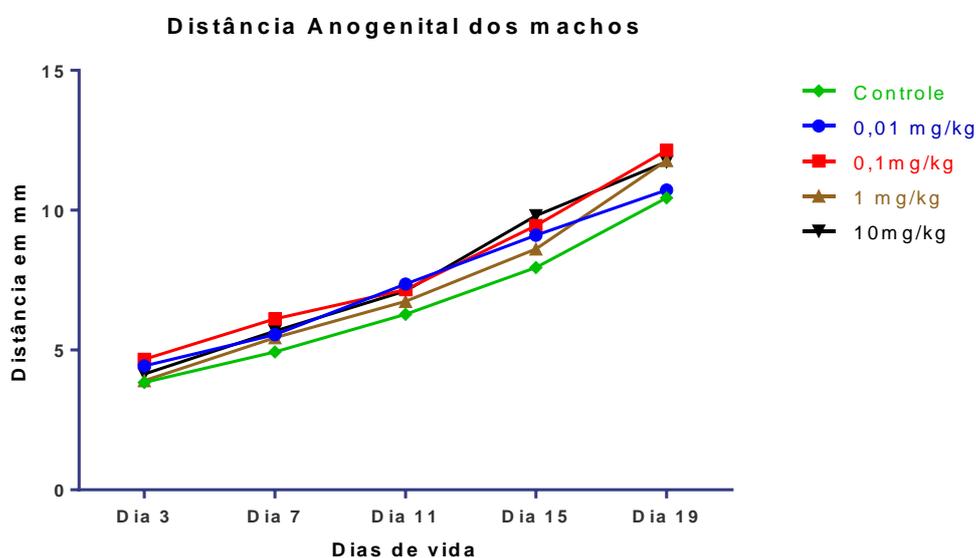


Gráfico 2. Evolução da DAG nos filhotes machos durante o período de lactação (ANOVA, seguido pelo pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

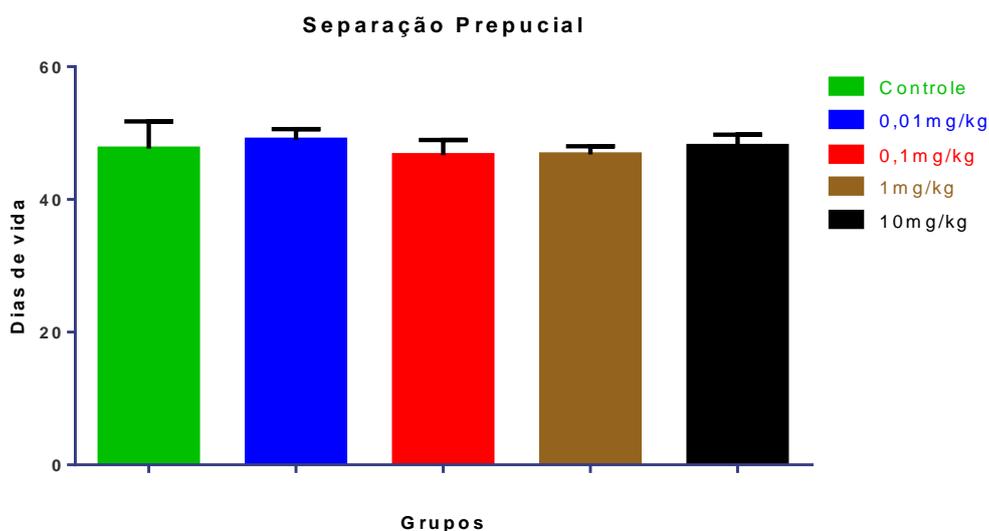


Gráfico 3. Separação prepucial. Os resultados expressam as médias em dias para a separação prepucial completa \pm erro padrão da média (ANOVA, seguido pelo pós teste de Dunn).

O peso relativo dos órgãos dos descendentes machos, aos 90 dias de vida, não diferenciou estatisticamente em relação ao peso dos órgãos, descartando no primeiro momento a possibilidade de uma intoxicação sistêmica (Tabela 1).

Tabela 1. Peso relativo dos órgãos avaliados (ANOVA, seguido pelo pós teste Bonferroni, $p < 0,05$)

Peso relativo dos órgãos(%)	Grupos doses (mg/kg)				
	Controle	0,01	0,1	1	10
Fígado	4,028 \pm 0,810	4,321 \pm 0,443	4,179 \pm 0,183	4,205 \pm 0,200	4,110 \pm 0,501
Rim	0,367 \pm 0,014	0,346 \pm 0,031	0,380 \pm 0,017	0,359 \pm 0,013	0,374 \pm 0,015
Baço	0,210 \pm 0,012	0,218 \pm 0,026	0,227 \pm 0,020	0,220 \pm 0,019	0,226 \pm 0,017
Vesícula Seminal	0,161 \pm 0,018	0,170 \pm 0,068	0,183 \pm 0,031	0,191 \pm 0,016	0,182 \pm 0,024
Epidídimo	0,156 \pm 0,007	0,157 \pm 0,010	0,164 \pm 0,016	0,167 \pm 0,007	0,150 \pm 0,015
Próstata	0,073 \pm 0,017	0,060 \pm 0,012	0,065 \pm 0,015	0,063 \pm 0,018	0,076 \pm 0,011
Testículo	0,504 \pm 0,031	0,503 \pm 0,027	0,528 \pm 0,063	0,501 \pm 0,017	0,515 \pm 0,052

Em relação ao espermograma, a produção espermática diária, a taxa de trânsito, quantidade de espermatozoides e quantidade de espermatozoides anormais não houve diferença estatística (Tabela 2).

Tabela 2. Espermograma (ANOVA, seguido pelo pós teste Bonferroni, $p < 0,05$)

Espermograma	Grupos	doses (mg/kg)			
		Controle	0,01	0,1	1
Produção espermática diária (x10 ⁶)	79,45 ± 3,842	73,84 ± 10,54	78,17 ± 11,34	60,86 ± 8,363	62,89 ± 17,25
Taxa de trânsito espermática (dias)	2,732 ± 0,360	2,173 ± 0,620	2,527 ± 0,477	2,388 ± 0,603	3,316 ± 0,312
Nº de espermatozoides (x10 ⁶)	218 ± 38,11	156,4 ± 30,81	201,4 ± 18,33	154,7 ± 50,72	170,3 ± 16,56
Nº de espermatozoides anormais (em 200)	2 ± 0	3,4 ± 0,894	3,429 ± 0,975	3 ± 2	5,5 ± 2,646

6. Discussão

A população está sujeita à ingestão de pesticidas encontrados nos alimentos *in natura* e processados. Essa exposição ambiental a substâncias, dentre as quais incluem-se químicos industriais, pesticidas, fungicidas, metais pesados e fitoestrógenos podem interferir em mecanismos hormonais. Esta pode alterar ou eliminar dimorfismos comportamentais, especialmente quando a exposição ocorre durante períodos críticos do desenvolvimento. Também pode alterar a fisiologia dos órgãos afetados por esses hormônios.

A exposição crônica a baixas doses pode levar a alterações reprodutivas, imunológicas e ao aparecimento de neoplasias (Colborn *et al*, 1993). Essa forma de intoxicação não é explícita ou não se consegue relacionar o período de exposição ao aparecimento do efeito.

Eaton e colaboradores em 2008, asseguram que devem ser consideradas mulheres grávidas como uma subpopulação potencialmente suscetível ao clorpirifós.

Estudos comprovaram alterações na fertilidade de ratos expostos ao organofosforado em doses mais altas que as utilizadas (Breslin *et al*, 1996; Jeong *et al*, 2006; Farag *et al*, 2010).

O ganho de peso das ratas prenhas durante o tratamento apresentou diferença estatística entre o grupo da maior dose (10mg/kg) e o controle. Essa diferença deve-se as possíveis alterações causadas pelo clorpirifós no metabolismo energético na gestação. O peso relativo dos órgãos após eutanásia entre o grupo controle e as doses não apresentou diferença significativa.

A distância anogenital é um marcador importante de desmasculinização em roedores e não foi encontrada diferença entre os grupos indicando que a exposição indireta dos filhotes a baixas doses do tóxico não interferiu no desenvolvimento sexual neonatal.

Em relação aos machos adultos da prole, os pesos relativos dos órgãos internos avaliados foram estatisticamente indiferentes, sugerindo que não houvera intoxicação sistêmica, semelhante a estudos prévios. (Breslin, 1996).

Com o objetivo de avaliar a interferência da exposição durante a gestação, na fertilidade dos machos da prole, foi avaliado o número de espermatozoides produzidos a partir de uma contagem das células encontradas no epidídimo, produção espermática diária, a taxa de trânsito. Comparando-se os dados do grupo controle com os grupos doses não houve diferença estatística, possivelmente pelo tipo e período de exposição.

Também deveria aumentar o grupo amostral para conclusões mais satisfatórias e conclusivas.

7. Conclusões

As ratas prenhas não foram afetadas pelas doses testadas do clorpirifós, indicando que estas doses possuem uma margem de segurança, não interferindo no metabolismo das ratas.

Da mesma forma, os descendentes não foram afetados pelas doses testadas e não demonstraram alteração na distância ano-genital e fertilidade. Assim concluímos que o pesticida organofosforado clorpirifós não induziu efeitos adversos após exposição indireta nas doses e protocolos utilizados.

8. Referências

AMANN, R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. Fundamental and Applied Toxicology, v. 2, p. 13-25. 1982.

BEAR, MARK F.(2007). Neuroscience: exploring the brain. 3ª edição. Lippincott Williams & Wilkins.

BRESLIN, J. W., ET AL. (1996). Evaluation of the Developmental and Reproductive Toxicity of Chlorpyrifos in the Rat. Fundamental and applied toxicology 29, 1 19 - 130

AIRES, M. DE MELLO. (2008). Fisiologia. 3ª .edição. - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan.

COLBORN, T. O futuro roubado. Tradução Claudia Buchwetiz. Porto Alegre: L&PM, 2002. 354 p.

COLBORN, T., F. S. VOM SAAL, ET AL. (1993). "Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans." Environ Health Perspect **101**(5):378-384.

CÓRDOBA D. Toxicología. 4ª. Edição, Manual Moderno.Bogotá (Colombia), 2001. 858 p.

DAI D., TANG J., ROSE R., HODSONG E., BIENSTOCK R., ET AL. Identification of Variants of CYP3A4 and Characterization of Their Abilities to Metabolize Testosterone and Chlorpyrifos. Pharmacol. 2001; 29:825-823.

DASTON, G. P., J. C. COOK, ET AL. (2003). "Uncertainties for endocrine disrupters: Our view on progress." Toxicological Sciences **74**(2): 245-252

DIXON, B., H. D. SCOTT, ET AL. (2002). "Prediction of aquifer vulnerability to pesticides using fuzzy rule-based models at the regional scale." Physical Geography **23**(2): 130-153.

EATON, D. L., R. B. DAROFF, ET AL. (2008). "Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment." Critical Reviews in Toxicology **38**(s2): 1-125.

ESTEVAN, C., E. VILANOVA, ET AL. (2013). "Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: Considerations for embryotoxic risk assessment." Toxicology Letters **217**(1): 14-22.

FARAG, A.T ET ALL, 2010. Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. Reproductive Toxicology 29 (2010) 80–85.

GILBERT, M. E., J. ROVET, ET AL. (2012). "Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences." NeuroToxicology **33**(4): 842-852

GUILLETTE, L. J. (2006). "Endocrine disrupting contaminants - Beyond the dogma." Environ Health Perspect **114**: 9-12.

GORE AC. Developmental exposures and imprinting on reproductive neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol (2008);**29**:358–374.

GORE AC. Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. Molecular and Cellular Endocrinology 192 (2002) 157-170

HALL, J.E. (2011). Tratado de Fisiologia Médica. 12ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier

HUGHES, I.A. Minireview: sex differentiation. Endocrinology (2001); 142: 3281–3287.

IMPERATO-MCGINLEY J (1983). Sexual differentiation: Normal and abnormal. In: Martini L and James VHT (eds.) Current Topics in Experimental Endocrinology, Vol. 5: Fetal Endocrinology and Me, pp. 231–307. New York: Academic Press.

JEONG, S.H ET ALL. Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid hormones in rat F0- and F1-generations. Toxicology 220 (2006) 189–202

JUGAN, M.-L., Y. LEVI, ET AL. (2010). "Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology." Biochemical Pharmacology **79**(7): 939-947

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

LENT, R. Cem bilhões de neurônios. Editora Atheneu. 848p, 2010.

LIU, C., XU, X., HUO, X. Anogenital distance and its application in environmental health research. Environ Sci Pollut Res Int. 2014 Apr;**21**(8):5457-64

MOOD, B.M; MOOD, B. K. Neurotoxic Disorders of Organophosphorus Compounds and Their Managements. Archives of Iranian Medicine, Volume 11, Number 1, (2008): 65 – 89.

PHOENIX CH, GOY RW, GERALL AA, YOUNG WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. Endocrinology 1959;**65**:369–392.

REY, R. A., GRINSPON, R. P., Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 25 (2011) 221–238

ROSARIO, P. W. AND S. PURISCH. "Thyroid dysfunction in pregnancy: definition of TSH cut-off should precede the decision of screening in low-risk pregnant women." Gynecological Endocrinology **27** (2011). 205-208

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

SANDLER, T.W. Langman, Embriologia Médica. 12. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2013. 209 -222.

SMEGAL DC. Human Health Risk Assessment. Chlorpyrifos. U.S Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. Health Effects Division, 2000. 8:138 p.

SHARPE, R.M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 20, No. 1, (2006) pp. 91–110

US.EPA, 1997; Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington D. C, 1997

VENEROSI, A., L. RICCERI, ET AL. (2012). "Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: The case of chlorpyrifos." NeuroToxicology **33**(6):1420-1426.

WANG, L., T. OHISHI, ET AL. (2013). "Reversible effect of developmental exposure to chlorpyrifos on late-stage neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in mouse offspring." Reproductive Toxicology **38**(0): 25-36.

WARING, R.H., HARRIS, R.M. Endocrine disrupters: A human risk? Molecular and Cellular Endocrinology 244 (2005) 2–9

WHITE, R. K. (1992). "Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic-Chemicals, Vol 2, Solvents - Howard, Ph." Risk Analysis **12**(1): 163-163

ZHU, Y.S., MCGINLEY, I. Disorders in Male Sexual Differentiation: Molecular Genetics, Gender Identity, and Cognition. Hormones, Brain and Behavior (2009), vol. 5, pp. 2787-2824

CHAPIN, R. E. et al. The Effects of Perinatal/Juvenile Methoxychlor Exposure on Adult Rat Nervous, Immune, and Reproductive System Function. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 138-157, 1997. ISSN 0272-0590. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272059097923812> >.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 5, p. 378-84, Oct 1993. ISSN 0091-6765 (Print)

0091-6765 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8080506> >.

DIXON, B. et al. Prediction of aquifer vulnerability to pesticides using fuzzy rule-based models at the regional scale. **Physical Geography**, v. 23, n. 2, p. 130-153, Mar-Apr 2002. ISSN 0272-3646. Available at: < <Go to ISI>://000182722900003 >.

EATON, D. L. et al. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. s2, p. 1-125, 2008. Available at: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10408440802272158> >.

ESTEVAN, C.; VILANOVA, E.; SOGORB, M. A. Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: Considerations for embryotoxic risk assessment. **Toxicology Letters**, v. 217, n. 1, p. 14-22, 2013. ISSN 0378-4274. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427412014063> >.

EVANS, T. J. Chapter 14 - Reproductive toxicity and endocrine disruption. In: RAMESH, C. G.; DVM, et al (Ed.). **Veterinary Toxicology**. Oxford: Academic Press, 2007. p.206-244. ISBN 978-0-12-370467-2.

FLIERS, E.; UNMEHOPA, U. A.; ALKEMADE, A. Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 251, n. 1-2, p. 1-8, Jun 7 2006. ISSN 0303-7207. Available at: < <Go to ISI>://000238344900001 >.

GILBERT, M. E. et al. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 4, p. 842-852, 2012. ISSN 0161-813X. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X11002051> >.

JUGAN, M.-L.; LEVI, Y.; BLONDEAU, J.-P. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 7, p. 939-947, 2010. ISSN 0006-2952. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295209009708> >.

ROSARIO, P. W.; PURISCH, S. Thyroid dysfunction in pregnancy: definition of TSH cut-off should precede the decision of screening in low-risk pregnant women. **Gynecological Endocrinology**,

v. 27, n. 3, p. 205-208, Mar 2011. ISSN 0951-3590. Available at: < <Go to ISI>://000286993200013 >.

WANG, L. et al. Reversible effect of developmental exposure to chlorpyrifos on late-stage neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in mouse offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 38, n. 0, p. 25-36, 2013. ISSN 0890-6238. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623813000221> >.

WHITE, R. K. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic-Chemicals, Vol 2, Solvents - Howard, Ph. **Risk Analysis**, v. 12, n. 1, p. 163-163, Mar 1992. ISSN 0272-4332. Available at: < <Go to ISI>://A1992HJ87200024 >.