

***DIOGO HENRIQUE KITA***

**EFEITOS DO PESTICIDA ROUDUP<sup>®</sup> SOBRE O SISTEMA  
REPRODUTOR DE RATOS WISTAR**

Monografia apresentada à Universidade Federal do  
Paraná como requisito parcial para a obtenção do título  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter.

CURITIBA

2004

## AGRADECIMENTOS

Ao Doutor, professor e amigo Paulo Roberto Dalsenter pela sua orientação, amizade e dedicação em passar os conhecimentos referentes à pesquisa científica.

A Kenia por seus conselhos, sua amizade, sua alegria... Por ser uma pessoa especial que jamais esquecerei.

À Claudia (ou melhor, “Claudinha”), que tem muito a nos ensinar com sua calma e paciência.

A Samanta que surpreende a todos com seu conhecimento, não nos deixando errar.

Aos professores do departamento de farmacologia que mais do que mentores são amigos.

Aos colegas de corredor, Tony, Lílian, Márcia, Ivana, Marcelo, Evelise, Cris, Daniel e outros pelos momentos de descontração neste “ponto de encontro”.

Aos funcionários do Biotério pela ajuda no fornecimento e cuidado com os animais e pela amizade de todos.

A todos os funcionários do departamento de farmacologia pelo suporte técnico durante os experimentos, em especial à Silvia que sempre nos recebeu sorrindo.

Aos meus grandes amigos Ariel, Eneias e João, vulgo “Pebe”, que sempre estiveram ao meu lado nas horas boas e más (mesmo que fosse apenas para tirar sarro da minha cara).

A todas as pessoas que tive o privilégio de conhecer dentro e fora das paredes da universidade.

E é claro, a minha família, pelo apoio, incentivo e por sempre estar presente em todos os momentos de minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
RESUMO.....	ii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 DESREGULADORES ENDOCRINOS .....	3
2.2 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO .....	5
2.2.1 Espermatogênese .....	5
2.2.2 Hormônio sexuais masculinos .....	8
2.3 ROUNDUP® .....	9
2.4 TESTES TOXICOLÓGICOS .....	11
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	13
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
4.1 ANIMAIS .....	14
4.2 SUBSTÂNCIA UTILIZADA .....	14
4.3 DOSES E TRATAMENTO .....	14
4.4 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTAÇÃO .....	14
4.5 DESENHO EXPERIMENTAL .....	15
4.5.1 Experimento I: Efeito do Roundup® após exposição crônica .....	15
4.5.1.1 Ganho de massa corporal .....	15
4.5.1.2 Separação prepucial .....	15
4.5.1.3 Peso absoluto e relativo de órgãos internos, órgãos sexuais e glândulas sexuais acessórias .....	16
4.5.1.4 Número de células espermáticas .....	16
4.5.1.5 Número de espermatozóides na cauda do epidídimo .....	17
4.5.1.6 Avaliação histológica dos testículos .....	17
4.5.2 Experimento II: Teste de Hershberger .....	19
4.5.3 Análise estatística .....	20

<b>5 RESULTADOS</b> .....	21
5.1 GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO E RELATIVO.....	21
5.2 SEPARAÇÃO PREPUCIAL .....	22
5.3 PESO ABSOLUTO E RELATIVO DE ÓRGÃOS .....	23
5.4 NÚMERO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS, ESPERMATOZÓIDES E TRÂNSITO ESPERMÁTICO .....	24
5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS .....	26
5.5.1 Área de túbulos seminíferos .....	26
5.5.2 Espermatogênese completa e incompleta .....	26
5.6 TESTE DE HERSHBERGER .....	27
5.6.1 Peso no sacrifício .....	27
5.6.2 Peso absoluto e relativo de órgãos internos e glândulas sexuais anexas .....	27
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....	4
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO TESTÍCULO .....	6
FIGURA 3 – CORTE HISTOLÓGICO EM TESTÍCULO DE RATO .....	7
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESPERMATOGÊNESE .....	8
FIGURA 5 – GANHO DE PESO CORPORAL ABSOLUTO .....	21
FIGURA 6 – GANHO DE PESO CORPORAL RELATIVO .....	21
FIGURA 7 – GANHO DE PESO ABSOLUTO 75° - 100° DIA DE VIDA.....	22
FIGURA 8 – GANHO DE PESO RELATIVO 75° - 100° DIA DE VIDA.....	22
FIGURA 9 – SEPARAÇÃO PREPUCIAL.....	22
FIGURA 10 – PESO ABSOLUTO E RELATIVO DO RIM .....	23
FIGURA 11 – PESO ABSOLUTO E RELATIVO DO FÍGADO .....	23
FIGURA 12 – PESO ABSOLUTO E RELATIVO DOS TESTÍCULOS .....	23
FIGURA 13 – PESO ABSOLUTO E RELATIVO DO EPIDÍDIMO .....	24
FIGURA 14 – PESO ABSOLUTO E RELATIVO DA PRÓSTATA .....	24
FIGURA 15 – PESO ABSOLUTO E RELATIVO DA VESÍCULA SEMINAL .....	24
FIGURA 16 – PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA .....	25
FIGURA 17 – NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES .....	25
FIGURA 18 – TAXA DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO .....	25
FIGURA 19 – ÁREA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS .....	26
FIGURA 20 – NÚMERO DE TÚBULOS SEMINIFEROS COM ESPERMATOGÊNESE COMPLETA .....	26
FIGURA 21 – NÚMERO DE TÚBULOS SEMINIFEROS COM ESPERMATOGÊNESE INCOMPLETA .....	27
FIGURA 22 – PESO DOS ANIMAIS NO DIA DO SACRIFÍCIO .....	27
FIGURA 23 – ANDROGENICIDADE – PESO ABSOLUTO DA VESÍCULA SEMINAL .....	28
FIGURA 24 – ANTIANDROGENICIDADE – PESO ABSOLUTO DA VESÍCULA SEMINAL .....	28
FIGURA 25 – ANDROGENICIDADE – PESO RELATIVO DA VESÍCULA SEMINAL .....	28
FIGURA 26 – ANTIANDROGENICIDADE – PESO RELATIVO DA VESÍCULA SEMINAL .....	29
FIGURA 27 – ANDROGENICIDADE – PESO ABSOLUTO DA PRÓSTATA .....	29
FIGURA 28 – ANTIANDROGENICIDADE – PESO ABSOLUTO DA PRÓSTATA .....	29
FIGURA 29 – ANDROGENICIDADE – PESO RELATIVO DA PRÓSTATA .....	30
FIGURA 30 – ANTIANDROGENICIDADE – PESO RELATIVO DA PRÓSTATA .....	30

## RESUMO

O pesticida Roundup<sup>®</sup> (princípio ativo glifosato) é um herbicida amplamente utilizado no controle não seletivo de plantas daninhas em diversas culturas como soja, café e pastagens, podendo estar presente na água e alimentos sob a forma de resíduo. O Roundup<sup>®</sup> é suspeito de interferir no sistema endócrino podendo acarretar em prejuízos reprodutivos segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (U. S. EPA). Este trabalho teve como objetivos avaliar a toxicidade do pesticida Roundup<sup>®</sup> sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar machos expostos durante a puberdade e comparar os resultados com os resultados obtidos em testes de exposição durante as fases de gestação e lactação. O outro objetivo deste trabalho é a avaliação de possíveis efeitos androgênicos ou antiandrogênicos através de teste de curta duração (Teste de Hershberger). Para a realização deste trabalho, foram utilizados ratos Wistar machos (15/grupo) tratados com Roundup<sup>®</sup> através de via oral (gavage) nas concentrações de 0, 50, 150, 450 mg/kg de peso corporal do 22º ao 70º dia de idade segundo protocolo proposto pela EPA. Ao atingir 70 dias de idade, o tratamento foi interrompido e os animais foram sacrificados a partir do 100º dia de idade, para avaliação de possíveis efeitos da substância em estudo sobre o sistema reprodutor. O teste de curta duração (teste de Hershberger) utilizou ratos Wistar machos castrados os quais foram tratados com Roundup<sup>®</sup> através da via oral por uma semana e sacrificados após o término do tratamento para detecção de possíveis efeitos androgênicos ou antiandrogênicos. Os resultados obtidos no teste de toxicidade crônica após o desmame demonstraram que os animais expostos ao pesticida não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle nos parâmetros avaliados, indicando que a exposição ao Roundup<sup>®</sup> antes e durante a puberdade não induz efeitos adversos sobre o sistema reprodutor e órgãos responsáveis pela detoxificação, diferindo dos resultados obtidos com testes feitos durante a gestação e lactação, onde vários parâmetros reprodutivos foram afetados. O teste de androgenicidade/antiandrogenicidade não apresentou diferenças significativas entre os animais tratados e o grupo controle, indicando que a substância não possui efeitos androgênicos ou antiandrogênicos. Com estes resultados, demonstra-se que a aplicação de diferentes protocolos em diferentes fases do ciclo vital se faz necessária para obter uma avaliação completa do potencial toxicológico de diferentes agentes químicos.

Palavras - chave: Roundup<sup>®</sup>, Desregulador endócrino, Sistema endócrino, Sistema reprodutor, Ratos Wistar

## 1 INTRODUÇÃO

No princípio o ser humano possuía uma vida nômade, caçando e colhendo os alimentos que encontrava em seu caminho. Durante seu processo evolutivo, aprendeu a manipular a terra, plantando seu alimento e colhendo os frutos de seu aprendizado, surgindo desse modo, a agricultura. Através dos tempos o homem aprimorou os métodos de plantio e preparação do terreno, obtendo maior sucesso na produção em massa de alimentos.

Um campo limpo e preparado é ideal para o desenvolvimento de cultivares e também para o estabelecimento de organismos invasores. As ervas daninhas prejudicam as plantações competindo com as plantas cultivadas por água, nutrientes e luz. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, foram introduzidas novas maneiras de controle de ervas daninhas através do uso de substâncias químicas, que impedem o crescimento das plantas invasoras, mas também podem interferir no desenvolvimento das plantas cultivadas. Atualmente as variedades vegetais resistentes a agrotóxicos são os produtos de última geração da biotecnologia vegetal. Esses vegetais resistentes a herbicidas ganharam popularidade entre os agricultores por permitir uma melhor combinação de herbicidas para o controle de pragas e proporcionar uma maior seletividade evitando danos ao vegetal cultivado.

Por muitos anos os critérios para a avaliação de um pesticida eram a sua eficácia e a seletividade deste com a cultura. Em contrapartida, a utilização freqüente de herbicidas levou à rápida descoberta de que alguns deles apresentavam efeitos adversos, como a formação de resíduos duradouros no solo e nos lençóis freáticos e efeitos tóxicos sobre organismos expostos, inclusive os seres humanos. Como exemplo, podemos citar o uso dos organoclorados (DDT, aldrin, dieldrin, heptacloro), que foram intensivamente utilizados até a década de 80 e, hoje banidos na maioria dos países, inclusive no Brasil.

Os pesticidas e outros agentes químicos lançados no meio ambiente, amplamente utilizados na agricultura atualmente, estão sendo apontados como principais responsáveis em provocar distúrbios adversos sobre organismos expostos a estes agentes químicos. Vários fatores podem afetar a fertilidade de animais e humanos, tais como doenças, desnutrição, variações hormonais e ação de substâncias químicas que possam afetar o sistema reprodutor. Segundo a organização não governamental WWF (World Wildlife Fund), a vida no planeta encontra-se ameaçada devido à poluição proveniente de substâncias tóxicas. Todas as regiões continentais e oceânicas de algum modo sofrem ou já sofreram algum tipo de

contaminação por alguma substância tóxica, acarretando em prejuízos para os ecossistemas e seres vivos, incluindo seres humanos (WWF Brasil, 2004).

Diversos pesticidas e agentes químicos industriais persistentes no ambiente têm sido implicados como substâncias com potencial de alterar a atividade hormonal e, indiretamente, afetar o desenvolvimento reprodutivo no homem e animais (DALSENER *et al.*, 1997). A maturação e manutenção do sistema reprodutivo dependem de uma série de interações hormonais, e estas interações são muito sensíveis a interferências diretas ou indiretas causadas por xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo). Estes agentes químicos podem agir diretamente com componentes do sistema reprodutivo ou agir indiretamente interferindo na regulação endócrina do organismo.

Um agente químico muito utilizado atualmente no combate de pragas é o glifosato (nome comercial **Roundup**<sup>®</sup>), um composto químico derivado da glicina. Este agente químico foi criado em 1950 como um potente agente de cadeia complexa. Em 1970, descobriu-se a ampla atividade herbicida do glifosato em diversos meios de cultura.

Trabalhos recentes (DALLEGRAVE, 2003; DARUICH *et al.*, 2001) demonstraram que o herbicida Roundup<sup>®</sup> tem o potencial de induzir efeitos adversos sobre o sistema hormonal, causando alterações nos níveis séricos dos animais expostos e toxicidade sobre os órgãos de metabolização e excreção, assim como também efeitos sobre o sistema reprodutor quando ratos Wistar são expostos durante a gestação e lactação.

A realização deste trabalho tem como objetivo observar os efeitos da exposição direta de ratos Wistar ao pesticida Roundup<sup>®</sup> logo após o desmame (início da fase de maturação sexual), onde os órgãos reprodutivos não estão totalmente desenvolvidos sendo estes possíveis alvos de substâncias desreguladoras do sistema endócrino. A exposição dos animais após o período de desmame foi escolhido devido ao início da maturação sexual dos organismos, ocorrendo nesta fase uma intensa produção hormonal para o desenvolvimento do sistema reprodutor, o que torna os indivíduos desta fase mais susceptíveis a qualquer alteração promovida por esses contaminantes químicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

O sistema endócrino é um complexo sistema químico que regula as funções vitais do organismo como a reprodução, o desenvolvimento embrionário e o sistema imunológico. Substâncias químicas com a possibilidade de originar distúrbios sobre o sistema hormonal e ocasionar danos sobre os indivíduos expostos são denominados desreguladores endócrinos.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA), desreguladores endócrinos são agentes exógenos que interferem na função do sistema endócrino, abrangendo os processos de síntese, armazenamento, liberação e transporte dos hormônios até os respectivos receptores, os mecanismos de interação com os receptores e as reações bioquímicas conseqüentes, causando efeitos adversos nos organismos expostos ou em suas progênes (figura 1). Podem ser considerados como possíveis desreguladores endócrinos uma grande variedade de agentes químicos, dentre eles, os pesticidas como o DDT/DDE, plastificantes (ftalatos), poluentes persistentes no ambiente e metais pesados como o mercúrio (U.S. EPA, 2002).

A potencialidade do impacto ecológico vinculado com a ação tóxica destas substâncias sobre os organismos expostos a esses agentes inclui alterações sobre a diferenciação sexual e a conseqüente indução de malformações nos órgãos reprodutivos (EERTMANS, 2003). Algumas substâncias desreguladoras do sistema endócrino apresentam atividade estrogênica ou antiestrogênica possuindo afinidade com os receptores estrogênicos citosólicos, sendo denominados exoestrógenos (substâncias capazes de mimetizar o estrógeno natural) (CONNOR *et al.*, 1997).

O sistema reprodutor masculino possui uma alta sensibilidade a substâncias que possam interferir na ação ou na produção dos hormônios sexuais (U.S. EPA, 1996). O aumento na incidência de casos de infertilidade, anormalidades estruturais no aparelho reprodutor masculino, diminuição da qualidade espermática, aumento na incidência de câncer testicular, aumento no número de casos de criptorquidismo (permanência dos testículos na cavidade abdominal) e hipospadias (abertura da uretra na base do pênis) pode estar relacionado ao aumento nas concentrações de substâncias químicas capazes de afetar o sistema endócrino (EERTMANS *et al.*, 2003). Vários produtos sintéticos (pesticidas e outros agentes químicos industriais) que apresentam alta persistência no ambiente ou são

bioacumulados têm sido implicados como agentes capazes de alterar a atividade hormonal, e indiretamente afetar a capacidade reprodutiva.

Entre os anos de 1950 a 1970 foi utilizado um medicamento em larga escala como antiabortivo, o dietilestilbestrol. Esse fármaco possuía a composição parecida com a do estradiol, sua aplicação era via oral, e o medicamento não apresentava transformação de primeira passagem pelo fígado. A utilização desse medicamento foi abandonada após a constatação de um raro tipo de câncer em adolescentes que foram expostas durante a gestação (REYS, 2001). Após a ocorrência de diversos distúrbios no organismo envolvendo substâncias potencialmente capazes de alterar a homeostase endócrina, a Agência de Proteção Ambiental norte americana (U.S. EPA) passou a exigir uma avaliação toxicológica das novas substâncias para a obtenção do registro de liberação comercial do produto. A investigação de substâncias capazes de desregular o sistema endócrino possui entraves devido à dificuldade de detecção dos efeitos de modulação endócrina.

#### REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS

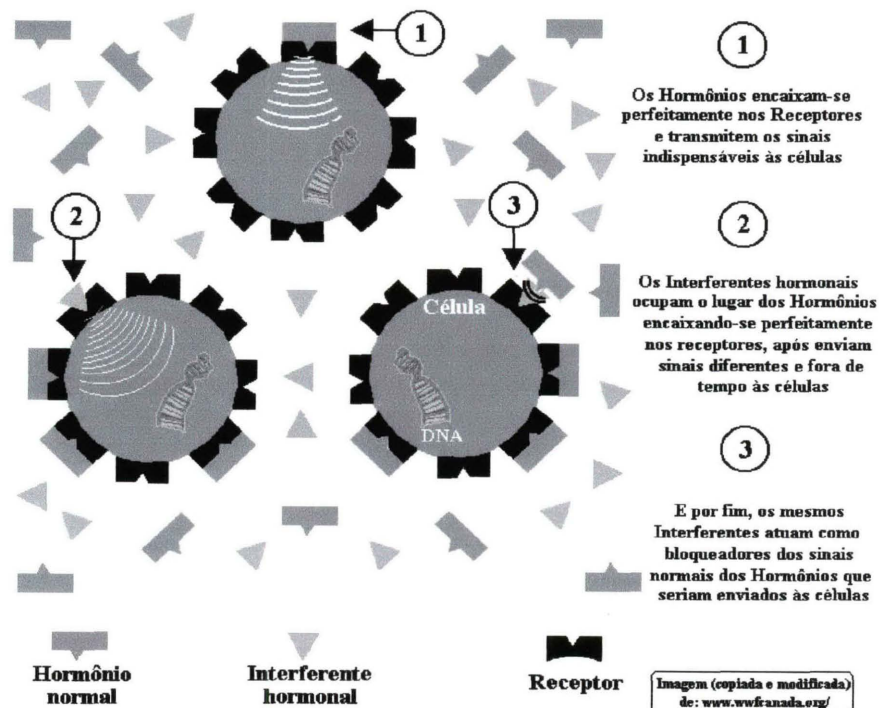


FIGURA 1 – Ação dos desreguladores endócrinos sobre a modulação endócrina

A ocorrência de distúrbios na homeostase hormonal causada por desreguladores endócrinos começou a despertar maior interesse após a publicação de trabalhos alertando sobre o perigo da exposição a estas substâncias. Outro alerta ocorreu após a constatação da redução nos níveis populacionais de jacarés no Lago Apopka localizado na Florida, em decorrência da exposição dos animais a uma mistura de dois pesticidas o DDT (diclorodifeniltricloroetano) e o DDE (diclorodifenildicloroetileno), na década de 80 causando uma variedade de efeitos adversos em crocodilos, como a “demasculinização” dos machos e “superfeminilização” das fêmeas, assim como também outros efeitos incluindo prejuízos na capacidade de chocar os ovos e alteração nos níveis populacionais. A constatação de problemas como os descritos anteriormente passaram a ter maior atenção após a publicação do livro de Rachel Carson (Primavera Silenciosa) alertando que certas substâncias químicas podem causar interferência sobre o sistema reprodutor de aves e, possivelmente acarretar em problemas reprodutivos em outros animais.

## 2.2 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

### 2.2.1 Espermatogênese

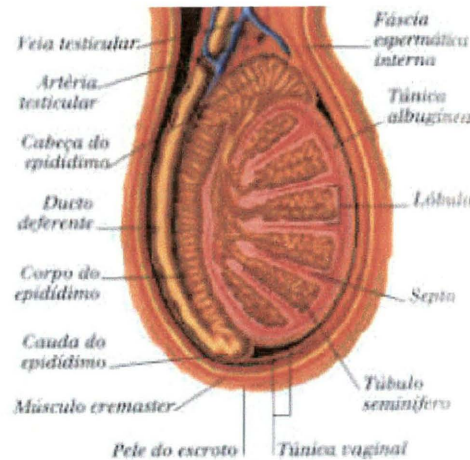
Para que o organismo possa produzir gametas maduros é necessária uma regulação adequada entre os sistemas neuroendócrino (hipófise e hipotálamo) e genital (testículos, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis).

As gônadas masculinas (testículos) dos mamíferos localizam-se suspensas na bolsa escrotal, externamente à cavidade abdominal e são responsáveis pela síntese de testosterona e função espermatogênica. O testículo é composto por túbulos seminíferos, onde são formados os espermatozóides e cada túbulo seminífero apresenta uma série de alças as quais estão conectadas aos túbulos retos e estes conectam-se ao epidídimo (figura 2). Entre os túbulos seminíferos são encontradas as células de Leydig (produtoras de testosterona), assim como vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas.

Os túbulos seminíferos contêm um grande número de células germinativas (espermatogônias) localizadas em duas a três camadas ao longo da borda externa do epitélio tubular e essas células germinativas proliferam-se continuamente para manter seu número constante. Uma parte destas células sofre diferenciação passando por estágios definidos de desenvolvimento para a formação do espermatozóide (figura 3). Após a formação do

espermatozóide, este passa por um processo de maturação e os espermatozoides maduros, são armazenados no epidídimo, canal deferente e ampola do canal deferente. Os espermatozoides podem permanecer armazenados nos dutos genitais e manter a sua fertilidade durante pelo menos um mês.

#### REPRESENTAÇÃO ESQUEMATICA DA ESTRUTURA DO TESTICULO



FONTE: Internet busca por imagens: <http://www.afh.bio.br/basicos/endocrino2.htm>

FIGURA 2 – Visualização da estrutura interna do testículo.

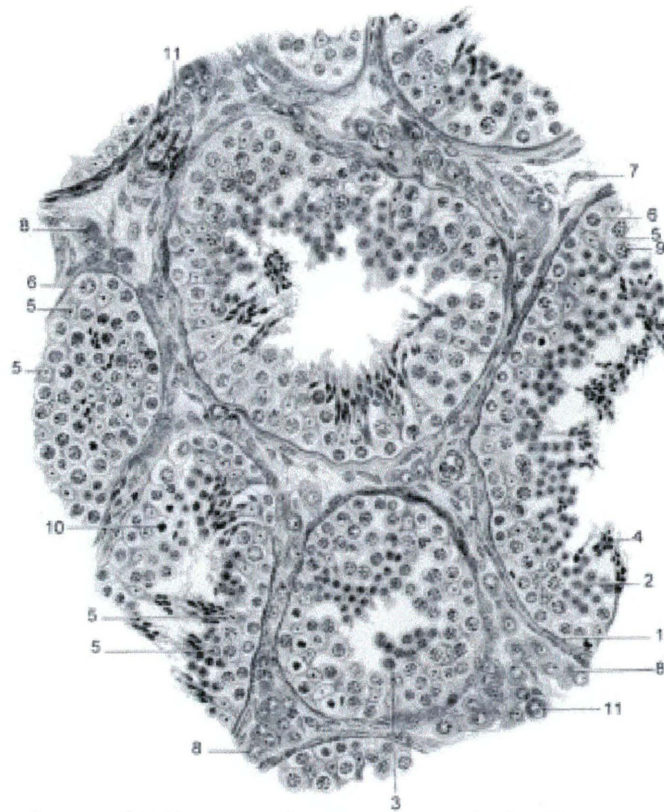
Durante o processo de formação dos espermatozoides, as espermatogônias (situadas próximo da membrana basal) constituem as células indiferenciadas do epitélio germinativo e dividem-se por mitose originando células do mesmo tipo ou células diferenciadas (espermatogônias do tipo A), as quais sofrem novas divisões dando origem às espermatogônias do tipo B (figura 4).

Neste estágio, as espermatogônias migram centralmente para as células de Sertoli, que apresentam envoltórios citoplasmáticos estendendo-se desde as camadas celulares de espermatogônias até o lúmen central do túbulo. As membranas das células de Sertoli são muito aderentes umas às outras em sua base, formando uma barreira que impede a penetração de grandes moléculas protéicas, como as imunoglobulinas dos capilares que circundam os túbulos, visto que essas moléculas poderiam interferir no desenvolvimento posterior das espermatogônias em espermatozoides (AIRES, 1991). A duração do ciclo espermatogênico varia de acordo com a espécie considerada. Em camundongos, a duração é de 34,5 dias, nos ratos é de 48 dias, no boi e carneiro, 49 dias e no homem, cerca de 64 dias.

Após atingir as células de Sertoli, as espermatogônias, através de divisões mitóticas, dão origem aos espermatócitos primários. Essas células através de divisão meiótica, sofrem a

primeira divisão de maturação formando os espermatócitos secundários. Durante o processo de formação do espermatócito secundário, todo o material genético celular é reduzido para metade (46 cromossomos para 23 cromossomos) havendo distribuição de material genético e segregação de cromossomos X e Y. Através destas divisões os espermatócitos secundários originam as espermatídes. Essas células não sofrem divisão, mas apresentam modificações morfológicas importantes para a formação do espermatozóide (espermiogênese – maturação do espermatozóide) através da perda de parte de seu citoplasma, reorganização da cromatina do núcleo para formar uma cabeça compacta e reunião do citoplasma restante e da membrana celular em uma das extremidades da célula para formar a cauda. Todos os estágios da conversão final dos espermatócitos em espermatozoides ocorrem com os espermatócitos e as espermatídes englobados nas células de Sertoli (GUYTON, 1992).

#### CORTE HISTOLÓGICO EM TESTÍCULO DE RATO



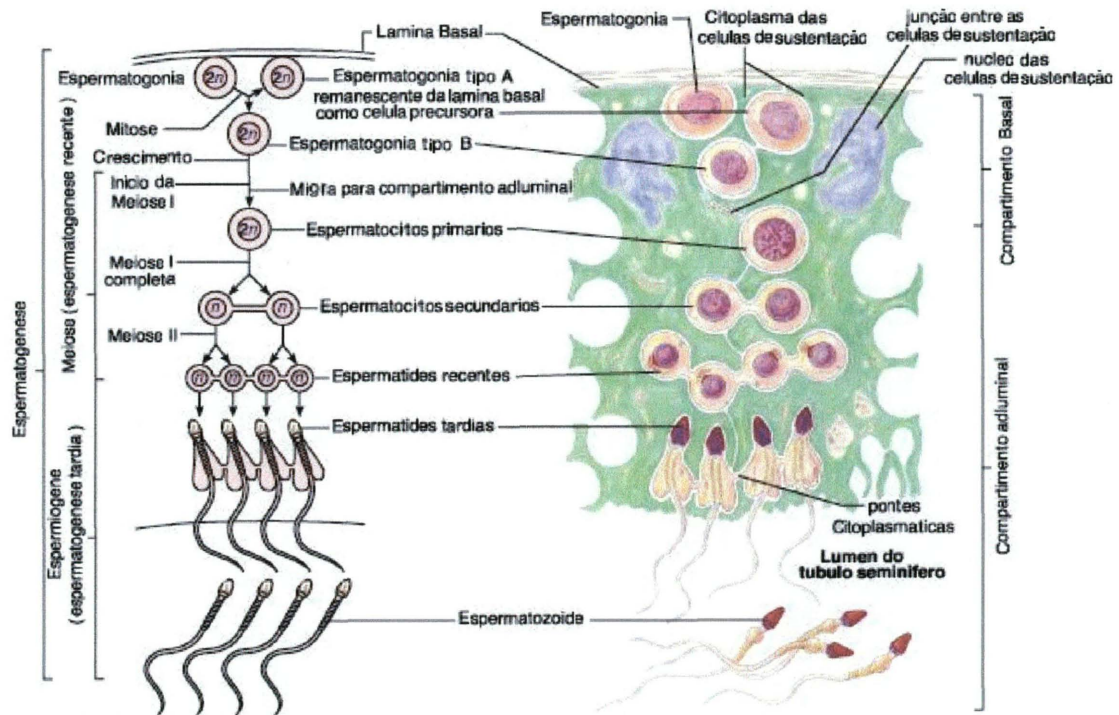
FONTE: Internet busca por imagens <<http://www.rgm.fmrp.usp.Br/cursors/zm/esp2/htm>>

#### Legenda

1 - Membrana basal, 2 - Espermatíde, 3 - Espermatócito secundário, 4 - Espermatozóide, 5 - Células de Sertoli, 6 - Espermatogônia, 7 - Fibroblasto, 8 - Células de Leydig, 9 - Espermatócito primário, 10 - Espermatócito primário em divisão, 11 - Vaso sangüíneo

FIGURA 3 – Corte histológico e visualização de túbulos seminíferos com células em diferentes graus de desenvolvimento.

## REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESPERMATOGÊNESE



FONTE: Internet - busca por imagens < <http://www.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/Image709.gif> >.

FIGURA 4 – Representação das fases da espermatogênese e formação do espermatozóide no interior do túbulo seminífero.

### 2.2.2 Hormônios sexuais masculinos

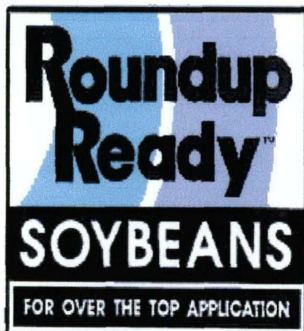
Na biossíntese dos esteróides, o testículo, o ovário, a placenta e o córtex da adrenal utilizam como precursor um arcabouço biossintético semelhante para a formação dos hormônios, diferindo entre si pela presença de enzimas específicas que, atuando sobre os substratos disponíveis, derivam a biossíntese para o hormônio específico da glândula ou tecido.

No testículo, sob o estímulo gonadotrófico, as células intersticiais de Leydig são as responsáveis pela biossíntese e secreção dos andrógenos - substâncias que estimulam o crescimento do órgão reprodutor masculino - esteróides com 19 átomos de carbono, cujo principal representante pela sua potência hormonal é a testosterona.

Os hormônios que fazem parte da função espermatogênica são:

- Testosterona - secretada pelas células de Leydig localizadas no interstício do testículo, é essencial para o crescimento e a divisão das células germinativas no processo de formação de espermatozóide.
- Hormônio luteinizante (HL ou LH) - secretado pela neurohipófise, estimula as células de Leydig a secretar testosterona.
- Hormônio folículo estimulante (HFE ou FSH) - secretado pela neurohipófise, estimula as células de Sertoli, estimulando o processo de espermiogênese.
- Estrogênios - formados a partir da testosterona pelas células de Sertoli quando estimuladas pelo FSH. Este hormônio também está envolvido com o processo de espermiogênese. As células de Sertoli também secretam uma proteína de ligação dos androgênios, que se liga à testosterona e aos estrogênios e os transporta para o líquido do túbulo seminífero, tornando esses hormônio disponíveis para a maturação do esperma.
- Hormônio do crescimento - necessário para o controle das funções metabólicas básicas dos testículos. O hormônio do crescimento promove especificamente a divisão inicial das espermatogônias. Na ausência deste hormônio, a espermatogênese torna-se deficiente ou ausente.

### 2.3 ROUNDUP®



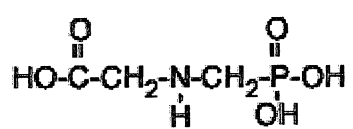
O herbicida Roundup® é um agente não seletivo de amplo espectro utilizado para impedir o desenvolvimento de ervas daninhas e outras gramíneas. Esse herbicida possui alta atividade quando aplicado em folhagens e é utilizado mundialmente na agricultura (WHO, 1994). O Roundup® é constituído de substâncias dentre elas o glifosato (sal de isopropilamina de N(fosfometil)glicina) o qual é o seu princípio ativo e uma substância surfactante utilizada para aumentar a permeabilidade foliar.

Após a absorção, o glifosato é rapidamente distribuído para várias partes da planta afetando o processo de fotossíntese, respiração celular e a síntese de ácidos nucléicos. O modo primário de ação do glifosato é a inibição competitiva da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Essa enzima é parte da via de shikimato que está envolvida na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos

em plantas e o metabolismo de compostos fenólicos, influenciando na síntese protéica e na formação de tecidos na planta, acarretando em inibição do crescimento, disfunção celular e conseqüente morte da planta (MONSANTO, 2001; COX, 2000; SALISBURY, 1992).

**Fórmula química:** C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P

**Fórmula estrutural:**



Isopropilamina de N-(fosfometil)glicina

O glifosato foi criado em 1950 pelo Dr. Henri Martin (químico suíço) como um potente agente de estrutura complexa. Vinte anos mais tarde (1970), o Dr. J. E. Franz da Companhia Monsanto descobriu a ampla atividade deste agente químico em diversos meios de cultura, lançando no ano seguinte o produto comercial Roundup<sup>®</sup>.

Devido à atuação do glifosato sobre os vegetais inibindo o desenvolvimento destes através da interrupção da via de formação de aminoácidos aromáticos, foram realizados estudos de melhoramento genético, como os da soja, para capacitar as plantas a resistir à aplicação do herbicida sem causar os danos referidos anteriormente. Desse modo, a Companhia Monsanto desenvolveu uma variedade de sementes de soja geneticamente modificadas resistentes ao herbicida Roundup<sup>®</sup> (Roundup-Ready<sup>®</sup>) (MONSANTO, 2001).

O glifosato é considerado um herbicida levemente tóxico, apresentando DL50 oral aguda para ratos de 5600mg/kg e a DL50 para camundongos apresenta-se acima de 10.000 mg/kg (EXTOXNET, 1996). Segundo a WHO (World Health Organization, 1994), a DL50 oral aguda para ratos e camundongos apresenta-se acima de 5g/kg.

Segundo a WHO (1994), a avaliação dos possíveis efeitos do herbicida glifosato para a saúde dos organismos expostos e o meio ambiente foi focada na presença de resíduos nos vegetais e animais destinados ao consumo humano. Conforme revisão de estudos com testes *in vitro* e testes *in vivo* com animais de laboratório, utilizando a via oral e dermal, não houve manifestações significativas de sensibilização, mutagenicidade, carcinogenicidade ou teratogenicidade (WILLIAMS, 2000).

## 2.4 TESTES TOXICOLÓGICOS

Para a determinação do potencial toxicológico das substâncias lançadas no meio ambiente para organismos expostos, as agências regulatórias internacionais estabeleceram protocolos para triagem de substâncias que tenham a capacidade de atuar como agentes desreguladores do sistema endócrino.

Os efeitos provocados por agentes tóxicos geralmente são dose-dependentes, ou seja, o aumento das doses aumenta o risco de manifestação das alterações reprodutivas (EPA, 1996). A avaliação toxicológica dos prováveis efeitos dos desreguladores endócrinos sobre os sistemas hormonais humano e animal segue protocolos padrões para testes de toxicidade reprodutiva conforme guias estabelecidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*). O FDA estabeleceu três protocolos de estudos.

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

A agência de proteção ambiental norte-americana (U.S. EPA) estabeleceu um Comitê Consultivo de Teste e Rastreamento de Desreguladores Endócrinos (EDSTAC - *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Commitee*) para o estabelecimento de protocolos de triagem e teste de substâncias desreguladoras do sistema endócrino e testes de avaliação dos riscos associados à exposição a essas substâncias (EDSTAC, 1998). Este comitê é responsável pelo Programa de Rastreamento de Desreguladores Endócrinos (EDSP - *Endocrine Disruptor Screening Program*), responsável pelo estabelecimento de prioridades na pesquisa dos prováveis agentes desreguladores endócrinos. Os testes incluem avaliação uterotrófica (estrogenicidade e antiestrogenicidade), teste de Hershberger (androgenicidade e

antiandrogenicidade), ensaios pubertais e avaliação sobre a reprodução de duas gerações (U.S. EPA, 2000).

Atualmente estão sendo feitos testes mais elaborados para a detecção de possíveis desreguladores endócrinos como ensaios *in vitro* e estudos de curta duração.

Os testes *in vivo* são essencialmente importantes para a detecção de substâncias desreguladoras do sistema endócrino pois a modulação endócrina possui uma complexidade que não é alcançada através de testes *in vitro*, e os resultados obtidos através de testes *in vivo* permitem uma extrapolação para os seres humanos indicando os riscos da exposição da população a estas substâncias.

Os protocolos de exposição crônica para os animais são:

- ✓ Protocolo de puberdade em fêmeas - avalia o potencial toxicológico de substâncias desreguladoras do sistema endócrino sobre fêmeas no período de 21 a 42 dias de vida;
- ✓ Protocolo de puberdade em machos - avalia a atividade androgênica ou antiandrogênica de substâncias suspeitas de atuarem sobre o sistema endócrino. A exposição dos animais ocorre do 21º ao 70º dia de vida.
- ✓ Protocolo de exposição *in utero* e lactação - os animais são expostos durante o desenvolvimento pré e pós-natal a substâncias suspeitas de agirem sobre o sistema endócrino e interferir nos mecanismos de ação mediados por hormônios como o desenvolvimento da diferenciação sexual.
- ✓ Protocolo de varias gerações - este protocolo é recomendado pelo EDSTAC para a avaliação dos possíveis efeitos de substâncias tóxicas sobre a viabilidade reprodutiva dos animais de estudo em duas gerações.

Os protocolos de curta duração para os animais são:

- ✓ Teste de Hershberger - teste de curta duração realizado para a detecção de substâncias com atividade androgênica ou antiandrogênica.
- ✓ Teste Uterotrófico - teste de curta duração usado para avaliar as substâncias suspeitas de apresentar propriedades estrogênicas ou antiestrogênicas.

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral determinar o possível potencial toxicológico do pesticida Roundup<sup>®</sup> sobre o sistema reprodutor de ratos machos expostos após o desmame, e detectar possíveis efeitos androgênicos ou antiandrogênicos desta substância sobre o sistema reprodutor masculino.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicação de protocolos propostos pelo EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) para averiguação de substância com potencial de desregular o sistema endócrino.
- Determinar o potencial toxicológico do herbicida **Roundup<sup>®</sup>** sobre o sistema reprodutor de ratos machos expostos após o desmame (21 dias de idade) e comparar com os resultados de testes realizados durante as fases de gestação e lactação.
- Ensaio *in vivo* de curta duração (teste de Hershberger) para detecção do potencial androgênico ou antiandrogênico da substância.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Este estudo utilizou cobaias (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), criados e mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais receberam água e ração (da marca Nuvilab) *ad libitum*, foram mantidos em um local com temperatura controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e um ciclo claro/escuro de 12 horas.

### 4.2 SUBSTÂNCIA UTILIZADA

Foi utilizado no tratamento dos animais o pesticida Roundup® (lote – 016/99 36000 Fab. Janeiro de 1999; Val. Janeiro de 2004) – princípio ativo Isopropilamina de N(fosfometil)glicina (glifosato). O produto comercial apresenta-se em uma concentração de 360g/L, produzido por Monsanto do Brasil.

### 4.3 DOSES E TRATAMENTO

As concentrações utilizadas nos experimentos foram baseadas em experimentos realizados por Dallegrave (2003). O pesticida Roundup® foi diluído em água destilada nas doses de 50, 150 e 450 mg/kg em um volume correspondente a 5 mL/kg corporal. Os animais receberam a substância por via oral (gavage) através de sonda rígida.

### 4.4 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os protocolos de experimentação utilizados nesta pesquisa foram os protocolos sugeridos pelo EDSTAC, os resultados serão então comparados com os resultados obtido com protocolos de animais expostos nos períodos pré e pós-natal.

## 4.5 DESENHO EXPERIMENTAL

### 4.5.1 Experimento I: Efeitos do Roundup® após exposição crônica

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 60 animais divididos em quatro grupos; Estes foram expostos ao pesticida a partir do 22º dia de idade (logo após desmame), recebendo o pesticida através da via oral (gavage) até o 70º dia de idade. O tratamento teve duração de 48 dias de acordo com protocolo proposto pelo EDSTAC (1998). O volume estabelecido foi de 5ml/kg corporal e as doses foram de 50, 150 e 450 mg/kg para cada grupo; um dos grupos foi destinado como controle, recebendo apenas água destilada. O tratamento foi interrompido no 70º dia de idade, e os animais foram sacrificados após o 100º dia de idade (fase adulta) para a determinação dos demais parâmetro de avaliação toxicológica da substância.

### 4.5.2 Parâmetros avaliados

Os parâmetros avaliados no protocolo de puberdade em machos foram os mesmos utilizados por Dalsenter *et al.* (1997) para a avaliação do potencial toxicológico da substância estudada. As variáveis investigadas foram: Ganho de massa corporal, separação prepucial, peso absoluto e relativo de órgãos internos, órgãos sexuais e glândulas sexuais acessórias, número de células espermáticas, número de espermatozóides na cauda do epidídimo e avaliação histológica dos testículos.

#### 4.5.2.1 Ganho de massa corporal

Para a avaliação deste parâmetro, foi feita a pesagem diária dos animais durante todo o período de tratamento (até o 70º dia de idade). Após a interrupção do tratamento, os animais foram pesados a cada cinco dias até o dia do sacrifício. Os valores foram então reportados estatisticamente.

#### 4.5.2.2 Separação prepucial

Para a avaliação deste parâmetro, foi feita a verificação macroscópica do prepúcio dos animais a partir do 33º dia de vida. A verificação foi efetuada manualmente separando o prepúcio para verificar o descolamento deste.

#### 4.5.2.3 Peso absoluto e relativo dos órgãos internos, órgãos sexuais e glândulas sexuais acessórias

Após o sacrifício dos animais, estes foram necropsiados para a retirada dos órgãos de metabolização/excreção (fígado e rins), órgãos sexuais (testículos e epidídimos) e glândulas sexuais acessórias (vesícula seminal e próstata) para avaliação da massa do órgão.

#### 4.5.2.4 Número de células espermáticas

Após a retirada e pesagem dos testículos, estes são colocados em uma solução de salina (NaCl 0,9%) + Triton (0,5%) para homogeneização destes órgãos. A avaliação deste parâmetro foi efetuada com o auxílio do homogeneizador de tecidos modelo Potter S. Os testículos que estão na solução de salina + Triton são colocados em tubos para homogeneização e macerados contra um pistilo sob uma rotação de 900rpm. Após o processo de homogeneização, retira-se uma alíquota de 0,1mL da solução e dilui em 0,9mL de solução salina, para realização de uma contagem do número de células espermáticas presentes na solução. A avaliação do número de células espermáticas foi realizada sob microscopia óptica com o auxílio de uma câmara de Bürker utilizando aumento de 200x.

#### 4.5.2.5 Número de espermatozóides na cauda do epidídimo

Para a averiguação do número de espermátides e espermatozóides, as caudas dos epidídimos são retiradas e separadas (lado direito e esquerdo) e colocadas em uma solução de cloreto de sódio 0,9% (salina) contendo 0,5% de Triton. As caudas do epidídimo são cortadas em pequenos pedaços e o processo de homogeneização foi realizado com o auxílio do homogeneizador de tecidos modelo Potter S colocando as caudas dos epidídimos (lados esquerdo e direito separadamente) que estão na solução de salina + Triton em tubos para

homogeneização. As caudas dos epidídimos são então maceradas contra um pistilo sob uma rotação de 900rpm. Após o processo de homogeneização foi efetuada uma diluição da solução retirando uma alíquota de 0,1mL da solução e diluindo em 0,9mL de solução salina. A contagem das células foi feita em uma câmara de Bürker sob microscopia óptica em aumento de 200x.

#### 4.5.2.6 Avaliação histológica dos testículos

Após o sacrifício, os testículos foram retirados, pesados e o testículo direito de cinco animais de cada grupo foram selecionados e separados para avaliação histológica.

Os testículos separados tiveram a túnica albugínea rompida através de cortes feitos com uma tesoura cirúrgica para permitir a penetração da solução fixadora (solução de Bouin) no tecido. Os testículos são colocados em frascos contendo 10mL de solução de Bouin (ácido pícrico 77mL; ácido acético glacial 2,5mL; formaldeído 20,5mL) para cada testículo, permanecendo durante um período de três horas. Após esse período, foram feitos cortes transversais com o auxílio de uma navalha (aproximadamente 2 mm de espessura). A solução de Bouin na qual estava o testículo foi desprezada e os cortes foram mergulhados em nova solução de Bouin (10mL) por mais três horas. Após a fixação do tecido os cortes foram mergulhados em álcool 70% (10mL) para preservação do material coletado. Devido ao sacrifício dos animais ocorrer em diferentes datas, os cortes dos testículos foram mantidos em álcool 70% até se obter amostras de todos os animais para dar continuidade ao processo de desidratação. Para os testículos mantidos na solução alcoólica 70%, essa solução foi renovada a cada 24 horas, durante três dias. A partir do quarto dia os cortes foram mantidos em álcool 70% sem a necessidade de renovar a solução.

Após o sacrifício de todos os animais, foi dada continuidade ao processo de desidratação. As amostras foram mergulhadas em soluções alcoólicas crescentes (10mL de solução): álcool 80% (90 minutos), álcool 90% (90 minutos), álcool 95% (90 minutos) e três tempos de 30 minutos em álcool absoluto, respectivamente. Após esse processo os cortes foram colocados em solução de etanol e xilol 1:1 e mantidos sob refrigeração por 12 horas. Após este período a solução foi desprezada e os cortes de testículos foram mergulhados em xilol absoluto por três tempos (20 min, 20 min, 5 min), respectivamente.

Após a desidratação os cortes foram impregnados em parafina a 56°C por 3 horas. Após esse processo, as peças foram imersas em parafina (emblocadas) e mantidas sob

refrigeração até a realização dos cortes para a confecção de lâminas permanentes. Para a realização dos cortes histológicos os blocos foram preparados retirando o excesso de parafina das laterais (deixando o bloco em formato piramidal). Os blocos foram cortados transversalmente em espessuras de 5  $\mu\text{m}$ , utilizando um micrômetro (marca Leika). Após a realização dos cortes histológicos, estes foram corados com hematoxilina/eosina para posterior análise sob microscopia óptica dos túbulos seminíferos (área) sob aumento de 100x e análise da espermatogênese dos animais também sob microscopia óptica sob aumento de 400x.

A área dos túbulos seminíferos foi avaliada através da medição dos diâmetros transversais dos túbulos seminíferos na fase 3 de desenvolvimento com o auxílio de uma régua ocular. Para a medição foram escolhidos os túbulos que se apresentavam mais arredondados. Para a realização da análise estatística, os valores das áreas foram multiplicados por 10,7 (fator de correção da régua). Para a avaliação da espermatogênese foram contados 100 túbulos por lâmina, avaliando o grau de desenvolvimento da espermatogênese (completo - fases I a VIII; incompleto - fases XII a XIV).

#### 4.5.3 Experimento II: Teste de Hershberger

Este ensaio foi baseado nos testes de curta duração realizados por Andrade (2002) para a avaliação da toxicidade da deltametrina sobre o sistema reprodutor de ratos machos.

O teste de Herhberger é um ensaio *in vivo* de curta duração utilizado na detecção de substâncias androgênicas ou antiandrogênicas. Este ensaio também faz parte do protocolo de triagem de substâncias desreguladoras endócrinas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EDSTAC, 1998). O teste de Herhberger baseia-se no crescimento de tecidos andrógeno-dependentes (próstata e vesícula seminal) em ratos machos castrados (androgenicidade); ou no bloqueio da ação trófica da testosterona (antiandrogenicidade) sobre esses tecidos.

Para a realização do teste, foram utilizados 70 ratos pré-pubescentes (sete semanas de idade), os quais foram castrados através de uma única incisão na bolsa escrotal e retirada dos testículos. Os animais foram anestesiados com 75mg/kg de ketamina (Ketarnacol<sup>®</sup> - Konig, Argentina) e 1,5mg/kg de xilazina (Rompum<sup>®</sup> - Bayer, São Paulo/SP) através da via intraperitoneal. Após a cirurgia os animais receberam uma injeção subcutânea (0,1mL/100g de peso corporal) do antibiótico Agropen L.A.<sup>®</sup> (Virbac, França: penicilina G procaína 10.000.000 UI; penicilina G benzatina 10.000.000 UI; sulfato de dihidroestreptomicina 20g; veículo q.s.p. 100mL). Os experimentos foram iniciados somente uma semana após a cirurgia para permitir a completa recuperação dos animais.

No experimento foram utilizados o Roundup<sup>®</sup> (Monsanto do Brasil), cipionato de testosterona (Durateston - Novaquímica, São Bernardo do Campo/SP) e flutamida (Galena, São Paulo/SP).

Os ratos machos castrados (n=10/grupo) foram tratados através da via oral (vo) e subcutânea (sc) durante sete dias consecutivos. Na avaliação de antiandrogenicidade três concentrações de Roundup<sup>®</sup> (5, 50 e 450 mg/kg/dia) foram administradas através da via oral a animais tratados com testosterona (0,25mg/kg/dia) pela via subcutânea. Para a detecção de androgenicidade, uma única dose de Roundup<sup>®</sup> (450mg/kg/dia) foi administrada oralmente a animais tratados com veículo – óleo de canola (1,0ml/kg/dia). A administração conjunta de testosterona (0,25mg/kg/dia) e veículo – água destilada (5,0ml/kg/dia) – serviu como controle positivo de androgenicidade, e a administração de veículo por ambas as vias (5,0mL/kg/dia vo e 1,0mL/kg/dia sc) como controle negativo. A flutamida (10,0mg/kg/dia sc), utilizada como

controle positivo de antiandrogenicidade, foi administrada a animais tratados com testosterona (0,25mg/kg/dia sc) e veiculo (5,0 mL/kg/dia vo). Os volumes de administração utilizados foram de 5,0mL/kg para via oral e 1,0mL/kg para a via subcutânea.

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

#### 4.5.4 Análise Estatística

As variáveis com medidas intervalares e que apresentaram distribuição normal foram analisadas através de análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Bonferroni. A análise estatística utilizou um nível de significância de 95%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO E RELATIVO

A avaliação da massa corpórea indica o estado de saúde do animal. Se o animal estiver com a massa corporal abaixo da média, não indicar ganho de massa ou indique uma perda de massa acentuada, este parâmetro pode indicar a viabilidade do organismo para o experimento ou não. Em relação ao ganho de massa corporal durante o período do tratamento, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, indicando que a substância, nas doses testadas, não induziu toxicidade geral sobre os animais (figuras 1 a 4).

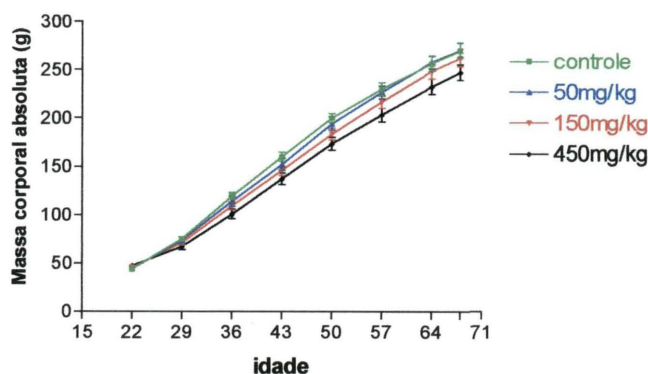


FIGURA 1 – Os dados representam o ganho de massa corporal absoluto dos animais durante o tratamento (22º ao 70º dia de idade) expostos ao Roundup® (50, 150, 450mg/kg) em relação ao grupo controle (veículo). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

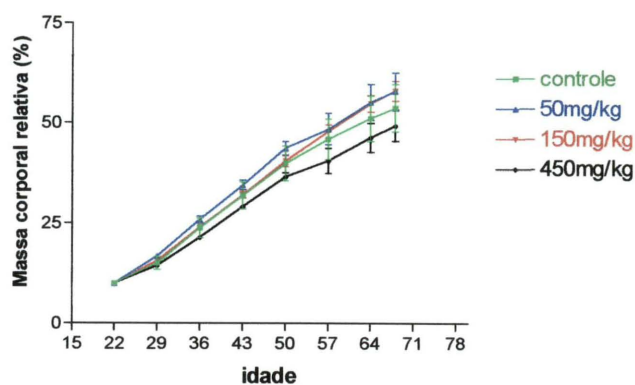


FIGURA 2 – Os dados representam o ganho de massa corporal relativo dos animais durante o tratamento (22º ao 70º dia de idade) expostos ao Roundup® (50, 150, 450mg/kg) em relação ao grupo controle (veículo). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

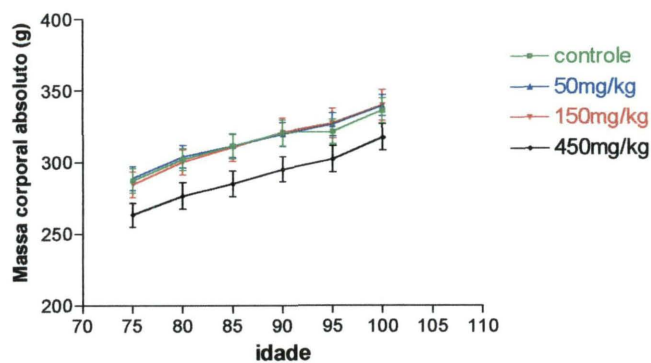


FIGURA 3 – Ganho de massa corporal absoluto dos animais após a interrupção do tratamento (75° ao 100° dia de idade). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

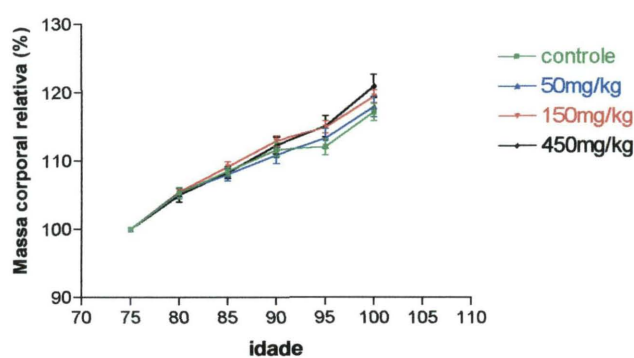


FIGURA 4 – Ganho de massa corporal relativa dos animais após a interrupção do tratamento (75° ao 100° dia de idade). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5.2 SEPARAÇÃO PREPUCIAL

O início da maturidade sexual tem como indicativo a separação prepucial dos indivíduos. Um atraso na separação prepucial pode indicar um retardo na maturidade sexual dos organismos testados. A maioria dos indivíduos teve a separação prepucial no mesmo dia, não havendo diferenças significativas neste parâmetro (figura 5).

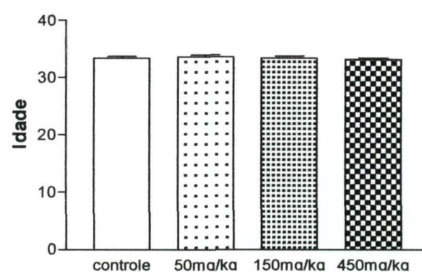


FIGURA 5 – Início da maturação sexual dos animais indicada pela separação prepucial (33° dia de idade). Avaliação efetuada entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup®. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.3 PESO ABSOLUTO E RELATIVO DE ÓRGÃOS

A determinação do peso relativo dos órgãos de metabolização/excreção (fígado e rins), órgãos sexuais (testículos e epidídimos) e glândulas sexuais acessórias (próstata e vesícula seminal) podem fornecer indicações da função de cada órgão e atuação da substância testada sobre o organismo. Não foram obtidos resultados significativos na avaliação dos pesos relativos e absolutos dos órgãos internos (rins, fígado), órgãos sexuais (testículos, epidídimos) e glândulas acessórias (próstata e vesícula seminal) entre os grupos tratados e o grupo controle, indicando ausência de efeitos da substância sobre o sistema reprodutor segundo as variáveis avaliadas nas doses testadas (figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

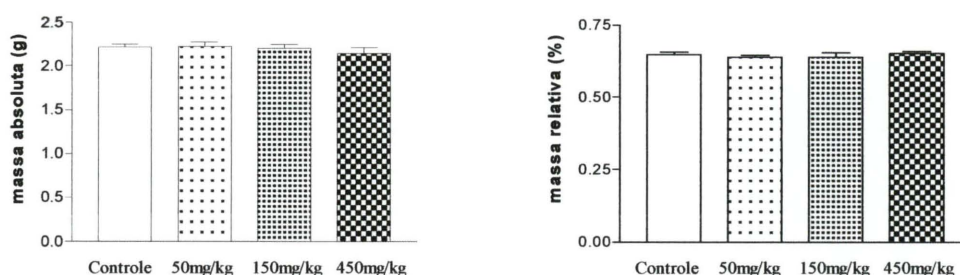


FIGURA 6 – Avaliação da massa absoluta e relativa dos rins efetuada entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup®. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

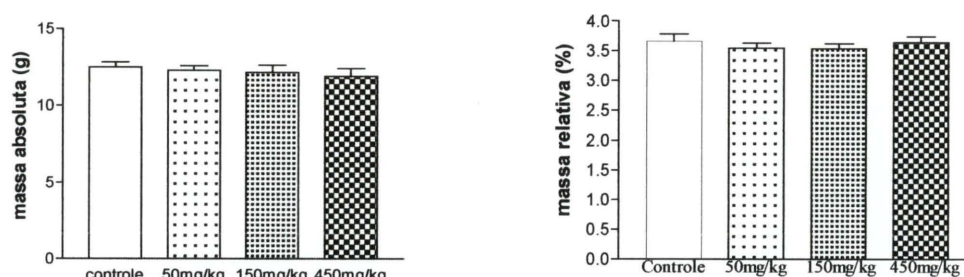


FIGURA 7 – Avaliação da massa absoluta e relativa do fígado efetuada entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup®. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

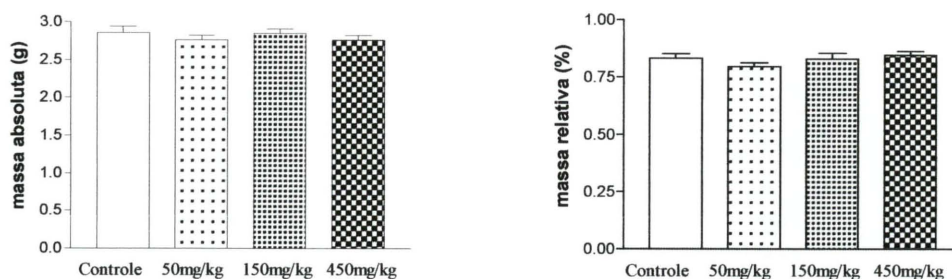


FIGURA 8 – Avaliação da massa absoluta e relativa dos testículos efetuada entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup®. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

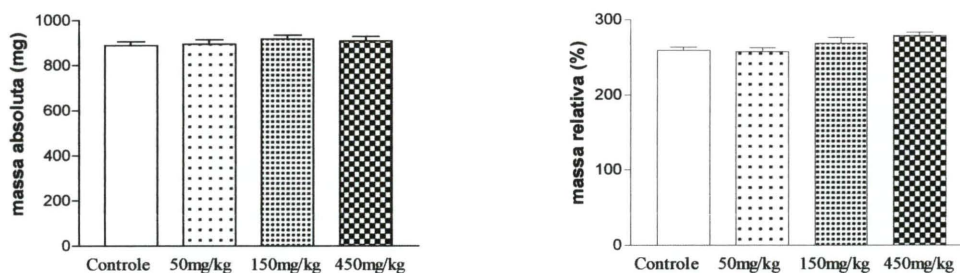


FIGURA 9 – Avaliação da massa absoluta e relativa do epidídimo efetuada entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup®. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

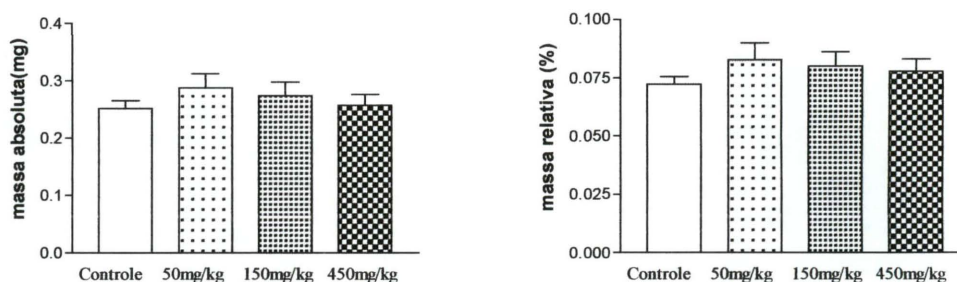


FIGURA 10 – Avaliação da massa absoluta e relativa da próstata efetuada entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup®. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

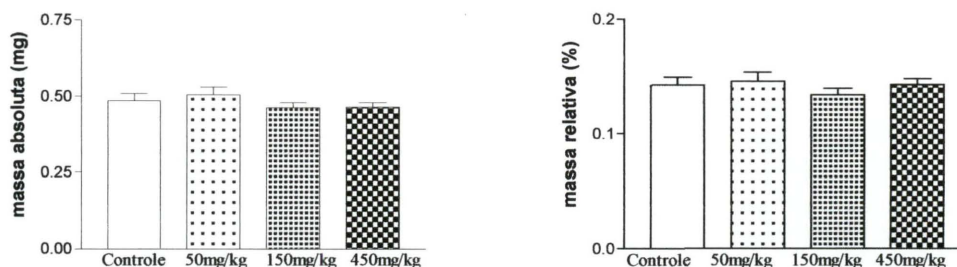


FIGURA 11 – Avaliação da massa absoluta e relativa da vesícula seminal efetuada entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup®. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 5.4 NÚMERO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS, ESPERMATOZÓIDES E TRÂNSITO ESPERMÁTICO

A contagem das células espermáticas proporciona uma avaliação do decorrer da espermatogênese, assim como também proporciona uma avaliação da funcionalidade das células do epitélio testicular e funcionalidade da cauda do epidídimo como órgão responsável pela armazenagem espermática. A contagem de células espermáticas,

espermatozoides e o trânsito espermático dos grupos tratados não apresentaram diferença significativa em relação aos resultados do grupo controle (figuras 12, 13 e 14).

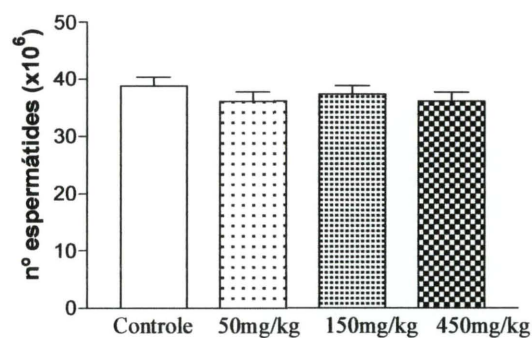


FIGURA 12 – Contagem do número de espermátides (milhões) entre os grupos expostos ao Roundup® e o grupo controle. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

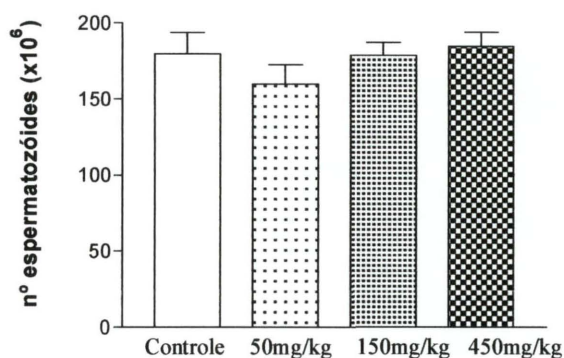


FIGURA 13 – Contagem do número de espermatozoides (milhões) entre os grupos expostos ao Roundup® e o grupo controle. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

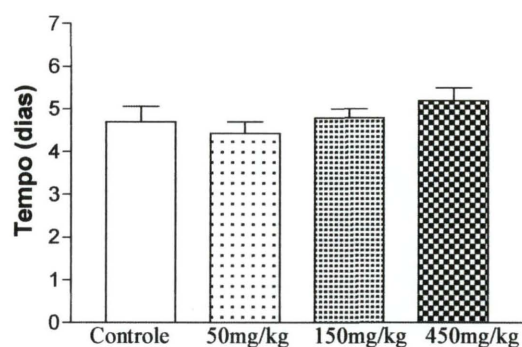


FIGURA 14 – Avaliação da taxa de trânsito espermático (dias). Dados expressos em média ± erro padrão da média.

## 5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS

### 5.5.1 Área de túbulos seminíferos

Os animais testados não apresentaram diferenças significativas com relação às medidas das áreas dos túbulos seminíferos entre os grupos tratados e o grupo controle (figura 15).

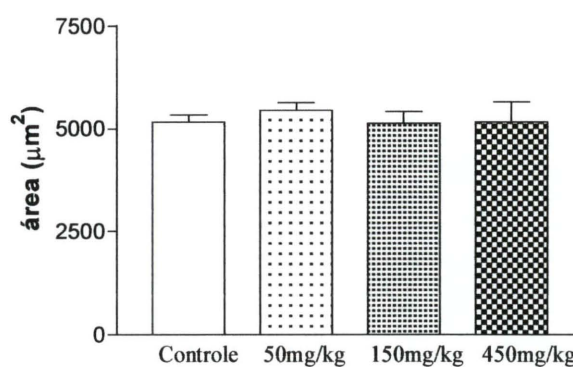


FIGURA 15 – Avaliação da área dos túbulos seminíferos (µm<sup>2</sup>) entre o grupo controle e os grupos expostos ao Roundup<sup>®</sup>. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

### 5.5.2 Espermatogênese completa e incompleta

Segundo os parâmetros avaliados, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle quanto à espermatogênese dos animais (completa e incompleta) (figuras 16 e 17).

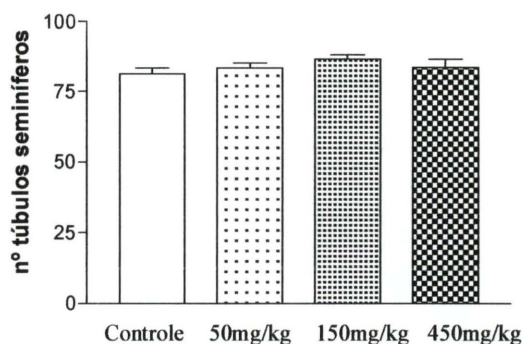


FIGURA 16 – Número de túbulos seminíferos que apresentam espermatogênese completa. Contagem de 100 túbulos/lâmina. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

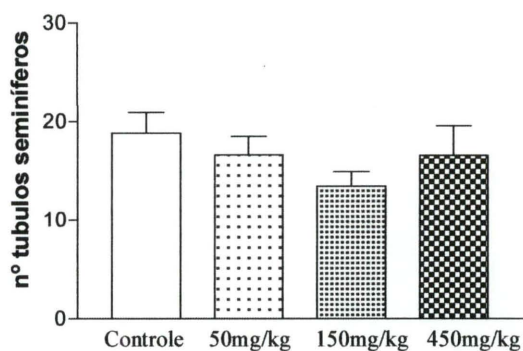


FIGURA 17 – Número de túbulos seminíferos que apresentam espermatogênese incompleta. Contagem de 100 túbulos/lâmina. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5.6 TESTE DE HERSHBERGER

### 5.6.1 Massa corporal no sacrifício

Os animais não apresentaram diferenças significativas na massa corporal no dia do sacrifício (figura 18).

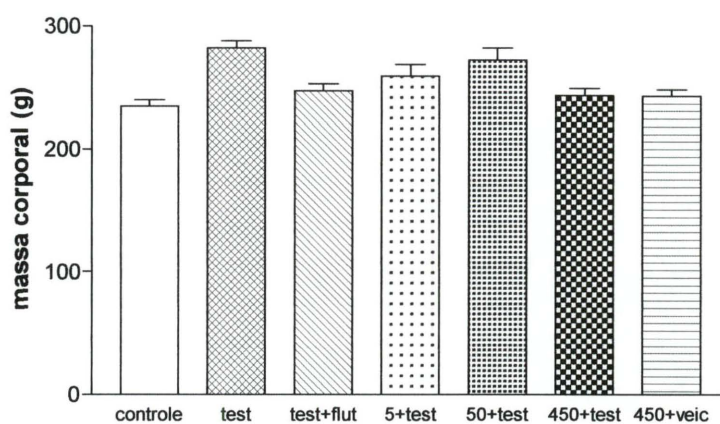


FIGURA 18 – Massa corporal dos animais antes de serem sacrificados. Grupos avaliados: controle; testosterona; testosterona + flutamida; Roundup (5, 50, 450,g/kg) + testosterona e Roundup (450mg/kg) + veículo. Dados dos grupos expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.6.2 Peso de órgãos e glândulas sexuais acessórias

Não houve diferenças significativas quanto ao peso (absoluto e relativo) dos órgãos de metabolização/excreção (fígado e rins), assim como suas glândulas anexas (próstata e vesícula seminal) entre os animais tratados e os seus respectivos grupos controle (figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26).

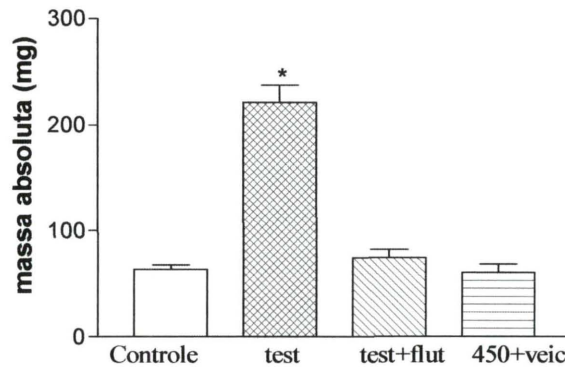


FIGURA 19 – Androgenicidade – Massa absoluta da vesícula seminal. Grupos avaliados: controle; testosterona; testosterona + flutamida; Roundup (450mg/kg) + veiculo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre o grupo tratado com testosterona e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

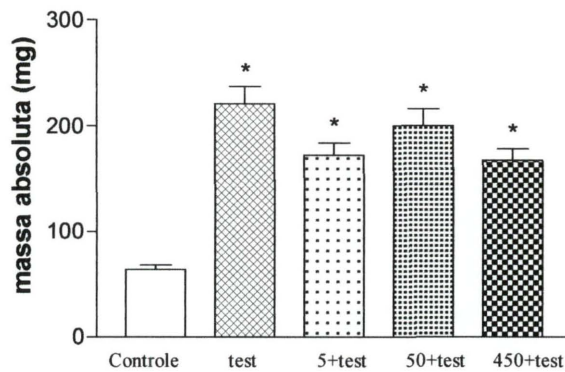


FIGURA 20 – Antiandrogenicidade – Massa absoluta da vesícula seminal. Grupos avaliados: controle; testosterona; Roundup (5, 50, 450mg/kg) + testosterona. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre os grupos tratados com testosterona e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

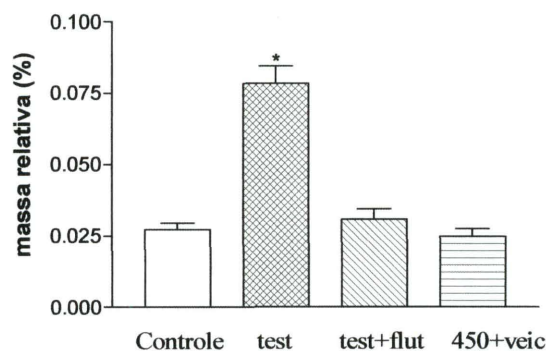


FIGURA 21 – Androgenicidade – Massa relativa da vesícula seminal. Grupos avaliados: controle; testosterona; testosterona + flutamida; Roundup (450mg/kg) + veiculo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre os grupos tratados com testosterona e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

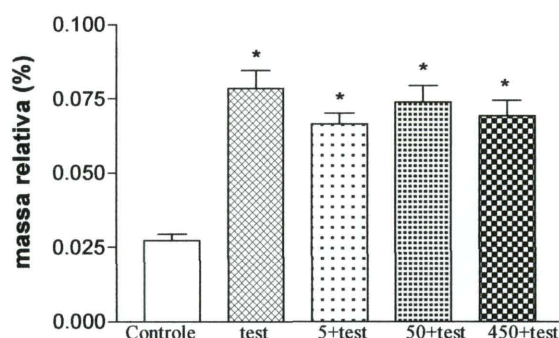


FIGURA 22 – Antiandrogenicidade – Massa relativa da vesícula seminal. Grupos avaliados: controle; testosterona; Roundup (5, 50, 450mg/kg) + testosterona. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre os grupos tratados com testosterona e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

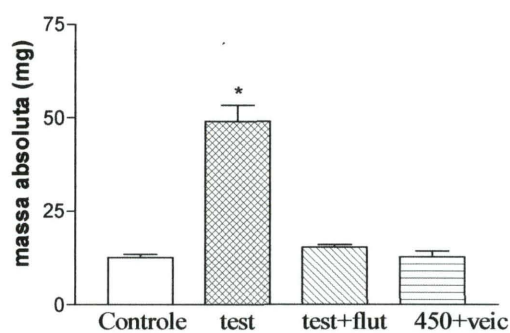


FIGURA 23 – Androgenicidade – Massa relativa da próstata. Grupos avaliados: controle; testosterona; testosterona + flutamida; Roundup (450mg/kg) + veiculo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre o grupo tratado com testosterona e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

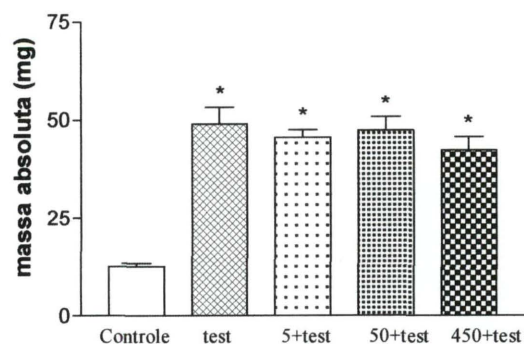


FIGURA 24 – Antiandrogenicidade – Massa absoluta da próstata. Grupos avaliados: controle; testosterona; Roundup (5, 50, 450mg/kg) + testosterona. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre os grupos tratados com testosterona e o grupo controle( $p < 0,05$ ).

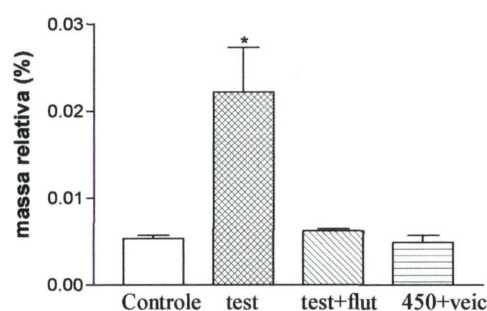


FIGURA 25 – Androgenicidade – Massa relativa da próstata. Grupos avaliados: controle; testosterona; testosterona + flutamida; Roundup (450mg/kg) + veiculo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre o grupo tratado com testosterona e o grupo controle( $p < 0,05$ ).

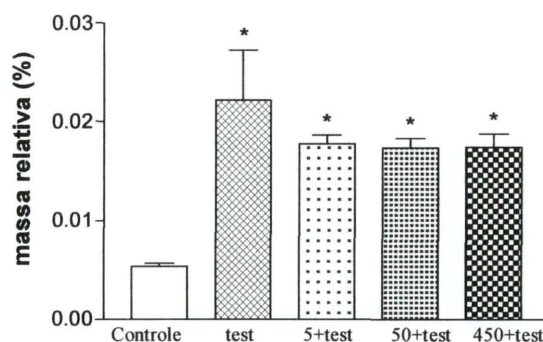


FIGURA 26 – Antiandrogenicidade – Massa relativa da próstata. Grupos avaliados: controle; testosterona; Roundup (5, 50, 450mg/kg) + testosterona. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*diferença significativa entre os grupos tratados com testosterona e o grupo controle( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Após a revolução industrial, as novas tecnologias desenvolvidas e o aprimoramento das técnicas de plantio tornaram a agricultura moderna mais produtiva, possibilitando ao homem maior autonomia no manejo de grandes áreas.

Através do desenvolvimento de novos materiais e técnicas de melhoramento genético, o homem aumentou a produção e a qualidade dos alimentos produzidos, porém, o custo desta melhoria pode ser alto para o meio ambiente (BRASHER, 2003). Muitas das substâncias usadas para manter as lavouras livres de pragas como insetos ou ervas daninhas pode apresentar efeitos nocivos aos animais e ao homem.

Devido ao uso intensivo de produtos tóxicos que apresentam alta persistência no meio ambiente, a elaboração e utilização de protocolos para a determinação da toxicidade de substâncias químicas utilizadas em lavouras ou produtos de uso diário possui uma grande importância.

Como o herbicida Roundup<sup>®</sup> é uma das substâncias citadas pela EPA (1998) que apresentam o potencial de causar alterações na modulação endócrina, salientou-se a necessidade da avaliação toxicológica deste herbicida dentro de protocolos que respondessem a esta necessidade.

Segundo Smith & Oehme (1992) o glifosato não apresenta efeitos mutagênicos, expressando pequena atividade na separação de cromátides-irmãs. Os mesmos autores também não obtiveram resultados significativos quanto à toxicidade maternal ou paternal em ratos Sprague-Dawley.

O herbicida glifosato apresenta baixa toxicidade através de rotas de exposição oral, dermal e subcutânea, apresentando altas taxas de toxicidade quando a exposição ocorre através de administração intraperitoneal (SMITH & OEHME, 1992).

Testes *in vitro* demonstraram que o inseticida Lindano pode inibir diretamente o processo de esteroidogênese nas células de Leydig alterando a expressão da proteína reguladora da esteroidogênese (SCAR). A proteína “SCAR” (Steroidogenesis Acute Regulatory) é uma via regulatória da esteroidogênese, atuando na transferência do colesterol do exterior para o interior da membrana interna da mitocôndria, onde a cadeia lateral do citocromo P<sub>450</sub> inicia a síntese de todos os hormônios esteróides (WALSH, 2000). Este mesmo autor realizou testes com outros pesticidas e seus resultados demonstraram que apenas o Roundup<sup>®</sup> possuía a capacidade de inibir a via da esteroidogênese através da desregulação

da expressão da proteína “StAR”, o que demonstrou a suscetibilidade desta proteína importante para a síntese de hormônios esteróides a poluentes ambientais.

A avaliação do Roundup<sup>®</sup> em trabalhos anteriores (DALLEGRAVE, 2003; DALLEGRAVE et al., 2003) demonstrou que o herbicida apresenta o potencial de causar efeitos adversos sobre a prole quando esta sofre exposição durante as fases de gestação e lactação. Portanto, neste trabalho procurou-se expor animais modelo em outros períodos de vida a fim de se comparar o grau de sensibilidade do organismo à substância de estudo em diferentes fases de desenvolvimento.

Segundo os protocolos utilizados, os animais expostos após o desmame ao herbicida Roundup<sup>®</sup> não apresentaram efeitos adversos, nas variáveis investigadas, em relação ao grupo controle. As variáveis de toxicidade geral, assim como as variáveis de toxicidade reprodutiva não foram afetadas neste período, demonstrando que o herbicida Roundup<sup>®</sup> não possui efeitos tóxicos (nas doses testadas) sobre organismos expostos em fases de desenvolvimento mais adiantadas (fase pubertal).

Estes resultados diferem dos resultados obtidos nos testes realizados por Dallegrave (2003), os quais demonstraram que a substância em estudo apresentou efeitos teratogênicos, retardo no desenvolvimento esquelético dos fetos e toxicidade sistêmica e reprodutiva nos animais expostos *in utero* e durante a lactação. Modelos experimentais feitos por Yousef *et al.* (1995) com coelhos machos tratados através da via oral (gavage) com doses subletais de glifosato (1/100 DL<sub>50</sub> e 1/10 DL<sub>50</sub>) demonstraram efeitos de toxicidade reprodutiva, caracterizada por perda de massa corporal, redução de libido, redução da concentração espermática e aumento do percentual de espermatozóides mortos ou anormais. Também foram detectados efeitos de toxicidade sistêmica (alterações hormonais), como redução dos níveis de testosterona atribuída à queda dos níveis séricos de LH. Os efeitos se mantiveram por longos períodos pós-tratamento, sugerindo que este herbicida tem um efeito de longa duração sobre a formação dos espermatozóides e de órgãos reprodutivos dos animais tratados.

O teste de curta duração para a determinação de possíveis efeitos androgênicos ou antiandrogênicos do Roundup<sup>®</sup> sobre o sistema reprodutor de ratos machos Wistar (Teste de Hershberger) não apresentou diferenças significativas entre os grupos expostos e o grupo controle nas variáveis investigadas, indicando que o Roundup<sup>®</sup> não apresenta efeitos de androgenicidade ou antiandrogenicidade. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos no protocolo de exposição após o desmame, onde as variáveis reprodutivas também

não foram afetadas.

Estes resultados demonstram a importância e a relevância da aplicação de vários protocolos em diferentes períodos de exposição para uma avaliação completa do potencial toxicológico de uma substância.

É de grande importância a avaliação dos níveis toxicológicos das substâncias químicas que estão em contato com o ser humano e animais selvagens através do contato direto com a substância ou através do contato indireto através da cadeia trófica. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a necessidade de uma avaliação completa das substâncias químicas que estão sendo aplicadas no meio ambiente e estão em contato com animais (incluindo o ser humano) em vários níveis de desenvolvimento.

## 7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos podemos concluir que:

- É necessária a aplicação de diferentes protocolos para diferentes fases de desenvolvimento do animal a fim de se determinar o potencial toxicológico de uma determinada substância.
- O Roundup® não apresenta efeitos tóxicos nas doses testadas e nas variáveis investigadas em animais expostos após o desmame.
- O herbicida não apresenta atividade androgênica ou antiandrogênica segundo o protocolo de curta duração (Teste de Hershberger) recomendado pelo EDSTAC.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 1991 Ed Guanabara Koogan S.A.

ANDRADE, A. J.M. **Efeitos da deltametrina sobre o sistema reprodutivo de ratos machos expostos *in utero* e durante a lactação**. 2002. 65p. Tese de mestrado - Faculdade de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BRASHER, P. Roundup – Resistant weeds are cropping up. Disponível em <<http://www.mindfully.org>>. Acesso em Agosto de 2003.

CONNOR, K., RAMAMOORTHY, K., MOORE, M., MUSTAIN, M., CHEN, I., SAFE, S., ZACHAREWSKI, T., GILLESBY, B., JOYEX, A., BALAGUER, P. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) and antiestrogens: Structure - activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 145, 111-123, 1997.

COX, C. Glyphosate Facsheet. **Journal of Pesticide Reform v 108, n. 3, 2000**

DALSENTER, P.R., FAQI, A. S., CHAHOUD, I. Lindane affects serum testosterone and sexual behavior in rats after prenatal exposure. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 16, 146-153, 1997.

DALLEGRAVE, E. **Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup® em ratos Wistar**. 2003. 225p. Tese de doutorado - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DALLEGRAVE, E., MANTESE, F. D., COELHO, R. S., PEREIRA, J. D., DALSENTER, P. R., LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters** 142, 45-52, 2003

DARUICH, J. Effect of the herbicide Glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research Section A** 85, 226-231, 2001

EERTMANS, F., DHOOGHE, W., STUYVAERT, S., COMHAIRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in vitro**, 17, 515-524, 2003.

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

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment** - EPA/630/R-96/009, Washington, Sept. 1996.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Endocrine disruptor screening program - report to congress (2000)** - DC: U.S. EPA, Washington, 2000

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Atmospheric Sciences Modeling Division** – Multimedia Modeling Component for Endocrine Disruptor Exposure. Página da internet <[www.epa.org](http://www.epa.org)> acessado em Março de 2002.

EXTOXNET - Extension Toxicology Network - Pesticide Information Profiles (revised June 1996). Página da internet <<http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/glyphosa.htm>> acessado em outubro de 2003

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica** 8º edição; 1992 Ed. Guanabara Koogan S.A.

MONSANTO - Avaliação da Segurança Alimentar e Ambiental da Soja Roundup Ready®, Evento 40-3-2, junho de 2001.

REYS, L. L. **Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino**. RFML, Série III, p.213-225, 2001.

SALISBURY, F. B. **Plant Physiology** 4th edition; 1992 Ed. Wadsworth Inc.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological Activity of Glyphosate to Plants and Animals: A Literature Review **Vet. Hum. Toxicol.** 34 (6) Dec. 1992.

WALSH, L. P.; McCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCOL, D. M.; Roundup Inhibits Stereoidogenesis by Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein Expression. **Environmental Health Perspectives** v.180, n.8 Aug. 2000

WHO - World Health Organization, Glyphosate. **Environmental Health Criteria** n. 159; Geneva 1994.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C.; Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Ingredient, Glyphosate, For Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** n. 31; p. 117 – 165, 2000.

WWF BRASIL. Disponível em <[www.wwfbrasil.com](http://www.wwfbrasil.com)> Acesso em Dezembro de 2003.

YOUSEF, M. I.; SALEM, M. H.; BERTHEUSSEN, K. Toxic effects of carbosulfan and glyphosate on semen characteristics in rabbits. **Journal Environmental Science Health British**, v. 30, n. 4, p. 513-534, 1995.