RENATA MARINO ROMANO

**Efeitos da exposição pré-púbere ao herbicida glifosato no
desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos**

São Paulo

2007

RENATA MARINO ROMANO

**Efeitos da exposição pré-púbere ao herbicida glifosato no
desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1900
FMVZ

Romano, Renata Marino

Efeitos da exposição pré-púbere ao herbicida glifosato no desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos / Renata Marino Romano. -- São Paulo: R. M. Romano, 2007.
98 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Glifosato. 2. Roundup. 3. Disrupção endócrina. 4. Esteroidogênese. 5. Morfologia testicular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos submetidos à ingestão oral de baixas dosagens de glifosato durante o período após o desmame até a puberdade", protocolado sob o nº869/2006, utilizando 80 (oitenta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/06/06".

(We certify that the Research "The study of reproduction development of male Wistar rats receiving low oral dosages of glyphosate during the period from weaning to puberty", protocol number 869/2006, utilizing 80 (eighty) rats, under the responsibility of Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 06/14/2006).

São Paulo, 19 de junho de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROMANO, Renata Marino

Título: Efeitos da exposição pré-púbere ao herbicida glifosato no desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição	_____
-----------	-------	-------------	-------

Assinatura	_____	Julgamento	_____
------------	-------	------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição	_____
-----------	-------	-------------	-------

Assinatura	_____	Julgamento	_____
------------	-------	------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição	_____
-----------	-------	-------------	-------

Assinatura	_____	Julgamento	_____
------------	-------	------------	-------

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido, Marco, e aos meus filhos, Patrícia e Rodrigo, pela ajuda e compreensão nos momentos de ausência.

Também aos meus pais, Fernando e Elvira, pela ajuda e apoio durante esse período.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira pela orientação e amizade durante este importante período.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano pelo auxílio na execução e viabilização do projeto em todas as suas etapas.

À Priscila pela ajuda no planejamento e execução das dosagens hormonais deste trabalho.

À Harumi, secretária do programa de pós-graduação do VRA, pelo profissionalismo na execução de seu trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Osvaldo Moura pelo uso dos equipamentos de seu laboratório e pela importante orientação estatística.

À Prof.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro pelo uso dos equipamentos e instalações de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka pela ajuda no planejamento das análises histológicas do projeto e pela ajuda na interpretação dos exames histopatológicos.

Aos colegas do LDH Débora, Lílian, Marie, Cláudia, Alexandre, Rodrigo e Priscila pela agradável convivência durante esses dois anos de mestrado.

À Capes pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

RESUMO

ROMANO, R. M. **Efeitos da exposição pré-púbere ao herbicida glifosato no desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos.** [Effects of the prepubertal exposure to glyphosate-Roundup on reproductive development of male Wistar rats]. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O glifosato-Roundup é um herbicida amplamente utilizado em diversas culturas agrícolas. Sua toxicidade reprodutiva está relacionada com a inibição da proteína StAR e da enzima aromatase, causando *in vitro* redução significativa da produção de testosterona e estradiol. Este trabalho teve como objetivo verificar esse efeito *in vivo*, utilizando-se ratos Wistar machos pré-púberes como modelo experimental. Utilizou-se 68 machos tratados dos 23 aos 53 dias de idade com as doses de 0, 5, 50 e 250 mg/kg de peso vivo por gavagem uma vez ao dia. Foram avaliados a progressão da puberdade, o desenvolvimento corporal, a produção hormonal de testosterona, estradiol e corticosterona, morfologia testicular e da glândula adrenal, função renal e hepática e histopatologia renal e hepática. As análises estatísticas utilizadas foram a análise de variâncias de uma via ANOVA, de duas vias MANOVA ou Kruskal-Wallis e pós-testes de Tukey-Kramer, Fisher ou de Dun. O herbicida glyphosate-Roundup alterou de forma significativa a progressão da puberdade de forma dose dependente, bem como se observou a redução na produção de testosterona e alterações na morfologia dos túbulos seminíferos. A morfologia da glândula adrenal e a produção de corticosterona não foram afetadas pelas doses utilizadas nesse estudo. Observou-se comprometimento da função renal e alterações patológicas nesse órgão. Não foram evidenciadas alterações hepáticas. O crescimento corporal dos animais não foi influenciado pelo tratamento. Pode-se concluir que esse herbicida é um potente *disruptor* endócrino *in vivo*, causando distúrbios no desenvolvimento reprodutivo e na produção hormonal dos animais.

Palavras-chave: Glifosato. Roundup. Disrupção endócrina. Esteroidogênese. Morfologia testicular.

ABSTRACT

ROMANO, R. M. **Effects of the prepubertal exposure to glyphosate herbicide on reproductive development of male Wistar rats.** [Efeitos da exposição pré-púbere ao glifosato-Roundup no desenvolvimento reprodutivo de ratos Wistar machos]. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The glyphosate-Roundup is a widely pesticide used in several culturas agrícolas. Its reproductive toxicity is associated to inhibition of StAR protein and aromatase enzyme that cause *in vitro* significantly reduction in testosterone and estradiol production. The objective of this study was to evaluate the *in vivo* effects of inhibition of StAR protein and aromatase enzyme, using prepubertal male Wistar rats like experimental model. 68 animals were exposed once a day by gavage to glyphosate-Roundup in following doses: 0, 5, 50 or 250 mg/kg of body weight. The end points were puberty progression, body development, testosterone, estradiol and corticosterona productions and testicular and adrenal morphology, renal and liver function and histopatology. The statistical analysis used were one-way ANOVA, multi-way ANOVA or Kruskal-Wallis and *posthoc* tests of Tukey-Kramer, Fisher or Dun. The herbicide glyphosate-Roundup changed significantly the puberty progression in dose-dependent manner, as well reduction in testosterone production and alterations in testicular morphology. There were not observed alterations in adrenal morphology or corticosterone production in the doses used in this study. The renal function and histopatology were altered in treated groups while liver function wasn't. The body development was not influenced by the exposure. In conclusion, glyphosate-Roundup is a potent endocrine disruptor *in vivo* that cause problems in reproductive development and hormonal synthesis in exposure animals.

Key-words: Glyphosate. Roundup. Endocrine disruption. Steroidogenesis. Testicular morphology.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Via metabólica para a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais nas plantas. O glifosato atua por inibição competitiva da enzima enolpiruvilshikimato fosfato sintase (EPSPS) e conseqüente inibição da síntese dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina	25
Quadro 2 – Via simplificada de degradação do glifosato no solo. Observar que há diferenças entre solos previamente em contato com o produto e solos onde a aplicação é realizada pela primeira vez	26
Quadro 3 – Ontogenia de receptores e hormônios no rato macho até os 35 dias de idade	33
Quadro 4 – Ontogenia de receptores e hormônios no rato macho dos 35 aos 90 dias de idade	34

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 –	Pesagem diária dos animais em balança apropriada para a contenção de ratos - São Paulo – 2007	45
Fotografia 2 –	Procedimento gavagem em animal - São Paulo – 2007	46
Fotografia 3 –	Verificação da separação balanoprepucial - São Paulo – 2007	46
Fotografia 4 –	Colheita de sangue por punção cardíaca em animal anestesiado - São Paulo – 2007	47
Fotografia 5 -	Localização para retirada dos testículos - São Paulo – 2007	48
Fotografia 6 –	Localização para retirada da glândula adrenal - São Paulo – 2007	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Distribuição dos pesos observados aos 23 dias de idade para os animais nos quatro grupos de tratamentos - São Paulo – 2007	43
Gráfico 2 –	Evolução dos pesos médios dos animais nos grupos de tratamentos de 0, 5, 50 e 250 mg/kg dos 23 aos 53 dias de idade - São Paulo – 2007	57
Gráfico 3 -	Evolução dos pesos médios ($\pm$ E.P.M.) de todos os animais nos grupos de tratamentos dos 23 aos 53 dias de idade - São Paulo – 2007	57
Gráfico 4 -	Idade média, erro-padrão da média (E.P.M.) e desvio-padrão (D.P.) observados para os animais à separação balanoprepucial nos grupos de tratamentos (1) 0, (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/kg - São Paulo – 2007	59
Gráfico 5 -	Peso médio, Erro-Padrão da Média (E.P.M.), desvio-padrão (D.P.) observados para os animais à separação balanoprepucial nos grupos de tratamentos (1) 0, (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/Kg - São Paulo – 2007	59
Gráfico 6 –	Peso médio relativo (mg/100g PV), desvio-padrão (D.P.) e erro-padrão da média (E.P.M.) para o peso testicular da média de ambos testículos nos animais dos grupos controle (1) 0 mg/kg e tratados: (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/Kg - São Paulo – 2007	61
Gráfico 7 -	Epitélio tubular, luz tubular e diâmetro tubular (μm ; $x \pm \text{E. P. M.}$) para os animais nos grupos de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007	63

Gráfico 8 –	Peso médio (mg/100g PV), desvio-padrão (D.P.) e Erro-Padrão da Média (E.P.M.) para a média das adrenais os animais nos grupos de tratamento (1) 0, (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/Kg - São Paulo – 2007	66
Gráfico 9 -	Concentração sérica de testosterona (ng/dL; $\bar{x} \pm$ E.P.M) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007	73
Gráfico 10 -	Concentração sérica de estradiol ($\bar{x} \pm$ E.P.M) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007	74
Gráfico 11 -	Concentração sérica de corticosterona (ng/mL; $\bar{x} \pm$ E.P.M) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007	75

LISTA DE LÂMINAS

- Lâmina 1 – Fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos de animais experimentais. Nota-se o diâmetro do lúmen tubular, a espessura do epitélio germinativo e o diâmetro total dos túbulos. Em **A** observa-se a fotomicrografia dos túbulos do grupo controle e em **B**, **C** e **D** dos grupos de 5mg/Kg, 50mg/Kg e 250mg/Kg. Ocorreu um aumento no diâmetro da luz e diminuição na espessura do epitélio germinativo ao longo das dosagens crescentes. (Aumento de 100X. Barra de escala 100 µm) – São Paulo – 2007 64
- Lâmina 2 – Leve congestão glomerular, degeneração de túbulos contornados com deposição de proteína e reepitelização observadas em animal do grupo de 5 mg/kg Aumento de 10X; Barra de escala: 100µm) - São Paulo – 2007 68
- Lâmina 3 – Congestão mais acentuada observada tanto na região glomerular quanto nos túbulos, degeneração epitelial tubular mais acentuada e presença de pigmento de deposição de metal no citoplasma das células do epitélio tubular observados em animal do grupo de 50 mg/kg (Aumento de 10X; Barra de escala: 100µm) - São Paulo – 2007 69
- Lâmina 4 – Congestão glomerular e tubular mais intensa, degeneração glomerular e degeneração tubular com deposição de proteína. Maior número de túbulos degenerados que na dose anterior. Presença de pigmento de deposição de metal no citoplasma das células do epitélio tubular observados em animal do grupo de 250 mg/kg (Aumento de 10X; Barra de escala: 100µm) - São Paulo – 2007 69

Lâmina 5 –	Observação em maior aumento dos túbulos renais degenerados e presença de massa hialina no interior do túbulo, provavelmente por deposição de cálcio nesse local e presença de pigmento de deposição de metal no citoplasma das células do epitélio tubular em animal do grupo de 250 mg/kg (Aumento de 20X; Barra de escala: 75µm) - São Paulo – 2007	70
Lâmina 6 –	Leve congestão hepática observada em animal do grupo de 50 mg/kg (Aumento de 10X; Barra de escala: 100µm) - São Paulo – 2007	71

LISTA DE DESENHOS

Desenho 1 – Diagrama esquemático da parede dos túbulos seminíferos e tecido intersticial adjacente. As junções “tight” entre as paredes das células de Sertoli adjacentes formam a barreira hemato-testicular que previne a passagem de grandes moléculas ao lúmen dos túbulos seminíferos (In: Norman e Litwack, 1997)	38
Desenho 2 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado – São Paulo – 2007	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Idade (dias, $x \pm \text{E.P.M.}$) e peso (g, $x \pm \text{E.P.M.}$) à separação balanoprepucial para os grupos de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007.....	58
Tabela 2 – Peso relativo (mg/100g PV, $x \pm \text{EPM}$) dos testículos direito, esquerdo e média nos quatro grupos de tratamentos - São Paulo – 2007.....	60
Tabela 3 – Epitélio tubular, luz tubular e diâmetro tubular (μm ; $x \pm \text{E.P.M.}$) para os animais nos grupos de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007.....	63
Tabela 4 – Peso (mg/100g PV, $x \pm \text{EPM}$) das adrenais direita, esquerda e média nos quatro grupos de tratamentos - São Paulo – 2007	65
Tabela 5 – Concentrações séricas de uréia e creatinina (mg/dL, $x \pm \text{E. P. M.}$) - São Paulo – 2007	67
Tabela 6 – Concentrações séricas de ALT E AST (U/mL, $x \pm \text{E. P. M.}$) - São Paulo – 2007	71
Tabela 7 – Concentração sérica de testosterona (ng/dL; $x \pm \text{E.P.M}$) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007	72
Tabela 8 – Concentração sérica de estradiol ($x \pm \text{E.P.M}$) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo – 2007	73
Tabela 9 – Corticosterona sérica (ng/mL, $x \pm \text{E.P.M.}$) dos animais nos grupos de tratamento - São Paulo – 2007	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	DEFENSIVOS AGRÍCOLAS COMO DISRUPTORES ENDÓCRINOS QUÍMICOS	22
2.2	GLIFOSATO	24
2.2.1	Características químicas e mecanismo de ação	24
2.2.2	Comportamento do glifosato no solo	26
2.2.3	Farmacodinâmica e farmacocinética em animais de laboratório	27
2.2.4	Roundup®: ingredientes ativos e inertes	28
2.2.5	Estudos toxicológicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	29
2.3	FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO	32
2.3.1	Desenvolvimento sexual do macho na pré-puberdade	32
2.3.2	Síntese testicular de esteróides	34
2.3.3	Morfologia testicular	37
2.4	Programa de Investigação dos Disruptores Endócrinos (EDSP)	39
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL E HIPÓTESE CENTRAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	ANIMAIS.....	42
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
4.3	MANEJO DOS ANIMAIS	43
4.4	EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA GLIFOSATO	44

4.5	VERIFICAÇÃO DA IDADE À PUBERDADE	46
4.6	COLHEITA DE AMOSTRAS PARA EXAMES LABORATORIAIS	47
4.6.1	Sangue	47
4.6.2	Necropsias: retirada de testículos e adrenais	48
4.7	DOSAGENS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS	49
4.7.1	Testosterona Total	50
4.7.2	Estradiol.....	50
4.7.3	Corticosterona	51
4.8	ANÁLISE HISTEREOLÓGICA DOS TECIDOS	51
4.9	ANÁLISE DA FUNÇÃO RENAL	52
4.9.1	Uréia	52
4.9.2	Creatinina	53
4.10	ANÁLISE DA FUNÇÃO HEPÁTICA	54
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	54
4.12	CUIDADOS COM O MANUSEIO, CONSERVAÇÃO E RESÍDUOS DE GLIFOSATO.....	55
5	RESULTADOS	56
5.1	EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL	56
5.2	IDADE E PESO À SEPARAÇÃO BALANOPREPUCIAL	57
5.3	TESTÍCULOS	60
5.3.1	Peso relativo	60
5.3.2	Histopatologia	61
5.3.3	Morfometria dos túbulos seminíferos	61
5.4	ADRENAL	65
5.4.1	Peso relativo	65
5.4.2	Histopatologia	66

5.5	RINS	67
5.5.1	Função renal (uréia e creatinina)	67
5.5.2	Histopatologia	68
5.6	FÍGADO	70
5.6.1	Função hepática (ALT e AST)	70
5.6.2	Histopatologia	71
5.7	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS	72
5.7.1	Testosterona	72
5.7.2	Estradiol	73
5.7.3	Corticosterona	74
6	DISCUSSÃO	76
6.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	76
6.2	EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL	78
6.3	PROGRESSÃO DA PUBERDADE	78
6.4	TESTÍCULOS: PESOS RELATIVOS, MORFOLOGIA E NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL	79
6.5	ADRENAIS: PESOS RELATIVOS, MORFOLOGIA E NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA	82
6.6	FÍGADO: FUNÇÃO HEPÁTICA E HISTOPATOLOGIA	83
6.7	RINS: FUNÇÃO RENAL E HISTOPATOLOGIA	84
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE	96

1 INTRODUÇÃO

*Disruptores*¹endócrinos são moléculas exógenas ambientais que podem afetar a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação, ação e catabolismo de hormônios naturais do organismo, podendo exercer seu efeito mesmo quando em mínimas quantidades.

O glifosato é um herbicida utilizado no combate às ervas daninhas prejudiciais a diversas culturas, bastante efetivo, não-seletivo e pós-emergente que inibe o crescimento da planta através da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da fotossíntese.

A detecção de resíduos de praguicidas em residências de agricultores e a presença desses resíduos e seus metabólitos em urina das famílias residentes em área agrícola demonstra que há risco de exposição ambiental, o que torna importante o conhecimento dos efeitos tóxicos em baixas doses por períodos prolongados.

O glifosato em baixas concentrações não tóxicas causa efeito de disrupção sobre a enzima aromatase em células de placenta humana *in vitro*. A partir do momento que o glifosato penetra na célula, e isso é facilitado nas formulações com adjuvantes (Roundup[®], Monsanto Co.), ele reduz a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos e também por diminuir expressivamente a expressão da proteína StAR (proteína de regulação rápida da esteroidogênese).

Nas culturas agrícolas, em diversas partes do mundo, o uso de praguicidas é intenso. Animais expostos a longos períodos de pastagem em áreas de Integração Lavoura e Pecuária podem estar ingerindo quantidades de subprodutos, metabólitos e contaminantes utilizados na agricultura. A contaminação do solo e água tanto fluvial como subterrânea, pode levar a distúrbios reprodutivos principalmente no que se refere às alterações do perfil hormonal destes animais. Os efeitos residuais destas substâncias podem estar contidos no sangue, na carne, no leite, na urina e nas fezes dos animais levando a recontaminação do solo e podendo chegar ao consumo humano.

¹

Empregarei o termo inglês uma vez que não há correspondente em língua portuguesa.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da disrupção endócrina ocasionada pelo herbicida glifosato em mamíferos, utilizando-se ratos pré-puberes como modelo experimental em protocolo previamente desenvolvido e validado. Esse efeito foi mensurado através do acompanhamento da progressão da puberdade; das dosagens séricas de testosterona, estradiol e corticosterona; pela morfologia do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos e da glândula adrenal; pela análise das funções hepática e renal; e pela histopatologia renal e hepática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O estudo dos *disruptores* endócrinos envolve o entendimento das áreas de toxicologia e de fisiologia reprodutiva. Neste tópico serão abordados os aspectos conceituais relacionados a estas duas áreas, como os efeitos dos praguicidas sobre o sistema endócrino, as características químicas do herbicida glifosato e seus efeitos toxicológicos sobre organismos e cultivos celulares, bem como o desenvolvimento reprodutivo normal pré-puberal dos ratos machos e o Programa de Investigação dos *Disruptores* Endócrinos.

2.1 PRAGUICIDAS COMO *DISRUPTORES* ENDÓCRINOS QUÍMICOS

As indústrias químicas ligadas à agricultura e pecuária vêm produzindo milhares de novos produtos a cada ano. Durante os últimos cinquenta anos, uma dezena de milhares de produtos químicos foram sintetizados e liberados para utilização no meio ambiente (SOLOMON; SCHETTLER, 2000). Americanos utilizam aproximadamente dois bilhões de galões de inseticidas a cada ano, e alguns resíduos permanecem na cadeia alimentar por décadas (SCOTT, 2005).

Em muitos destes produtos são encontradas substâncias que mimetizam hormônios ou possuem atividade de *disrupção* endócrina, especialmente com propriedades estrogênicas ou de hormônios tiroideanos (COLBORN; DUMANOSKI; MEYERS, 1996; SOLOMON; SCHETTLER, 2000; SCOTT, 2005).

Estas substâncias denominadas *disruptores* endócrinos químicos, incluem diversos produtos de uso comum na agricultura como alquilfenóis, glifosato, ácido diclorofenoxiacético (2,4D), praguicidas organoclorados, metolacoloro, acetocoloro, alacoloro, clorpirifós, metoxicloro e piretróides sintéticos (KRIMSKI, 2000; CURWIN et al., 2005).

Disrupção endócrina, no entanto, não é um fenômeno recente. Em 1930, estudos envolvendo animais de laboratório demonstraram propriedades estrogênicas de um grande número de produtos químicos industriais, dentre eles o

DDT (diclorodifeniltricloroetano), um pesticida que causava feminilização em galos (SOLOMON; SCHETTLER, 2000).

O sistema endócrino é alvo principal da manifestação tóxica dos praguicidas e pode levar a alterações reprodutivas, principalmente nas funções hormônio esteróides dependentes. As alterações endócrinas podem ser decorrentes de antagonismos e sinergismos bioquímicos ou em receptores específicos para os hormônios esteróides. No geral, relacionam-se com o aumento do clearance metabólico da testosterona, decréscimo na síntese de testosterona, ação anti-androgênica de alguns pesticidas como o DDE (metabólito do DDT) e aumento da secreção dos estrógenos pela ação de substâncias como o DDT, dieldrin, metoxicloro e toxafeno (LE BLANC; BAIN; WILSON, 1997).

Além do potencial efeito sobre as funções endócrinas reprodutivas e neurológicas, existem evidências que tais produtos também se degradam no ambiente em substâncias com funções prejudiciais à imunologia animal e humana (BARNETT; COLBORN; FOURNIER, 1996; CRISP et al., 1998).

No entanto, seu potencial risco *disruptor* não está somente no contato direto com os componentes, mas na interação destes com outras substâncias ou com produtos nitrogenados contidos nos fertilizantes encontrados no solo e na água do subsolo (PORTER; JAEGER; CARLSON, 1999; SCOTT, 2005).

Seus efeitos podem ser agudos ou crônicos, na dependência do tempo de exposição, concentração no ambiente, modo de contato com o produto e tipo de degradação, interferindo no padrão hormonal dos reprodutores promovendo queda na fertilidade e até infertilidade (AKINGBEMI et al., 2004).

A exposição à contaminação ambiental ou induzida experimentalmente em crocodilos (*Alligator mississippiensis*) levou a profundas alterações sobre a fertilidade desses animais, com efeitos estrogênicos marcados (CRAIN et al., 1997).

As exposições crônicas interferem com o funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal produzindo diminuição dos níveis séricos de andrógenos, uma vez que tais substâncias são consideradas como protótipos anti-androgênicos (GRAY et al., 1999).

É provável que não exista, no campo da toxicologia, controvérsia maior de que se os poluentes químicos no ambiente são os responsáveis por malformações congênitas em animais silvestres, declínio da contagem espermática no homem e o câncer de mama na mulher (SCOTT, 2005).

2.2 GLIFOSATO²

O glifosato é um herbicida utilizado no combate às ervas daninhas prejudiciais a diversas culturas, bastante efetivo, não-seletivo e pós-emergente (HAYES; LAWS, 1991; CERDEIRA et al., 2007), representando cerca de 30% do total de herbicidas utilizados na lavoura (INOUE et al., 2003).

Nas culturas tradicionais, sua aplicação é realizada antes do plantio ou após o plantio com uso de equipamentos adequados para evitar o contato com a planta cultivada. O desenvolvimento de sementes de espécies comerciais resistentes ao glifosato (transgênicas) proporcionou segurança na aplicação do produto em qualquer fase do crescimento da planta (CERDEIRA et al., 2007).

Seu uso ainda contempla o controle de plantas daninhas aquáticas, onde seu efeito sobre a biodiversidade ainda é discutível (SANCHES et al., 2003; BRAUNSCH; SMITH, 2007). O estudo comparativo de diferentes formulações à base de glifosato em sedimentos aquáticos mostrou toxicidade relativa à formulação, sendo que os organismos estudados, *Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella azteca*, mostraram-se bastante sensíveis a esse herbicida (TSUI; CHU, 2003, 2004).

2.2.1 Características químicas e mecanismo de ação

O glifosato inibe o crescimento da planta através da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da enzima enolpiruvilshikimatofosfatossintase (EPSPS), a qual é responsável pela biossíntese de chorismato, um intermediário na biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano (Quadro 1). Esta via para a biossíntese de aminoácidos aromáticos não é expressa por nenhum membro do reino animal, tornando esse mecanismo de ação exclusivo às plantas (WILLIAMS et al., 2000; CERDEIRA et al., 2007).

²

Nome comum. Nome químico: N-fosfonometilglicina (C₃H₈NO₅P).

Fonte: WILLIAMS et al., 2000.

Quadro 1 – Via metabólica para a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais nas plantas. O glifosato atua por inibição competitiva da enzima enolpiruvilshikimatofosfatosintase (EPSPS) e conseqüente inibição da síntese dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina.

As sementes transgênicas apresentam a expressão do gene CP4EPSPS da *Agrobacterium* sp, que inibe o efeito da enzima natural da semente, transpondo o efeito do herbicida e produzindo as sementes resistentes ao glifosato. As variedades de soja resistentes ao glifosato são denominadas GRS, *glyphosate resistant soybeans* (CASTLE et al., 2004; CERDEIRA; DUKE, 2006; CERDEIRA et al., 2007; YASOUR; RIOV; RUBIN, 2007).

2.2.2 Comportamento do glifosato no solo

É um produto degradado pelos microorganismos presentes no solo com meia-vida frente à biodegradação de aproximadamente 28 dias, chegando a 90% em 90 dias. A persistência do produto no solo é de 30 a 90 dias (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998). As reações de biotransformação e biodegradação do glifosato no meio ambiente estão esquematizadas no quadro 2.

Fonte: WILLIAMS et al., 2000.

Quadro 2 – Via simplificada de degradação do glifosato no solo. Existem diferenças entre solos previamente em contato com o produto e solos onde a aplicação é realizada pela primeira vez.

O glifosato também interage com as propriedades físicas e químicas do meio ambiente, como a temperatura, luminosidade e tipo de solo que podem influenciar na sua ação. Quando em contato com o solo, é rapidamente adsorvido pelos minerais formando quelatos de ligação forte, sendo então degradado pelos microorganismos presentes (HAYES; LAWS, 1991; GOLDSBOROUGH; BROWN, 1993; HANEY; SENSEMAN; HONS, 2002; TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). É uma substância não volátil, sofrendo pouca fotólise e sua biodegradação não é influenciada pelo baixo pH do solo, condição freqüente em solos brasileiros (ABREU-JR; MURAOKA; LAVORANTE, 2003; GETENGA; KENGARA, 2004; TONI; SANTANA; ZAIA, 2006).

O estudo da presença de glifosato e ácido aminofosfônico (AMPA) em águas superficiais no Rio Grande do Sul em áreas de cultivo intenso de arroz evidenciou a ocorrência em baixas concentrações desses produtos, estando em conformidade com os níveis máximos estabelecidos pela legislação brasileira e americana (SILVA; PERALBA; MATTOS, 2003). Isso pode significar baixo risco de lixiviação e contaminação ambiental ocasionado pelo uso desse herbicida (SANCHES, 2003).

Entretanto, a detecção de resíduos de praguicidas em residências de agricultores (CURWIN et al., 2005) e a presença desses resíduos e seus metabólitos em urina das famílias residentes em área agrícola (CURWIN et al., 2006) demonstra que há risco de exposição ambiental, o que torna importante o conhecimento dos efeitos tóxicos em baixas doses por períodos prolongados (CURWIN et al., 2005; CURWIN et al., 2006). Além disso, a presença de alguns tipos de resíduos em alimentos também tem sido identificada (COX; SURGAN, 2006).

2.2.3 Farmacodinâmica e farmacocinética em animais de laboratório

A excreção do glifosato ocorre principalmente por via fecal, sendo observada nas fezes a presença de 62 a 69% da dose oral administrada (WILLIAMS et al., 2000). A eliminação do produto também se dá via renal, sendo encontrada cerca de 36% da dose oral na urina. A meia-vida da eliminação pelas fezes e urina é calculada em dois dias (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991).

A distribuição pelos tecidos é pequena, aparecendo em maior quantidade no intestino delgado, ossos, cólon e rins. A absorção máxima ocorre em seis horas após a ingestão do produto, havendo rápido declínio em todos os tecidos, exceto nos ossos onde a eliminação é mais lenta (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991). Após 5 dias da administração de dose única de glifosato, observam-se traços residuais (3 a 6 ppb) no fígado, rins e musculatura esquelética (WILLIAMS et al., 2000).

A eliminação do produto é predominantemente na forma química como foi ingerido, havendo pequena transformação em AMPA (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991; WILLIAMS et al., 2000). Também não é evidenciada a formação de metabólitos tóxicos (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991).

2.2.4 Roundup^{®3}: ingredientes ativos e inertes

O registro de praguicidas define a composição do produto em ingredientes ativos e inertes. Os ingredientes ativos são os responsáveis pela ação principal do praguicida, matando, repelindo ou prevenindo a manifestação de pragas. Os ingredientes inertes são formados pelos adjuvantes, podendo ter efeito próprio, com ação química, sendo inclusive potencialmente tóxico para o ser humano (COX; SURGAN, 2006).

Os ingredientes inertes das formulações de praguicidas podem apresentar várias funções, atuando como solventes, surfactantes, preservativos, entre outras. Um único produto pode conter um grande número de ingredientes inertes, cada um com um propósito diferente na formulação. Esses componentes são protegidos por sigilo industrial (COX; SURGAN, 2006).

Os mais recentes estudos no desenvolvimento dos ingredientes inertes dos praguicidas estão focados na nanotecnologia. Os ingredientes ativos e inertes são manipulados em nanopartículas, formando uma emulsão, ou então o ingrediente ativo é encapsulado. Atribuindo-se, assim, novas características químicas aos

³ Roundup[®] é a formulação comercial mais conhecida do glifosato e a utilizada neste estudo.

produtos formulados, que podem alterar suas características de ação e toxicidade anteriormente conhecidas (ETCGROUP, 2004).

Existem diferenças na eficácia das formulações de glifosato de acordo com o tipo de ingrediente inerte que é adicionado (HAEFS et al., 2002; BELLES et al., 2006). Nos ensaios toxicológicos é observada maior toxicidade nas formulações comerciais de glifosato do que quando se utiliza somente o sal, indicando que a toxicidade dos ingredientes inertes é maior que a do ingrediente ativo, e que a sua presença produz maior efeito tóxico (SURGAN, 2005; COX; SURGAN, 2006).

A avaliação dos efeitos tóxicos a diferentes surfactantes utilizados no preparo das formulações comerciais de glifosato realizado na espécie de camarão *Thamnocephalus platyurus* demonstrou que esses são bastante tóxicos, provavelmente por alterar o transporte de oxigênio nas superfícies respiratórias (BRAUSCH; SMITH, 2007).

Da mesma forma, alterações causadas em quatro tipos de sapos norte americanos expostos a cinco formulações à base de glifosato demonstraram incremento no tempo de metamorfose, danos na cauda e anormalidades nas gônadas causadas por disrupção dos hormônios, comprovados pelo aumento na transcrição de RNAm nos animais expostos, com maior efeito nos animais expostos ao surfactante politoxilado tallowamine POEA (HOWE et al., 2004).

Ainda, o efeito tóxico maior das formulações de glifosato também foi confirmado em cultivos de células testiculares de camundongos (WALSH et al., 2000), em mitocôndrias de hepatócitos de ratos (PEIXOTO, 2005), em cultivo de células placentárias humanas (RICHARD et al., 2005; BENACHOUR et al., 2007), em cultivo de células embrionárias humanas (BENACHOUR et al., 2007) e em embriões invertebrados (MARC et al., 2002).

2.2.5 Estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*

Vários estudos foram conduzidos para demonstrar a segurança e as limitações da utilização do glifosato, e sua marca comercial mais conhecida, o Roundup®. Ensaio avaliando seus efeitos tóxicos sobre animais de laboratório, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães, macaco e galos; e outros *in vitro* em

culturas celulares distintas vêm sendo realizados a partir da década de 70 (WILLIAMS et al., 2000).

Dallegrave et al. (2003) observaram o retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal em ratos Wistar causado pelo Glifosato-Roundup® e comprovaram esse efeito tóxico sobre o desenvolvimento fetal em exposições agudas induzidas utilizando-se as doses orais diárias de 0, 500, 750 ou 1.000 mg/kg entre o 6.^a e 15.^o dia de gestação. Verificou-se a ocorrência de mortalidade de 50% das fêmeas que receberam a dose de 1.000 mg/kg.

Benedetti et al. (2004) avaliaram o efeito hepático da administração oral em dias alternados de baixas doses de glifosato-biocarb (0, 4,87, 48,7 ou 487 mg/kg) em ratos Wistar por 75 dias. O glifosato modificou o metabolismo hepático, tendo sido observadas alterações desde a dose mais baixa de 4,87 mg/kg. Ocorreu elevação das enzimas hepáticas ALT e AST, sugerindo danos irreversíveis aos hepatócitos; aumento das células de Kupfer nos sinusóides dos animais tratados, seguido pela deposição de fibras de reticulina, compostas principalmente por colágeno tipo III.

Em mitocôndrias isoladas de hepatócitos de ratos, observou-se redução de 50% no processo de fosforilação oxidativa na presença de Roundup®, que atuou direta e indiretamente na atividade da ATPase (PEIXOTO, 2005).

A formulação Roundup® atrasou a ativação da CDK1/ciclina B, inibindo também a síntese global de proteínas, o que alterou a regulação do ciclo celular, durante o desenvolvimento embrionário inicial do *Sphaerechinus granularis*, um invertebrado marinho utilizado como modelo para avaliação da exposição à contaminação ambiental por praguicidas (MARC et al., 2002).

Em ampla revisão realizada por Williams et al. (2000), os autores citam que não há evidências que doses orais de 0 a 30mg/kg e de 0 a 30.000 ppm levem a alterações significativas na capacidade de ratos se reproduzirem. Porém, observou-se a redução nas concentrações espermáticas no epidídimo em cerca de 20% em animais expostos a doses orais de 25.000 ppm e 50.000 ppm. Fêmeas que receberam doses de 50.000 ppm apresentaram elevação no comprimento do ciclo estral de 4,9 para 5,4 dias.

Tem-se observado que algumas agricultoras que utilizam glifosato têm problemas para engravidar, mas o mecanismo de ação do glifosato em mamíferos ainda é questionado. Richard et al. (2005) demonstraram que o glifosato em baixas

concentrações não tóxicas causa efeito de disrupção sobre a enzima aromatase em células de placenta humana *in vitro*. A partir do momento que o glifosato penetra na célula, e isso é facilitado nas formulações de Roundup® com adjuvantes, ele reduz a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos.

A diminuição da atividade da aromatase também foi observada em cultivos de células embrionárias humanas, sendo estas mais sensíveis que as células placentárias. A disrupção da aromatase foi mais intensa na presença de Roundup®, mas também foi observada na utilização de glifosato sem adjuvantes. Efeitos citotóxicos também foram observados, sendo maiores com o maior período de exposição ao produto, mostrando efeito tempo e dose dependentes (BENACHOUR et al., 2007).

A exposição de patos (*Anas platyrhynchos*) ao Roundup® causou diminuição significativa na produção de testosterona, afetando em aproximadamente 90% a sua concentração plasmática em doses de 5 ou 100 mg/kg. Também houve redução na concentração plasmática de estradiol nos animais expostos à dose de 5 mg/kg (OLIVEIRA et al., 2007).

O mecanismo de disrupção do glifosato estudado por Walsh et al. 2000 em cultivo celular de Leydig da linhagem tumoral MA-10, quantificou a expressão da proteína StAR e da enzima aromatase nos cultivos celulares submetidos a diferentes concentrações de Roundup® (Monsanto). Houve a redução de 90% dos níveis da proteína StAR, implicando que, de cada 100 moléculas de colesterol disponíveis para o transporte ao interior da membrana mitocondrial, apenas 10 atingiram o sistema enzimático P450scc. Em seguida, a conversão de colesterol em pregnenolona foi reduzida em 71% pela inibição da atividade de P450scc. Ao final das transformações bioquímicas observou-se a redução de 94% na esteroidogênese total.

Estudos conduzidos em plantas de linhagem transgênica resistentes ao glifosato demonstraram ocorrer infertilidade dos indivíduos do sexo masculino. Aparentemente, o macho apresenta menor expressão do gene CP4 EPSPS no tecido reprodutivo, o que o torna mais sensível à ação do glifosato. O efeito aparece na redução da polinização, deformidade e queda dos botões embrionários e redução da produtividade (em algumas espécies). O mecanismo envolvido na infertilidade masculina de algumas dessas variedades transgênicas ainda não foi elucidado (YASOUR; RIOV; RUBIN, 2007).

2.3 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO

Os *disruptores* atuam sobre a fisiologia reprodutiva, podendo provocar alterações funcionais e morfológicas significativas. O desenvolvimento do sistema reprodutivo desde a fase embrionária, a síntese testicular de esteróides e a morfologia testicular são os tópicos mais importantes para o entendimento da ação dos *disruptores* sobre a fisiologia reprodutiva do macho.

2.3.1 Desenvolvimento sexual do macho na pré-puberdade

A puberdade é a fase do desenvolvimento onde ocorrem profundas alterações hormonais, físicas, comportamentais e psicológicas que tornam o indivíduo capaz de se reproduzir, pela produção de gametas viáveis transferidos através de um sistema reprodutivo maduro. O início da puberdade nos mamíferos depende de uma seqüência completa e ordenada de alterações maturacionais que são iniciadas no cérebro, no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (OJEDA; BILGER, 2000).

Externamente, a progressão da puberdade no rato macho é marcada pelo crescimento do testículo e, mais precisamente, pela separação da pele do pênis da glândula, conhecida como separação balanoprepucial (OJEDA; URBANSKI, 1994). O acompanhamento dessa fase é utilizado em protocolos de avaliação dos *disruptores* endócrinos para verificar o efeito das alterações hormonais (STOKER et al., 2000a,b).

O desenvolvimento sexual do rato macho pode ser dividido em quatro fases: *período neonatal*: primeira semana após o nascimento; *período infantil*: do 8.º ao 21º dia de vida; *período juvenil*: até o do 35.º dia de vida; e *período peripuberal*, que termina entre o 55.º e 60.º dias de idade (OJEDA; URBANSKI, 1994).

No rato macho os níveis hipotalâmicos de GnRH continuam a se elevar durante o desenvolvimento pós-natal. Da mesma forma, o conteúdo de LH e FSH na hipófise aumentam gradualmente com a idade, assim como a responsividade da glândula à estimulação do GnRH. A resposta máxima ao FSH ocorre entre os dias

25 e 35 de idade, enquanto a resposta máxima ao LH ocorre entre os dias 35 e 45 de idade (OJEDA; URBANSKI, 1994).

Os receptores hipofisários de GnRH mostram-se elevados durante as quatro primeiras semanas de vida, alcançando um pico em torno dos 30 dias, declinando então aos níveis adultos observados entre os dias 60 e 80 de idade. Este declínio é inversamente correlacionado com a elevação da testosterona sérica, sugerindo um feedback negativo dos esteróides testiculares sobre a função hipotalâmica e hipofisária (OJEDA; URBANSKI, 1994). A ontogenia de receptores e hormônios pode ser observada nos quadros 3 e 4 (STOCKER et al., 2000b).

<i>Esteróide ou Proteína</i>	<i>DG 18 - nascimento</i>	<i>DPN 1-15</i>	<i>DPN 16-25</i>	<i>DPN 26-35</i>
GnRH	+	+	+++	+++
GnRHr	+	+	+	+++
LHr	+	+	++	++
FSH	+	+	+	+++
FSHr	+	+++	+++	++
ARt	+	++	+	++

Fonte: Adaptado de Stocker et al. (2000).

Legendas: + = baixo nível; ++ = nível moderado; +++ = nível elevado. GnRHr = receptores para GnRH; LHr = receptores para LH; FSHr = receptores para FSH em túbulos seminíferos; ARt = Receptores de andrógenos testiculares; DG = dia gestacional; DPN = dia pós-natal.

Quadro 3 – Ontogenia de hormônios reprodutivos e seus receptores no rato macho até os 35 dias de idade.

<i>Esteróide ou Proteína</i>	<i>DPN 36-45</i>	<i>DPN 46-55</i>	<i>DPN 56-65</i>	<i>DPN 66-90</i>
GnRH	+++	+++	Pulsátil	Pulsátil
GnRHr	+++	+++	++	↓
LHr	+++	+++	+++	+++
FSH	+++	++	++	++
FSHr	↓			
ARt	++	+++	+++	+++

Fonte: Adaptado de Stocker et al. (2000).

Legendas: + = baixo nível; ++ = nível moderado; +++ = nível elevado; ↓ = diminuição para níveis adultos. Células em branco correspondem a níveis indeterminados. GnRHr = receptores para GnRH; LHr = receptores para LH; FSHr = receptores para FSH em túbulos seminíferos; ARt = Receptores de andrógenos testiculares; DG = dia gestacional; DPN = dia pós-natal.

Quadro 4 – Ontogenia de hormônios reprodutivos e seus receptores no rato macho dos 35 aos 90 dias de idade.

A partir do 16.^o dia pós-natal até por volta do 55.^o, os hormônios dos eixos hipotalâmico-hipofisário-gonadal e hipotalâmico-hipofisário-tiroideano bem como seus receptores estão sendo expressos de maneira crescente e alguns já em níveis definitivos. Dessa forma, esse período pode ser utilizado para a verificação do efeito dos *disruptores* endócrinos químicos em ratos não-castrados (STOKER et al., 2000a,b).

2.3.2 Síntese testicular de esteróides

Os andrógenos são os esteróides com 19 moléculas de carbono (NORMAN; LITWACK, 1997), sendo a testosterona o andrógeno mais importante secretado pelos testículos (HALL, 1994). Outros esteróides andrógenos são produzidos pelo organismo, com diferentes graus de atividade androgênica em relação à

testosterona, como a 5 α diidrotestosterona (150-200%), testosterona (100%), androstenediol (65%), androstenediona (25%), androsterona (10%) e dehidroepiandrosterona (10%) (NORMAN; LITWACK, 1997).

A síntese dos hormônios esteróides utiliza como precursor o colesterol. Dentro da célula, o colesterol forma depósitos no citoplasma na forma de ésteres, que serão utilizados à medida que a esteroidogênese se intensifica (EPAND, 2006).

O colesterol citoplasmático é originado da alimentação ou é sintetizado pelo organismo a partir do acetato (NORMAN; LITWACK, 1997). Ele chega à célula através da corrente circulatória ligado a lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL) (HALL, 1994). Na superfície da membrana plasmática encontram-se receptores com alta afinidade pelas LDL, que serão retidas e o colesterol introduzido ao interior da célula (EPAND, 2006).

O transporte intracelular de colesterol é feito pelas proteínas de regulação rápida da esteroidogênese (proteínas StAR). As proteínas StAR apresentam vários subtipos, mas a de maior expressão nas células testiculares é a StAR D₁. O colesterol liga-se a essa proteína que o leva até a membrana mitocondrial, para o início das reações de transformação (STOCCO; CLARK, 1996; EPAND, 2006).

Problemas na expressão gênica da proteína StAR causam em humanos a doença denominada de hiperplasia adrenal congênita lipóide, situação em que há acúmulo de colesterol e ésteres de colesterol e o recém-nascido é incapaz de sintetizar níveis adequados de hormônios esteróides. Situação semelhante é observada na linhagem de camundongos *knockout* para a proteína StAR (CARON et al., 1997).

A primeira transformação bioquímica sofrida pelo colesterol é sua conversão a pregnenolona, pelas enzimas citocromo P450_{scc} (clivagem da cadeia lateral), que tornam essas substâncias mais solúveis em água em resposta à hidroxilação (HALL, 1994). Em seguida, a pregnenolona é transferida ao retículo endoplasmático para ser convertida em progesterona. Esta retorna à mitocôndria para transformação em androstenediona. Finalmente, a conversão de androstenediona em testosterona é realizada por enzimas no retículo endoplasmático. Essa reação é livremente reversível e a enzima 17 β hidroxiesteróidesdesidrogenase (17 β HSD) possui dois sítios ativos, sugerindo que a atividade enzimática é influenciada pelas concentrações disponíveis tanto de androstenediona quanto de testosterona e ainda pela taxa de remoção de produtos da reação (HALL, 1994).

As células testiculares também produzem pequenas quantidades de estrógenos. Nos humanos apenas 10% do estradiol circulante é proveniente dos testículos, sendo o tecido adiposo o principal produtor, enquanto que nos ratos a maioria do estradiol é proveniente da síntese testicular (AKINGBEMI, 2005).

Os estrógenos são produzidos a partir da conversão de androstenediona ou de testosterona, e é caracterizada pela perda de uma molécula de carbono. Esta conversão é realizada pela enzima aromatase. Os esteróides de maior ocorrência com atividade estrogênica são o estradiol, o estriol e a estrona (NORMAN; LITWACK, 1997).

A excreção dos hormônios esteróides é realizada por reações de redução que resultam em inativação. Essa redução é realizada no fígado onde há a conjugação com glucuronídeos e sulfatos e posterior excreção via renal (DEVLIN, 2000).

A atual preocupação com a exposição masculina a agentes estrogênicos ambientais tem levado a pesquisas na relação da sensibilidade a ação desses estrógenos. A secreção hormonal de gonadotrofinas (FSH e LH) é regulada no hipotálamo e hipófise pela síntese de esteróides gonadais. A localização dos receptores de FSH está restrita às células de Sertoli, enquanto os receptores de LH se expressam nas células de Leydig (AKINGBEMI, 2005).

Apesar dessa distribuição definida dos receptores gonadotróficos, a expressão de receptores de estrógenos é mais diversificada. São encontrados em núcleos hipotalâmicos e gonadotropos hipofisários, indicando que os estrógenos podem atuar diretamente sobre o eixo hipotalâmico e influenciar na liberação das gonadotrofinas. Os receptores de estrógenos também foram encontrados em células de Leydig, em células mióides peritubulares e em células germinativas (SHUGHRUE et al., 1998).

Além disso, estudos evidenciaram que o gene responsável pela síntese de LH apresenta em seu DNA o elemento responsivo ao estrógeno (ERE), indicando que o estrógeno pode atuar diretamente sobre a produção de LH (SHUPNIK et al., 1991).

A expressão da enzima aromatase foi identificada em vários tipos celulares do testículo adulto, incluindo células de Leydig, de Sertoli, espermatócitos, espermátides e espermatozóides. No testículo fetal foi encontrada somente nas células de Leydig e de Sertoli (FISHER et al., 1998; LEVALLET et al., 1998).

Estudos com animais *knockout* para os receptores de estrógenos (ERKO α) demonstraram que os níveis de LH e testosterona estavam elevados (EDDY et al.,

1996). A deleção gênica dos receptores de estrógenos ERKO β não ocasionou alterações nos níveis de LH e testosterona (OGAWA et al., 1999). A não expressão da enzima aromatase (animais ARKO) implicou em níveis elevados de FSH, LH e testosterona e ausência de 17 β estradiol (FISHER et al., 1998; ROBERTSON et al., 1999).

2.3.3 Morfologia testicular

Os testículos são compostos em seu parênquima por túbulos seminíferos, que são envoltos por uma cápsula composta por três camadas. As paredes dos túbulos seminíferos são formadas por células germinativas e de Sertoli, onde se realiza a espermatogênese. As células de Sertoli envolvem as células germinativas desde a periferia até o lúmen do túbulo, formando a barreira hemato-testicular (Il. 1) (NORMAN; LITWICK, 1997; HAFEZ; HAFEZ, 2000).

O tecido intersticial que ocupa cerca de 5% do volume testicular total contém as células de Leydig, que são responsáveis pela produção testicular de andrógenos (Desenho 1) (NORMAN; LITWICK, 1997; HAFEZ; HAFEZ, 2000).

Fonte: Norman e Litwack, 1997.

Desenho 1 – Diagrama esquemático da parede dos túbulos seminíferos e tecido intersticial adjacente. As junções *tight* entre as paredes das células de Sertoli adjacentes formam a barreira hemato-testicular que previne a passagem de grandes moléculas ao lúmen dos túbulos seminíferos.

A privação estrogênica em camundongos ARKO causou vários problemas na morfologia e arquitetura dos túbulos seminíferos. Esses animais apresentaram diminuição na espermatogênese, enquanto nenhuma alteração na secreção de gonadotrofinas ou andrógenos foi observada. Inicialmente, observaram-se problemas nos estágios iniciais de espermiogênese, pelo aumento de apoptose celular e aparecimento de células multinucleadas, e redução significativa nas espermátides alongadas. As células de Sertoli e as células germinativas primordiais não foram alteradas. Em contraste, houve hiperplasia e hipertrofia das células de Leydig, provavelmente por ocorrerem maiores níveis circulantes de LH (ROBERTSON et al., 1999).

A disrupção dos receptores de estrógenos em camundongos ERKO também causou distúrbios morfológicos nos testículos. Os animais homozigotos apresentaram quantidades muito menores de espermatozóides epididimais que os

selvagens e os heterozigotos, além de serem inférteis (apesar da aparência macroscópica normal dos órgãos reprodutivos). A observação histológica dos túbulos seminíferos revelou a presença de lúmen dilatado e epitélio seminífero desorganizado com poucas células espermatogênicas ou ausência de lúmen e presença de células de Sertoli. Os túbulos seminíferos dilatados puderam ser observados desde os 20 dias de idade (EDDY et al., 1996).

Apesar da presença de estrógeno nos testículos ser importante, vários estudos com substância de ação estrogênica também evidenciaram problemas na morfologia testicular e na espermatogênese. A exposição neonatal ao dietilestilbestrol (DES), ao octilfenol ou ao bisfenol-A causou retardo na espermatogênese puberal (18 dias idade), diminuição no peso testicular, formação de lúmen, aumento no volume nuclear do espermatócito e elevação na apoptose de células germinativas (SHARPE et al., 1998; ATANASSOVA et al., 1999; ATANASSOVA et al., 2000; GOYAL et al., 2001; GOYAL et al., 2003; ATANASSOVA et al., 2005).

Atanassova et al. (2005) também observaram que a exposição estrogênica pode diminuir o número de células de Sertoli e os níveis de inibina-B circulantes, sem alterar os níveis de FSH.

2.4 PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO DOS *DISRUPTORES* ENDÓCRINOS

O Programa de Investigação dos *Disruptores* Endócrinos (EDSP) vinculado à Agência de Proteção Ambiental americana (EPA) controla os produtos químicos com potencial ação de *disruptor* endócrino. Esse controle é muito difícil, visto que há mais de 87.000 itens catalogados capazes de causar efeitos tóxicos endócrinos, além do risco de interação entre eles (VOGEL, 2005).

Apesar da problemática, há a necessidade de se desenvolver produtos ambientalmente mais seguros e que apresentem menor toxicidade, mesmo quando em concentrações consideradas muito baixas. Para isso, as investigações toxicológicas são consideradas essenciais (VOGEL, 2005). Os estágios da investigação dos produtos químicos envolvem o estabelecimento de prioridades, investigação e testes, análise de risco e regulação (ENDOCRINE, 1998).

O estabelecimento de prioridades é feito pela classificação do produto em quatro categorias, de acordo com o seu tipo e conhecimento prévio da toxicidade. A categoria 1 é formada pelos produtos retidos; a categoria 2 é formada por produtos com dados insuficientes e têm prioridade nos testes investigativos (*Bateria 1*); a categoria 3 contempla produtos que necessitem de aprofundamento em sua investigação (*Bateria 2*); e a categoria 4 é formada pelos produtos cujas informações já estão adequadas (ENDOCRINE, 1998).

Os testes de investigação são divididos em duas baterias: a primeira é composta por ensaios rápidos que visam à detecção da interação do produto químico com o sistema endócrino (*Bateria 1*); e a segunda é composta por ensaios mais longos que estabelece interações, efeitos mais complexos e relações entre dose e efeito (*Bateria 2*) (ENDOCRINE, 1998).

Após a fase de investigação toxicológica, realiza-se a análise de risco de Saúde Pública, baseada em fatores como a probabilidade de exposição ao produto, comportamento no meio ambiente, subpopulações vulneráveis, padrões culturais, sociais, econômicos, etc. Se o produto for considerado de risco estará sujeito ao controle governamental (EPA, 1999).

Com todas essas etapas cumpridas seria de se esperar que os produtos hoje comercializados fossem seguros ao risco de problemas endócrinos. No entanto, a aplicação dessa metodologia é complicada e há divergências internas na própria Agência quanto ao estabelecimento de prioridades e execução de todas as etapas do teste (VOGEL, 2005).

De fato, testar todos os 87.000 produtos químicos e ainda as suas possíveis interações em baterias longas é praticamente impossível. A EPA considera importantes as informações fornecidas pelos estudos científicos realizados sob condições experimentais adequadas à investigação dos *disruptores* endócrinos químicos, pois esses resultados publicados nas revistas científicas auxiliam na decisão do estabelecimento de prioridades de testes (VOGEL, 2005).

O protocolo utilizado nesse experimento foi baseado no proposto por Stoker et al. (2000a), Laws et al. (2006), Parker (2006), Tyl e Marr (2006) e validado por Stoker et al. (2000b), apresentado à EDSTAC (*Endocrine-Disrupter and Testing Advisory Committee* - vinculado à EPA e ao programa EDSP) como alternativa aos testes da primeira bateria.

3 OBJETIVOS

Com base nas evidências toxicológicas apontadas na revisão de literatura e nas características do desenvolvimento reprodutivo, este trabalho possui o seguinte objetivo geral e específico:

3.1 OBJETIVO GERAL E HIPÓTESE CENTRAL

Avaliar a possível correlação entre o desenvolvimento das características de puberdade, os níveis séricos de testosterona, estradiol e corticosterona e as características histológicas dos testículos e da glândula adrenal à exposição prolongada ao herbicida glifosato-Roundup®.

Hipótese Central: A exposição prolongada ao glifosato-Roundup® causa alteração significativa no perfil hormonal dos animais em estudo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito de diferentes doses orais diárias de glifosato-Roundup® sobre:

- 1 a progressão da puberdade nos animais em estudo;
- 2 o perfil hormonal de testosterona, estradiol e corticosterona;
- 3 o desenvolvimento em peso do testículo e da glândula adrenal;
- 4 a histologia testicular e da glândula adrenal;
- 5 a função e histologia renal e hepática.

4 MATERIAL E MÉTODO

O material utilizado nesse experimento e a metodologia empregada para cada etapa estão descritos nos itens e subitens a seguir.

4.1 ANIMAIS

Diariamente, 20 fêmeas Wistar (*Ratus norvegicus*) foram observadas a partir do 17.º dia de gestação com finalidade de determinação do exato dia de nascimento. Ao quarto dia pós-natal a ninhada foi padronizada para 8 filhotes por fêmea, sendo mantida esta proporção até o desmame, realizado aos 21 dias de idade. Selecionou-se 68 ratos machos recém-desmamados que foram divididos em 4 grupos de tratamento (G1, G2, G3 e G4, sendo G1 o controle e os demais submetidos a diferentes concentrações do produto em análise). Cada grupo foi formado por 16 a 18 animais subdivididos em 2 a 3 animais por gaiola de criação em polipropileno, medindo 43 x 43 x 20 cm. O experimento foi realizado em duas repetições consecutivas de janeiro a abril de 2007.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi o de blocos completos ao acaso, sendo que o fator para a formação de blocos foi o peso corporal aos 23 dias de idade. Todos os animais foram pesados e calculou-se a média e o desvio-padrão. Os animais que apresentaram peso corporal abaixo ou acima de dois desvios-padrões em torno da média foram retirados e enviados para utilização em outros experimentos. Dividiram-se então, de forma aleatória os animais nos grupos de tratamentos. Cada animal de cada grupo recebeu identificação individual durante todo o período experimental. O gráfico 1 mostra a distribuição da frequência de observações dos pesos dos animais ao início do experimento.

Gráfico 1 – Distribuição dos pesos observados aos 23 dias de idade para os animais nos quatro grupos de tratamentos - São Paulo - 2007

4.3 MANEJO DOS ANIMAIS

Os animais foram submetidos aos tratamentos experimentais do 23.º até o 53.º dia de idade. O período de lactação estendeu-se até o 21.º dia de vida e após esse período os animais foram alimentados com ração comercial balanceada para ratos e com água mineral disponível *ad libitum*. O tratamento teve duração total e ininterrupta de 31 dias (Desenho 2). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em fotoperíodo de igual duração de noite e dia e temperatura ambiente controlada entre 23 a 25°C. O período e protocolo experimental estão em conformidade com o sugerido por Stocker et al. (2000a) à EDSTAC (Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee).

Desenho 2 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado – São Paulo - 2007

4.4 EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA GLIFOSATO

Diariamente, todos os animais foram pesados para a determinação das quantidades orais a serem fornecidas, do 23.º dia até a conclusão da fase de exposição, aos 53 dias de idade com o objetivo de administração de dose em função do peso (Fotografia 1). A balança utilizada apresentou as seguintes especificações técnicas: acurácia classe III; 3.000 g / 0,1g (BS Eletronic Celtec).

O volume oral diário de suspensão de glifosato foi de 0,25 mL para 100g de peso vivo, através de ingestão forçada (gavagem) uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, às 8 horas da manhã (Fotografia 2). A administração por gavagem teve como objetivo a confirmação da administração da dose ministrada e observação de sua total ingestão.

A gavagem foi realizada com auxílio de sonda rígida em aço inoxidável, de 1 mm de diâmetro por 5 ou 8 cm de comprimento, que foram utilizadas conforme o crescimento dos animais, acoplada a uma seringa de 1 mL de volume total, graduada a cada 0,05 mL. As doses utilizadas foram de 0 (zero) mg/Kg de peso vivo para o grupo controle (G1), 5 (cinco), 50 (cinquenta) e 250 (duzentos e cinquenta) mg/kg de peso vivo para o G2, G3 e G4 respectivamente.

O glifosato foi diluído em suspensão aquosa preparada a cada cinco dias, de modo a garantir o volume máximo permitido para ingestão e a estabilidade do produto diluído conforme orientação do fabricante, uma vez que o mesmo mantém suas propriedades por 17 dias. Na diluição, utilizaram-se pipetas e vidrarias esterilizadas, e a manipulação do produto foi realizada em capela de exaustão com a devida segurança necessária. O grupo controle (0 mg/kg) recebeu somente água deionizada esterilizada por gavagem. O produto comercial utilizado para o tratamento foi o Roundup Transorb^{®4} (Monsanto Co., St. Louis, MO) cuja nota da aquisição encontra-se no Apêndice A. Os cálculos necessários para a diluição e preparo das soluções para as respectivas doses encontram-se no Apêndice B.

O objetivo das diluições foi o de garantir a aplicação da concentração necessária, dentro do volume adequado à capacidade digestiva para cada fase do desenvolvimento dos animais.

Fotografia 1 – Pesagem diária dos animais em balança apropriada para a contenção de ratos - São Paulo - 2007

⁴ Composição: 648 g/L de sal de isopropilamina de glifosato, 480 g/L de equivalente ácido de N-fosfonometilglicina (glifosato) e 594 g/L de ingredientes inertes.

Fotografia 2 – Procedimento gavagem em animal - São Paulo - 2007

4.5 VERIFICAÇÃO DA IDADE À PUBERDADE

Para determinação da idade à puberdade, foi utilizada como método a avaliação da separação balanoprepucial, que é a separação da mucosa prepucial e exteriorização da glândula peniana.

A monitoração da separação do prepúcio e exposição da glândula do pênis foi iniciada no 33.º dia de idade para todos os animais de todos os grupos, realizada uma vez ao dia, no momento da pesagem, até a constatação da separação da pele e exposição completa da glândula (PARKER, 2006), visto que a puberdade é considerada como um fenômeno continuado que mostra como marco de referência o total descolamento balanoprepucial (Fotografia 3).

Fotografia 3 – Verificação da separação balanoprepucial - São Paulo - 2007

4.6 COLHEITA DE AMOSTRAS PARA EXAMES LABORATORIAIS

Para as posteriores análises laboratoriais colheu-se amostras de sangue, testículos, adrenais, rins e fragmentos de tecido hepático. Os procedimentos estão descritos nos subitens a seguir.

4.6.1 Sangue

A colheita de sangue para extração de soro foi realizada aos 53 dias de idade para todos os animais objetivando as dosagens hormonais e das funções hepática e renal. Os animais foram anestesiados com anestesia geral por pentobarbital sódico e a colheita realizada através de punção cardíaca (Fotografia 4). Todas as colheitas foram realizadas entre 07:30 e 08:30h da manhã. Em seguida, os animais ainda anestesiados foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico. As amostras de sangue foram colhidas e depositadas em tubos à vácuo contendo gel separador para soro, centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos. O soro foi separado, acondicionado em tubo tipo *Eppendorf* e congelado a -18.°C para posteriores análises laboratoriais de dosagens de testosterona, estradiol, cortisol e determinação da função renal e hepática dos animais.

Fotografia 4 – Colheita de sangue por punção cardíaca em animal anestesiado - São Paulo – 2007

4.6.2 Necropsias: retirada de testículos e adrenais

Após a eutanásia, todos os animais foram submetidos à necropsia para observação geral dos órgãos e análise macroscópica. Os testículos foram retirados, separado das túbicas e do epidídimo e pesados em balança de precisão (Bioprecisa Eletronic Balance, FA2104U; 100g/0,0001g). Os pesos foram transformados em proporções relativas à 100g de peso vivo para as subseqüentes análises e comparações. O testículo direito foi seccionado transversalmente em duas porções iguais e fixado em solução de formol a 10% por 24 horas. Em seguida, retirou-se o tecido deformado da borda de corte e seccionaram-se novamente cada fragmento no sentido transversal. Os quatro fragmentos foram novamente fixados em solução de formol a 10% para posterior realização de estudo histológico. A fotografia 5 mostra a localização dos testículos durante a necropsia.

Fotografia 5 - Localização para retirada dos testículos - São Paulo - 2007

As adrenais foram removidas e pesadas em balança de precisão. Os pesos foram transformados em proporções relativas à 100g de peso vivo para as subseqüentes análises e comparações. A adrenal direita foi fixada em solução de formol a 10% para posterior processamento e análise. A fotografia 6 mostra a localização da adrenal durante a necropsia.

Fotografia 6 – Localização para retirada da glândula adrenal - São Paulo - 2007

4.7 DOSAGENS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS

Os ensaios para as dosagens séricas hormonais de testosterona, estradiol e corticosterona foram realizados através de *kits* comerciais de dosagens hormonais no Laboratório de Dosagens Hormonais LDH do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os três *kits* utilizados nesse experimento são o de radioimunoensaio em fase sólida marcado com ^{125}I designado para a dosagem quantitativo da testosterona, estradiol ou corticosterona em soro sem extração. O hormônio marcado com ^{125}I compete por um período fixo de tempo com o hormônio da amostra para os sítios do anticorpo. O tubo é decantado, para separar a forma ligada da livre, e é contado em um contador gama acoplado a um microcomputador. A quantidade de hormônio presente na amostra é determinada a partir de uma curva de calibração, obtida pela dosagem dos calibradores que fazem parte do *kit*.

As amostras de soro foram armazenadas em freezer à temperatura de -18°C , transferidas para o refrigerador à temperatura de 4°C e ali mantidas até o seu completo descongelamento. Os reagentes, tubos e amostras foram mantidos em temperatura ambiente de 21°C cerca de trinta minutos antes do início do ensaio. Os tubos foram preparados e identificados, tanto os calibradores quanto os das

amostras, em duplicata para a testosterona e estradiol, e em simplicata para a corticosterona. Pipetou-se o volume da amostra na base de cada tubo, adicionou-se o hormônio marcado ^{125}I em todos os tubos e misturou-se em vórtex. Seguiu-se a incubação. Retirou-se o sobrenadante da amostra decantada, eliminando-se todas as gotas da amostra. Os tubos foram levados ao contador gama, onde o procedimento de contagem durou em média 1 minuto para cada amostra.

4.7.1 Testosterona Total

A dosagem sérica de testosterona total foi realizada através do *kit* comercial Testosterona Total Coat-A-Count[®], DPC, Los Angeles, USA. Os resultados foram expressos em ng/dL. A sensibilidade do teste foi de 92% (2,8 ng/dL). O coeficiente de variação interensaio baixo foi de 9,07% e o alto 4,69% e os coeficientes de variação intraensaio para o primeiro ensaio foram de 6,14% para o baixo e 2,55% para o alto e no segundo ensaio os coeficientes foram 11,82% para o baixo e 6,73% para o alto.

4.7.2 Estradiol

A dosagem sérica de estradiol foi realizada através do *kit* comercial Estradiol Coat-A-Count[®], DPC, Los Angeles, USA. Os resultados foram expressos em pg/mL. A sensibilidade do teste foi de 93% (1,64 pg/mL). O coeficiente de variação foi de 3,93%.

4.7.3 Corticosterona

A dosagem sérica de corticosterona foi realizada através do *kit* comercial Coat-A-Count® Corticosterona em ratos, DPC, Los Angeles, USA. Os resultados foram expressos em ng/mL. A sensibilidade do teste foi de 92% (4,61 ng/mL). O coeficiente de variação intra-ensaio foi 5,22% para o baixo e 0,33% para o alto.

4.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS

Após a fixação em formaldeído a 10%, as amostras de tecidos foram tratadas com álcool e incluídas em parafina por processo automatizado em equipamento Leica. Os blocos de tecidos incluídos em parafina foram cortados no micrótomo e colocados sobre uma lâmina e corada por hematoxilina e eosina. Procederam-se às análises histopatológicas dos tecidos e morfometria dos túbulos seminíferos.

A morfometria linear dos túbulos seminíferos foi realizada pela mensuração do diâmetro tubular (medida considerada da lâmina basal até a outra lâmina basal no sentido oposto), espessura epitelial (da lâmina basal até o final da cabeça das espermátides alongadas) e diâmetro luminal. Selecionaram-se os campos com cortes histológicos no sentido transversal dos túbulos, desconsiderando-se aqueles em sentido longitudinal.

Selecionou-se aleatoriamente 10 campos por lâmina com cortes transversais, onde se marcou aproximadamente 800 pontos de medidas, sendo esses classificados como diâmetro tubular, espessura epitelial ou diâmetro luminal, tabulados em μm . Para cada túbulo calculou-se as médias para as referidas medidas e, então, a média de cada campo. A medida para cada animal foi obtida pela média de todos os campos analisados. Essas medições foram realizadas com auxílio do software tpsDig2 (ROHLF, 2006). O procedimento para essas medições foram previamente descritos por Robertson et al. (1999) e Goyal et al. (2001).

4.9 ANÁLISE DA FUNÇÃO RENAL

A função renal foi avaliada através das dosagens das concentrações séricas de uréia e creatinina, que são substâncias eliminadas durante a filtração do sangue nos rins, com o uso de *kits* comerciais.

4.9.1 Uréia

A dosagem sérica de uréia foi realizada através do kit Uréia Color BioTécnica (BioTécnica Ltda, Brasil). O princípio desse teste baseia-se na decomposição química da uréia presente na amostra em amônia, pela ação da urease, e em seguida em indofenol, pela ação do nitroprussiato. Esse indofenol colorido será medido pelo espectrofotômetro.

As amostras e reagentes foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos. Pipetou-se 1 mL de reagente à base de urease no tubo branco, 10µL do padrão de uréia e 1 mL do reagente à base de urease no tubo padrão, e 1 mL do reagente à base de urease e 10µL de cada amostra nos tubos dos testes. Agitou-se e incubou-se a 37°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL do segundo reagente em todos os tubos, agitou-se e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos. Procedeu-se, então, a leitura da absorbância no espectrofotômetro.

O cálculo foi realizado dividindo-se a absorbância do teste pela equação 1. Determina-se o fator de calibração (Equação 2). E a concentração de uréia é obtida multiplicando-se o resultado das equações 1 e 2, conforme a equação 3. Os resultados estão expressos em mg/dL de uréia.

$$\text{Equação 1: } \Delta A_{\text{teste}} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{padrão}}} \times \text{padrão}$$

$$\text{Equação 2: Fator de calibração} = \text{padrão} \div (A_2 - A_1)_{\text{padrão}}$$

$$\text{Equação 3: Uréia } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \Delta A_{\text{teste}} \times \text{Fator}$$

4.9.2 Creatinina

A dosagem sérica de creatinina foi realizada através do *kit* Creatinina Labtest (Labtest Diagnóstica AS, Brasil). Esse teste baseia-se no princípio de que a creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que será medido fotometricamente. Em seguida, a adição de um acidificante reduz o pH a 5,0, o que separa o complexo formado entre o picrato e a creatinina, permanecendo inalterada a coloração dos cromogênios. Promove-se novamente a leitura através do espectrofotômetro, e o valor da creatinina verdadeira será a diferença entre a primeira e a segunda medição.

Os reagentes e amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos. Pipetou-se 2 mL de solução tampão, 0,25 mL de água destilada e 0,5 mL de ácido pícrico no tubo branco, 2 mL de solução tampão, 0,25 mL de solução padrão e 0,5 mL de ácido pícrico no tubo padrão e 2 mL de solução tampão, 0,25 mL de cada amostra e 0,5 mL de ácido pícrico nos tubos dos testes. Misturou-se e incubou-se em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Determinou-se a absorbância dos testes e padrão em 510nm (ou filtro verde), utilizando-se o tubo branco como zero. Essa absorbância foi considerada para os cálculos posteriores como A_1 . Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de acidificante nos tubos de testes e no branco, misturou-se e deixou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Determinou-se a absorbância A_2 dos tubos, da mesma forma que na medição anterior.

O cálculo da creatinina sérica foi obtido pela subtração das absorbâncias 1 e 2, dividindo-se esse resultado pela absorbância do padrão e multiplicando-se o resultado final por 4, como na equação 4. Os valores foram expressos em mg/dL.

$$\text{Equação 4: Creatinina } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{A_1 - A_2}{A_{\text{padrão}}} \times 4$$

4.10 ANÁLISE DA FUNÇÃO HEPÁTICA

A dosagem sérica de AST foi realizada através do *kit* Transaminase Oxaloacética e a dosagem de ALT pelo *kit* Transaminase Pirúvica (Labtest Diagnóstica SA, Brasil). O princípio dos dois métodos é baseado na ação dessas enzimas sobre o L-aspartato e α -cetoglutarato numa reação de transformação. A AST transforma esses dois substratos em glutamato e oxaloacetato, enquanto a ALT os transforma em glutamato e piruvato. O oxaloacetato e o piruvato são medidos através da formação de hidrazona, a qual apresenta intensa cor em meio alcalino.

As amostras e reagentes foram mantidos à temperatura ambiente por 10 minutos. Pipetou-se 0,25 mL de substrato de ALT ou AST no tubo de ensaio e incubou-se por 2 minutos. Adicionou-se 0,05 mL da amostra e incubou-se exatamente por 60 minutos. Retirou-se do banho-maria e pipetou-se 0,25 mL do reagente de cor e manteve-se à temperatura ambiente por 20 minutos. Adicionou-se 2,5 mL de solução de NaOH e esperou-se 5 minutos para o início da leitura. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro de filtro verde (490 a 540 nm). A curva de calibração do teste foi realizada seguindo-se todos os passos descritos acima, sendo que a amostra foi substituída por cinco concentrações conhecidas das enzimas. O cálculo das concentrações das amostras foi realizado a partir da equação de regressão da curva de calibração. Os valores foram expressos em unidades/mL (U/mL).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As variáveis estudadas foram primeiramente submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Quando alguma premissa do teste paramétrico não foi atingida, optou-se por utilizar testes não-paramétricos para as médias e testes posteriores. Considerou-se diferença estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05. Os valores estão expressos em média ($\bar{x}$) e erro-padrão da média ($\pm$ E.P.M.). Todas as análises foram efetuadas com a utilização do software Statistica 6.0, StatSoft Inc.

A análise dos dados relativos às pesagens diárias foi realizada pela análise de variâncias de duas vias para medidas repetidas (MANOVA), através do modelo linear generalizado (GLM). O peso foi comparado entre os diferentes grupos e entre diferentes idades, considerando-se a evolução esperada pelo crescimento corporal.

O dia e o peso da completa separação balanoprepucial foi comparado entre os grupos utilizando-se análise não-paramétrica pelo método de Kruskal-Wallis. O pós-teste realizado foi o de Dunn.

O peso dos testículos e adrenais foi transformado em proporção para cada 100g de peso vivo. A seguir submeteu-se a análise de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, ou a análise de variâncias (ANOVA) e ao pós-teste de Tukey-Kramer.

As medidas testiculares de diâmetro tubular, espessura epitelial e diâmetro luminal foram analisados pela ANOVA e pelo pós-teste de Fisher.

As concentrações séricas de uréia, creatinina, ALT, AST, testosterona, corticosterona e estradiol também foram analisadas pela ANOVA e pelo pós-teste de Fisher.

4.12 CUIDADOS COM O MANUSEIO, CONSERVAÇÃO E RESÍDUOS DE GLIFOSATO

O herbicida foi manipulado conforme as recomendações do fabricante, aprovadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), com a utilização de luvas, máscara e óculos de proteção em ambiente ventilado (Capela de exaustão). O produto foi conservado fora do alcance de outras pessoas e do contato com outros animais e ao abrigo da luz. As sobras do produto diluído após cada diluição foram armazenadas em recipiente plástico e encaminhadas para reutilização agrícola. As lavagens dos recipientes seguiram determinação da ANVISA e os resíduos desprezados em local apropriado.

5 RESULTADOS

As possíveis alterações causadas pela administração diária do herbicida glifosato foram avaliadas pelo ganho de peso corporal, idade e peso à puberdade e pelas características morfológicas e funcionais dos testículos, adrenais, fígado e rins. Os subitens a seguir apresentam esses resultados analisados separadamente.

5.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

A avaliação de peso diário desde o desmame até a puberdade foi realizada com o objetivo de verificar possíveis comprometimentos no desenvolvimento causados pelo herbicida. Constatou-se que não existiu diferença significativa no peso dos animais entre os grupos estudados, com os diferentes tratamentos de Roundup® Transorb.

Somente a variação esperada relativa à idade foi observada, demonstrando que a evolução corporal não foi afetada pelas concentrações utilizadas e, desta forma, não comprometendo seu desenvolvimento. Além disso, existiu grande homogeneidade no desenvolvimento entre os grupos, com baixa variabilidade das médias.

O valor de $F(3,65) = 0,4$; $p > 0,05$ para o peso entre os grupos e $F(90,1950) = 1,8$ $p < 0,001$ para o peso entre os grupos e idades demonstram a evolução e desenvolvimento normal dos animais. Essa evolução do peso dos animais nos respectivos grupos pode ser observada no gráfico 2 e o peso conjunto dos animais em todos os grupos no gráfico 3.

Gráfico 2 – Evolução dos pesos médios dos animais nos grupos de tratamentos de 0, 5, 50 e 250 mg/kg dos 23 aos 53 dias de idade - São Paulo – 2007

Gráfico 3 - Evolução dos pesos médios ($\pm$ E.P.M.) de todos os animais nos grupos de tratamentos dos 23 aos 53 dias de idade - São Paulo - 2007

5.2 IDADE E PESO À SEPARAÇÃO BALANOPREPUCIAL

Um dos parâmetros utilizados, embora subjetivo, para determinação da progressão da puberdade em ratos machos é a separação da mucosa prepucial e exposição da glândula peniana, que diariamente foi analisada em cada indivíduo. Notou-se que a exposição diária ao herbicida glifosato-Roundup®Transorb causou

atraso significativo no início da puberdade. O resultado do teste de Kruskal-Wallis foi KW (3,69) = 35,5 (corrigido para empates); com valor de $p < 0,001$.

O pós-teste de Dunn mostrou que houve diferença significativa entre os grupos de 0 mg/kg e 50 mg/kg ($p < 0,01$), entre 0 mg/kg e 250mg/kg ($p < 0,001$) e entre 5 mg/kg e 250 mg/kg ($p < 0,001$). O grupo de 5 mg/kg posicionou-se de forma intermediária entre o de 0 e o de 50 mg/kg, não diferindo significativamente desses grupos.

Já o peso dos animais não foi significativamente diferente [KW(3,69) = 2,1, $p > 0,05$] entre os grupos controle e tratados. Como as idades em que a separação foi observada foram bastante próximas, o peso entre os grupos nesses períodos não diferiu. O valor das médias $\pm$ E.P.M. para as idades e pesos pode ser observado na tabela 1 e nos gráficos 4 e 5.

Tabela 1 – Idade (dias, $x \pm$ E.P.M.) e peso (g, $x \pm$ E.P.M.) à separação balanoprepucial para os grupos de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo - 2007

Grupos (mg/kg)	Idade (dias)	Peso (g)
0	$37 \pm 0,2^{a,c}$	$146,0 \pm 4,5$
5	$37,4 \pm 0,2^c$	$144,4 \pm 4,9$
50	$38,1 \pm 0,4^b$	$152,2 \pm 5,5$
250	$38,5 \pm 0,4^d$	$153,0 \pm 4,1$
a e b diferem entre si ($p < 0,01$) c e d diferem entre si ($p < 0,001$)

Gráfico 4 - Idade média, erro-padrão da média (E.P.M.) e desvio-padrão (D.P.) observados para os animais à separação balanoprepucial nos grupos de tratamentos (1) 0, (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/kg (**p<0,01, ***p<0,001) - São Paulo - 2007

Gráfico 5 - Peso médio, Erro-Padrão da Média (E.P.M.), desvio-padrão (D.P.) observados para os animais à separação balanoprepucial nos grupos de tratamentos (1) 0, (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/Kg - São Paulo - 2007

5.3 TESTÍCULOS

A análise morfológica dos testículos foi realizada pelas pesagens logo após a necropsia e pelo estudo microscópico, sendo realizada a histopatologia e a morfometria dos túbulos seminíferos. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.3.1 Peso relativo

Após a eutanásia, os testículos removidos foram pesados para constatação de efeito do herbicida Roundup Transorb® sobre seu desenvolvimento. Constatou-se pelo pós-teste de Dunn que existiram diferenças significativas para o peso testicular relativo analisado entre os grupos de 0mg/kg e 250 mg/kg ($p < 0,05$), tanto unilateral esquerda e direita, quanto para a média em peso de ambos os testículos. O valor do teste de médias para o testículo direito foi KW (3,69) = 9,6; $p < 0,05$; para o esquerdo KW (3,69) = 9,4; $p < 0,05$; e para a média KW (3,69) = 9,2; $p < 0,05$. Os pesos relativos dos testículos podem ser observados na tabela 2 e no gráfico 6.

Tabela 2 – Peso relativo (mg/100g PV, $\bar{x} \pm \text{EPM}$) dos testículos direito, esquerdo e média nos quatro grupos de tratamentos - São Paulo - 2007

Grupos (mg/kg)	Testículo direito (mg/100g PV)	Testículo esquerdo (mg/100g PV)	Peso médio (mg/100g PV)
0	528,6 $\pm$ 12,4 ^a	534,3 $\pm$ 13,5 ^a	531,4 $\pm$ 12,8 ^a
5	534,6 $\pm$ 12,8	542,4 $\pm$ 13,9	538,5 $\pm$ 13,2
50	548,6 $\pm$ 12,4	556,5 $\pm$ 13,5	552,6 $\pm$ 12,8
250	578,4 $\pm$ 13,1 ^b	582,2 $\pm$ 14,3 ^b	580,3 $\pm$ 13,6 ^b

a e b diferem entre si ($p < 0,05$)

Gráfico 6 – Peso médio relativo (mg/100g PV), desvio-padrão (D.P.) e erro-padrão da média (E.P.M.) para o peso testicular da média de ambos testículos nos animais dos grupos controle (1) 0 mg/kg e tratados: (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/Kg (*p<0,05) - São Paulo - 2007

5.3.2 Histopatologia

As lâminas observadas não apresentaram alterações patológicas como degenerações, fibrose ou acúmulo de substâncias estranhas ao tecido testicular ou ainda figuras celulares patológicas pela metodologia de processamento histológico utilizada.

5.3.3 Morfometria dos túbulos seminíferos

O estudo das fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos testiculares dos grupos controle e tratados demonstram que ocorreram variações

entre eles. A análise estatística do epitélio tubular demonstrou diferenças significativas entre os três grupos tratados e o grupo controle, com valor de $F(3, 63) = 8,5$ e $p < 0,001$, sendo que a espessura do epitélio (μm) foi maior no grupo controle e reduzidas nos grupos de 5mg/Kg, 50mg/Kg e 250mg/Kg em 16%, 20% e 24%, respectivamente, denotando uma redução na quantidade de células germinativas nestes animais tratados. O pós-teste de Fisher indicou que essas diferenças ocorreram entre os grupos de 5, 50 e 250 mg/kg em relação ao grupo de 0 mg/kg ($p < 0,001$), mas dentro dos grupos tratados com diferentes concentrações de Roundup Transorb® não houveram diferenças ($p > 0,05$), indicando que o efeito máximo para essa variável (espessura do epitélio germinativo) já pode ser notada desde a dose mais baixa de 5 mg/Kg.

O diâmetro da luz tubular também variou, sendo menor no grupo controle e maior entre os grupos tratados, com valor de $F(3, 63) = 8,3$ e $p < 0,001$. A luz foi maior em 24%, 22% e 32% para as doses de 5mg/Kg, 50mg/Kg e 250mg/Kg respectivamente em relação ao controle 0mg/Kg ($p < 0,001$). Entre os grupos de 50 e 250 mg/kg ($p < 0,05$) e entre os grupo 5 e 250 mg/kg o valor de $p = 0,07$, indicou tendência a diferença estatística.

Apesar das variações na espessura do epitélio e na luz tubular, o diâmetro tubular total permaneceu inalterado entre os grupos, sendo a análise estatística com valor de $F(3, 63) = 0,9$ e $p = 0,4$, indicando que as alterações ocorreram somente com redução do epitélio germinativo, mas o diâmetro total manteve-se inalterado.

A tabela 3 mostra os valores do epitélio, luz e diâmetro tubular, o gráfico 7 apresenta estes valores comparativamente e a lâmina 1 são as fotomicrografias dos cortes histológicos dos testículos submetidos às medições.

Tabela 3 – Epitélio tubular, luz tubular e diâmetro tubular (μm ; $\bar{x} \pm \text{E.P.M.}$) para os animais nos grupos de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo - 2007

Grupos (mg/kg)	Epitélio tubular (μm)	Luz tubular (μm)	Diâmetro tubular (μm)
0	$85,8 \pm 2,8^a$	$94,0 \pm 5,7^a$	$265,7 \pm 4,8$
5	$71,9 \pm 5,3^b$	$116,6 \pm 6,6^b$	$260,5 \pm 7,8$
50	$69,1 \pm 1,7^b$	$114,3 \pm 3,1^{b,c}$	$252,6 \pm 5,4$
250	$65,2 \pm 1,3^b$	$130,3 \pm 4,8^{b,d}$	$260,7 \pm 4,9$

a,b diferem entre si na coluna ($p < 0,001$)
c,d diferem entre si na coluna ($p < 0,05$)

RU = Roundup; *** $p < 0,001$

Gráfico 7 - Epitélio tubular, luz tubular e diâmetro tubular (μm ; $\bar{x} \pm \text{E. P. M.}$) para os animais nos grupos de 0 (controle), 5, 50 e 250 mg/kg (** $p < 0,001$) - São Paulo - 2007

Lâmina 1 – Fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos de animais experimentais. Nota-se o diâmetro do lúmen tubular, a espessura do epitélio germinativo e o diâmetro total dos túbulos. Em **A** observa-se a fotomicrografia dos túbulos do grupo controle e em **B**, **C** e **D** dos grupos de 5mg/Kg, 50mg/Kg e 250mg/Kg. Ocorreu um aumento no diâmetro da luz e diminuição na espessura do epitélio germinativo ao longo das dosagens crescentes. (Aumento de 100X. Barra de escala 100 μ m) - São Paulo - 2007

5.4 ADRENAL

O estudo da glândula adrenal foi realizado através da pesagem logo após a necropsia e pela histopatologia do órgão. Os resultados dessas análises estão descritos a seguir.

5.4.1 Peso relativo

A análise dos pesos médios das adrenais realizada pelos testes de Kruskal-Wallis e de ANOVA mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$), nas análises unilaterais e na média. O resultado de KW (3,69) = 9,2 ($p < 0,05$) para a adrenal direita, F (3,69) = 4,6; $p < 0,01$ para a adrenal esquerda e KW (3,69) = 11,3; $p < 0,05$ para a média de ambas, demonstram que houveram diferenças entre as glândulas nos respectivos tratamentos. O pós-teste realizado de Dunn evidenciou diferenças entre os grupos 50 e 250 mg/kg para a adrenal direita ($p < 0,05$) e entre os grupos de 0 e 250 mg/kg para a média das adrenais ($p < 0,01$). O pós-teste de Tukey-Kramer evidenciou diferenças entre os grupos de 0 e 250 mg/kg para a adrenal esquerda ($p < 0,01$). Esses resultados podem ser observados na tabela 4 e no gráfico 8.

Tabela 4 – Peso (mg/100g PV, $\bar{x} \pm \text{EPM}$) das adrenais direita, esquerda e média nos quatro grupos de tratamentos - São Paulo - 2007

Grupos (mg/kg)	Adrenal direita (mg/100g PV)	Adrenal esquerda (mg/100g PV)	Peso médio (mg/100g PV)
0	11,4 $\pm$ 0,6	11,1 $\pm$ 0,5 ^c	11,3 $\pm$ 0,5 ^c
5	12,9 $\pm$ 0,4	12,8 $\pm$ 0,6	12,8 $\pm$ 0,4
50	11,5 $\pm$ 0,4 ^a	13,0 $\pm$ 0,5	12,3 $\pm$ 0,3
250	15,2 $\pm$ 1,1 ^b	14,0 $\pm$ 0,6 ^d	14,6 $\pm$ 0,8 ^d

a e b diferem entre si na coluna ($p < 0,05$)

c e d diferem entre si na coluna ($p < 0,01$)

Gráfico 8 – Peso médio (mg/100g PV), desvio-padrão (D.P.) e Erro-Padrão da Média (E.P.M.) para a média das adrenais os animais nos grupos de tratamento (1) 0, (2) 5, (3) 50 e (4) 250 mg/Kg (**p<0,01) - São Paulo - 2007

5.4.2 Histopatologia

O estudo histopatológico da glândula adrenal não evidenciou alterações patológicas pela metodologia de processamento histológico utilizada, apesar das alterações macroscópicas observadas. A hipótese do acúmulo de gordura na região cortical externa pela deficiência na ação da proteína StAR não pode ser confirmada pois há o acúmulo de gordura durante o funcionamento normal glandular e, se houve alterações, estas foram discretas o suficiente para não serem identificadas pela técnica utilizada.

5.5 RINS

A influência do tratamento sobre os rins foi verificada pelas alterações morfológicas, evidenciadas pela histopatologia, e por alterações funcionais, através das dosagens das concentrações séricas de uréia e creatinina. Esses resultados estão apresentados a seguir.

5.5.1 Função renal (uréia e creatinina)

As dosagens séricas de uréia não demonstraram diferenças significativas entre os grupos tratados, não servindo como um parâmetro seguro para constatação do efeito do herbicida sobre os rins. O valor de $F(3,23) = 1,15$ e $p > 0,05$. No entanto, as dosagens séricas de creatinina, um indicador mais sensível para determinação da função renal, demonstraram diferenças entre os grupos tratados com valores de $F(3,23) = 5,83$ e $p < 0,01$. No pós-teste de Fisher identificou-se que os grupos de 50 e 250 mg/kg foram diferentes dos grupos de 0 e 5 mg/kg, apresentando concentrações séricas de creatinina superiores ($p < 0,05$), confirmando a suspeita de que o herbicida Roundup® Transorb além das alterações testiculares causou lesões renais detectáveis por este método indicativo. Esses resultados estão representados na tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações séricas de uréia e creatinina (mg/dL, $\bar{x} \pm E. P. M.$) - São Paulo - 2007

Grupos (mg/kg)	Uréia	Creatinina
0	78,0 $\pm$ 2,7	0,64 $\pm$ 0,06 ^a
5	82,7 $\pm$ 2,7	0,65 $\pm$ 0,08 ^a
50	80,4 $\pm$ 2,3	0,85 $\pm$ 0,06 ^b
250	82,5 $\pm$ 2,7	0,89 $\pm$ 0,07 ^b

a,b diferem entre si na coluna ($p < 0,05$)

5.5.2 Histopatologia

Observou-se leve congestão na região glomerular do grupo de 5 mg/kg, que se intensificou progressivamente nos outros grupos (50 e 250 mg/kg). Nesses dois últimos grupos observou-se também congestão na região tubular. Essa região mostrou sinais de degeneração leve no grupo de 5 mg/kg, que também se intensificou progressivamente nos dois outros grupos subsequentes. No grupo de 250 mg/kg também foi possível observar a deposição de tecido hialino no interior tubular, provavelmente por deposição de cálcio. Os três grupos tratados apresentaram grânulos intracelulares na região tubular característicos da deposição de metais. Não é possível a determinação exata do tipo de metal, mas é um indício de que o produto utilizado tenha algum tipo de resíduo em sua composição. Essas alterações são mostradas nas lâminas de 2 a 5.

Lâmina 2 – Leve congestão glomerular, degeneração de túbulos contornados com deposição de proteína e reepitelização observadas em animal do grupo de 5 mg/kg (Aumento de 10X; Barra de escala: 100µm) - São Paulo - 2007

Lâmina 3 – Congestão mais acentuada observada nas regiões glomerular e tubular, degeneração epitelial tubular mais acentuada e presença de pigmento de deposição de metal no citoplasma das células do epitélio tubular observados no grupo de 50 mg/kg (Aumento de 10X; Barra de escala: 100μm) - São Paulo - 2007

Lâmina 4 – Congestão glomerular e tubular mais intensa, degeneração glomerular e degeneração tubular com deposição de proteína. Maior número de túbulos degenerados que na dose anterior. Presença de pigmento de deposição de metal no citoplasma das células do epitélio tubular observados no grupo de 250 mg/kg (Aumento de 10X; Barra de escala: 100μm) - São Paulo - 2007

Lâmina 5 – Observação em maior aumento dos túbulos renais degenerados e presença de massa hialina no interior do túbulo, provavelmente por deposição de cálcio nesse local e presença de pigmento de deposição de metal no citoplasma das células do epitélio tubular no grupo de 250 mg/kg (Aumento de 20X; Barra de escala: 75μm) - São Paulo - 2007

5.6 FÍGADO

As possíveis alterações hepáticas foram avaliadas pelas dosagens das concentrações séricas das enzimas hepáticas aspartato-amino-transferase (AST) e alanina-amino-transferase (ALT) e, ainda pelas alterações morfológicas, através do estudo histopatológico. Esses resultados estão apresentados nos subitens a seguir.

5.6.1 Função hepática (AST e ALT)

As dosagens séricas de AST e ALT não evidenciaram alterações entre os grupos tratados. O valor de $F(3,23) = 0,78$ e $p > 0,05$ para a AST e $F(3,23) = 1,5$ e $p > 0,05$. Os valores médios das concentrações séricas dessas enzimas podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 – Concentrações séricas de ALT E AST (U/mL, $\bar{x} \pm E. P. M.$) - São Paulo – 2007

Grupos (mg/kg)	ALT (U/mL)	AST (U/mL)
0	45,6 $\pm$ 2,0	77,4 $\pm$ 6,2
5	44,4 $\pm$ 4,7	82,7 $\pm$ 6,1
50	36,7 $\pm$ 2,1	72,2 $\pm$ 3,3
250	44,5 $\pm$ 4,0	73,3 $\pm$ 1,4

5.6.2 Histopatologia

Pode-se notar leve congestão hepática que não se repetiu em todos os grupos tratados (Lâmina 6). Outras alterações patológicas não foram observadas no tecido hepático pela metodologia de processamento histológico utilizada.

Lâmina 6 – Leve congestão hepática observada em animal do grupo de 50 mg/kg (Aumento de 10X; Barra de escala: 100 μ m) - São Paulo - 2007

5.7 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS

O efeito da exposição diária ao herbicida sobre a endocrinologia do animal foi avaliada através das dosagens das concentrações séricas de testosterona, estradiol e corticosterona. A análise desses resultados está descrita a seguir.

5.7.1 Testosterona

A concentração sérica de testosterona foi significativamente diferente entre os grupos controle e tratados, sendo o valor de $F(3,52) = 6,4$ e $p < 0,001$. O pós-teste de Fisher indicou concentração reduzida em 30%, 45% e 50% nos grupos de 5, 50 e 250 mg/kg, respectivamente, em comparação ao grupo controle de 0 mg/kg (Tabela 7 e Gráfico 9) demonstrando que além da redução nas células germinativas e aumento da luz tubular, houve redução na função das células intersticiais em relação a conversão ou síntese da testosterona, o que, por sua vez, também pode ter influenciado na espermatogênese e quantidade de células germinativas. Os resultados indicam que as observações morfológicas microscópicas dos túbulos seminíferos foram seguidas por redução na esteroidogênese, provavelmente por mudanças também nas células intersticiais.

Tabela 7 – Concentração sérica de testosterona (ng/dL; $\bar{x} \pm E.P.M$) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo - 2007

Grupos (mg/kg)	Testosterona (ng/dL)
0	154,5 $\pm$ 12,9 ^{a,c}
5	108,6 $\pm$ 19,6 ^b
50	84,5 $\pm$ 12,2 ^d
250	76,9 $\pm$ 14,2 ^d

a,b diferem entre si na coluna ($p < 0,05$)

c,d diferem entre si na coluna ($p < 0,001$)

Gráfico 9 - Concentração sérica de testosterona (ng/dL; $\bar{x} \pm \text{E.P.M}$) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0 (controle), 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo - 2007

5.7.2 Estradiol

A dosagem de estradiol sérico não demonstrou diferenças significativas entre os grupos estudados, sendo o valor de $F(3,31) = 1,6$ e $p > 0,05$. Os valores médios ($\pm \text{E.P.M.}$) de corticosterona sérica estão expressos na tabela 8 e no gráfico 10.

Tabela 8 – Concentração sérica de estradiol ($\bar{x} \pm \text{E.P.M}$) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo - 2007

Grupos (mg/kg)	Estradiol ()
0	31,5 $\pm$ 1,2
5	37,3 $\pm$ 2,9
50	36,0 $\pm$ 1,8
250	37,6 $\pm$ 2,8

Gráfico 10 - Concentração sérica de estradiol ($x \pm \text{E.P.M.}$) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0, 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo - 2007.

5.7.3 Corticosterona

A análise relativa à corticosterona não demonstrou diferenças significativas entre os grupos controle e tratados, sendo o valor de $F(3, 62) = 1,8$ e $p > 0,05$, indicando que não houve alteração na função da glândula na produção deste hormônio, embora a morfologia macroscópica tenha apresentado alteração nos pesos glandulares. Os valores médios ($\pm \text{E.P.M.}$) de corticosterona sérica estão expressos na tabela 9 e no gráfico 11.

Tabela 9 – Corticosterona sérica (ng/mL, $x \pm \text{E.P.M.}$) dos animais nos grupos de tratamento - São Paulo - 2007

Grupo (mg/kg)	Corticosterona sérica (ng/mL)
0	103,4 $\pm$ 22,8
5	177,2 $\pm$ 39,8
50	104,5 $\pm$ 24,1
250	104,5 $\pm$ 14,8

RU = Roundup; $p > 0,05$

Gráfico 11 - Concentração sérica de corticosterona (ng/mL; $\bar{x} \pm \text{E.P.M}$) para as amostras dos animais nos grupos de tratamento de 0 (controle), 5, 50 e 250 mg/kg - São Paulo - 2007

6 DISCUSSÃO

A correlação dos resultados obtidos com a literatura apresentada está descrita a seguir, dividida em subitens para facilitar a leitura e entendimento das informações.

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados mostrados nesse estudo são sugestivos que o glifosato-Roundup Transorb possui toxicidade elevada no sistema endócrino reprodutivo dos animais, apesar de ser classificado como Classe III, ou produto medianamente tóxico segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2002). Seu amplo uso em lavouras e jardinagem (HAYES; LAWS, 1991; INOUE et al., 2003; CERDEIRA et al., 2007) foi condicionado à sua segurança pela baixa toxicidade aguda e pouca correlação com o surgimento de neoplasias. A especificidade de ação do sal de glifosato sobre a enzima EPSPS (WILLIAMS et al., 2000) é um avanço tecnológico na produção de praguicidas seguros ao ser humano, no entanto, a toxicidade dos ingredientes inertes altera de forma significativa a toxicidade da formulação final (WALSH et al., 2000; MARC et al., 2002; HOWE et al., 2004; PEIXOTO, 2005; SURGAN, 2005; COX; SURGAN, 2006; BENACHOUR et al., 2007; BRAUSCH; SMITH, 2007).

Atualmente, sua importância como herbicida está em destaque pelo desenvolvimento e permissão de plantio de variedades agrícolas resistentes ao seu princípio ativo (CASTLE et al., 2004; CERDEIRA; DUKE, 2006; CERDEIRA et al., 2007; YASOUR; RIOV; RUBIN, 2007) e espera-se que esse produto seja utilizado de maneira mais freqüente nas culturas transgênicas de soja, milho, algodão ou qualquer outra nova variedade advinda da manipulação gênica.

Mas a segurança desse processo ao meio ambiente, com a conseqüente contaminação das águas superficiais e subterrâneas (SILVA; PERALBA; MATOS, 2003), impacto direto e indireto sobre a biodiversidade (SANCHES et al., 2003; TSUI; CHU, 2003, 2004; BRAUNSCH; SMITH, 2007), às pessoas que manipulam o produto com freqüência (CURWIN et al., 2005; RICHARD et al., 2005; CURWIN et

al., 2006) e a possibilidade de resíduos químicos nos alimentos (COX; SURGAN, 2006) não contempla a toxicidade ao sistema endócrino.

Isso demonstra que os parâmetros hoje em vigor pela legislação específica necessitam ser revisados e atualizados com base em novos efeitos tóxicos, não menos importantes que os já implantados para o registro e comercialização desses produtos. Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental tem regulamentação específica para o controle da liberação de produtos *disruptores* endócrinos (FEDERAL REGISTER, 1998; STOCKER et al., 2000b; EPA, 2006; LAWS et al., 2006; PARKER, 2006; TYL; MARR, 2006). No entanto, a aplicação dessa legislação é de difícil implantação e a abrangência dos testes ainda depende de evidências toxicológicas apontadas pela literatura científica (VOGEL, 2005).

O período experimental de 30 dias utilizado nessa pesquisa poderia ser considerado para efeitos de contaminação ambiental, já que a degradação do princípio ativo pelos microorganismos presentes no solo (GOLDSBOROUGH; BROWN, 1993; HANEY, SANSEMAN; HONS, 2002) ocorre entre 30 e 90 dias (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998). Período em que não é influenciado por fatores ambientais externos, como pH do solo e luz solar (ABREU-JR; MURAOKA; LAVORANTE, 2003; GETENGA; KENGARA, 2004; TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). Durante todo esse período, os organismos presentes nesse ecossistema estão em contato com o produto e sujeitos aos efeitos tóxicos. A persistência real do Roundup® na cadeia alimentar ainda não é conhecida.

O efeito da *disrupção* endócrina dos praguicidas agrícolas considera produtos principalmente com atividade estrogênica (COLBORN; DUMANOSKI; MEYERS, 1996; SOLOMON; SCHETLER, 2000; SCOTT, 2005). Mas outros efeitos, como o anti-androgênico observado neste estudo também são importantes, embora menos freqüentes na literatura científica (GRAY et al., 1999). O conhecimento do efeito estrogênico teve como uma de suas principais publicações o trabalho realizado por Crain et al. (1997) em crocodilos no rio Mississippi. Desde então, a comunidade científica passou a considerar com maior importância a toxicidade ao sistema endócrino (COLBORN; FOURNIER, 1996; LEBLANC; BAIN; WILSON, 1997; CRISP et al., 1998; PORTER; JAEGER; CARLSON, 1999; BARNETT; KRIMSKI, 2000; AKINGBEMI, 2004). No entanto, decorreram-se dez anos e o problema ainda não alcançou a discussão e a tomada de decisões suficientes, pois todos os produtos citados nessa dissertação (alquilfenóis, 2,4-D, metolacoloro, acetocoloro, alacoloro,

metoxicloro, piretróides, atrazina) ainda são normalmente comercializados, com exceção ao DDT que foi banido por outros motivos e ao clorpirifós que está suspenso até a conclusão de novos estudos toxicológicos (não endócrinos).

6.2 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

A evolução e o desenvolvimento dos animais durante o período experimental foi normal, não existindo efeito do manuseio diário ou do produto ingerido no metabolismo geral dos animais, permitindo um desenvolvimento ponderal adequado até a puberdade. Esse comportamento torna mais fácil a interpretação das variáveis estudadas na seqüência, pois restringe as causas sobre os problemas de desenvolvimento reprodutivo observados. Embora não controlável, é desejado que isso ocorra conforme Goldman et al. (2000).

Alterações no crescimento são observadas em doses maiores que as utilizadas neste trabalho em exposição ao sal de glifosato (PESTICIDES, 2004) e os resultados sugerem que os ingredientes inertes do Roundup Transorb® não alteraram essa toxicidade do sal nas doses e período deste experimento.

6.3 PROGRESSÃO DA PUBERDADE

O atraso observado nesse estudo à separação balanoprepucial, demonstra que ocorreram perturbações hormonais nessa fase. A puberdade, conforme descrita por OJEDA e BILGER (2000), é a fase do desenvolvimento onde ocorrem profundas alterações hormonais, físicas, comportamentais e psicológicas que tornam o indivíduo capaz de se reproduzir. Sendo assim, transtornos nesse período poderão acarretar problemas em sua vida reprodutiva adulta.

Entretanto, essa separação da pele do pênis da glândula definida por Ojeda e Urbanski (1994) e anexada aos protocolos de avaliação dos *disruptores* endócrinos para verificar o efeito das alterações hormonais (STOKER et al., 2000a,b) tem execução que necessita de manipulação delicada e interpretação um tanto subjetiva.

Isso pode ter se refletido na não observação de atraso nessa variável no grupo recebendo a dose de 5 mg/kg, embora a alteração na produção hormonal tenha sido significativa.

A análise absoluta do atraso em dias parece questionável por ser muito pequena a variação em relação ao controle. Mas o desenvolvimento dos ratos é muito rápido e o que ocorre em seu corpo num único dia poderia levar até meses na comparação com o ser humano, por exemplo. Pequenas alterações nesse parâmetro são consideradas importantes e decisivas na conclusão do princípio ativo estudado ter potencial de *disruptor* endócrino ou não. Stocker et al. (2000b) também observaram atrasos de um a dois dias e meio em relação ao grupo controle no ensaio utilizando-se o herbicida atrazina.

É extremamente importante para considerações toxicológicas futuras do herbicida Roundup Transorb a observação de atraso à puberdade desde a dose de 50 mg/kg, pois essa dose encontra-se no limite para observação dos efeitos deletérios do sal de glifosato sobre a reprodução (LU, 1995).

Provavelmente, a ação direta desse sal não tenha sido a principal causa no atraso à puberdade, uma vez que alguns trabalhos com o sal de glifosato não apresentaram efeito prejudicial à fertilidade, mas sim de seus componentes adjuvantes. Walsh et al. (2000), Marc et al. (2002), Howe et al. (2004), Peixoto (2005), Surgan (2005), Cox e Surgan (2006), Benachour et al. (2007) e Brausch e Smith (2007) relatam que nos ensaios toxicológicos é observada maior toxicidade nas formulações comerciais de glifosato do que quando se utiliza somente o sal, indicando que a toxicidade dos ingredientes inertes é maior que a do ingrediente ativo, e que a sua presença produz maior efeito tóxico.

6.4 TESTÍCULOS: PESOS RELATIVOS, MORFOLOGIA E NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL

Após a eutanásia, os testículos removidos foram pesados para constatação de efeito do herbicida Roundup Transorb[®] sobre seu desenvolvimento. O peso testicular relativo diferiu entre os grupos tratados, constatando-se diferenças significativas entre os grupos de 0mg/kg e 250 mg/kg, tanto unilateral esquerda e

direita, quanto para a média em peso de ambos os testículos. Entretanto, não foram observadas alterações histopatológicas no grupo de 250 mg/kg que possa explicar essa diferença no peso.

O mecanismo de disfunção endócrina elucidado *in vitro* por Walsh et al. (2001) relaciona a maioria das alterações com a falha na produção de proteína StAR. A falha na atuação dessa proteína leva ao acúmulo de ésteres de colesterol no citoplasma celular, fazendo com que a célula aumente de tamanho. Seria de se esperar que como resultado final o órgão estivesse aumentado se o acúmulo fosse grande. Mas o procedimento histológico utilizado nesse trabalho não objetivou a especificidade na constatação de grânulos de gordura e, dessa forma, se alguma alteração ocorreu não foi detectada. Oliveira et al. (2007) observaram a presença de grânulos citoplasmáticos de gordura em todos os grupos tratados com Roundup® nas lâminas histológicas estudadas por corantes apropriados, como o Sudan Black.

Estudou-se a morfologia dos túbulos seminíferos para a verificação de efeitos provocados tanto pela alteração na síntese hormonal, como verificado por Oliveira et al. (2007) em patos, Walsh et al. (2001) e Richard et al. (2005) em cultivos celulares, quanto por alterações tóxicas diretas sobre o funcionamento celular, como verificado por Marc et al. (2002) e Peixoto (2005).

Comprovou-se pelas fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos alterações entre os grupos controle G1 e tratados G2, G3 e G4. A espessura do epitélio foi maior no grupo controle e reduzida nos grupos de 5mg/Kg, 50mg/Kg e 250mg/Kg em 16%, 20% e 24%, respectivamente. A espessura do epitélio germinativo reflete o processo de espermiogênese (NORMAN; LITWICK, 1997; HAFEZ; HAFEZ, 2000) e alterações hormonais levam a problemas em sua arquitetura (EDDY et al., 1996; SHARPE et al., 1998; ATANASSOVA et al., 1999; ROBERTSON et al., 1999; ATANASSOVA et al., 2000; GOYAL et al., 2001; GOYAL et al., 2003; ATANASSOVA et al., 2005) justificando a menor espessura epitelial de todos os grupos tratados, o que também foi observado por Oliveira et al. (2007).

O diâmetro da luz tubular foi menor no grupo controle e maior entre os grupos tratados em 24% no grupo de 5mg/Kg, 22% no grupo de 50mg/Kg e 32% para o grupo de 250mg/Kg. Denotando novamente que as doses mínimas já foram suficientes para a constatação dos efeitos prejudiciais do herbicida, como também constatado em outras pesquisas por Marc et al. (2002) e Williams et al. (2000) que descrevem redução nas concentrações espermáticas em cerca de 20% em animais

expostos a doses orais de 25.000 ppm e 50.000 ppm. Essas alterações no diâmetro tubular também estão relacionadas aos problemas hormonais como o epitélio germinativo.

Apesar das variações na espessura do epitélio e na luz tubular, o diâmetro tubular total permaneceu inalterado entre os grupos, indicando que as alterações ocorreram somente com redução do epitélio germinativo, mas o diâmetro total e integridade anatômica mantiveram-se inalteradas. Oliveira et al. (2007) também relatou esse fato em túbulos seminíferos de patos.

A concentração sérica de testosterona foi significativamente diferente entre os grupos controle e tratados, sendo reduzida em 30%, 45% e 50% nos grupos de 5, 50 e 250 mg/kg. Isso explica as alterações observadas na morfologia dos túbulos seminíferos. A diminuição da produção de testosterona também prejudica o aparecimento das características sexuais secundárias, como a separação balanoprepucial, e a produção espermática. A célula intersticial de Leydig produz a testosterona a partir inicialmente do colesterol intracelular e a redução observada nesse trabalho está de acordo com a observada por Oliveira et al. (2007) em patos e por Walsh et al. (2001) em cultivo celular. No entanto, esse primeiro autor constatou redução em 95% na produção de testosterona. De forma curiosa e ainda não definida, o Roundup® causa esterilização da planta de algodão, parecendo atuar diretamente sobre o tecido masculino, sem alterar a produtividade (YASOUR; RIOV; RUBIN, 2007).

O grupo de 5 mg/kg apresentou redução do epitélio germinativo extremamente significativa ($p < 0,001$) não diferindo dos outros grupos tratados. Já a concentração sérica de testosterona apresentou-se de forma intermediária entre o grupo controle e os outros tratados. Isso sugere que as alterações morfométricas teciduais podem não ser totalmente causadas pela redução na produção de testosterona, podendo estar relacionadas com a toxicidade celular sobre a atividade mitocondrial (PEIXOTO, 2005) e síntese protéica (MARC et al., 2002).

Já a concentração sérica de estradiol não demonstrou diferenças entre os animais nos diferentes grupos de tratamentos, apesar da diminuição na produção de testosterona. Isso pode estar relacionado ao fato do estradiol ser produzido também pelo tecido adiposo, não estando somente correlacionado à esteroidogênese testicular (AKINGBEMI, 2005).

Dessa forma, a dosagem de estradiol sérico não evidenciou alterações restritas aos testículos. Pois, se a testosterona foi significativamente reduzida nos animais recebendo o herbicida e este hormônio é precursor do estradiol (NORMAN; LITWACK, 1997), esperava-se que ele também estivesse reduzido. Além disso, outros autores observaram *in vitro* efeito de inibição da enzima aromatase, que ocasionaria também a menor conversão da testosterona em estradiol (WALSH et al., 2001; RICHARD et al., 2005). Mas estes resultados estão de acordo com o obtido por Oliveira et al. (2007), que também verificou redução na testosterona e não variação no estradiol *in vivo*. Estes resultados sugerem que há diferenças nos resultados obtidos em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

6.5 ADRENAIS: PESOS RELATIVOS, MORFOLOGIA E NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA

A análise dos pesos relativos das adrenais demonstrou diferenças significativas entre os grupos estudados. A glândula adrenal foi incluída nesse estudo por também ser produtora de hormônios esteróides, utilizando como substrato o colesterol, assim como os testículos. O transporte intracelular do colesterol é realizado pela proteína StAR de mesmo subtipo que o transporte testicular, a StARD₁ (EPAND, 2006). Assim, esperava-se que ocorressem alterações na morfologia tecidual e na produção de esteróides. Entretanto, nenhuma dessas alterações foi comprovada. Da mesma forma que no caso dos testículos, o procedimento histológico não evidenciou acúmulo anormal de gordura, já que existe um acúmulo normal na região cortical. A não observação de alterações na produção de corticosterona indica que o transporte intracelular de colesterol não foi afetado de forma significativa. Talvez para o aparecimento de deficiência na síntese hormonal desse órgão haja a necessidade de uma interrupção mais brusca da proteína StAR, como a descrita na hiperplasia adrenal lipóide congênita em humanos (CARON et al., 1997).

6.6 FÍGADO: FUNÇÃO HEPÁTICA E HISTOPATOLOGIA

A metabolização dos hormônios esteróides ocorre no fígado (DEVLIN, 2000) e apesar de não haver metabolização hepática do glifosato (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991; WILLIAMS et al., 2000), outros estudos sugerem que a formulação de glifosato-Biocarb é hepatotóxica em doses semelhantes à utilizada nesse estudo (BENEDETTI et al., 2004). Problemas no metabolismo desse órgão poderiam causar alterações nos níveis circulantes desses hormônios por deficiência na sua eliminação e não por uma deficiência primária na sua produção. As dosagens séricas de ALT e AST não demonstraram alterações funcionais no fígado, o que descarta essa possibilidade.

Entretanto, Benedetti et al. (2004) observaram modificação do metabolismo hepático na exposição ao glifosato-Biocarb por 75 dias, tendo sido observada alterações desde a dose mais baixa de 4,87 mg/kg. Embora as doses utilizadas neste trabalho forem semelhantes, esse efeito tóxico hepático não foi observado. O menor tempo de exposição ao produto e também a formulação comercial diferente, que implica na combinação de outros ingredientes inertes, podem ter contribuído para a não observação das alterações.

Neste estudo, observou-se somente alterações histopatológicas leves, como a congestão. Benedetti et al. (2004) descrevem alterações como o aumento das células de Kupfer nos sinusóides dos animais tratados, seguido pela deposição de fibras de reticulina, compostas principalmente por colágeno tipo III.

Alterações hepáticas foram também descritas, observando-se elevações nos níveis séricos de ALT e AST e discreto dano hepático à microscopia em animais tratados com doses de sal de glifosato a partir de 414 mg/kg de peso vivo ao dia, em tratamento prolongado. Colangite proliferativa e hepatite foram também descritas em outro estudo (PESTICIDES, 2004). As doses utilizadas neste experimento foram inferiores a esses estudos e um dos objetivos foi observar os efeitos em doses menores, compatíveis com a exposição ambiental e de manipulação do produto pelos seus usuários. Estes resultados estão em acordo com os desses autores, pois eles não observaram alterações hepáticas nas doses inferiores a 414 mg/kg, indicando que a composição dos ingredientes inertes não interferiu de forma

significativa para o surgimento dessas lesões, durante o período observado nesse estudo.

6.7 RINS: FUNÇÃO RENAL E HISTOPATOLOGIA

Após a metabolização hepática, os esteróides são excretados na urina (DEVLIN, 2000) e como o glifosato é excretado por essa via (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991), danos à função renal podem alterar a eliminação do produto do organismo. Observou-se neste estudo elevação na creatinina sérica, que também foi descrito na exposição ao sal de glifosato, em doses a partir de 250 mg/kg de peso vivo por via oral (PESTICIDES, 2004). Mas neste estudo, a elevação na creatinina aconteceu desde a dose de 50 mg/kg, indicando que a toxicidade da formulação de Roundup® Transorb para esse parâmetro foi maior que aquela observada para o sal de glifosato. O Roundup® Transorb possui em sua formulação adjuvante que propicia maior absorção (Monsanto Co.), isso pode ter gerado maior influxo celular do sal de glifosato e mimetizado o resultado desse experimento com uma dose oral menor.

Várias alterações patológicas ocorreram na exposição ao Roundup® Transorb e haviam sido descritas anteriormente para o sal de glifosato, como nefrocalcinose, necrose papilar e hiperplasia transicional celular (PESTICIDES, 2004).

Ainda pode-se observar a presença de grânulos de deposição de metais no citoplasma das células tubulares renais, indicando que houve exposição a algum tipo de metal, provavelmente presente na formulação do produto.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que o glifosato-Rondup® Monsanto:

- Causa problemas na progressão da puberdade, evidenciada pelo atraso à separação balanoprepucial desde a dose de 50 mg/kgPV.
- Não interfere com o crescimento corporal dos animais tratados.
- Causa alterações no peso dos órgãos esteroideogênicos testículos e adrenais no grupo tratado com a dose de 250 mg/kgPV.
- Causa alterações no nível sérico de testosterona em todos os grupos tratados, desde a dose de 5 mg/kgPV.
- Não altera o nível sérico de estradiol
- Não altera o nível sérico de corticosterona, nem alterações histopatológicas evidentes.
- Causa alterações morfológicas testiculares, reduzindo a espessura do epitélio germinativo desde a dose de 5 mg/kgPV.
- Causa alterações funcionais e histopatológicas nos rins, desde a dose de 5 mg/kg (histopatologia).
- Não causa alterações hepáticas funcionais ou histopatológicas significativas nas doses utilizadas.
- Finalmente, com base no efeito sobre a testosterona sérica pode-se considerar que produto é um *disruptor* endócrino sobre o eixo reprodutivo de mamíferos *in vivo*, desde a dose mais baixa utilizada neste estudo, de 5 mg/kg.

REFERÊNCIAS

- ABREU-JR, C. H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A. F. Relationship between acidity and chemicals properties of Brazilian soils. **Science Agricultural**, v. 60, p. 337-343, 2003.
- AKINGBEMI, B. T. Estrogen regulation of testicular function. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 51, p. 1-13, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov>>. Acesso em: 10 Jul 2006.
- AKINGBEMI, B. T.; GE, R.; KLINEFELTER, G. R.; ZIRKIN, B. R.; HARDY M. P. Phthalate-Induced Leydig cell Hyperplasia is Associated With Multiple Endocrine Disturbances. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 775-780, 2004.
- ATANASSOVA, N.; MCKINNEL, C.; TURNER, K. J.; WALKER, M.; FISHER, J. S.; MORLEY, M.; MILLAR, M. R.; GROOME, N. P.; SHARPE, R. M. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3898-3907, 2000.
- ATANASSOVA, N.; MCKINNEL, C.; WALKER, M.; TURNER, K. J.; FISHER, J. S.; MORLEY, M.; MILLAR, M. R.; GROOME, N. P.; SHARPE, R. M. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 5364-5373, 1999.
- ATANASSOVA, N. N.; WALKER, M.; MCKINNEL, C.; FISHER, J. S.; SHARPE, R. M. Evidence that androgens and oestrogens, as well follicle stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. **Journal of Endocrinology**, v. 184, p. 107-17, 2005.
- BARNETT, J. B.; COLBORN, T.; FOURNIER, M. Consensus Statement from the work session on 'Chemically induced alteration in the development immune system'. The Wildlife connection. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 4, p. 807-808, 1996 (Supplement).
- BELLES, D.; SHANER, D.; WESTRA, P.; BRUNK, G. Comparison of efficacy absorption and translocation of three glyphosate formulations on velvetleaf. **Pesticide Management Science**, v. 62, p. 1177-1181, 2006.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SERALINI, G. E. Time and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 126-133, 2007.

BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. D.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 2, p. 227-232, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Critérios para a classificação toxicológica**. Manual de procedimentos para análise toxicológica de produtos agrotóxicos, seus componentes e afins. Brasília: ANVISA, 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/manual>>. Acesso em: 17 out 2005.

BRAUSCH, J. M.; SMITH, P. N. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 2, p. 217-221, 2007.

BREWSTER, D.; WARREN, J.; HOPKINS, W. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: Tissue distribution, identification and quantification of glyphosate derived materials following a single oral dose. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 43-51, 1991.

CARON, K. M.; SOO, S. C.; WETSEL, W. C.; STOCCO, D. M.; CLARK, B. J.; PARKER, K. L. Target disruption of the mouse gene encoding esteroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 11540-11545, 1997.

CASTLE, L. A.; SIEHL, D. L.; GORTON, R.; PATTEN, P. A.; CHEN, Y. H.; BERTAIN, S.; CHO, H. J.; DUCK, N.; WONG, J.; LIU, D.; LASSNER, M. W. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. **Science**, v. 304, p. 1151-1154, 2004.

CERDEIRA, A. L.; DUKE, S. O. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. **Journal Environmental Qual**, v. 35, p. 1633-1658, 2006.

CERDEIRA, A. L.; GAZZIERO, D. L. P.; DUKE, S. O.; MATALLO, M. B.; SPADOTTO, C. A. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, p. 539-549, 2007.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MEYERS, J. P. **Our stolen future**: are we threatening our fertility, intelligence and survival? A Scientific detective story. New York: Ed Dutton, 1996.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 1803-1806, 2006.

CRAIN, D. A.; GUILLETTE, L. J.; ROONEY, A. A.; PICKFORD, D. B. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 528-533, 1997.

CRISP, T. M.; CLEGG, E. D.; COOPER, R. L.; WOOD, W. P.; ANDERSON, D. G.; BAETCKE, K. P.; HOFFMANN, J. L.; MORROW, M. S.; RODIER, D. J.; SCHAEFFER, J. E.; TOUART, L. W.; ZEEMAN, M. G.; PATEL, Y. L. Environmental Endocrine Disruption: an effects assessment and analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 1, p.11-56, 1998 (Supplement).

CURWIN, B. D.; HEIN, M. J.; SANDERSON, W. T.; NISHIOKA, M. G.; REYNOLDS, S. J.; WARM, E. M.; ALAVANJA, M. C. Pesticide constamination inside farm and nonfarm homes. **Journal Occupational Environmental Hygiene**, v. 2, n. 7, p. 357-367, 2005.

CURWIN, B. D.; HEIN, M. J.; SANDERSON, W. T.; STRILEY, C.; HEEDERIK, D.; KROMHOUT, H.; REYNOLDS, S. J.; ALAVANJA, M. C. Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. **Journal Occupational Environmental Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 53-65, 2007.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup im Wistas rats. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 1-2, p. 45-52, 2003.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4. ed. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 2000. 1007 p.

EDDY, E. M.; WASHBURN, T. F.; BUNCH, D. O.; GOULDING, E. H.; GLADEN, B. C.; LUBAHN, D. B.; KORACH, K. S. Target disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 4796-4805, 1996.

ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING PROGRAM. Proposed statement of policy. **Federal Register**. v. 63, n. 248, p. 71541-71568. 1998. Disponível em: <http://www.epa.gov/EPA-PEST/1998/December/Day-28/p34298.htm>. Acesso em: 20 Nov 2006.

EPA. ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY: Assessing health risks from pesticides. Washington DC: Office of Pollution Prevention Worksheet, 1999. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/riskassess.htm>> Acesso em: 20 Nov 2006.

EPAND, R. M. Cholesterol interactions of proteins with membrane domains. **Progress in Lipid Research**, v. 45, p. 279-294, 2006.

ETCGROUP. **Down on the farm**: The impact of nano-scale technologies on food and agriculture. Ottawa: ETCGroup, 2004, 68 p. Disponível em: <<http://www.etcgroup.org>>. Acesso em: 20 Nov 2006.

FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; PARLOW, A. F.; SIMPSON, E. R. Characterization of mice deficient aromatase (ARKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 6965-6970, 1998.

GETENGA, Z. M.; KENGARA, F. O. Mineralization of glifosate in compost-amended soil under controlled conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, p. 266-275, 2004.

GOLDMAN, J. M.; LAWS, S. C.; BALCHAK, S. K.; COOPER, R. L.; KAVLOCK, R. J. Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 135-196, 2000.

GOLDSBOROUGH, L. G.; BROWN, D. J. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest. **Environment Toxicology Chem**, v. 12, p. 1139-1147, 1993.

GOYAL, H. O.; BRADEN, T. D.; MANSOUR, M.; WILLIAMS, C. S.; KAMALELDIN, A.; SRIVASTAVA, K. K. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 927-934, 2001.

GOYAL, H. O.; ROBATEOU, A.; BRADEN, T. D.; WILLIAMS, C. S.; SRIVASTAVA, K. K.; ALI, K. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 6, p. 2081-2091, 2003.

GRAY, L. E.; WOLF, C.; LAMBRIGHT, C.; MANN, P.; PRICE, M.; COOPER, R. L.; OSTTBY, J. Administration of potentially antiandrogenic pesticides and toxic substances during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1-2, p. 94-118, 1999.

HAEFS, R.; SCHMITZ-EIBERGER, M.; MAINX, H. G.; MITTELSTAEDT, W.; NOGA, G. Studies on a new group of biodegradable surfactants for glyphosate. **Pesticide Management Science**, v. 58, n. 8, p. 825-833, 2002.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Ed Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 509 p.

HALL, P. F. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press Ltda, 1994, v. 2, p. 363-410.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M. Bioremediation and biodegradation: effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 730-735, 2002.

HAYES, W. J.; LAWS, E. R. (Eds.) **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego: Academic Press, 1991, v. 3, p. 1339-1340.

HOWE, C. M.; BERRILL, M.; PAULI, B. D.; HELBING, C. C.; WERRY, K.; VELDHOEN, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1928-38, 2004.

INOUE, M. H.; OLIVEIRA-JR., R. S.; REGITANO, J. B.; TORMENA, C. A.; TORNISIELO, V. L.; CONSTANTIN, J. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. **Planta Daninha**, v. 21, p. 313-323, 2003.

KRIMSKI, S. **Hormonal chaos. The scientific and social origins of the environmental endocrine hypothesis**. Baltimore: John Hopkins University Press, 2000.

LAWS, S. C.; STOKER, T. E.; GOLDMAN, J. M.; WILSON, V.; GRAY-JR, L. E.; COOPER, R. L. The U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program: in vitro and in vivo mammalian tier 1 screening assays. In: HOOD, R. D. (Ed.) **Developmental and reproductive toxicology**. New York: Taylor and Francis, 2006, p. 489-523.

LE BLANC, G. A.; BAIN, L. J.; WILSON, V. S. Pesticides: multiple mechanisms of demasculinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 1-5, 1997.

LEVALLET, J.; BILINSKA, B.; MITTRE, H.; GENISSEL, C.; FRESNEL, J.; CARREAU, S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome p450 aromatase in mature rat testicular cells. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 919-926, 1998.

LU, F. C. A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 352-364, 1995.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chemicals Research Toxicology**, v. 15, p. 326-331, 2002.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2. ed. Califórnia: Academic Press, 1997. 558p.

OGAWA, S.; CHAN, J.; CHESTER, A. E.; GUSTAFSSON, J.; KORACH, K. S.; PFAFF, D. W. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor gene-deficient (ERKO) male and female mice. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12887-12892, 1999.

OJEDA, S. R.; BILGER, M. Neuroendocrine regulation of puberty. In: CONN, P. M.; FREEMAN, M. E. (Ed.). **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. 1. ed. New Jersey: Humana Press Inc., 2000, p. 197-224.

OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press Ltda, 1994, v.2, p. 363-410.

OLIVEIRA, A. G.; TELLES, L. F.; HESS, R. A.; MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A. Effects of the herbicide Roundap on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 182-191, 2007.

PARKER, R. M. Testing for reproductive toxicity. In: HOOD, R. D. (Ed.). **Developmental and reproductive toxicology**. New York: Taylor and Francis, 2006, p. 425-487.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, p. 1115-1122, 2005.

PESTICIDE residues in food: 2004 toxicological evaluations. In: JOINT MEETING OF THE FAO PANEL OF EXPERTS ON PESTICIDE RESIDUES IN FOOD AND THE ENVIRONMENT AND THE WHO CORE ASSESSMENT GROUP, 2004, Rome. [Proceedings]. Geneva: World Health Organization, 2006. 723p. Disponível em: <http://www.who.int/ipocs/publications/jmrp/draft_impr_2004_monograph.pdf> Acesso em: 14 Jul 2007.

PORTER, W. P.; JAEGER, J. W.; CARLSON, I. H. Endocrine, Immune and Behavioral effects of aldicarb (carbamate), Atrazine (triazine) and nitrate (fertilizers) mixtures at groundwater concentrations. **Toxicology Industrial Health**, v. 15, p. 133-150, 1999.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Differential effects of glyphosate and Roundap on human placental cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

ROBERTSON, K. M.; O'DONNELL, L.; JONES, M. E. E.; MEACHEM, S. J.; BOON, W. C.; FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; MCLACHLAN, R. I.; SIMPSON, E. R. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp19) gene. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 7986-7991, 1999.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 4. ed. Londrina: Ed. Agris, 1998, p. 300-309.

ROLHF, F. J. **tpsDig**. Versão 2.10. Suny at Stony Brook: Ecology and Evolution, 2006. Disponível em: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph>>. Acesso em: 07 jul 2007.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SCOTT, F. G. **Developmental Biology**. 6.ed. Editora Sinauer, 2005. Disponível em:< www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 14 out 2005.

SHARPE, R. M.; ATANASSOVA, N.; MCKINNEL, C.; PARTE, P.; TURNER, K. J.; FISHER, J. S.; KERR, J. B.; GROOME, N. P.; MACPHERSON, S.; MILLAR, M. R.; SAUNDERS, P. T. K. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with DES: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1084-1094, 1998.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; SCRIMO, P. J.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution os estrogen receptor alpha and beta mRNA in the rat pituitary, gonad and reproductive tract. **Steroids**, v. 63, p. 498-504, 1998.

SHUPNIK, M. A.; ROSENZWEIG, B. A. Identification of an estrogen responsive element in the rat LH beta gene. DNA-estrogen receptor interactions and functional analysis. **Journal of Biology Chemistry**, v. 266, p. 17084-17091, 1991.

SILVA, M. D.; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. **Pesticidas: R Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 19-28, 2003.

SOLOMON, G. M.; SCHETTLER, T. Environment and Health: Endocrine disruption and potencial human health implications. **Canadian Medical Association of Journal**, v. 163, n. 11, p. 1471-76, 2000.

STATISTICA (data analysis software system), version 6. 2001.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocrinology Reviews**, v. 17, p. 221-244, 1996.

STOKER, T. E.; LAWS, S. C.; GUIDICI, D. L.; COOPER, R. L. The effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 50-59, 2000a.

STOKER, T. E.; PARKS, L. G.; GRAY, L. E.; COOPER, R. L. Endocrine-disrupting chemicals: pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197-252, 2000b.

SURGAN, M. H. Toxicity tests: "inert" and active ingredients. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 10, p. A657-A658, 2005.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-base formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, p. 1189-1197, 2003.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Comparative toxicity of glyphosate-base herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 316-323, 2004.

TYL, R. W.; MARR, M. C. Developmental toxicity testing – Methodology. In: HOOD, R. D. (Ed.). **Developmental and reproductive toxicology**. New York: Taylor and Francis, 2006, p. 201-261.

VOGEL, J. M. Perils of paradigm: complexity, policy design and the Endocrine Disruptor Screening Program. **Environmental health: A global access science source**, v.4, n. 2, 2005. Disponível em: <<http://www.ehjournal.net/content/4/1/2>>. Acesso em: 20 Nov 2006.

WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D. M. Roundap inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundap and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

YASOUR, H.; RIOV, J.; RUBIN, B. Glyphosate-induced male sterility in glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is associated with inhibition of anther dehiscence and reduced pollen viability. **Crop Protection**, v. 26, p. 363-369, 2007.

Apêndices

Apêndice A – Nota de compra do Roundup Transorb, Monsanto.

AGROPLAN		RUA SALDANHA MARINHO, 4057 - V. CARLI CEP: 85035-160 - CAIXA POSTAL 151 GUARAPUAVA - PARANÁ e-mail: agroplan@almix.com.br FONE / FAX: (42) 3624-1718		NOTA FISCAL FATURA		036563 SÉRIE 1	
V. J. FUCHS & CIA. LTDA.		CNPJ / CPF 77.000.909/0001-74		1º VIA DESTINATÁRIO/REMETENTE		DATA PARA EMISSÃO 21/12/2007	
C.F.O.P. 5.102		INSCR. ESTADUAL DO SUBST. TRIB.		INSCRIÇÃO ESTADUAL 40103545-15		DATA LIMITE PARA EMISSÃO 21/12/2007	
NOME DO OPERADOR Venda a Vista		C.F.O.P. 5.102		INSCRIÇÃO ESTADUAL 40103545-15		DATA PARA EMISSÃO 14/12/2006	
DESTINATÁRIO / REMETENTE		CNPJ / CPF 273.136.438-61		BAIRRO		DATA DA SAÍDA/ENTRADA 14/12/2006	
RUA AFONSO BOTEIHO, 1208		FONE / FAX		UF PR		HORA DA SAÍDA 10:32:26	
GUARAPUAVA		INSCRIÇÃO ESTADUAL					
UR							
NÚMERO	VENCIMENTO	VALOR	NÚMERO	VENCIMENTO	VALOR		
1-36563-1	14/12/2006	16,00					
<div> <div>OR</div> <div>R</div> <div>SO</div> </div> <div>(DEZESSEIS REAIS)</div>							
OS DO PRODUTO							
CÓDIGO	ITEM	DESCRIÇÃO DOS PRODUTOS	SITUAÇÃO	UNID.	QUANTIDADE	DESC.	VALOR UNITÁRIO
	1051	Roundup Transorb (herbicida) Reg.MA:004299 CT:III Produto não restrito para transporte	051	LT	1,000		16,00
							16,00
							0
CÁLCULO DO IMPOSTO							
CÁLCULO DO ICMS		VALOR DO ICMS	0,00	BASE DE CÁLC. ICMS SUBST.	0,00	VALOR DO ICMS SUBSTITUIÇÃO	0,00
FRETE		0,00	VALOR DO SEGURO	0,00	OUTRAS DESP. ACESSÓRIAS	0,00	VALOR TOTAL DOS PRODUTOS
							16,00
							0,00
							16,00
EXPORTADOR / VOLUMES TRANSPORTADOS							
SOCIAL DO TRANSPORTADOR		FRETE P/ CONTA		PLACA DO VEÍCULO		CNPJ / CPF	
0		3 - EMISSÃO 2 - DESTINATÁRIO		2		-	
CO		MUNICÍPIO		UF		INSCRIÇÃO ESTADUAL	
ACE		ESPECIE		MARCA		PESO BRUTO	
1,00						0,00	
						PESO LÍQUIDO	
						0,00	
DADOS ADICIONAIS							
RESERVADO AO FISCO							
<div> <div>***ICMS DIFERIDO DEC.5141/01 ART.91-RICMS/PR.***</div> <div>JUNTAMENTE COM A NOTA FISCAL SEQUE FICHAS DE EMERGENCIA E ENVELOPE</div> <div>RME LEI 9974/00 OS ADQUIRENTES DE AGROTÓXICOS ESTÃO OBRIGADOS A DEVOLVER SUAS EMBALAGENS VAZIAS, NO PRAZO DE UM ANO, APÓS SUBMETÊ-LAS À TRÍPLICE LAVAGEM OU TECNOLOGIA EQUIVALENTE.</div> <div>PO PRODUÇÃO DAS EMBALAGENS ADICIONAIS - PR 277 - KM 348,5 - ESTRADA SÃO SEBASTIÃO - FONE 3627-6035 - GUARAPUAVA - PR</div> <div>RAMOS QUE OS PRODUTOS CONSTANTES DESTA NOTA FISCAL, ESTÃO DEVIDAMENTE ACONDICIONADOS PARA SUPORTAR RISCOS DE CARREGAMENTO, DESCARREGAMENTO E TRANSPORTE, CONFORME LEGISLAÇÃO EM VIGOR.</div> </div>							
Nº DE CONTROLE DO FORMULÁRIO							
036563							
FORM - FORMULÁRIOS CONTÍNUOS LTDA. Rua Saldanha Marinho, 2940 - Fone: 3623-3113 - Guarapuava - PR. CNPJ 02702000/0001-27 - INSCR. 90166176-68 - 2.000 x 4 35.501 A 37.500 MOD. 1 FATURA - SÉRIE 1 - AUT. 11850592-10 - 21/06/2006							
B(EMOS) DE V. J. FUCHS & CIA. LTDA., OS PRODUTOS CONSTANTES DESTA NOTA FISCAL FATURA SÉRIE 1 INDICADA AO LADO.							
DATA		ASSINATURA		NOTA FISCAL FATURA - SÉRIE 1			
/ /				036563			

Apêndice B - Diluição do Roundup

Solução 1: Para a dosagem de 500 mg/kg

- a. Concentração do produto: $480 \text{ g/L} = 480 \text{ mg/mL}$
- b. Diluir 10,4 mL de Roundup em 39,6 mL de água miliQ
- c. Obter a solução final de 5.000 mg/50 mL
- d. Concentração final da solução = 100 mg/mL

Solução 2: Para a dosagem de 50 mg/kg

- a. Diluir 5 mL da solução obtida na diluição 1 em 45 mL de água miliQ
- b. Obter a solução final de 500 mg/50 mL
- c. Concentração final da solução = 10 mg/mL

Solução 3: Para a dosagem de 5 mg/kg

- a. Diluir 5 mL da solução obtida na diluição 2 em 45 mL de água miliQ
- b. Obter a solução final de 50 mg/50 mL
- c. Concentração final da solução = 1 mg/mL

Solução 4: Para a dosagem de 250 mg/kg

- a. Diluir 20 mL da solução 1 em 20 mL de água miliQ
- b. Obter a solução final de 2.000 mg/40mL
- c. Concentração final da solução = 50 mg/mL

Solução 5: Para a dosagem de 0 mg/kg

- a. 0 mL de Roundup em 50 mL de água miliQ.