ANDRÉ TADEU GOTARDO

**Avaliação de desreguladores endócrinos em machos:
estudo dos efeitos tóxicos da *Ipomoea carnea* em caprinos.**

São Paulo
2013

ANDRÉ TADEU GOTARDO

**Avaliação de desreguladores endócrinos em machos:
estudo dos efeitos tóxicos da *Ipomoea carnea* em caprinos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvana Lima Górnjak

São Paulo

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2844
FMVZ

Gotardo, André Tadeu

Avaliação de desreguladores endócrinos em machos: estudo dos efeitos tóxicos da *Ipomoea carnea* em caprinos. / André Tadeu Gotardo. -- 2013.
121 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górniak

1. Desreguladores endócrinos. 2. Caprinos. 3. Andrologia. 4. Toxicologia da reprodução.
5. Bisfenol A. 6. *Ipomoea carnea*. I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Proposta de modelo para a avaliação, em machos, de desreguladores endócrinos em ruminantes: estudo dos efeitos tóxicos na *Ipomoea carnea*", protocolado sob o nº1748/2009, utilizando 45 (quarenta e cinco) caprinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "A model for evaluation of Endocrine disruptors in male ruminants: study of *Ipomoea carnea* toxic effect", protocol number 1748/2009, utilizing 45 (forty five) caprines, under the responsibility Profa. Dra. Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 30 de outubro de 2009

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOTARDO, André Tadeu

Título: Avaliação de desreguladores endócrinos em machos: estudo dos efeitos tóxicos da *Ipomoea carnea* em caprinos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __ / __ / __

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico:

À minha esposa **Mary**, que sempre acreditou em meu trabalho, vibrou com as minhas conquistas e me apoiou nos momentos mais difíceis. Agradeço toda compreensão e apoio nesta longa jornada. Estar ao seu lado tornou-me mais forte para realização deste sonho. Muito obrigado! Tenho certeza que juntos conquistaremos todos nossos objetivos e sonhos mais distantes.

Amo você.

Aos meus pais, **Jair** e **Vera**, sempre incentivadores. Nunca mediram esforços para me propiciar as melhores condições de estudo. Juntos chegamos a mais esta conquista. Você são exemplo para mim. Muito obrigado.

Amo vocês

À Prof^a Dr^a **Silvana Lima Górnjak**, minha orientadora, por acreditar em mim e dar a oportunidade de trilhar o caminho científico ao seu lado. Agradeço os seus ensinamentos, conselhos, paciência, compreensão e constante incentivo. Tudo isso foi determinante na minha formação. Você é um exemplo como professora, pesquisadora e como ser humano. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- ✓ Aos meus grandes amigos do CEPTOX: Adilson (Bala), Elaine, Ester, Estevão, Marco, Paulo César (PC) e Solange que sempre estiveram ao meu lado durante esta caminhada, me ajudando no que fosse preciso. Meus sinceros agradecimentos por tudo que vocês fizeram e fazem por mim.
- ✓ A Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas, pela disposição em me ajudar nos estudos histopatológicos deste trabalho;
- ✓ Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, por toda ajuda e orientação na realização das avaliações andrológicas;
- ✓ Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, pela disposição em colaborar com as avaliações hormonais;
- ✓ Ao Henrique Carvalho, ao Kleber Lemes e a Evelyn Pavanelli por terem se dedicado e contribuído muito com a realização deste trabalho. Muito obrigado;
- ✓ À minha sogra, sogro e cunhados, por ter me acolhido com tanto carinho em Pira.
- ✓ Ao Vânius, amigo e companheiro de CEPTOX durante o mestrado e doutorado;
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Isis Machado Hueza e à Prof^a. Dr^a Ana Cristina Tasaka, pelos conselhos e orientações durante a qualificação.
- ✓ Aos funcionários do laboratório de histologia: Cláudio e Luciano pela confecção das lâminas;
- ✓ Aos funcionários do laboratório de farmacologia por todo o auxílio;
- ✓ A todos meus colegas de pós-graduação;
- ✓ À todo o pessoal da secretaria de pós-graduação. Obrigado pela ajuda;
- ✓ Às garotas das secretarias do departamento: Adriana e Miilena. Muito obrigado;
- ✓ À Cristina por todo o empenho e ajuda com as burocracias da pós e por todas as “quebradas de ganho”;

- ✓ Todos os funcionários da Biblioteca pelo auxílio na conclusão desta Tese;
- ✓ A todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho e estiveram ao meu lado. Muito obrigado;
- ✓ Ao grande amigo: Marcos Barbosa Ferreira. Muito obrigado pelas inúmeras ajudas e dicas preciosas.
- ✓ Ao Jim Pfister, um grande amigo sempre disposto a ajudar;
- ✓ A todos os professores do departamento de patologia (FMVZ-USP), pelo incentivo e auxílio;
- ✓ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

"...Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei,
Nada sei... "

Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

GOTARDO, A. T. **Avaliação de desreguladores endócrinos em machos: estudo dos efeitos tóxicos da *Ipomoea carnea* em caprinos.** [Evaluation of endocrine disruptors in males: study of toxic effects of *Ipomoea carnea* in goats.]. 2013. 121 f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Recentemente, pesquisas vêm claramente demonstrando que xenobióticos podem apresentar efeitos deletérios sobre o sistema endócrino e passam a ser de grande importância toxicológica à medida que se tornam contaminantes ambientais. Tais substâncias passaram a ser denominadas de desreguladores endócrinos (DEs). Entre os diferentes DEs identificados, muitos são praguicidas, amplamente utilizados no meio agropecuário em todo o mundo. Atualmente, já são bem estabelecidas as metodologias para avaliação do potencial efeito DE de diferentes substâncias em roedores; porém uma busca na literatura deixa clara a falta de estudos e de protocolos para avaliação de DEs em animais de produção ruminantes, os quais certamente estão expostos a um grande número de agentes tóxicos com estas características. Assim, foi objetivo desta pesquisa dar início ao desenvolvimento de um protocolo para avaliação de efeitos DEs de xenobióticos em ruminantes. Para tal, estudou-se o bisfenol A (BPA), o qual é, classicamente, um DE para roedores. Além disto, avaliou-se o potencial efeito DE da *I. carnea*, uma planta tóxica de grande importância para ruminantes no Brasil e em outros países. O estudo foi realizado em duas etapas, na primeira avaliou-se os efeitos do BPA e da planta nos caprinos machos púberes; na segunda etapa propôs-se avaliar os efeitos tóxicos da exposição *in utero* de caprinos machos púberes a estas mesmas substâncias. Os resultados obtidos mostraram que os bodes púberes expostos ao BPA apresentaram redução significativa dos níveis séricos de tiroxina, e da qualidade espermática. Também observou-se nestes mesmos animais degeneração vacuolar na *rete testis*. Já os caprinos machos púberes que receberam a *I. carnea* apresentaram aumento significativo do número de espermatozoides com alterações morfológicas e degeneração vacuolar testicular. Ainda, estes mesmos animais apresentaram diminuição estatisticamente significativa dos níveis séricos dos hormônios

tireoidianos (T3 e T4). O protocolo empregado para avaliação dos efeitos da exposição *in utero* a *I. carnea* ou ao BPA em machos púberes, não evidenciou nenhuma alteração hormonal e/ou reprodutiva. Conclui-se que o protocolo empregado para avaliação de possíveis efeitos DEs de xenobióticos, em ruminantes foi eficaz, no entanto, futuras metodologias deverão ser introduzidas neste protocolo, para detectar alterações mais sutis no sistema endócrino.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos. Caprinos. Andrologia. Toxicologia da reprodução. Bisfenol A. *Ipomoea carnea*.

ABSTRACT

GOTARDO, A. T. **Evaluation of endocrine disruptors in males: study of toxic effects of *Ipomoea carnea* in goats.** [Avaliação de desreguladores endócrinos em machos: estudo dos efeitos tóxicos da *Ipomoea carnea* em caprinos.]. 2013. 121 f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Recently, many studies clearly showed that xenobiotics may have deleterious effects on the endocrine system. These substances are termed endocrine disruptors (EDs), and have great toxicological significance when they become environmental contaminants. Many of EDs are identified as pesticides, which were widely used in agriculture and livestock worldwide. Currently, there are already well-established methodologies for assessing the potential effect of endocrine disruptor (ED) of different substances in rodents; however, a literature search shows clearly the lack of studies and protocols for assessing EDs in ruminant livestock, which are indubitably exposed to a large number of these substances. Thus, the objective of the present research was to start developing a protocol for evaluation of possible effects of EDs in ruminants. For this, it was studied bisphenol A (BPA), a classic ED and also *I. carnea*, an important toxic plant to ruminants in Brazil and other countries. The study was conducted in two stages, in the first, it was evaluated the effects of BPA and *I. carnea* in pubescent male goats, and in the second stage it was studied the effects in pubescent male goats from mothers exposed, during pregnancy, to BPA or the toxic plant. The pubescent male goats treated with BPA showed significant reduction in serum thyroxine levels and in the sperm quality. Those animals also presented vacuolar degeneration in the rete testis. Pubescent male goats exposed to *I. carnea* showed many alterations: significant increase in morphological changes in the sperm, decrease in serum levels of thyroid hormones (T3 and T4) and testicular vacuolar degeneration. The used protocol for evaluation of the effects of *in utero* exposure to BPA or *I. carnea* in pubescent male goats showed no hormonal or reproductive changes in male goats evaluated at the puberty. In conclusion, the protocol used in the present study showed to be worthy to evaluate EDs effects in ruminants; however

future methodologies should be introduced to detect more subtle changes in the endocrine system.

Key words: Endocrine disrupters. Goats. Andrology. Reproductive toxicology.
Bisphenol A. *Ipomoea carnea*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Ipomea carnea</i>	32
Figura 2 -	Canteiro de <i>I. carnea</i> após 90 dias do seu plantio..	40
Figura 3 –	Colocação da esponja, impregnada com acetato de medroxiprogesterona no tubo guia para introdução na vagina das cabras.....	47
Figura 4 -	Aplicação da esponja, impregnada com acetato de medroxiprogesterona, no interior da vagina das cabras, com auxílio do tubo guia	47
Figura 5 -	Monta natural de caprinos após a fêmea ser submetida à indução de estro.....	48
Figura 6 -	Sonograma para confirmação de gestação no 27º dia pós cobertura. Vesícula embrionária (contorno vermelho); embrião (seta amarela); bexiga urinária (contorno amarelo)	50
Figura 7 -	Caprino recebendo no cocho o BPA individualmente	51
Figura 8 -	Caprino recebendo no cocho a <i>I. carnea</i> individualmente.....	52
Figura 9 -	Coleta de sangue de caprino por punção de veia jugular..	53
Figura 10 -	Avaliação andrológica de bodes. Mensuração do perímetro escrotal (A) e da consistência testicular (B)	56
Figura 11 -	Avaliação andrológica de bodes. Higienização externa do prepúcio com água e sabão (A) e colheita de sêmen por eletroejaculação (B)	57
Figura 12 -	Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP	57
Figura 13 -	Aparelho HTM-IVOS, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA. Utilizado para a avaliação computadorizada da motilidade espermática	62
Figura 14 –	Coleta de testículo e epidídimo de caprino. Procedimento anestésico (A) e castração (B)	63
Figura 15 –	Testículo e epidídimo de caprino (A) e epidídimo após divulsão do testículo (B).....	63
Figura 16 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de ureia (mg/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).....	73
Figura 17 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de FA (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um	

	período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)	74
Figura 18 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de AST (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a l. carnea (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).	75
Figura 19 –	Média e erro padrão dos níveis séricos de GGT (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a l. carnea (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).	76
Figura 20 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de T3 (ng/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a l. carnea (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).	78
Figura 21 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de T4 ($\mu\text{g/dL}$) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a l. carnea (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).	79
Figura 22 -	Média e erro padrão da variável porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente íntegras (MPI) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a l. carnea (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).	81
Figura 23 –	Média e erro padrão da variável defeitos espermáticos maiores (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a l. carnea (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).	83
Figura 24 –	Média e erro padrão da variável total de defeitos espermáticos (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a l. carnea (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).	84

- Figura 25 - Fotomicrografia de luz de testículo de bodes adultos tratados ou não com l. carnea na dose de 5g/kg/dia por 120 dias. A figura A mostra corte de animal do grupo controle, as figuras B e C mostram tecidos de animais experimentais. Evidencia-se degeneração vacuolar das células de Sertoli (setas) e áreas de depósito laminar de cálcio (cabeça de seta) em cortes de animais tratados com a l. carnea, HE, (10x).86
- Figura 26 - Fotomicrografia de luz de testículo de bodes adultos tratados ou não com BPA na dose de 25mg/kg/dia por 120 dias. A figura A mostra corte da região da rete testis de animal do grupo controle, a figura B mostra a mesma região de animal experimental. Notar presença de vacuolização citoplasmática (setas) em corte de animal tratado com BPA, HE, (10x).87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação dos animais segundo nota obtida em índice pré-estabelecido e distribuição dos animais nos grupos experimentais.....	45
Tabela 2 -	Média e erro padrão das variáveis ganho de peso quinzenal (Kg) e ganho de peso total (Kg) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) durante período experimental de 120 dias.....	71
Tabela 3 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), creatinina (mg/dL), albumina (g/L) e proteína total (g/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	71
Tabela 4 -	Média e erro padrão dos níveis sérico de ureia (mg/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	73
Tabela 5 –	Média e erro padrão dos níveis séricos de FA (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	74
Tabela 6 –	Média e erro padrão dos níveis séricos de AST (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	75
Tabela 7 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de GGT (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	76
Tabela 8 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de cortisol (µg/dL), testosterona (ng/mL) e LH (ng/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	77
Tabela 9 –	Média e erro padrão dos níveis séricos de T3 (ng/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um	

	período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	78
Tabela 10 -	Média e erro padrão dos níveis séricos de T4 ($\mu\text{g/dL}$) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.	79
Tabela 11 -	Média e erro padrão das variáveis perímetro escrotal (cm), consistência testicular (escala de 1 a 5), concentração espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) e porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente íntegras (MPI) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.	80
Tabela 12 -	Média e erro padrão das variáveis das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.	82
Tabela 13 –	Média e erro padrão da variável defeitos espermáticos menores (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	82
Tabela 14 –	Média e erro padrão da variável defeitos espermáticos maiores (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	83
Tabela 15 –	Média e erro padrão da variável total de defeitos espermáticos totais (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.	84
Tabela 16 -	Média e erro padrão das variáveis peso relativo do testículo esquerdo (PRTE), direito (PRTD) e peso relativo do epidídimo esquerdo (PREE) e direito (PRED) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120	85
Tabela 17 -	Parâmetros reprodutivos de cabras prenhes e pesos dos seus filhotes. As fêmeas gestantes foram expostas ou não (grupo controle, $n=5$) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, $n=4$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=4$) durante o período gestacional.....	89

Tabela 18 - Média e erro padrão dos níveis séricos de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), albumina (g/L), proteína total (g/L), ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), AST (u/L), GGT (u/L) e FA (u/L) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional.....	90
Tabela 19 - Média e erro padrão dos níveis séricos de cortisol (ng/mL), T3 (ng/mL) e T4 (ng/mL) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional.....	91
Tabela 20 - Média e erro padrão do perímetro escrotal (cm), consistência testicular (escala de 1 a 5), concentração espermática (x10 ⁶ espermatozoides/mL) e porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente íntegras (MPI) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional.	92
Tabela 21 - Média e erro padrão dos defeitos espermáticos maiores (%), defeitos espermáticos menores (%) e total de defeitos espermáticos (%) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional.....	92
Tabela 22 - Média e erro padrão das variáveis das características do movimento espermático avaliados pelo sistema computadorizado (CASA) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional.....	93
Tabela 23 - Média e erro padrão das variáveis peso relativo do testículo esquerdo (PRTE), direito (PRTD) e peso relativo do epidídimo esquerdo (PREE) e direito (PRED) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a <i>I. carnea</i> (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional.....	94

PRÓLOGO

A presente tese é continuidade da nossa Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação da toxicidade da *Ipomoea carnea* em caprinos durante o período perinatal: estudos de neuroteratologia". Desta forma, a Dissertação forneceu informações importantes a respeito das alterações reprodutivas decorrentes a ingestão da *I. carnea* em fêmeas caprinas gestantes. Além disso, aquela pesquisa permitiu acrescentar outro procedimento ao protocolo para avaliação de teratogenicidade em ruminantes, o estudo neurocomportamental dos neonatos, que já vem sendo desenvolvido há alguns anos, neste laboratório, o Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX).

Assim, dando continuidade a esta linha de pesquisa, a qual objetiva estabelecer protocolos para avaliações de risco em ruminantes, esta Tese de Doutorado teve como principal objetivo iniciar o desenvolvimento de um protocolo para a avaliação, em machos, de possível efeito desregulador endócrino (DE), que servirá para avaliar diversas substâncias, às quais os ruminantes podem estar expostos tais como, toxinas de plantas, micotoxinas, medicamentos e pesticidas entre outras. Para tanto, nesta presente pesquisa foram avaliadas as possíveis alterações reprodutivas e hormonais consequentes à exposição à *I. carnea*, determinando, assim, o seu potencial DE. Ainda, com o objetivo de validar nossa metodologia, acrescentamos ao estudo uma substância DE "clássica", para roedores, o bisfenol A (BPA).

Neste estudo objetivou-se avaliar os efeitos da exposição em machos adultos e da exposição *in utero*. Assim, a pesquisa foi dividida em duas partes. Na primeira, foram avaliados parâmetros reprodutivos e endócrinos de caprinos machos, adultos, expostos à *I. carnea* ou ao BPA. Na outra etapa, foram avaliados parâmetros reprodutivos e endócrinos de caprinos machos adultos, cujas mães foram expostas ao BPA ou à *I. carnea*, durante o período gestacional.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	SOBRE O BISFENOL A	29
1.2	SOBRE A <i>Ipomoea carnea</i>	30
2	OBJETIVO	37
2.1	OBJETIVO GERAL	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	ANIMAIS E MANEJO	39
3.2	MATERIA VEGETAL (<i>I. carnea</i>)	39
3.3	BISFENOL A	40
3.4	EQUIPAMENTOS E REAGENTES	40
3.5	KITS PARA AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HORMONAL	42
3.6	FÁRMACOS	42
3.7	PROCEDIMENTOS	43
3.7.1	Exames laboratoriais	43
3.7.2	Distribuição dos caprinos machos púberes nos tratamentos experimentais	44
3.7.3	Avaliação clínica e do ganho de peso	46
3.7.4	Indução do estro por esponjas impregnadas com progestágeno	46
3.7.5	Acasalamento	48
3.7.6	Avaliação ultrassonográfica para diagnóstico de gestação	49
3.7.7	Administração do bisfenol A	50
3.7.8	Administração de <i>I. carnea</i>	51
3.7.9	Coleta de sangue	52
3.7.10	Dosagem de enzimas e componentes sanguíneos	53
3.7.11	Avaliação hormonal	53
3.7.11.1	Radioimunoensaio	54
3.7.11.2	Imunoensaio com base em esferas magnéticas fluorescentes	54

3.7.12	Avaliação de anomalias e/ou malformações dos filhotes após o nascimento.....	55
3.7.13	Avaliação andrológica.....	55
3.7.13.1	Mensuração do perímetro escrotal e da consistência testicular ...	55
3.7.13.2	Colheita do sêmen.....	56
3.7.13.3	Determinação de volume do ejaculado	57
3.7.13.4	Avaliação da concentração espermática	58
3.7.13.5	Avaliação do motilidade, vigor e turbilhonamento	58
3.7.13.6	Análise da funcionalidade da membrana plasmática por teste de resistência osmótica	59
3.7.13.7	Avaliação da morfologia espermática.....	59
3.7.13.8	Avaliação computadorizada da motilidade espermática.....	60
3.7.14	Castração, coleta e pesagem dos testículos e epidídimos.....	62
3.7.15	Processamento dos tecidos para avaliação histopatológica.....	63
3.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	64
3.8.1	Avaliação dos efeitos tóxicos produzidos pelo BPA a ou pela <i>I. carnea</i> administrados a caprinos machos púberes.....	64
3.8.2	Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição <i>in utero</i> de caprinos machos púberes ao BPA ou à <i>I. carnea</i>	65
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
3.9.1	Procedimento estatístico empregado nos resultados do protocolo de avaliação dos efeitos tóxicos produzidos pelo BPA ou pela <i>I. carnea</i>, administrados a caprinos machos púberes.....	67
3.9.2	Procedimento estatístico empregado nos resultados do protocolo de avaliação dos efeitos tóxicos da exposição <i>in utero</i> de caprinos machos púberes ao BPA ou a <i>I. carnea</i>	67
4	RESULTADOS	70
4.1	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS PRODUZIDOS PELO BISFENOL A OU PELA <i>I. CARNEA</i> ADMINISTRADOS A CAPRINOS MACHOS PÚBERES	70
4.1.1	Avaliação clínica e do ganho de peso	70
4.1.2	Dosagem de enzimas e componentes sanguíneos	71
4.1.3	Avaliação hormonal.....	77

4.1.4	Avaliação Andrológica	80
4.1.5	Peso relativo	85
4.1.6	Avaliação histopatológica	85
4.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO IN UTERO DE CAPRINOS MACHOS PÚBERES AO BPA OU A <i>I.</i> <i>carnea</i>	88
4.2.1	Avaliação clínica e do ganho de peso	88
4.2.2	Dosagem de enzimas e componentes sanguíneos	89
4.2.3	Avaliação hormonal.....	90
4.2.4	Avaliação andrológica.....	91
4.2.5	Peso relativo	93
4.2.6	Avaliação histopatológica	94
5	DISCUSSÃO	96
6	CONCLUSÃO.....	108
	REFEÊNCIAS	110

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos evidenciou-se que muitos produtos químicos, presentes no meio ambiente, podem interferir com as ações fisiológicas dos hormônios endógenos. Estas substâncias, por alterarem a homeostase de diferentes hormônios, passaram a ser chamadas de “desreguladores endócrinos” (DEs). Segundo a *Environmental Protection Agency* (U.S. EPA, 1997), DE é conceituado como “agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no organismo, os quais são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos”.

Dentre os DEs já catalogados, verifica-se que a grande parte destes possui ação sobre o trato reprodutivo (HEINDEL, 2005; ANWAY; SKINNER, 2006). Outro dado relevante se refere ao fato de que muitos são praguicidas, portanto, empregados como herbicidas, inseticidas, fungicidas, etc (VINGGAARD et al., 2000; ANDERSEN et al., 2002; KOJIMA et al., 2004; LEMAIRE et al., 2006). Estas substâncias contaminam o solo, a água, as pastagens e, inevitavelmente, os alimentos, tanto destinados à alimentação animal como humana (KOLPIN; THURMAN; LINHART, 2000). O problema torna-se evidente, quando estudos epidemiológicos evidenciam a correlação entre a alta incidência de baixo peso ao nascimento (XIANG; NUCKOLS; STALLONES, 2000), morte fetal (BELL; HERTZ-PICCIOTTO; BEAUMONT, 2001) e câncer infantil (REYNOLDS et al., 2002) com a proximidade de residência a áreas agrícolas. Além disso, outras pesquisas também correlacionaram à concentração de pesticidas no leite materno e a incidência de criptorquidismo (SKAKKEBAEK et al., 2001; DAMGAARD et al., 2006)

Há muito se tem ciência dos efeitos de substâncias estrogênicas sobre o sistema endócrino de animais de laboratório. No final da década de 1930, Dodds et al. (1938) induziram o estro em ratas ovariectomizadas com a administração de estilbeno e seus derivados. Porém, o interesse científico por tais substâncias é recente. Assim, foi somente a partir da década de 1990, que a constatação do aumento da detecção de anomalias na saúde humana e de animais, bem como a suspeita de que estas alterações poderiam estar relacionadas à ação de substâncias moduladoras do sistema endócrino que fizeram com que houvesse um aumento nas

pesquisas sobre o efeito de substâncias químicas que possuíssem efeitos deletérios na função endócrina.

Neste sentido, uma busca na literatura revela que desde então, vários artigos científicos vêm mostrando que os DEs afetam diferentes espécies animais, sejam estas invertebradas ou vertebradas. Assim, por exemplo, em uma destas pesquisas, verificou-se que jacarés jovens apresentaram baixa concentração de testosterona e redução no tamanho do pênis, efeitos esses que, acredita-se estejam relacionados à exposição a substâncias estrogênicas e antiandrógenicas (GUILLETTE et al., 1996, 1999; MILNES et al., 2002). De fato, numa destas pesquisas Guillette et al. (1999) verificaram níveis elevados de o 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-cloro-fenil) etano (DDT) nesses animais resultante de contaminação ambiental.

Também, são conhecidos os efeitos adversos dos DEs para pássaros. Desta maneira, sabe-se a diferenciação do sistema reprodutor destes animais é dependente de estrógeno (FRY, 1995); portanto, a exposição de aves a substâncias estrogênicas é bastante crítica. De fato, a exposição a organoclorados e bifenilas policloradas resultam em anomalias em embriões machos e fêmeas como, por exemplo, a feminilização dos machos. Estas alterações são observadas em áreas com elevados índices de contaminação por estes compostos (FRY, 1995).

Organismos aquáticos invertebrados também são afetados por DEs. Desta maneira, verificou-se que resíduos de tributileno e trifenilestano, oriundos da tinta dos cascos de embarcações promoveram o desenvolvimento de órgãos masculinos em fêmeas de moluscos (caramujos e lesmas). Estes compostos interferem na síntese de testosterona, causando um incremento na sua produção em fêmeas. Esta alteração, chamada de *imposex* (imposição sexual) é irreversível e provoca a esterilização dos animais (GIBBS; BRYAN, 1994). No Brasil, este fenômeno foi descrito no litoral do Rio de Janeiro e Ceará, em regiões próximas a portos e marinas (FERNANDEZ et al., 2002).

Os relatos de maior notoriedade envolvendo DEs foram aqueles relacionados ao praguicida DDT e a substância estrogênica sintética dietilestilbestrol. Assim, em 1938, Paul Muller anunciou a síntese química de um composto organoclorado, o DDT, com o qual ganhou o Prêmio Nobel de Medicina em 1948, pela descoberta deste “praguicida milagroso” (COLBORN et al., 2002). A partir de então o DDT passou a ser utilizado em larga escala no mundo inteiro, principalmente nas décadas

de 1950 e 1960. No entanto, foi no início da década de 1960, quando a bióloga marinha Rachel Carson publicou o livro *Primavera Silenciosa* (CARSON, 1962), que houve um despertar da comunidade científica sobre os perigos da contaminação ambiental pelo DDT. Neste livro, foram evidenciados os efeitos negativos, da exposição ao DDT em animais, como falhas no processo reprodutivo e o declínio de algumas populações. Diversas pesquisas subsequentes comprovaram a persistência no meio ambiente do DDT, bem como a sua atividade estrogênica, acarretando em grandes distúrbios do sistema reprodutor de mamíferos e pássaros (US. EPA, 1997). Portanto, a partir da obra de Carson (1962), os governos de diversos países adotaram medidas restritivas ao uso de pesticidas organoclorados proibindo o seu emprego e fabricação, face aos riscos de contaminação do ambiente (BAIRD, 2002); no entanto, deve-se considerar que ainda nos dias de hoje, é utilizado em alguns países (MNIF et al., 2011). No Brasil, o DDT teve sua retirada do mercado em duas etapas: em 1985, teve sua autorização cancelada para uso agrícola; e em 1998, foi proibido para uso em campanhas de saúde pública. Porém, só em 2009 o DDT teve sua fabricação, importação, exportação, manutenção em estoque, comercialização e uso proibidos pela Lei n.º 11.936 de 14 de maio de 2009.

Já o dietilestilbestrol foi utilizado como um potente estrogênio sintético, com o objetivo de evitar o aborto e estimular o crescimento fetal em mulheres gestantes, entre os anos de 1948 a 1970. Posteriormente, descobriu-se que crianças, cujas mães fizeram uso deste composto estrogênico, ao atingir a puberdade, apresentavam disfunção no sistema reprodutivo, redução na fertilidade, gestação anormal, alterações imunológicas e, em alguns casos, câncer vaginal (COLBORN et al., 1993). Atualmente, sabe-se que uma fase bastante crítica à exposição aos DEs é justamente o período gestacional; ainda, vários estudos sugerem que substâncias DEs, podem apresentar efeitos duradouros no sistema reprodutor após exposição *in utero* (US. EPA, 1997).

Os DEs podem interferir com o funcionamento do sistema endócrino de três formas: (1) mimetizando a ação de um hormônio endógeno, como o estrogênio ou a testosterona, afetando as funções que esses hormônios controlam; (2) bloqueando os receptores hormonais nas células, impedindo assim a ação dos hormônios naturais; (3) alterando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando assim as concentrações dos hormônios naturais no corpo

(CREWS et al., 2000). Gerando desta forma, déficits funcionais no sistema endócrino que, inevitavelmente, rompem funções fisiológicas de hormônios endógenos (HEINDEL, 2005; WARING; HARRIS, 2005; TABB; BLUMBERG, 2006).

1.1 SOBRE O BISFENOL A

Entre os diferentes DEs um exemplo clássico é o bisfenol A (BPA), um monômero de plásticos e resina-epoxi, amplamente empregado na fabricação de latas de alimentos, bebidas, mamadeira, selante dental entre outros (STAPLES et al., 1998). Sabe-se que baixos níveis de BPA podem lixiviar das embalagens nas quais ele é utilizado para fabricação e acabam contaminando seu conteúdo (BILES et al., 1997). O BPA tem demonstrado, tanto em experimentos *in vitro* como também *in vivo*, agir como um DE com ação estrogênica (KRISHNAN et al., 1993; WELSHONS et al., 2003; VOM SAAL; HUGHES, 2005). Ainda, similarmente a outros estrógenos, o BPA pode ligar-se a receptores androgênicos e inibir a ação destes hormônios (LEE et al., 2003).

A grande maioria dos estudos, verificando-se os efeitos tóxicos do BPA sobre o sistema reprodutor, foi realizada empregando-se ratos como modelo animal e estes revelam várias alterações como: diminuição na produção espermática e da fertilidade (SAKAUE et al., 2001), na concentração espermática epididimal, do peso dos testículos e vesículas seminais (AL-HIYASAT; DARMANI; ELBETIEHA, 2002) e, ainda, alterações hormonais como diminuição das concentrações séricas de testosterona (TAKAO et al., 1999) e do hormônio luteinizante (LH) (AKINGBEMI et al., 2004).

Da mesma forma, os efeitos da exposição *in utero* ao BPA já foram avaliados. Estudos mostraram que roedores, machos, provenientes de mães expostas ao BPA durante o período gestacional, apresentam menor potencial reprodutivo (KAWAI et al., 2003; TAINAKA et al., 2012) e diminuição da produção diária de espermatozoide (VOM SAAL et al., 1998).

Estudo *in vitro*, utilizando testículo de bodes imaturos, mostrou que o BPA pode provocar alterações morfológicas em células de Sertoli (ANDRIANA et al., 2004) o que permite fortemente sugerir que o BPA pode ser um potencial DE para animais de produção. Assim, na presente pesquisa, decidiu-se utilizar esta substância como “controle positivo”.

Atualmente, os estudos relativos à avaliação da interferência dos DEs, seja durante o período pré-natal como pós-natal, concentram-se basicamente em roedores. Assim, são escassas as pesquisas envolvendo os efeitos de DEs em animais de produção e menos ainda em herbívoros ruminantes (ANDRIANA et al., 2004; PAUL et al., 2005; BELLINGHAM et al., 2012). No entanto, deve-se considerar que os animais de produção são expostos constantemente a diversas substâncias que podem atuar como DEs, especialmente aquelas utilizadas em larga escala na agricultura e que acabam se tornando contaminantes ambientais como, por exemplo, o vinclozolin, a atrazina ou mesmo os organoclorados (RHIND et al., 2010, MNIF et al., 2011).

1.2 SOBRE A *Ipomoea carnea*

A *Ipomoea carnea* (*I. carnea*) Jacq. Spp. *fistulosa* (Choisy) D. F. Austin é uma planta tóxica perene pertencente à família Convolvulaceae (Figura 1), que possui as seguintes características botânicas: “é uma planta arbustiva de porte ereto, com altura entre 1 a 3 metros, com caule glabro, oco e pouco ramificado por onde corre a seiva de aspecto leitoso. Suas folhas glabras, alternadas, são longo-pecioladas, com medidas variando entre 10 e 30 centímetros de comprimento e 5 e 15 centímetros de largura. A sua inflorescência é axilar, em cimeiras, com flores abundantes sustentadas por longo pedúnculo. Sua multiplicação ocorre naturalmente por dispersão de sementes, que são ovóides-cuneiformes de superfície pouco áspera (8-10 milímetros de comprimento); porém, coberta de pelos ferrugíneos. De fácil multiplicação, podendo ser cultivada através do plantio da semente ou com o

emprego da técnica de estaqueamento, na qual o caule da planta é enterrado” (HOEHNE, 1939; LORENZI, 1991).

A *I. carnea* é encontrada não só no Brasil como também em outros países tropicais, tanto na América (AUSTIN; HUAMAN, 1996), como na África (GONÇALVES, 1987). No território nacional possui ampla distribuição ocorrendo em maior quantidade na Amazônia, no Pantanal e de uma forma muito particular na região Nordeste, principalmente no vale do São Francisco e no sul do Piauí, onde é uma das poucas plantas que se conserva verde durante o período da seca (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). Dependendo da região onde se encontra pode receber diferentes nomes vulgares; assim, no Nordeste é chamada de “canudo” ou “algodão bravo”, na Amazônia por “manjorana” e no Mato Grosso do Sul como “algodão-do-pantanal” ou “algodão-do-brejo”. Podendo ter ainda outras denominações como “mata-pinto”, “salsa-branca” e “campainha-de-canudo” (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1960; TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

Esta planta possui como particularidade a resistência a longos períodos de seca permanecendo verde durante todo o ano, tornando-se assim, extremamente importante do ponto de vista toxicológico, pois durante a seca, período em que há escassez de pastagem, a mesma passa a ser fonte de matéria verde aos animais de produção, momento no qual ocorrem os surtos de intoxicação (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). Em condições naturais se intoxicam diferentes espécies animais, como bovinos, ovinos e, particularmente os caprinos, sendo esta a espécie mais susceptível a forma clínica da toxicose (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). A intoxicação é de caráter crônico promovendo nos animais de produção perda de peso, apatia e alterações nervosas de origem cerebelar, como paresia dos membros posteriores, tremores de cabeça, dismetria, decúbito esternal e, eventualmente, pode levar a morte por inanição (HOEHNE, 1939; DAMIR; ADAM; TARTOUR, 1987; SRILATHA, 1997; TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; SCHUMAHER-HENRIQUE et al., 2003). Em particular, os caprinos intoxicados pela planta manifestam alterações nervosas bastante acentuadas (BRANDÃO et al., 1989; DE BALOGH et al., 1999; SCHUMAHER-HENRIQUE et al., 2003).

Figura1 - *Ipomea carnea*

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013.

Histopatologicamente, diversos estudos mostram que as principais alterações produzidas pela *I. carnea*, na espécie caprina, ocorrem ao nível do sistema nervoso central (SNC), onde são verificadas vacuolização de neurônios e das células da glia em associação com esferóide axonal e, ainda, a perda das células de Purkinje (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1960; DAMIR; ADAM; TARTOUR, 1987; TIRKEY et al., 1987; SRILATHA et al., 1997; DE BALOGH et al., 1999). Ainda esta mesma degeneração vacuolar é observada em outros órgãos como tireóide, fígado, pâncreas e rins (VAN KAMPEN; JAMES, 1970; SCHUMAHHER-HENRIQUE, 2005; ARMIÉN et al., 2007).

A *I. carnea* possui como princípios ativos tóxicos dois tipos distintos de alcaloides, o alcaloide indolizidínico: suainsonina e os alcaloides nortropânicos: calisteginas B₂ e C₁ (DE BALOGH et al., 1999).

A suainsonina não é observada exclusivamente na *I. carnea*, este alcaloide também é encontrado em outras plantas ao redor do mundo, responsáveis por quadros clínicos semelhantes. São exemplos as plantas do gênero *Astragalus*, *Oxytropis*, também conhecidas como *locoweeds*, as quais vêm causando grandes perdas na criação animal nos Estados Unidos (VAN KAMPEN; JAMES, 1970; JAMES; NIELSON, 1988), a *Swainsona canescens* (DORLING; HUXTABLE; VOGEL, 1978) e a *Ipomoea muelleri* (GARDINER; ROYCE; OLDROY, 1965) ambas originárias da Austrália.

A suainsonina atua inibindo duas enzimas celulares distintas. A primeira delas é a α -manosidase lisossomal, esta enzima é responsável pelo processamento de oligossacarídeos no interior dos lisossomos, com a sua inibição estes oligossacarídeos não processados passam a se acumular no interior da organela formando vacúolos que aumentam de tamanho levando a perda da função celular e no último estágio morte da célula. (TULSIANI et al., 1988; ELBEIN, 1989). A segunda enzima inibida pela suainsonina é a manosidase II do Complexo de Golgi, esta enzima é responsável pelo processo de glicosilação de glicoproteínas, cabendo a esta manosidase remover ou alterar os padrões de resíduos de manose de glicoproteínas recém-sintetizadas pelo retículo endoplasmático rugoso. Assim, sua inibição resulta na formação de glicoproteínas defeituosas (TULSIANI; TOUSTER, 1982); inúmeras macromoléculas de grande importância biológica são glicoproteínas, entre elas: hormônios, moléculas de adesão e receptores de membrana (STEGELMEIER et al., 1998). Desta forma, os efeitos tóxicos da suainsonina, além de alterações no SNC, também podem comprometer funções endócrinas (STEGELMEIER et al., 1994; TAYLOR; STRICKAND, 1998), reprodutivas (PANTER; JAMES; HARTLEY, 1989), imunes (KARASUNO et al., 1992; HUEZA; GÓRNIK, 2011), embriogênicas (NELSON et al., 1980), gastrointestinal (PAN et al., 1993) e renal (HUXTABLE; DORLING, 1983).

Em relação aos alcaloides nortropânicos: as calisteginas B₂ e C₁, isolados das folhas de *I. carnea* por De Balogh et al. (1999) pouco se sabe a respeito de suas atividades biológicas e o seu papel nos quadros de intoxicação, estudos *in vitro*

mostram que estes inibem a β -glicosidase e α - e β -galactosidases (ASANO et al., 1995). Sugere-se que a presença destes alcalóides pode produzir a exacerbação do efeito tóxico da suainsonina. Posteriormente, Haraguchi et al. (2003) isolaram, ainda nesta planta, as calisteginas B1 e B3; no entanto, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos biológicos destes alcaloides nortropânicos.

Assim, em nossa dissertação de mestrado propusemos estudar os efeitos teratogênicos da *I. carnea* em caprinos. Para tanto, acrescentamos ao protocolo de avaliação de teratogenicidade em caprinos desenvolvido neste laboratório (SOTO-BLANCO; GÓRNIK, 2004; SCHUMACHER-HENRIQUE, 2005; BARBOSA-FERREIRA, 2008) a avaliação neurocomportamental dos neonatos.

Este estudo deixou claro o potencial toxicológico reprodutivo da *I. carnea*. Assim, as fêmeas gestantes apresentaram aborto, morte fetal e natimortos mesmo quando expostas a baixas doses da planta e na ausência da sintomatologia neurológica clássica de intoxicação. Ainda, estas mesmas fêmeas, apresentavam alterações comportamentais logo após o parto que poderiam comprometer a sobrevivência do neonato. Da mesma forma, os filhotes cujas mães ingeriram a planta durante a gestação apresentaram alterações importantes. Foram observadas alterações morfológicas como antrogrípse e retrognatismo e alterações neurofuncionais suficientes para comprometer a sua sobrevivência (GOTARDO et al., 2011, 2012). Ainda, estes mesmos estudos realizados permitiram propor protocolos para diagnóstico de teratogenicidade e avaliação neuroteratogenicidade em ruminantes.

Porém, até o momento não se sabe se estes transtornos reprodutivos decorrentes a ingestão da *I. carnea* por caprinos estão relacionados apenas a alterações em fêmeas gestantes ou se machos (reprodutores) também podem sofrer alterações no trato reprodutivo ou mesmo em seus níveis hormonais que possam comprometer o seu desempenho reprodutivo. Da mesma forma, desconhece-se se filhotes machos, cujas mães tenham ingerido a planta durante a gestação, podem apresentar déficits reprodutivos e/ou hormonais quando adultos.

Portanto, considerando a grande possibilidade de ruminantes estarem expostos aos diferentes DEs e o potencial risco desta exposição comprometer significativamente o desempenho reprodutivo destes animais, foi objetivo deste trabalho verificar se o BPA, um DE clássico poderia acarretar estas mesmas

alterações, já avaliadas em roedores, agora em ruminantes. Além disso, e considerando que não existem dados na literatura que correlacionem alterações reprodutivas ou mesmo hormonais em animais de produção expostos à fitotoxinas durante o período perinatal, foi outro objetivo desta pesquisa avaliar se as toxinas presentes na *I. carnea* podem romper com funções endócrinas e/ou reprodutivas em animais de produção.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Iniciar o desenvolvimento de um protocolo para avaliação de possíveis efeitos DEs de xenobióticos, em ruminantes machos, utilizando-se para tal a espécie caprina. Avaliar a possível ação de fitotoxinas como DE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar, em caprinos machos púberes, expostos ao BPA ou *I.carnea* o perfil hormonal e bioquímico, os padrões andrológicos e as possíveis lesões no epitélio testicular e epididimal;
- ✓ Avaliar, em caprinos machos púberes, expostos ao BPA ou *I.carnea in utero* o perfil hormonal e bioquímico, os padrões andrológicos e as possíveis lesões no epitélio testicular e epididimal.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

São descritos abaixo os diferentes materiais e métodos empregados na realização desta Tese.

3.1 ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizadas cabras, nulíparas, puras de origem da raça pardo alpina, com idade aproximada de 18 meses e ao redor de 45 kg de peso corporal. Caprinos machos, púberes da mesma raça, com idade aproximada de 15 meses e peso ao redor de 40 kg no início do experimento. Ainda, empregou-se um reprodutor, da mesma raça, com 5 anos e pesando 70 Kg.

As cabras e os bodes púberes foram alojados em baias coletivas, enquanto que o reprodutor foi mantido em baia individual, nas instalações do CEPTOX do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Campus Administrativo de Pirassununga.

Os animais receberam água *ad libitum* e, como alimento, cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.), suplementação mineral *ad libitum*, além de ração comercial, a qual foi produzida no próprio Campus Administrativo de Pirassununga. A quantidade diária de ração administrada foi de 1,5% do peso vivo.

3.2 MATÉRIA VEGETAL (*I. carnea*)

Foi realizado o plantio da *I. carnea* com a técnica de estaqueamento em uma área de 1.500 m² nas instalações do CEPTOX – FMVZ/USP, campus Administrativo de Pirassununga (Figura 2).

Após este procedimento, procedeu-se à irrigação desta área, duas vezes por semana, por aspersão.

Figura 2 - Canteiro de *I. carnea* após 90 dias do seu plantio

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013.

3.3 BISFENOL A

Foi utilizado o BPA 99% (Sigma-Aldrich[®]) na forma de pó.

3.4 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

- Álcool 70% (Dinamica[®]);
- Agulha hipodérmica 25x0,80mm (BD[®]);
- Balança digital (Marte[®] LC 200);
- Banho Maria (Prolab[®]);
- Cabo de bisturi n° 4 (Erwin Guth[®]);
- Câmara de Neubaer;
- Centrífuga (Eppendorf[®] 5810R);
- Citrato tri- sódio (Dinamica[®]);

- Diluidor de sêmen comercial para ruminantes sem crioprotetor Botu-Bov[®] (Botupharma);
- Eletroejaculador (DUBOI[®]) acoplado a sonda de caprinos/ovinos;
- Estetoscópio (BD[®]);
- Fio de nylon 0 (Technofio[®]);
- Fixador de Bouin (Merk[®]);
- Frutose (Dinamica[®]);
- Funil plástico de 250 ml;
- Gel para ultra-som (BioGel[®]);
- Hematoxilina e eosina (HE);
- Lâmina e lamínula (Glasstechica[®]);
- Lâmina para bisturi descartável nº 24 (Solidor[®]);
- Luvas de látex para procedimento (Sempremed[®]);
- Magpix[®] (Luminex);
- Máquina de tosquia (Golden A-5 Clipper - Oster[®]) provida de lâmina 40;
- Microcubo (Axygen[®]);
- Microscópio óptico de contraste de fase (Nikon[®]);
- Microscópio óptico de luz (Olympus[®]);
- Micrótomo (Leica[®], LM 2435);
- Parafina;
- Placa aquecedora (Marconi[®]);
- Pipeta e ponteiras (Eppendorf[®]);
- Proveta graduada;
- Seringa 10mL descartável (BD[®]);
- Sistema Bioquímico Automático (Celm[®]- SAB-200);
- Termômetro (Accumed[®]).
- Thorne Research Mobility Analyses modelo HTM-IVOS (Hamilton Thorne Biosciences[®]);
- Tintura de iodo 10% (Vansil[®]);
- Tubo de ensaio;
- Tubo falcon de 15 mL (Corning[®]);

- Ultrassom Pie Medical[®] (Falco 100 vet), com transdutor linear de 6,0-8,0MHz.

3.5 KITS PARA AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HORMONAL

- Para dosagem enzimática de fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase - GGT (Merck[®]);
- Para dosagem de glicose, colesterol, creatinina, ureia, albumina, proteína total (Celm[®]);
- Para dosagem de Cortisol, triiodotironina (T3), tiroxina (T4), testosterona e hormônio luteinizante (LH) foram utilizados kits comerciais Coat-A-Count[®] (Siemens).
- Para dosagem de cortisol, T3 e T4 foram utilizados kits comerciais MAP Steroid/*Thyroid Hormone Magnetic Bead Panel* (Milliplex[®])

3.6 FÁRMACOS

- Clorprostenol sódico – análogo sintético da prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$ - Ciosin[®])
- Esponja de acetato com 60mg de medroxiprogesterona (MAP[®]-Syntex S.A.);
- Lidocaína (Anestésico L[®] Pearson);
- Preparação altamente purificada de gonadotrofina coriônica de égua gestante (PMSG) + gonadotrofina coriônica equina (eCG) – (Norvormon[®]);
- Repelente (Tanidil[®]).
- Doramectina (Dectomax[®])

3.7 PROCEDIMENTOS

São apresentados os diferentes procedimentos realizados, divididos em tópicos, para melhor compreensão, sendo os mesmos aprovados pela comissão de bioética da FMVZ/USP, protocolado com o numero 1748/2009.

3.7.1 Exames laboratoriais

Todas as cabras foram submetidas a exames laboratoriais para a confirmação da sanidade das mesmas, para tanto realizou-se exames sorológicos 45 dias antes do início do experimento, para determinar a possível titulação para *Mycoplasma* spp., *Brucella* spp., *Toxoplasma* spp. e *Leptospira* spp., certificando-se que todos estes animais estavam livres destes agentes infecciosos.

As amostras de sangue foram coletadas dos animais e enviadas para os seguintes laboratórios:

- Instituto Biológico de São Paulo, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução, para diagnóstico de *Brucella* spp.;
- FMVZ/USP, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Laboratório de Zoonoses Bacterianas para diagnóstico de *Leptospira* spp.;
- FMVZ/USP, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Laboratório de Doenças Parasitárias, para diagnóstico de *Toxoplasma* spp.;
- Instituto de Ciências Biológicas – USP, Laboratório de Mycoplasma, para diagnóstico de *Mycoplasma* spp.

Também foi realizado o exame coproparasitológico das cabras, dos bodes púberes e do reprodutor. As contagens de ovos de nematóides por grama de fezes

(OPG) foram realizadas em câmara de McMaster conforme a técnica preconizada por Hitloch (1948), no laboratório do CEPTOX.

3.7.2 Distribuição dos caprinos machos púberes nos tratamentos experimentais

Previamente ao início do experimento, os animais foram avaliados de acordo com sua capacidade reprodutiva em duas oportunidades. Com base nas avaliações de presença de defeitos espermáticos maiores, defeitos menores e motilidade. Foi calculada a média para cada uma destas características, por animal. Os animais foram então classificados segundo um índice (nota), o qual foi calculado através da seguinte fórmula (GARCIA, 2004):

$\text{NOTA DO CAPRINO} = (3 \times \text{TDMA}) + (2 \times \text{TDME}) + (1 \times \text{IM})$

Onde:

TDMA: Total de defeitos maiores;

TDME: Total de defeitos menores;

IM: Inverso da motilidade.

Com base na média das notas das duas colheitas anteriores ao início do experimento, cada animal foi distribuído nos grupos experimentais de modo que as médias das notas dos grupos fossem as mais semelhantes possíveis, para que se obtivessem grupos homogêneos. A saber, grupo controle (C), grupo bisfenol A (BPA), grupo *I. carnea* (IC), como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos animais segundo nota obtida em índice pré-estabelecido e distribuição dos animais nos grupos experimentais

Bode	TDMA ⁽⁻¹⁴⁾	TDMA ⁽⁻⁷⁾	TDME ⁽⁻¹⁴⁾	TDME ⁽⁻⁷⁾	IM ⁽⁻¹⁴⁾	IM ⁽⁻⁷⁾	Nota	Grupo
540	0	0	0	1	60	22	42	C
543	3	2	2	1	38	64	64	C
545	2	2	3	9	43	43	61,5	C
562	1	2	1	4	43	64	61	C
563	3	2	1	8	34	61	63	C
Média	-	-	-	-	-	-	58,3	C
501	2	1	3	4	79	57	79,5	IC
512	2	1	2	4	67	31	59,5	IC
514	0	1	0	2	26	54	43,5	IC
522	1	1	0	1	41	73	61	IC
535	1	0	1	2	37	52	49	IC
564	2	3	1	3	39	52	57	IC
Média	-	-	-	-	-	-	58,25	IC
510	0	1	4	3	41	63	60,5	BPA
524	0	2	0	1	38	51	48,5	BPA
525	2	0	0	4	69	36	59,5	BPA
531	1	6	2	6	41	54	66	BPA
537	2	2	2	0	32	47	47,5	BPA
538	2	1	3	1	48	71	68	BPA
Média	-	-	-	-	-	-	58,33	BPA

TDMA⁽⁻¹⁴⁾: total de defeitos maiores D-14 (14 dias antes do início do experimento).

TDMA⁽⁻⁷⁾: total de defeitos maiores em D-7 (7 dias antes do início do experimento).

TDME⁽⁻¹⁴⁾: total de defeitos menores em D-14.

TDME⁽⁻⁷⁾: total de defeitos menores em D-7.

IM⁽⁻¹⁴⁾: inverso da motilidade em D-14.

IM⁽⁻⁷⁾: inverso da motilidade em D-7.

Nota: média da nota atribuída a cada animal em D-7 e D -14, calculada através da fórmula (3 x TDMA) + (2 x TDME) + (1 x IM).

Grupo: distribuição dos animais em diferentes grupos, para efeito de tratamento experimental onde: C: Grupo Controle; BPA: Grupo Bisfenol A; IC: Grupo *Ipomoea carnea*.

3.7.3 Avaliação clínica e do ganho de peso

Os animais foram, semanalmente, submetidos à avaliação clínica e do ganho de peso no período matutino, sempre entre 8:00 e 9:00h, sendo aferidas a temperatura corpórea, coloração de mucosas, as frequências cardíaca e respiratória, os movimentos ruminais e avaliados os órgãos genitais.

3.7.4 Indução do estro por esponjas impregnadas com progestágeno

Para se ter uma homogeneidade no período gestacional, as cabras receberam tratamento hormonal para a indução do estro. Para tanto, foi empregado o procedimento proposto por Traldi (1994), que utiliza uma esponja impregnada com 60mg de acetato de medroxiprogesterona, que é introduzida na vagina da fêmea, com auxílio de um tubo guia (Figuras 3 e 4) que permaneceu no seu interior por 10 dias. Dois dias antes do final deste tratamento (dia 8), procedeu-se a administração intramuscular de 250 UI (1,0 ml) por animal de eCG e 0,3 ml de PGF₂ α , para promover o crescimento folicular. No 10º dia procedeu-se a retirada da esponja e após cerca de 20 h (24-48 horas) as cabras manifestaram estro, sendo cobertas pelo reprodutor.

Figura 3 - Colocação da esponja, impregnada com acetato de medroxiprogesterona no tubo guia para introdução na vagina das cabras

Fonte: GOTARDO, A. T., 2009

Figura 4 - Aplicação da esponja, impregnada com acetato de medroxiprogesterona, no interior da vagina das cabras, com auxílio do tubo guia

Fonte: GOTARDO, A. T., 2009

3.7.5 Acasalamento

As cabras foram fecundadas por meio de monta natural (Figura 5). Todas as fêmeas foram cobertas pelo mesmo reprodutor, sendo permitido até 4 coberturas/dia, para que não houvesse redução da fertilidade do macho.

As cabras que foram cobertas até às 11 horas da manhã, tiveram este dia considerado com dia 1 da prenhez; aquelas cabras que foram cobertas após esse horário, este dia foi considerado como dia 0 da prenhez. Este esquema foi adotado para não haver um número excessivo de animais submetidos à avaliação ultrassonográfica no mesmo dia.

Figura 5 - Monta natural de caprinos após a fêmea ser submetida à indução de estro.

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

3.7.6 Avaliação ultrassonográfica para diagnóstico de gestação

A detecção de gestação foi feita pela avaliação ultrassonográfica, via transretal, realizada a cada 24 horas do 24º ao 27º dia após a cobertura. Foi empregado o aparelho de ultrassom, adaptando-se um tubo de policloreto de vinila (PVC) ao transdutor para servir de extensor e apoio, facilitando, assim, sua manipulação transretal. A fixação ao transdutor foi feita com fita adesiva elástica, que permitiu a sua fixação adequada, evitando traumatismos no esfíncter anal (CHALOUB, 2000).

Para a realização da avaliação ultrassonográfica, por via transretal, a cabra foi contida em estação. Em seguida, foi aplicado gel para ultrassom no esfíncter anal para lubrificar e facilitar o subsequente esvaziamento do conteúdo fecal da parte final do reto. A seguir, o gel foi colocado sobre o transdutor, que foi introduzido no reto até que se pudesse visualizar os cornos uterinos. Nesse momento, o transdutor foi girado em um ângulo de 90 graus no sentido horário e 180 graus no sentido oposto até que todo trato reprodutivo da fêmea pudesse ser explorado (SCHRICK, 1993).

A confirmação da gestação foi evidenciada (CHALOUB, 2000) pela presença de líquido no útero, caracterizada pela visualização de áreas anecogênicas próximas à bexiga urinária e pela presença da vesícula embrionária, caracterizada pelo acúmulo de fluido embrionário anecogênico de forma arredondada ou alongada bem delimitada e pela detecção do embrião no interior da vesícula embrionária, que foi caracterizado pelo surgimento de um ponto ecogênico próximo à parede uterina (Figura 6).

Figura 6 - Sonograma para confirmação de gestação no 27º dia pós cobertura. Vesícula embrionária (contorno vermelho); embrião (seta amarela); bexiga urinaria (contorno amarelo)

Fonte: GOTARDO, A. T., 2009

3.7.7 Administração do bisfenol A

O BPA foi administrado aos animais do grupo experimental na concentração de 25 mg/Kg/dia. O BPA foi administrado individualmente de manhã junto a ração e, posteriormente, foi observado se houve a ingestão da mistura na quantidade desejada, para tal, cada animal foi mantido preso em seu respectivo cocho (Figura 7).

Figura 7 - Caprino recebendo no cocho o BPA, individualmente

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

3.7.8 Administração de *I. carnea*

Foram administradas folhas recém-colhidas e trituradas da *I. carnea* aos animais do grupo experimental na concentração de 5g/ kg/dia. A folha foi administrada de manhã e, posteriormente, foi observado se houve a ingestão da *I. carnea* na quantidade desejada. Para administração, os animais foram mantidos presos, individualmente, em seu respectivo cocho, até o momento em que a planta fosse ingerida na quantidade determinada para cada animal (Figura 8).

Figura 8 - Caprino recebendo no cocho a *I. Carnea*, individualmente.

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

3.7.9 Coleta de sangue

O sangue dos caprinos foi coletado por punção da veia jugular (Figura 9). A coleta foi realizada com seringas sem anticoagulante para obtenção do soro. Este material foi usado para dosagem de enzimas, componentes sanguíneos, e hormônios empregando-se kits comerciais específicos.

Figura 9 - Coleta de sangue de caprino por punção de veia jugular

Fonte: GOTARDO, A. T., 2009

3.7.10 Dosagem de enzimas e componentes sanguíneos

O soro obtido das coletas de sangue dos animais foi usado para realização da dosagem dos níveis séricos de glicose, colesterol, creatinina, ureia, albumina, proteína total, FA, AST e gama GGT empregando-se kits comerciais específicos e analisador automático de bioquímica.

3.7.11 Avaliação hormonal

As dosagens hormonais foram realizadas por duas técnicas distintas descritas a seguir.

3.7.11.1 Radioimunoensaio

Os ensaios para dosagens hormonais utilizando-se a técnica de radioimunoensaio (RIA), foram executados no Laboratório de Endocrinologia Animal da Universidade Estadual Paulista de Araçatuba¹. Para isso, foram utilizados conjuntos de reagentes comerciais, desenvolvidos para avaliação quantitativa dos hormônios: cortisol, LH, testosterona, T3 e T4 sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação valendo-se do I¹²⁵, como elemento radiativo traçador. O ensaio foi realizado com amostras em duplicata, sendo considerado o valor médio de cada uma.

O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio do cortisol foi de 9,19% para o controle alto e de 1,35% para o controle baixo e a sensibilidade dos ensaios de cortisol foi de 0,076 ng/ml. Para a testosterona, o CV intra-ensaio foi de 1,85 para o controle alto e de 0,62% para o controle baixo; a sensibilidade dos ensaios de testosterona foi de 1,952 ng/dl. Para T3, o CV intra-ensaio foi de 6,47% para o controle alto e de 1,19% para o controle baixo ; a sensibilidade dos ensaios de T3 foi de 3,55 ng/dl. Para T4, o CV intra-ensaio foi de 11,84% para o controle alto e de 0,10% para o controle baixo; a sensibilidade dos ensaios de T4 foi de 0,052 ng/ml. Para LH, o CV intra-ensaio foi de 13,51% para o controle alto e de 2,10% para o controle baixo ; a sensibilidade dos ensaios foi de 0,062 ng/ml

3.7.11.2 Imunoensaio com base em esferas magnéticas fluorescentes

Foi executado ensaio para dosagem hormonal com o auxílio da plataforma MAGPIX[®] (Luminex xMAP) –. Utilizado kit de reagente comercial, para avaliação dos hormônios: cortisol, T3 e T4 (EMD Millipore's MILLIPLEX[®] MAP multi species Steroid/Thyroid Hormone panel). Previamente a realização da análise foi realizada a extração química da amostra por precipitação com acetonitrila.

O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio do cortisol foi de 31,32% para o

¹ Laboratório de Endocrinologia Animal pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista de Araçatuba. Professor responsável: Dr^o Guilherme de Paula Nogueira

controle alto e de 2,08% para o controle baixo e a sensibilidade dos ensaios de cortisol foi de 0,02 ng/ml. Para T3, o CV intra-ensaio foi de 7,32% para o controle alto e de 0,054% para o controle baixo; a sensibilidade dos ensaios foi de 0,04 ng/dl. Para T4, o CV intra-ensaio foi de 25,94% para o controle alto e de 0,90% para o controle baixo; a sensibilidade dos ensaios foi de 0,28 ng/ml.

3.7.12 Avaliação de anomalias e/ou malformações dos filhotes após o nascimento

Imediatamente após o parto foi identificado o sexo e realizada a pesagem dos filhotes. Também foram realizados exames minuciosos para constatar a conformação e posicionamento de olhos, boca, crânio, mandíbula, membros anteriores e posteriores, cauda e pele, além da presença de perfuração anal, para pesquisa de possíveis malformações e/ou anomalias externas (SZABO, 1989).

3.7.13 Avaliação andrológica

São descritos abaixo as diferentes avaliações reprodutivas realizadas nos caprinos machos.

3.7.13.1 Mensuração do perímetro escrotal e da consistência testicular.

Os bodes tiveram o perímetro escrotal mensurado antes de cada colheita de sêmen. Para tal, foi usada fita específica para a finalidade, dotada de escala em centímetros e subdivisões em milímetros. Neste momento, também foi aferida a consistência testicular por palpação, de acordo com as prerrogativas para exame andrológico (CBRA, 1998) (Figura 10). A consistência testicular foi classificada em

escala de 1 (mais flácida) a 5 (mais firme) por dois observadores diferentes e o resultado médio registrado.

Figura 10 - Avaliação andrológica de bodes. Mensuração do perímetro escrotal (A) e da consistência testicular (B)

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

3.7.13.2 Colheita do sêmen

Previamente a colheita, foi realizada higienização externa do prepúcio com água e sabão neutro para evitar contaminação da amostra (Figura 11). O método empregado para colheita foi a eletroejaculação, conforme descrito por Mies Filho (1977) e ilustrado na figura 11. O critério estabelecido para o final da colheita foi de que cada animal tivesse ejaculado um volume mínimo de 0,5 ml. Após cada colheita, o sêmen foi imediatamente enviado ao Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia² (Figura 12).

² Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA), pertencente ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ/USP, Campus Administrativo de Pirassununga, Professor responsável: Drº Rubens Paes de Arruda.

Figura 11 - Avaliação andrológica de bodes. Higienização externa do prepúcio com água e sabão (A) e colheita de sêmen por eletroejaculação (B)

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

Figura 12 - Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

3.7.13.3 Determinação de volume do ejaculado.

O volume do ejaculado foi determinado no momento da colheita através de leitura direta em tubo graduado (mL), previamente aquecido a 37°C.

3.7.13.4 Avaliação da concentração espermática

Para determinação da concentração espermática, uma alíquota de 10µl de sêmen fresco foi diluído a 1:400 em solução de formol salino tamponado. A contagem das células foi realizada com o auxílio de câmara hematómica de Neubauer, sob microscopia óptica de luz, em aumento de 400x, sendo o resultado determinado em milhões de espermatozoides por mililitro.

3.7.13.5 Avaliação do motilidade, vigor e turbilhonamento

O sêmen recém coletado foi mantido em temperatura controlada e estável a 37°C em banho-maria e rapidamente avaliado quanto às características de motilidade, vigor e turbilhonamento das células espermáticas (CBRA, 1998). As análises foram sempre realizadas por um mesmo avaliador, em pelo menos três campos microscópicos distintos, de modo que a estimativa final foi dada em função da leitura do campo com as melhores características.

Para avaliação subjetiva da motilidade espermática, o sêmen fresco foi diluído para a concentração final de 30×10^6 espermatozoides/mL em diluidor comercial para ruminantes sem crioprotetor. Depois de diluído, uma amostra de 10µL foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. A análise foi realizada em microscopia óptica de luz em aumento de 100x. O resultado foi dado em função da proporção de células com movimento progressivo no melhor dos campos avaliados (em %).

O vigor espermático foi estimado concomitantemente à avaliação da motilidade. O resultado foi dado pela estimativa da força de movimentação progressiva individual das células móveis do ejaculado e sua classificação foi baseada em uma escala de 0 (ausente) a 5 (máxima).

Para avaliação do turbilhonamento, uma amostra de 10µL de sêmen fresco foi colocada sobre lâmina pré-aquecida a 37°C e a análise foi efetivada sem lamínula,

sob microscopia óptica de luz em aumento de 40x. O turbilhonamento das células foi classificado em escala que varia de 0 (movimento ausente) a 5 (máximo).

3.7.13.6 Análise da funcionalidade da membrana plasmática por teste de resistência osmótica

Para avaliação da funcionalidade da membrana plasmática, foi utilizado o teste de resistência osmótica segundo descrito por Fonseca et al. (2001) para caprinos. Foi feita uma solução hiposmótica a base de citrato tri-sódio e frutose, tendo uma concentração final de 125 mOsm/L. Foram colocados 10µL de sêmen em 1800 µL de solução hiposmótica e incubados à 37°C por 60 minutos. Posteriormente, uma alíquota da solução final foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x, sendo classificadas células com enrolamento de cauda e células com cauda reta. Para obter os resultados, foram retirados os valores das anormalidades morfológicas da cauda. O resultado final foi expresso em porcentagem de células com enrolamento de cauda. Determinando assim a porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente integras (MPI).

3.7.11.7 Avaliação da morfologia espermática.

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozoides, o sêmen foi diluído com 500 µL de formol salino tamponado a 5%. Foi preparada uma câmara úmida, com uma alíquota de 6µl sêmen diluído entre lâmina e lamínula, e a avaliação realizada pela contagem de 200 células em aumento de 1000x, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC).

A classificação das células segundo sua morfologia foi realizada conforme proposto por Blom (1973), agrupando as alterações morfológicas em defeitos maiores e defeitos menores.

Os defeitos maiores dos espermatozoides foram representados pelas seguintes alterações morfológicas: defeito de cabeça (subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, cauda enrolada na cabeça e contorno anormal da cabeça), defeitos de peça intermediária (fibrilação, fratura total, fratura parcial, edema e pseudogotas), defeitos de cauda (fortemente dobrada ou enrolada, dobrada com gota citoplasmática distal anexa), defeito do acrossomo, “*pouch formation*” e por ultimo, gota citoplasmática proximal. A somatória da ocorrência desses defeitos foi apresentada como “total de defeitos maiores” (em %).

Os defeitos menores dos espermatozoides foram representados pelas seguintes alterações morfológicas: defeitos de cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal, isolada normal), defeitos de implantação da cauda (abaxial, retroaxial, oblíqua), defeitos de cauda (dobrada, enrolada) e gota citoplasmática distal. A somatória da ocorrência desses defeitos foi apresentada como “total de defeitos menores” (em %).

O total de defeitos espermáticos foi dado pela somatória do total de defeitos maiores e do total de defeitos menores.

3.7.11.8 Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Para avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA – *Computer assisted sperm analysis*), inicialmente o sêmen foi diluído para a concentração final de 30×10^6 espermatozoides/mL em diluidor comercial para ruminantes sem crioprotetor. Uma amostra de 10 μ L do sêmen diluído foi colocada em câmara de leitura, a qual foi inserida no aparelho *Hamilton Thorne Research Motility Analyser* (HTM-IVOS) que captura a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador e envia os dados para um programa computacional (*Animal Motility*) responsável por realizar a análise, sendo ajustado o *setup* para

análise de sêmen caprino (Figura 13). Após a visualização de todos os campos, os 6 melhores foram selecionados para leitura e análise. As variáveis analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos flagelares (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

De acordo com Verstegen et al. (2002) os parâmetros reportados pelo CASA são:

- VCL ($\mu\text{m/s}$): velocidade da trajetória real do espermatozóide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade;
- VSL ($\mu\text{m/s}$): velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozóide. É sempre a mais baixa das três velocidades;
- VAP ($\mu\text{m/s}$): velocidade da trajetória média do espermatozóide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL;
- ALH (μm): amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo; assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização;
- BCF (Hz): número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF irá ser subestimada;
- STR (%): relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta;
- LIN (%): Relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de célula que tem index linear > 0.7 , ângulo absoluto menor que 25° e ângulo algébrico menor que 3° . Quanto mais o espermatozóide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade.

Figura 13 - Aparelho HTM-IVOS, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA. Utilizado para a avaliação computadorizada da motilidade espermática

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

3.7.14 Castração, coleta e pesagem dos testículos e epidídimos

Os animais foram castrados, mediante anestesia local, utilizando lidocaína associada a vasoconstritor (Figura 14). Após a castração foram coletados os testículos juntamente com os epidídimos. Procedeu-se à divulsão dos epidídimos do testículo seguida da pesagem de cada órgão separadamente, para cálculo do peso relativo (Figura 15).

Foram coletados fragmentos da região cranial, medial e caudal do testículo. Da mesma forma foram coletas a cabeça, corpo e cauda do epidídimo. As amostras foram fixadas em fixador de Bouin.

Figura 14 - Coleta de testículo e epidídimo de caprino. Procedimento anestésico (A) e castração (B)

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

Figura 15 - Testículo e epidídimo de caprino (A) e epidídimo após divulsão do testículo (B)

Fonte: GOTARDO, A. T., 2013

3.7.15 Processamento dos tecidos para avaliação histopatológica

Os fragmentos de testículo e epidídimo depois de fixados em Bouin foram desidratados, diafanizados e emblocados em parafina, a seguir este material foi cortado com 5µm de espessura em micrótomo e corado com hematoxilina-eosina (HE).

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

São apresentados os delineamentos experimentais realizados, divididos em tópicos para um melhor entendimento.

3.8.1 Avaliação dos efeitos tóxicos produzidos pelo BPA a ou pela *I. carnea* administrados a caprinos machos púberes

Foram utilizados 17 caprinos machos púberes, com idade aproximada de 15 meses (item 3.1). Previamente à realização do experimento, os animais passaram por exame coproparasitológico (item 3.7.1) e foram distribuídos de acordo com as suas características reprodutivas em três tratamentos experimentais, a saber: grupo controle (n=5); grupo BPA (n=6) e grupo *I. carnea* (IC, n=6) (item 3.7.2).

O período experimental foi de 120 dias sendo que durante este período os animais passaram por avaliações clínicas semanais e pesagens quinzenais, conforme descrito no item 3.7.3. Do dia zero ao 120º, os animais receberam, por via oral, o BPA (item 3.7.7) ou a *I. carnea* (item 3.7.8). Os caprinos pertencentes ao grupo controle não receberam nenhum tratamento. Coletou-se sangue dos animais nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 de experimento (item 3.7.9), sendo o soro armazenado em freezer para avaliação bioquímica, de componentes sanguíneos (item 3.7.10) e dosagem hormonal (item 3.7.11.1). Ainda, nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 de experimento, foi mensurado o perímetro escrotal e aferido a consistência testicular de cada animal, conforme descrito no item 3.7.13.1. Após tais mensurações foi realizada a colheita do sêmen por eletroejaculação, conforme descrito no item 3.7.13.2. Imediatamente após a colheita, a amostra de sêmen de cada animal foi avaliada quanto ao volume (item 3.7.13.3), concentração (item 3.7.13.4), motilidade, vigor e turbilhonamento (item 3.7.13.5). Ainda, foi realizada a análise da funcionalidade da membrana espermática por teste hiposmótico (item 3.7.13.6), da

morfologia espermática (item 3.7.13.7), e a avaliação computadorizada da motilidade espermática conforme apresentado no item 3.7.13.8.

Ao término do período experimental (121º dia), os bodes foram castrados, sendo os testículos e epidídimos coletados e pesados (item 3.7.14). Depois de fixados, os fragmentos de testículo e epidídimo foram processados para avaliação histopatológica conforme item 3.7.15.

3.8.2 Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição *in utero* de caprinos machos púberes ao BPA ou à *I. carnea*

Foram utilizadas 21 cabras nulíparas, com idade aproximada de 18 meses (item 3.1). Previamente à realização do experimento as fêmeas foram submetidas ao exame coproparasitológico e sorológico, conforme item 3.7.1. Semanalmente, estes animais passaram por avaliação clínica e de peso, conforme item 3.7.3. Após estes procedimentos, as cabras foram induzidas ao estro e cobertas, conforme os itens 3.7.4 e 3.7.5 respectivamente.

Entre os dias 24 e 27 pós-cobertura, as fêmeas foram submetidas aos exames ultrassonográficos, conforme item 3.7.6 para confirmação de gestação. Após serem diagnosticadas como prenhes, foram separadas em três grupos iguais (n=7): um controle e dois experimentais, sendo que as fêmeas dos diferentes grupos experimentais receberam o BPA (item 3.7.7) ou a *I. carnea* (item 3.7.8), diariamente, a partir do 27º dia de gestação até o momento do parto. Imediatamente após o parto, os recém-nascidos foram pesados e examinados quanto a possíveis malformações e/ou anomalias externas (item 3.7.12) permanecendo com suas respectivas mães até à desmame. No momento do desmame, os filhotes machos foram devidamente identificados e continuaram a ser avaliados clinicamente durante todas as semanas até ao redor do 15º mês de vida, conforme descrito no item 3.7.3.

Ao atingirem 15 meses de idade (púberes), previamente à realização das diferentes avaliações, os animais foram submetidos ao nivelamento biológico, no

qual os mesmos passaram por duas coletas de sêmen (item 3.7.13.2) com intervalo de sete dias. Após este procedimento, coletou-se o sangue destes animais (item 3.7.9) para dosagem de enzimas, componentes sanguíneos e hormônios, conforme apresentado nos itens 3.7.10 e 3.7.11.2, respectivamente. Foi também mensurado o perímetro escrotal e aferido a consistência testicular, conforme descrito no item 3.7.13.1; após tais mensurações realizou-se a colheita do sêmen por eletroejaculação (item 3.7.13.2). Imediatamente após a colheita, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume (item 3.7.13.3), concentração (item 3.7.13.4), motilidade, vigor e turbilhonamento (item 3.7.13.5). Ainda, foi realizada a análise da funcionalidade da membrana espermática (item 3.7.13.6), da morfologia espermática (item 3.7.13.7), e a avaliação computadorizada da motilidade espermática, conforme apresentado no item 3.7.13.8. Ao término da avaliação andrológica, os animais foram castrados sendo os testículos e epidídimos coletados e pesados (item 3.7.14). Depois de fixados os fragmentos de testículo e epidídimo foram processados para avaliação histopatológica, conforme descrito no item 3.7.15.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados na forma de médias seguidas por seus respectivos erros-padrão da média. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SAS (*Version 9.2, SAS Institute, Cary, NC*). A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

Os procedimentos estatísticos empregados são apresentados abaixo divididos de acordo com os delineamentos experimentais para facilitar o seu entendimento.

3.9.1 Procedimento estatístico empregado nos resultados do protocolo de avaliação dos efeitos tóxicos produzidos pelo BPA ou pela *I. carnea*, administrados a caprinos machos púberes

Os dados referentes ao ganho de peso, a análise bioquímica e de componentes sanguíneos (glicose, colesterol, creatinina, ureia, albumina, proteína total, FA, AST e GGT), a dosagem hormonal (cortisol, T3, T4, testosterona e LH) e as avaliações andrológicas (perímetro escrotal, consistência testicular, concentração espermática, integridade funcional de membrana, defeitos maiores, defeitos menores, total de defeitos, MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN) foram analisados por um modelo linear misto por procedimento *MIXED* (*PROC MIXED*), sendo cada animal determinado como uma unidade fixa, e os demais fatores como variáveis (WOLFINGER; CHANG, 1996). Foi aplicado um teste de variância ANOVA para verificar se havia interação significativa ($P < 0,05$) entre tratamento e tempo. A opção PDIFF foi utilizada para localizar as interações significantes (SAS, 2004).

Para avaliação dos dados referentes ao peso relativo dos testículos direito e esquerdo e dos epidídimos direito e esquerdo, foi realizado o teste de Bartlett, com o objetivo de verificar a homocedascidade dos dados (GAD; WEIL, 1989). Após comprovar que todos os dados eram paramétricos foi empregada a análise de variância ANOVA (SNEDCOR, 1946) para a comparação das médias entre os vários grupos. Para a detecção de diferenças significantes entre os grupos, foi utilizado como teste posterior à ANOVA o teste *post hoc* de Duncan. Para a análise da consistência testicular, aferida em escala, foi utilizando o teste de Cochran-Mantel-Haenszel (CMH)

3.9.2 Procedimento estatístico empregado nos resultados do protocolo de avaliação dos efeitos tóxicos da exposição *in utero* de caprinos machos púberes ao BPA ou a *I. carnea*

Para análise dos dados referentes ao peso, da avaliação bioquímica e de componentes sanguíneos (glicose, colesterol, creatinina, ureia, albumina, proteína

total, FA, AST e GGT), a dosagem hormonal (cortisol, T3, T4, testosterona e LH) e as avaliações andrológicas (perímetro escrotal, consistência testicular, concentração espermática, integridade funcional de membrana, defeitos maiores, defeitos menores, total de defeitos, MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN) foram avaliadas a homocedasticidade dos dados entre os diferentes grupos pelo teste de Bartlett, diferenciando-se, assim, os dados paramétricos daqueles não paramétricos (GAD; WEIL, 1989). Os dados paramétricos foram então submetidos à análise de variância ANOVA (SNEDCOR, 1946), para a comparação das médias entre os valores obtidos dos vários grupos. A detecção de diferenças significantes entre os grupos foi realizada com o teste *post hoc* de Duncan. Para a análise da consistência testicular, aferida em escala, foi utilizando o teste de Cochran-Mantel-Haenszel (CMH).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados de cada variável estudada, pertinente aos animais, serão apresentados em forma de tabelas. Caso o resultado tenha efeito estatístico significativo, o mesmo será também apresentado em forma de gráfico, a fim de proporcionar uma melhor visualização do comportamento do fenômeno observado.

4.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS PRODUZIDOS PELO BISFENOL A OU PELA *I. CARNEA* ADMINISTRADOS A CAPRINOS MACHOS PÚBERES

4.1.1 Avaliação clínica e do ganho de peso

O exame clínico realizado semanalmente durante o período experimental não revelou nenhuma alteração digna de nota na frequência cardíaca e respiratória, temperatura corpórea, movimentos ruminais e coloração de mucosas nos caprinos machos púberes. Também não foi evidenciada nenhuma alteração que caracterizasse intoxicação pela *I. carnea* ou pelo BPA. Em relação ao exame dos órgãos genitais, não foi encontrado nenhuma anormalidade em tamanho, forma e coloração de mucosas dos mesmos. Um animal do grupo IC morreu subitamente após 72 dias de experimento sem apresentar nenhuma sintomatologia clínica.

A análise de variância não apresentou efeitos significantes ($p > 0,05$) para nenhuma fonte de variação para as variáveis, ganho de peso quinzenal e ganho de peso total dos caprinos machos púberes que receberam o BPA ou a *I. carnea*. As médias e erro padrão para esta variável encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Média e erro padrão das variáveis ganho de peso quinzenal (Kg) e ganho de peso total (Kg) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) durante período experimental de 120 dias

Grupos	Ganho de peso quinzenal	Ganho de peso total
Controle	0,61±0,32 (40) ^a	5,9±2,39 (5)
BPA	0,72±0,32 (48)	6,08±2,76 (6)
IC	0,64± 0,26 (45)	6,3±2,46 (5)

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

4.1.2 Dosagem de enzimas e componentes sanguíneos

A análise de variância não apresentou efeitos significantes ($p>0,05$) para nenhuma fonte de variação para os níveis séricos de glicose, colesterol, creatinina, albumina e proteína total dos caprinos machos púberes que receberam o BPA ou a *I. carnea* (Tabela 3).

Tabela 3 - Média e erro padrão dos níveis séricos de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), creatinina (mg/dL), albumina (g/L) e proteína total (g/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Variável	Grupos		
	Controle (25) ^a	BPA (30)	IC (28)
Glicose	65,56 ± 3,71	62,27 ± 3,06	62,80 ± 2,12
Colesterol	76,76 ± 4,32	70,00 ± 3,46	69,46 ± 2,61
Creatinina	1,22 ± 0,04	1,18 ± 0,03	1,20 ± 0,03
Albumina	2,70 ± 0,05	2,65 ± 0,04	2,69 ± 0,04
Proteína total	7,69 ± 0,17	7,54 ± 0,18	7,87 ± 0,16

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por variável.

No que se refere aos níveis séricos de ureia, a análise de variância revelou efeito significativo da interação tratamento x tempo nos dados obtidos entre os diferentes grupos ($F=6,27$; $df=2/13$ e $p<0,05$). A aplicação do teste PDIFF detectou um aumento significativo ($p<0,05$) neste parâmetro nas coletas dos dias 30 e 90, nos animais do grupo IC quando comparados com os animais do grupo controle (Tabela 4 e Figura 16).

Quanto aos níveis séricos de FA e AST, a análise de variância revelou efeito significativo da interação tratamento x tempo nos dados obtidos entre os diferentes grupos ($F=6,97$, $F=50,26$; respectivamente, $df=2/13$ e $p<0,01$). A aplicação do teste PDIFF detectou um aumento significativo ($p<0,01$) nestes parâmetros nas coletas dos dias 30, 60, 90 e 120 nos animais do grupo IC quando comparados com os animais do grupo controle (Tabelas 5 e 6 e Figuras 17 e 18 respectivamente).

Com relação aos níveis séricos de GGT, a análise de variância revelou efeito significativo da interação tratamento x tempo nos dados obtidos entre os diferentes grupos ($F=5,00$; $df=2/13$ e $p<0,05$). A aplicação do teste PDIFF detectou uma diminuição significativa ($p<0,05$) neste parâmetro na coleta dos dias 90 e 120, nos animais do grupo IC, quando comparados com os animais do grupo controle (Tabela 7 e Figura 19).

Tabela 4- Média e erro padrão dos níveis sérico de ureia (mg/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	40,80 ± 2,90	26,80 ± 1,39	24,60 ± 1,80	18,80 ± 2,89	19,40 ± 3,04
BPA (6)	43,83 ± 1,08	37,00 ± 4,37	29,33 ± 3,54	23,67 ± 2,43	24,67 ± 3,51
IC (6)	34,00 ± 2,53	49,33 ± 3,01*	32,17 ± 2,44	36,20 ± 3,14*	20,00 ± 2,28

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 16 - Média e erro padrão dos níveis séricos de ureia (mg/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

Tabela 5 - Média e erro padrão dos níveis séricos de FA (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	103,40±11,02	130,60±5,49	286,60±21,64	421,80±51,76	437,80±26,29
BPA (6)	116,83±19,03	184,67±43,58	276,00±52,10	362,00±40,09	375,50±40,57
IC (6)	129,67±29,38	436,50±56,12*	904,17±188,50*	1354,00±173,36*	1184,00±120,63*

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 17 - Média e erro padrão dos níveis séricos de FA (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

Tabela 6 - Média e erro padrão dos níveis séricos de AST (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	130,80±6,30	168,60±6,53	131,60±9,36	144,40±12,93	147,00±16,23
BPA (6)	133,33±3,89	162,67±12,03	138,50±5,47	128,17±4,50	122,67±5,23
IC (6)	108,00±5,80	412,33±13,06*	439,33±21,26*	354,20±14,89*	367,80±16,28*

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 18 - Média e erro padrão dos níveis séricos de AST (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

Tabela 7 - Média e erro padrão dos níveis séricos de GGT (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	30,56 ± 2,30	27,60 ± 0,93	24,04 ± 1,26	85,40 ± 6,73	96,20 ± 14,24
BPA (6)	29,28 ± 1,10	24,60 ± 1,43	23,02 ± 1,13	74,22 ± 7,55	73,60 ± 15,74*
IC (6)	27,07 ± 0,79	21,10 ± 0,38	18,43 ± 0,84	38,44 ± 0,73 *	36,80 ± 1,67*

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 19 - Média e erro padrão dos níveis séricos de GGT (U/L) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

4.1.3 Avaliação hormonal

A análise de variância não apresentou efeitos significantes ($p>0,05$) para nenhuma fonte de variação para os níveis séricos de cortisol, testosterona e LH dos caprinos machos púberes que receberam o BPA ou a *I. carnea* (Tabela 8).

Tabela 8 - Média e erro padrão dos níveis séricos de cortisol ($\mu\text{g/dL}$), testosterona (ng/mL) e LH (ng/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia , $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia , $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Variável	Grupos		
	Controle (25) ^a	BPA (30)	IC (28)
Cortisol	$1,34 \pm 0,24$	$0,93 \pm 0,12$	$0,73 \pm 0,28$
Testosterona	$274,10 \pm 66,34$	$222,79 \pm 40,59$	$244,04 \pm 39,17$
LH	$0,24 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,02$

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por variável.

No que se refere aos níveis séricos de T3, a análise de variância revelou efeito significativo da interação tratamento x tempo nos dados obtidos entre os diferentes grupos ($F=3,16$; $df=2/13$ e $p<0,05$). A aplicação do teste PDIFF detectou diminuição significativa ($p<0,05$) neste parâmetro nas coletas dos dias 30, 60, 90 e 120 nos animais do grupo IC, quando comparados com os animais do grupo controle (Tabela 9 e Figura 20).

A tabela 10 mostra e a figura 21 ilustra os dados referentes aos níveis séricos de T4. A análise de variância revelou efeito significativo da interação tratamento x tempo nos dados obtidos entre os diferentes grupos ($F=3,64$; $df=2/13$ e $p<0,05$). A aplicação do teste PDIFF detectou diminuição significativa ($p<0,05$) neste parâmetro nas coletas dos dias 30 e 60 nos animais do grupo IC, e na coleta do dia 120 nos animais do grupo BPA, quando comparados com os animais do grupo controle.

Tabela 9 -. Média e erro padrão dos níveis séricos de T3 (ng/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	58,40 ± 2,95	62,34 ± 3,30	93,31 ± 8,26	81,01 ± 4,35	79,13 ± 6,37
BPA (6)	54,36 ± 2,54	61,48 ± 4,38	101,10 ± 7,26	78,52 ± 5,04	75,60 ± 5,10
IC (6)	59,11 ± 3,33	46,56 ± 3,84*	60,70 ± 5,44*	63,68 ± 5,48*	58,22 ± 4,30*

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 20 - Média e erro padrão dos níveis séricos de T3 (ng/dL) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

Tabela 10 - Média e erro padrão dos níveis séricos de T4 ($\mu\text{g/dL}$) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	3,26 $\pm$ 0,13	3,51 $\pm$ 0,16	4,12 $\pm$ 0,44	2,52 $\pm$ 0,27	2,72 $\pm$ 0,23
BPA (6)	2,84 $\pm$ 0,16	3,24 $\pm$ 0,40	3,50 $\pm$ 0,19	2,08 $\pm$ 2,24	1,89 $\pm$ 0,09 *
IC (6)	3,22 $\pm$ 0,35	2,47 $\pm$ 0,22*	2,47 $\pm$ 0,15*	2,65 $\pm$ 0,34	2,18 $\pm$ 0,31

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 21 - Média e erro padrão dos níveis séricos de T4 ($\mu\text{g/dL}$) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

4.1.4 Avaliação Andrológica

A análise de variância não apresentou efeitos significantes ($p>0,05$) para nenhuma fonte de variação para as variáveis perímetro escrotal, consistência testicular e concentração espermática dos caprinos machos púberes que receberam o BPA ou a *I. carnea* (Tabela 11). Por outro lado, em relação a variável porcentagem de membrana plasmática funcional íntegra (MPI) a análise de variância apontou efeitos significantes para a fonte de variação tratamento ($F=6,67$; $df=2/13$ e $p<0,05$). A aplicação do teste PDIFF detectou diminuição significativa ($p<0,05$) neste parâmetro nos animais do grupo BPA, quando comparados com os animais do grupo controle (Tabela 11 e Figura 22).

Tabela 11 - Média e erro padrão das variáveis perímetro escrotal (cm), consistência testicular (escala de 1 a 5), concentração espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) e porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente íntegras (MPI) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, $n=5$) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, $n=6$) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, $n=6$) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Variável	Grupos		
	Controle (25) ^a	BPA (30)	IC (28)
Perímetro escrotal	26,34 $\pm$ 0,17 ^a	26,58 $\pm$ 1,44	25,79 $\pm$ 0,37
Consistência testicular	2,98 $\pm$ 0,10	2,93 $\pm$ 0,11	2,73 $\pm$ 0,12
Concentração espermática	2055,60 $\pm$ 197,65	1481,00 $\pm$ 187,28	1414,64 $\pm$ 186,69
MPI	63,64 $\pm$ 1,74	57,23 $\pm$ 2,42*	63,21 $\pm$ 2,95

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por variável.

* $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 22 - Média e erro padrão da variável porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente íntegras (MPI) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

A análise de variância não apresentou efeitos significantes ($P > 0,05$) para nenhuma fonte de variação para as variáveis das características do movimento espermático avaliados pelo sistema computadorizado (CASA) dos caprinos machos púberes que receberam o BPA ou a *I. carnea*. As estimativas de média e erro padrão para estas variáveis encontram-se na tabela 12.

A análise de variância não apresentou efeitos significantes ($P > 0,05$) para nenhuma fonte de variação para a variável defeitos espermáticos menores dos caprinos machos púberes que receberam o BPA ou a *I. carnea*. As estimativas de média e erro padrão para esta variável encontram-se na tabela 13. Em relação as variáveis defeitos espermáticos maiores e total de defeitos espermáticos a análise de variância revelou efeito significativo da interação tratamento x tempo, nos dados obtidos entre os diferentes grupos ($F=3,02$ e $F=3,18$ respectivamente; $df=2/13$ e $p < 0,05$). A aplicação do teste PDIFF detectou aumento significativo ($p < 0,05$) nestes parâmetros nas coletas dos dias 60, 90 e 120 nos animais do grupo IC, quando comparados com os animais do grupo controle (Tabelas 14 e 15 e Figuras 23 e 24 respectivamente).

Tabela 12 - Média e erro padrão das variáveis das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Variável	Grupos		
	Controle (25) ^a	BPA (30)	IC (28)
MT ¹ (%)	84,32±1,97 ^a	81,37±2,23	84,61± 1,92
MP ² (%)	48,28±2,75	51,37±2,04	44,78± 2,60
VAP ³ (µm/s)	62,38 ± 1,56	64,68 ± 1,34	61,70 ± 1,52
VSL ⁴ (µm/s)	56,81 ± 1,51	59,36 ± 1,35	56,04 ± 1,44
VCL ⁵ (µm/s)	83,06 ± 2,92	85,28 ± 1,99	81,10 ± 2,36
ALH ⁶ (µm)	2,74 ± 0,10	2,77 ± 0,10	2,8 ± 0,60
BCF ⁷ (Hz)	35,60 ± 0,86	35,07 ± 0,80	33,60 ± 0,77
STR ⁸ (%)	90,28 ± 0,73	91,07 ± 0,44	90,28 ± 0,52
LIN ⁹ (%)	71,48±1,61	72,30±1,15	71,93± 1,10

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por variável.

¹MT: motilidade total; ²MP: motilidade progressiva; ³VAP: velocidade do trajeto; ⁴VSL: velocidade progressiva; ⁵VCL: velocidade curvilínea; ⁶ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; ⁷BCF: frequência de batimentos flagelares; ⁸STR: retilinearidade; ⁹LIN: linearidade.

Tabela 13 - Média e erro padrão da variável defeitos espermáticos menores (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Variável	Grupos		
	Controle (25) ^a	BPA (30)	IC (28)
Defeitos menores	1,56 ± 0,16	2,23 ± 0,33	1,43 ± 0,27

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

Tabela 14 - Média e erro padrão da variável defeitos espermáticos maiores (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	2,20±0,73	1,80±0,49	1,40±0,24	5,20±1,98	2,20±0,49
BPA (6)	2,83±0,54	2,83±0,60	5,17±2,15	4,0±0,93	3,33±0,73
IC (6)	2,33±0,42	3,50±0,85	17,67±6,18 *	19,20±3,93 *	20,80±7,06 *

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 23 - Média e erro padrão da variável defeitos espermáticos maiores (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

Tabela 15 - Média e erro padrão da variável total de defeitos espermáticos totais (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Grupos	Dias				
	0	30	60	90	120
Controle (5)^a	2,20±0,73	1,80±0,49	1,40±0,24	5,20±1,98	2,20±0,49
BPA (6)	2,83±0,54	2,83±0,60	5,17±2,15	4,0±0,93	3,33±0,80
IC (6)	2,33±0,42	3,50±0,85	17,67±6,18 *	19,20±3,93 *	20,80±7,06 *

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por grupo em cada coleta.

* p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF).

Figura 24 - Média e erro padrão da variável total de defeitos espermáticos (%) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de PDIFF)

4.1.5 Peso relativo

As análises de variância não apresentaram efeitos significativos ($p>0,05$) para nenhuma fonte de variação para as variáveis peso relativo do testículo esquerdo e direito e peso relativo do epidídimo esquerdo e direito dos caprinos machos púberes que receberam o BPA ou a *I. carnea*. As estimativas de média e erro padrão para esta variável encontram-se na tabela 16.

Tabela 16 - Média e erro padrão das variáveis peso relativo do testículo esquerdo (PRTE), direito (PRTD) e peso relativo do epidídimo esquerdo (PREE) e direito (PRED) de bodes adultos expostos ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=6) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=6) por um período experimental de 120 dias, sendo as coletas realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120

Variável	Grupos		
	Controle (5) ^a	BPA (6)	IC (5)
PRTE (%)	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,02
PRTD (%)	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,02
PREE (%)	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,003
PRED (%)	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,003

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

4.1.6 Avaliação histopatológica

O estudo histopatológico revelou haver alterações no tecido testicular dos bodes que ingeriram a *I. carnea*, sendo observado, no epitélio seminífero, focos de degeneração vacuolar das células de Sertoli e áreas de depósito laminar de cálcio (Figura 25). Já os testículos dos bodes que receberam BPA apresentou degeneração vacuolar na rede testicular (*rete testis*), conforme ilustrado na figura 26.

Nenhuma alteração digna de nota foi observada no epidídimo dos bodes de ingeriram a planta ou o BPA.

Figura 25 - Fotomicrografia de luz de testículo de bodes adultos tratados ou não com *I. carnea* na dose de 5g/kg/dia por 120 dias. A figura A mostra corte de animal do grupo controle, as figuras B e C mostram tecidos de animais experimentais. Evidencia-se degeneração vacuolar das células de Sertoli (setas) e áreas de depósito laminar de cálcio (cabeça de seta) em cortes de animais tratados com a *I. carnea*, HE, (10x)

Fonte: GOTARDO, A. T. 2013

Figura 26 - Fotomicrografia de luz de testículo de bodes adultos tratados ou não com BPA na dose de 25mg/kg/dia por 120 dias. A figura A mostra corte da região da rete testis de animal do grupo controle, a figura B mostra a mesma região de animal experimental. Notar presença de vacuolização citoplasmática (setas) em corte de animal tratado com BPA, HE, (10x)

Fonte: GOTARDO, A. T. 2013

4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* DE CAPRINOS MACHOS PÚBERES AO BPA OU A *I. carnea*

4.2.1 Avaliação clínica e do ganho de peso

A avaliação dos exames sorológicos realizados nas cabras revelou resultado negativo em todos os animais do rebanho para *Brucella* spp., *Mycoplasma* spp, *Leptospira* spp. e *Toxoplasma* spp. Já o exame coproparasitológico evidenciou alto número de ovos de parasitos e, por este motivo, instituiu-se o tratamento com uma avermectina, a doramectina (em dose única de 0,01g/50kg). Repetiu-se o exame coproparasitológico 15 dias após a administração do antiparasitário, verificando-se a efetividade do tratamento.

Todas as fêmeas acasaladas foram diagnosticadas como gestantes entre o 24º e 27º dia de gestação. No que se refere à avaliação clínica semanal destas fêmeas gestantes, em relação à frequência cardíaca e respiratória, movimentos ruminais, temperatura corpórea e coloração de mucosas nenhuma alteração foi digna de nota, permanecendo estes parâmetros dentro da normalidade. Da mesma forma não foi evidenciada nenhuma manifestação clínica característica de intoxicação pela planta ou pelo BPA durante o período gestacional. Já com relação aos parâmetros reprodutivos, foram observados dois abortos em fêmeas do grupo que recebeu a planta no terço final de gestação e uma cabra do grupo controle morreu devido a parto distócico. Após o parto a pesquisa de possíveis malformações e/ou anomalias externas nos filhotes recém-nascidos resultou negativa. A análise estatística revelou não haver diferenças significantes ($p>0.05$) no ganho de peso total das fêmeas durante a gestação, no peso ao nascimento e aos 15 meses dos filhotes entre os diferentes grupos. Os dados referentes ao desempenho reprodutivo das fêmeas gestantes e dos pesos são apresentados na tabela 17.

No que se refere à avaliação clínica semanal dos caprinos machos cujas mães receberam a *I. carnea* ou o BPA durante o período gestacional, em relação à frequência cardíaca e respiratória, movimentos ruminais, temperatura corpórea e

coloração de mucosas nenhuma alteração foi digna de nota, em todas as avaliações realizadas semanalmente, permanecendo estes parâmetros dentro da normalidade.

Tabela 17 - Parâmetros reprodutivos de cabras prenhes e pesos dos seus filhotes. As fêmeas gestantes foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional

Parâmetros	Grupos		
	Controle (7)	BPA (7)	IC (7)
Número de cabras prenhes	7	7	7
Ganho de peso durante a gestação ^a	8,7 ± 1,5	8,9 ± 1,8	8,3 ± 1,7
Mortalidade de cabras prenhes	1	0	0
Morte embrionária	0	0	0
Abortos	0	0	2
Número de partos gemelares	4	4	3
Filhotes vivos	10	11	8
Machos	5	4	4
Fêmeas	5	7	4
Malformações	0	0	0
Mortalidade de filhotes pós-parto	0	0	0
Peso dos filhotes ao nascimento ^a	3,1 ± 0,5	3,2 ± 0,6	2,9 ± 0,4
Peso dos machos aos 15 meses ^a	51,8 ± 1,73	51,1 ± 2,87	52,0 ± 2,41

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

^a Média ± erro padrão.

4.2.2 Dosagem de enzimas e componentes sanguíneos

No que se refere à avaliação de enzimas e componentes sanguíneos dos caprinos machos púberes cujas mães receberam a *I. carnea* ou o BPA durante o período gestacional, a análise de variância não apresentou efeitos significantes ($p>0,05$), para os níveis séricos de glicose, colesterol, albumina, proteína total, ureia, creatinina, AST, GGT e FA (tabela 18).

Tabela 18 - Média e erro padrão dos níveis séricos de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), albumina (g/L), proteína total (g/L), ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), AST (u/L), GGT (u/L) e FA (u/L) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional

Variável	Grupos		
	Controle (5) ^a	BPA (4)	IC (4)
Glicose	56,6 ± 2,63	64,75 ± 8,81	60,25 ± 3,03
Colesterol	68,6 ± 6,19	63,00 ± 14,31	73,25 ± 10,68
Albumina	3,94 ± 0,08	4,02 ± 0,10	3,97 ± 0,09
Proteína total	6,37 ± 0,19	6,38 ± 0,33	6,48 ± 0,15
Ureia	71,60 ± 8,04	84,25 ± 3,56	75,75 ± 2,78
Creatinina	1,96 ± 0,11	1,99 ± 0,03	2,07 ± 1,15
AST	82,8 ± 7,10	76,00 ± 7,24	86,00 ± 11,05
GGT	60,00 ± 8,39	55,00 ± 9,80	62,5 ± 6,68
FA	297,8 ± 104,67	189,24 ± 21,55	205,25 ± 69,27

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por variável.

4.2.3 Avaliação hormonal

Quanto à avaliação hormonal dos caprinos machos púberes cujas mães receberam a *I. carnea* ou o BPA durante o período gestacional, a análise de variância não apresentou efeitos significantes ($p > 0,05$) para os níveis séricos de cortisol, T3 e T4 (tabela 19).

Tabela 19 - Média e erro padrão dos níveis séricos de cortisol (ng/mL), T3 (ng/mL) e T4 (ng/mL) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional

Variável	Grupos		
	Controle (5) ^a	BPA (4)	IC (4)
Cortisol	15,28 ± 1,47	16,81 ± 1,59	14,25 ± 4,22
T3	1,09 ± 0,14	1,19 ± 0,16	1,25 ± 0,13
T4	39,19 ± 3,95	40,07 ± 2,56	42,12 ± 4,09

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas por variável.

4.2.4 Avaliação andrológica

A tabela 20 mostra a média e o desvio padrão do perímetro escrotal, consistência testicular, concentração espermática e porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente íntegras de caprinos púberes cujas mães foram expostas ou não a *I. carnea* ou ao BPA durante o período gestacional. A análise de variância não revelou diferenças significantes entre os grupos.

A tabela 21 mostra os resultados da avaliação morfológica de espermatozoides de caprinos púberes cujas mães foram expostas, ou não, a *I. carnea* ou ao BPA durante o período gestacional. A análise de variância não revelou diferenças significantes entre os grupos.

Da mesma forma, a análise de variância não revelou diferenças significantes entre os grupos nos resultados referentes à avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) do sêmen de caprinos púberes cujas mães foram expostas ou não a *I. carnea* ou ao BPA durante o período gestacional (tabela 22).

Tabela 20 - Média e erro padrão do perímetro escrotal (cm), consistência testicular (escala de 1 a 5), concentração espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) e porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionalmente íntegras (MPI) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional

Variáveis	Grupos		
	Controle (5) ^a	BPA (4)	IC (4)
Perímetro escrotal	28,64 $\pm$ 1,00	29,07 $\pm$ 1,21	27,17 $\pm$ 0,18
Consistência testicular	3,5 $\pm$ 0,35	3,38 $\pm$ 0,42	2,88 $\pm$ 0,47
Concentração espermática	1996,00 $\pm$ 364,54	1785,00 $\pm$ 363,16	2055,00 $\pm$ 613,58
MPI	48,50 $\pm$ 5,92	41,75 $\pm$ 8,30	50,20 $\pm$ 4,09

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

Tabela 21 - Média e erro padrão dos defeitos espermáticos maiores (%), defeitos espermáticos menores (%) e total de defeitos espermáticos (%) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional

Variáveis	Grupos		
	Controle (5) ^a	BPA (4)	IC (4)
Defeitos maiores (%)	2,20 $\pm$ 0,73	2,75 $\pm$ 0,75	3,00 $\pm$ 1,08
Defeitos menores (%)	2,60 $\pm$ 0,60	1,75 $\pm$ 0,62	1,75 $\pm$ 0,85
Defeitos totais (%)	4,8 $\pm$ 1,11	4,50 $\pm$ 0,86	4,75 $\pm$ 1,03

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

Tabela 22 - Média e erro padrão das variáveis das características do movimento espermático avaliados pelo sistema computadorizado (CASA) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional

Variáveis	Grupos		
	Controle (5)	BPA (5)	IC (5)
MT ¹ (%)	81,60±3,82	73,50±17,88	82,00±7,71
MP ² (%)	45,20±5,23	33,25±9,14	51,00±13,04
VAP ³ (µm/s)	56,04±2,57	51,42±2,83	56,65±4,91
VSL ⁴ (µm/s)	53,40±2,22	47,60±3,23	52,92±4,79
VCL ⁵ (µm/s)	65,02±2,87	65,02±2,20	67,72±5,50
ALH ⁶ (µm)	1,82±0,12	2,12±0,08	1,87±0,11
BCF ⁷ (Hz)	30,30±2,78	34,72±2,47	33,45±1,64
STR ⁸ (%)	94,80±1,35	92,00±1,68	92,5±0,86
LIN ⁹ (%)	83,60±1,96	77,75±0,85	79,25±1,88

¹MT: motilidade total; ²MP: motilidade progressiva; ³VAP: velocidade do trajeto; ⁴VSL: velocidade progressiva; ⁵VCL: velocidade curvilínea; ⁶ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; ⁷BCF: frequência de batimentos flagelares; ⁸STR: retilinearidade; ⁹LIN: linearidade.

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

4.1.5 Peso relativo

Os resultados referentes a avaliação do peso relativo do testículo direito e esquerdo e do peso relativo do epidídimo direito e esquerdo de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não a *I. carnea* ou ao BPA durante o período gestacional são apresentados na tabela 23. A análise de variância não revelou diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 23 - Média e erro padrão das variáveis peso relativo do testículo esquerdo (PRTE), direito (PRTD) e peso relativo do epidídimo esquerdo (PREE) e direito (PRED) de bodes púberes cujas mães foram expostas ou não (grupo controle, n=5) a *I. carnea* (IC, 5g/kg/dia, n=4) ou ao bisfenol A (BPA, 25mg/kg/dia, n=4) durante o período gestacional

Variáveis	Grupos		
	Controle (5)	IC (4)	BPA (4)
PRTD¹	0,24±0,24	0,23±0,02	0,24±0,02
PRTE²	0,23±0,02	0,21±0,02	0,23±0,03
PRED³	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
PREE⁴	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00

^a Entre parênteses o número de amostras analisadas.

4.2.6 Avaliação histopatológica

O estudo histopatológico revelou não haver nenhuma alteração digna de nota no tecido testicular e epididimal dos caprinos machos púberes expostos ou não ao BPA ou a *I. carnea in utero*.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Ao delinear os experimentos desta pesquisa pretendia-se que os animais não apresentassem nenhum efeito tóxico, tanto com o BPA, quanto com a *I. carnea* que pudesse ser detectado clinicamente. Assim, esperava-se estudar aqueles efeitos tóxicos sutis que se refletissem na esfera reprodutiva e hormonal e não toxicidade em outro órgão ou tecido que poderia, indiretamente, causar danos no sistema reprodutor ou endócrino. E, com efeito, os objetivos foram atingidos, haja vista que os resultados mostraram que não houve alterações dignas de nota na avaliação clínica semanal dos caprinos machos púberes de ambos os grupos experimentais. Por outro lado, verificou-se que um animal do grupo tratado com a planta veio a óbito durante o período experimental. Porém, como este animal não apresentou qualquer sinal clínico que sugerisse lesão de origem cerebelar, isto é, tremores de cabeça, andar cambaleante etc, que classicamente indica intoxicação pela *I. carnea* (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; SCHUMAHER-HENRIQUE et al., 2003), aliado ao fato de que nenhum dos animais pertencentes a este grupo manifestaram nenhuma sintomatologia, nem mesmo queda do peso corporal, parâmetro este que é sabidamente um dos importantes indicadores de efeitos de um xenobiótico no organismo animal (STEVENS; GALLO, 1989), acredita-se que a morte observada não seja resultante da ingestão da planta.

Inúmeros estudos realizados, tanto *in vivo* como *in vitro*, mostram de forma inequívoca que o BPA é responsável por alterações reprodutivas e hormonais em roedores machos adultos (TAKAO et al., 1999; SAKAUE et al., 2001; AL-HIYASAT; DARMANI; ELBETIEHA, 2002; IIDA et al., 2003; AKINGBEMI et al., 2004; NAKAMURA et al., 2010). Por esta característica, o BPA atualmente é tido como um DE “clássico” para roedores. Além disso, um estudo realizado *in vitro*, utilizando testículos de bodes sexualmente imaturos, mostrou que o BPA pode provocar alterações morfológicas em células espermáticas e de Sertoli (ANDRIANA et al., 2004). Portanto, devido às indicações de que esta substância promoveria efeito tóxico no sistema reprodutivo de caprinos machos, optou-se por utilizá-la como controle positivo no presente estudo.

Outro desafio em relação ao uso do BPA foi a escolha da dose a ser empregada nesta pesquisa, uma vez que, naquele momento, dados sobre a exposição a este agente em ruminantes, por via oral, eram inexistentes. Desta forma, baseado em estudo prévio no qual verificou-se que a administração de 5mg/kg/dia de BPA, pela via subcutânea, em ovelhas, durante o período gestacional não produziu alterações clínicas (SAVABIEASFAHANI et al., 2006), optou-se pela utilização do BPA na dose de 25mg/kg, ou seja, uma dose cinco vezes maior que aquela utilizada no estudo com as fêmeas gestantes pela via subcutânea. A escolha de tal dose deve-se ao fato de que se sabe que a biodisponibilidade do BPA é dependente da dose e da via de exposição, sendo que administração oral, via de eleição nesta pesquisa, resulta em menor biodisponibilidade (POTTENGER et al., 2000).

Surpreendentemente, e, neste momento, difícil de se saber o porquê, ao contrário do que é relatado com roedores machos (TAKAO et al., 1999; AKINGBEMI et al., 2004; NAKAMURA et al., 2010), os dados aqui encontrados não revelaram diferenças nos níveis de testosterona e LH dos caprinos tratados com o BPA. Por outro lado, os níveis séricos de T4 mostraram-se reduzidos nestes mesmos animais, no 120º dia de avaliação. Do mesmo modo, um estudo conduzido em ovelhas gestantes tratadas com 5mg/kg/dia de BPA, durante o período gestacional, revelou que tanto estas fêmeas como suas proles apresentaram redução significativa (ao redor de 30%) dos níveis séricos deste hormônio tireoidiano (VIGUIÉ et al., 2012). Segundo Gentilcore et al. (2013), que conduziram estudos em *Danio rerio* (peixe paulistinha), tal redução nos níveis de T4 estaria relacionada à capacidade do BPA afetar a expressão de genes responsáveis pela produção de hormônios tireoidianos.

Embora a avaliação da morfologia espermática não tenha revelado qualquer alteração naqueles caprinos que receberam o BPA, o teste de resistência osmótica mostrou redução na porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática funcional íntegra. Este teste avalia a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides (BAHAMONDES, 2001), característica importante para todos os eventos fisiológicos para qual o espermatozoide está habilitado, incluindo a fertilização (capacitação, reação acrossômica e fusão com o ovócito), sendo considerado como um indicador de fertilidade em diversas espécies como humanos (JEYENDRAN et al., 1984; VAN DER VEN et al., 1986; CHAN et al., 1991; HOSSAIN

et al., 1998), equinos (NIE; WENZEL, 2001; MELO; HENRY, 1999; NEILD et al., 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), bovinos (CORREA; ZAVOS, 1994) ovinos (OBERST et al., 2003) e, também, caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS; TORES; FONSECA, 2001; SALGUEIRO et al., 2003). Neste sentido, espera-se que, quanto mais espermatozoides preservarem esta característica, melhor será a qualidade do sêmen (JEYENDRAN et al., 1984). Portanto, pode-se supor que os caprinos pertencentes ao grupo BPA tiveram redução da qualidade espermática e, conseqüentemente, da sua fertilidade. De fato, corrobora esta conjectura os dados provenientes de um estudo realizado em roedores, os quais evidenciaram que a exposição de machos ao BPA afeta a espermatogênese, refletindo em redução de fertilidade (SAKAUE et al., 2001). Além disto, pesquisas conduzidas em humanos correlacionaram a baixa qualidade espermática e até mesmo infertilidade aos níveis elevados de BPA excretados na urina (MEEKER et al., 2010; LI et al., 2011).

A avaliação histopatológica do testículo destes animais que receberam BPA, neste estudo, evidenciou a presença de vacúolos em grande quantidade na rete testis. Não existe, na literatura, nenhum dado sobre lesão semelhante em outras espécies animais, mesmo em roedores que, como já dito, são constantemente utilizados como sujeito experimental em pesquisas envolvendo os efeitos tóxicos do BPA. Porém, é possível presumir que o BPA possa estar envolvido na gênese desta alteração, por meio de sua ação em receptores de estrógeno, encontrados na rete testis e que desempenham papel fundamental na manutenção da sua morfologia e fisiologia (LEE et al., 2000). Portanto, supõe-se que o BPA, atuando em receptores de estrógeno da rete testis, promoveria, de alguma maneira, esta lesão aqui observada; No entanto, a compreensão do mecanismo de ação deste xenoestrógeno e a relação entre as alterações espermáticas e testiculares, bem como o porquê tal lesão foi verificada apenas em caprinos e não em outros animais, será objetivo de futuras investigações. É também importante determinar porque, ao contrário do verificado em roedores (CHITRA; LATCHOUMYCANDANE; MATHUR, 2003; CHITRA; RAO; MATHUR, 2003), não foi observada diminuição nos pesos relativos de testículos e epidídimos nos caprinos expostos ao BPA.

Reunindo-se todos os dados desta pesquisa relativos aos caprinos púberes expostos ao BPA e comparando-os com os achados daqueles estudos conduzidos com roedores tratados com este mesmo xenoestrógeno, pôde-se observar

divergências nos resultados, já que, de maneira geral, os animais nesta pesquisa mostraram-se mais resistentes ao BPA. Vários são os fatores que devem ser considerados para procurar explicar tal discrepância. Inicialmente, é fundamental considerar que a extrapolação dos dados obtidos a partir de espécies monogástricas para aquelas poligástricas deve ser feita com muito cuidado. De fato, o rúmen tem papel fundamental na farmacodinâmica e farmacocinética de agentes químicos. Neste sentido, está muito bem estabelecido que microrganismos ruminais podem biotransformar algumas substâncias por redução ou hidrólise, fato que resulta em diminuição da concentração de tais substâncias disponíveis para a absorção (BAGGOT, 2007). Assim, é plausível supor que uma possível biotransformação ruminal pode ser a responsável pela diferença detectada.

Outra possível explicação seria a de que ruminantes tolerariam níveis mais elevados de BPA. Assim, não só as alterações na toxicocinética (isto é, a biotransformação ruminal do xenobiótico), mas também diferenças na toxicodinâmica (por exemplo, interação com receptores hormonais), podem ter propiciado os efeitos tóxicos sutis aqui observados. Portanto, outros estudos deverão ser realizados com o objetivo de melhor compreender os efeitos do BPA em ruminantes. No entanto, esta pesquisa deixou claro que existe variabilidade de efeitos tóxicos entre as espécies e evidenciou a necessidade de protocolos específicos de avaliação toxicológica de DEs para os ruminantes.

Várias foram as alterações observadas naqueles machos púberes tratados com a *I. carnea*, sendo estas, detectadas por meio de avaliação espermática, hormonal, bem como histopatológica.

A morfologia espermática é aceita como um dos componentes mais importantes para a fertilidade. Após a cópula, o trato reprodutivo feminino impõe barreiras anatômicas naturais como a cérvix, o corpo do útero e os cornos uterinos, limitando o acesso de grande parte dos espermatozoides anormais à junção ampola-istmo, onde ocorre a fertilização. Da mesma forma, as camadas celulares que revestem o oócito também são determinantes, tornando espermatozoides com defeitos morfológicos menos eficientes à ligação e à penetração da zona pelúcida (JOHNSON, 1997). Ainda, além de ser um importante indicador de fertilidade, este parâmetro também é relacionado a danos espermáticos consequentes a agentes físicos ou químicos (VERSTEGEN et al., 2002). Desta forma, a alta frequência de

espermatozoides morfologicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade (HOWARD; PACE, 1988).

O presente estudo revelou que embora a avaliação computadorizada não tenha apontado qualquer alteração na motilidade espermática nos caprinos púberes que receberam a *I. carnea*, a análise da morfologia espermática mostrou aumento na porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores nas coletas do 60º, 90º e 120º dias de experimento, sendo a alteração responsável por este aumento a gota protoplasmática proximal (ao redor de 20%). Segundo Barth e Oko (1989), a gota protoplasmática é uma das alterações morfológicas mais frequentes e pode ser observada como gota proximal, a qual localiza-se na peça intermediária próxima à cabeça, e indica espermatogênese anormal, ou gota distal, sendo neste caso localizada no final da peça intermediária, próximo ao anulus, e que indica falha no processo de maturação espermática.

A *I. carnea* possui como princípios ativos tóxicos dois tipos distintos de alcaloides, os nortropânicos: as calisteginas B₂ e C₁ e o indozilidínico: a suainsonina. Em relação às calisteginas pouco se sabe a respeito de suas atividades biológicas e o seu papel nos quadros de intoxicação, no entanto, estudos *in vitro* mostram que estes inibem a β -glicosidase e α - e β -galactosidases (ASANO et al., 1995). Sugere-se que a presença destes alcaloides pode produzir a exacerbação do efeito tóxico da suainsonina. Por outro lado, a suainsonina, é o mais importante princípio ativo tóxico da planta, o qual atua como potente inibidor da α -manosidase lisossomal; sendo que a inibição desta enzima acarreta em acúmulo lisossômico de oligossacarídeos não processados completamente, perda de função celular e, no último estágio, morte celular (TULSIANI et al., 1988). Além destas alterações, a suainsonina inibe também a enzima golgi monosidase II, que, por sua vez, está envolvida com o processo de formação de glicoproteínas (TULSIANI; HARRIS; TOUSTER, 1982).

Assim, uma questão foi levantada, em relação aos princípios ativos: seria a suansonina, as calisteginas B₂ e C₁, ou estas toxinas em conjunto que estariam promovendo o aumento na porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores? Tal pergunta pode ser respondida tomando-se como embasamento um estudo conduzido por Panter, James e Hartley (1989), os quais administraram a carneiros a *Astragalus lentiginosus* (vulgarmente denominada *locoweed*), uma planta cujo

princípio ativo tóxico é, da mesma maneira que a *I. carnea*, o alcalóide indolizidinico suainsonina, e no qual se detectou a mesma alteração morfológica aqui descrita, a gota protoplasmática proximal, sendo esta, detectada em mais de 50% dos espermatozoides dos animais expostos à planta. Portanto, pode-se assumir que é a suainsonina o princípio ativo promotor de tal lesão.

Segundo Sharpe et al. (2003), o número de células de Sertoli influencia diretamente a produção espermática, refletindo na fertilidade. Estas células são fundamentais para a espermatogênese, não só controlando a nutrição dos espermatozoides em formação e secretando fluido de transporte, mas também fagocitando restos citoplasmáticos que se desprendem das espermatídes (JOHANISSON et al., 2000). Assim, esta célula possui um citoplasma rico em aparato de Golgi e lisossomos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999), organelas que, como já mencionado anteriormente, são alvo da ação da suainsonina (TULSIANI; HARRIS; TOUSTER, 1982; TULSIANI et al., 1988). Portanto, considerando-se o destacado papel das células de Sertoli na espermatogênese, pode-se conjecturar que a suainsonina seria a responsável pelo comprometimento das funções desta célula, promovendo a vacuolização citoplasmática, levando-a a morte e refletindo sobre a fertilidade (SHARPE et al., 2003).

Apoia tal proposição a avaliação histopatológica realizada nesta pesquisa, a qual revelou alterações compatíveis àquelas produzidas pela suainsonina. Assim, foram observados, no epitélio seminífero daqueles animais expostos à *I. carnea*, focos de degeneração vacuolar das células de Sertoli e áreas de depósito laminar de cálcio, indicando degeneração testicular. Tais alterações observadas nas células testiculares são compatíveis com as lesões já verificadas e descritas em diferentes órgãos, em estudos anteriores, com plantas que contêm a suainsonina (SCHMAHER-HENRIQUE et al., 2003; ARMIÉN et al., 2007; GOTARDO et al., 2011).

Os dados aqui obtidos permitem claramente evidenciar que a ingestão da *I. carnea* por bodes adultos leva à degeneração vacuolar testicular que, por sua vez, acarreta em alteração na espermatogênese. Estas alterações inevitavelmente refletem no aumento do número de espermatozoides defeituosos, como, de fato, foi observado neste estudo. Mais uma vez é pertinente ressaltar que tal distúrbio reprodutivo foi diagnosticado na ausência da sintomatologia clássica de intoxicação

por *I. carnea*, ou mesmo perda de peso. Portanto é provável que em condições naturais, a campo, não seria possível suspeitar que a queda de qualidade espermática, aqui detectada, estaria relacionada à ingestão da planta.

Os resultados obtidos na avaliação hormonal dos animais púberes que ingeriram a *I. carnea* revelam uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis séricos de T3 e T4. Como já mencionado, a suainsonina inibe a α -manosidase lisossomal, levando ao acúmulo lisossômico de oligossacarídeos não processados completamente, formando vacúolos citoplasmáticos em vários órgãos, entre eles a tireoide, em caprinos jovens (SCHUMAHHER-HENRIQUE, et al., 2003), adultos (ARMIÉN et al., 2007) e em fêmeas gestantes (SCHUMAHHER-HENRIQUE, 2005). Assim, com base nestes resultados, é possível levantar a hipótese de que a diminuição dos níveis séricos de T3 e T4, observada nos animais que ingeriram a planta, é decorrente da ação direta da suainsonina na tireoide. Portanto, propõe-se que esta lesão possa levar a um quadro de hipotireoidismo.

Corroborar esta suposição os dados oriundos da bioquímica. Assim, nesta avaliação um importante dado observado foi a diminuição significativa dos níveis séricos de GGT nos dias 90 e 120 naqueles animais expostos à planta. Um provável aumento dos níveis de GGT seria compreensível pelas alterações hepatobiliares produzidas pela *I. carnea* (SCHUMAHHER-HENRIQUE et al., 2003; ARMIÉN et al., 2007); porém, ao contrário do esperado, foi observada uma diminuição dos níveis séricos desta enzima. No entanto, é ainda necessário acrescentar neste raciocínio que algumas afecções podem resultar em níveis diminuídos de GGT, entre elas o hipotireoidismo. Neste sentido, estudos demonstraram correlação entre baixos níveis séricos de T3 e T4 e diminuição dos níveis da enzima GGT (AZIZI, 1982; RAMBABU et al., 1991). Sabe-se que os hormônios tireoidianos regulam a taxa metabólica basal de todas as células, incluindo os hepatócitos e, assim, modulam a função hepática. O fígado, por sua vez, biotransforma os hormônios da tireoide e regula seus efeitos endócrinos sistêmicos. Desta maneira, disfunções tireoidianas podem modular a função hepática e doenças no fígado podem modular a biotransformação dos hormônios tireoidianos (MALIK; HODGSON, 2002). Portanto, os níveis baixos da enzima GGT aqui encontrados provavelmente estão relacionados à diminuição do metabolismo hepático, secundária ao hipotireoidismo.

Por outro lado, ainda no que diz respeito à avaliação hormonal, estes mesmos animais não apresentaram alteração dos níveis séricos de LH e testosterona. Sabe-se que a testosterona é produzida pelas células de Leydig localizadas no testículo, sendo esta célula estimulada principalmente pelo LH (SILVA JUNIOR; FRANÇA, 2001). Assim, é possível supor que no testículo, diferentemente do que ocorreu com as células de Sertoli, as células de Leydig não tiveram sua função, pelo menos no que se refere à produção de testosterona, comprometida pela suainsonina.

Segundo Haschek e Rousseaux (1998), a avaliação bioquímica é uma importante ferramenta que auxilia o diagnóstico de intoxicações, sendo que a correta escolha dos parâmetros a serem analisados é fundamental para a avaliação adequada do comprometimento de cada órgão ou sistema. De fato, os dados provenientes das avaliações bioquímicas aqui realizadas concordam com estudos anteriores em caprinos; assim, os achados bioquímicos, tais como alterações nos níveis séricos de enzimas hepáticas e ureia foram também detectados em pesquisas realizadas em caprinos em crescimento (SCHUMAHHER-HENRIQUE et al., 2003) e cabras gestantes (SCHUMAHHER-HENRIQUE, 2005; GOTARDO, 2009), expostos à *I. carnea*. Portanto, ratifica-se o que vem sendo sugerido pelas pesquisas anteriores, demonstrando a importância da análise bioquímica como ferramenta de diagnóstico precoce de quadros de intoxicação, uma vez que os animais expostos à planta, mesmo não manifestando qualquer sintomatologia clínica, já apresentavam alterações bioquímicas sugestivas de intoxicação, particularmente ao nível hepático e renal.

Na década de 1970, a partir do estudo de Herbst et al. (1971), verificou-se a relação da exposição *in utero* e a desregulação endócrina na prole. Nesta elegante pesquisa foi identificada uma correlação clara entre a exposição de mulheres gestantes ao dietilestilbestrol e alterações em suas filhas após a puberdade. Assim, a partir daquele estudo pioneiro, outros tantos se seguiram, basicamente conduzidos em roedores e extrapolados para o homem, com diferentes agentes, como praguicidas, plastificantes, resíduos químicos industriais, medicamentos, entre outros, reiterando tal relação (PALANZA et al., 1999; SULTAN et al., 2001; HEINDEL, 2005; ANWAY et al., 2005). Assim, também foi objetivo deste estudo verificar se ruminantes machos estão sujeitos aos efeitos tóxicos da exposição *in utero* aos DEs, uma vez que tais informações são escassas na literatura.

Com a finalidade de organizar um cronograma para que futuramente as avaliações dos filhotes pudessem ser realizadas de maneira adequada, procedeu-se à sincronização do ciclo estral e cobertura das fêmeas, conforme proposto por Traldi (1994) para caprinos. Esta metodologia já vem sendo empregada neste laboratório há anos e vem se mostrando bastante eficiente. De fato, novamente, verificou-se nesta pesquisa que todas as fêmeas destinadas ao acasalamento foram diagnosticadas como prenhes e em dias previamente estabelecidos. Ainda, deve-se salientar que a opção pelo uso de apenas um macho reprodutor foi bastante adequada, pois tal procedimento permitiu a restrição de variáveis que poderiam advir da introdução de outro reprodutor nesta pesquisa.

As doses de *I. carnea* aqui escolhidas foram aquelas que supostamente não promoveriam qualquer manifestação clínica da intoxicação, uma vez que, estudos anteriores, realizados neste laboratório, mostraram que cabras intoxicadas com a planta, em doses elevadas, independentemente da fase de gestação, apresentaram aborto ou morte fetal, após manifestação de sintomatologia neurológica (SCHUMAHER-HENRIQUE, 2005; GOTARDO et al., 2012). Tais efeitos inevitavelmente inviabilizariam a continuidade deste experimento. No entanto, embora no presente estudo não tivessem sido observados sinais clínicos característicos da intoxicação pela *I. carnea*, duas fêmeas abortaram no terço final de gestação. Como a pesquisa por agentes infecciosos responsáveis por abortamentos de maior incidência para caprinos no Brasil (*Mycoplasma sp.*, *Brucella sp.*, *Toxoplasma sp.* e *Leptospira sp.*) resultou negativa, e considerando-se que os abortamentos verificados anteriormente foram em fêmeas que claramente manifestavam sinais neurológicos de toxicidade pela *I. carnea*, não seria plausível imputar este efeito aos agentes infecciosos, pelo menos os mais frequentes causadores de abortamento em caprinos em nosso país, ou à toxicidade da planta. No entanto, não seria possível, neste momento, levantar uma teoria do porque deste efeito aqui verificado.

Outro parâmetro que pode indicar a inexistência de toxicidade materna relacionada aos abortamentos verificados neste estudo foi a inobservância de alteração de peso entre os animais provenientes de mães tratadas com a planta. Este resultado também tem importante implicação no que se refere aos protocolos de avaliação de teratogenicidade. De fato, o peso ao nascimento dos filhotes é de

grande importância e muito utilizado em estudos de toxicologia do desenvolvimento (WHO, 1967; US EPA, 1991). Portanto, pelas avaliações classicamente empregadas em diferentes protocolos, os filhotes de mães expostas à *I. carnea*, no nascimento, não apresentaram qualquer alteração que pudesse indicar toxicidade.

Da mesma forma, resultados obtidos na avaliação hormonal e reprodutiva dos filhotes machos púberes de mães expostas à planta durante a gestação não revelaram nenhuma alteração significativa nas diferentes avaliações realizadas. No entanto, trabalho realizado por este mesmo grupo evidenciou que filhotes de mães expostas durante a gestação a *I. carnea* apesar de não apresentarem nenhuma alteração morfológica ao nascimento, quando submetidos aos testes neurocomportamentais mostraram alterações motoras e déficit de aprendizado (GOTARDO et al., 2011). Desta forma, a ausência de efeitos tóxicos aqui pesquisados não permite, neste momento, descartar os potenciais riscos desta exposição *in utero*, tanto no que se refere às alterações hormonais, quanto reprodutivas da prole.

Este estudo é o primeiro com o propósito de avaliar os possíveis efeitos adversos de fitotoxinas, em machos, resultantes da exposição a estas substâncias *in utero*; assim é apenas o início de uma linha de pesquisa, na qual, se pretende, possa gerar um protocolo para a avaliação bastante sensível de xenobióticos como DEs em ruminantes. Neste sentido, futuros experimentos darão continuidade a este estudo, introduzindo-se novas metodologias mais sensíveis, como, por exemplo, a avaliação do comportamento sexual e a dosagem de leptina, um hormônio que vem sendo associado a disfunções reprodutivas (MANTZOROS, 2000; MOSCHOS; CHAN; MANTZOROS, 2002), entre outras, que poderão subsidiar a interpretação de dados futuros. Assim, acredita-se que estas avaliações, mais refinadas, poderão detectar alterações ocultas pela metodologia até o momento empregada.

Reforça a necessidade de adicionar novos componentes neste protocolo de avaliação, o fato de que, da mesma maneira que os filhotes machos expostos *in utero* à *I. carnea*, os machos expostos *in utero* ao BPA não mostraram qualquer alteração nos parâmetros avaliados. Por outro lado, tomando-se como exemplo roedores, existe uma vasta literatura que correlaciona inequivocamente a exposição *in utero* a este xenoestrógeno, apontando diferentes alterações reprodutivas em machos, tais como, menor potencial reprodutivo (TAINAKA et al., 2012; KAWAI et.

al., 2003), diminuição da produção diária de espermatozoide, diminuição do peso epididimal (VOM SAAL et al., 1998) e diminuição dos níveis séricos de testosterona (AKINGBEMI et al., 2004).

Além disto, outro fator que deve ser considerado e que justificaria a inexistência de efeito adverso produzido pelo BPA é a via de administração aqui empregada. Deste modo, em um estudo realizado com ovelhas, Viguié et al. (2012), mostraram que a exposição, diária, de fêmeas gestantes a dose de 5mg/kg de BPA (ou seja, uma dose cinco vezes menor do que a usada na presente pesquisa), por via subcutânea promoveu a diminuição de 30% nos níveis séricos de T4 nos neonatos, na ausência de sintomatologia clínica das fêmeas gestantes. Nesta pesquisa, o xenobiótico foi administrado por via oral, o que obrigatoriamente faz com que este passe pelo rúmen, podendo assim ter sido parcial ou totalmente biotransformado, resultando na diminuição da concentração disponível para a absorção. Por outro lado, na pesquisa com ovelhas o BPA foi administrado por via parenteral; portanto, não houve a passagem inicial pelo trato gastrointestinal do animal e, por isto, não haveria a possibilidade de inativação do composto.

Também, quando da administração por via oral não é possível descartar o denominado “efeito de primeira passagem”, no qual a substância absorvida pelo intestino é conduzida através da veia porta hepática para o fígado, onde pode ocorrer a biotransformação de grande parte da substância antes da sua distribuição pelo organismo. Deve-se ainda considerar que este efeito tem grande importância em ruminantes, mais do que em monogástricos (BAGGOT, 2007)

Concluindo, esta pesquisa não só apontou alterações reprodutivas e hormonais decorrentes a ingestão da *I. carnea* ou do BPA por ruminantes machos púberes, mas também, e principalmente, evidenciou a grande variabilidade de efeitos entre as espécies, deixando clara a necessidade do desenvolvimento de protocolos específicos e mais sensíveis para avaliações de risco e regulamentação de diferentes produtos veterinários (medicamentos), que vêm sendo amplamente utilizados em ruminantes, ou mesmo na análise de risco de praguicidas e contaminantes ambientais. Ainda, pelas avaliações aqui realizadas, esta pesquisa permite incluir as fitotoxinas no rol dos DEs.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ A administração da dose de 25mg/kg/dia de BPA, via oral, a caprinos machos púberes por um período de 120 dias foi responsável por: diminuição do nível sérico de T4; diminuição da qualidade espermática; degeneração vacuolar da rete testis.
- ✓ O BPA se mostrou um provável DE para caprinos machos púberes.
- ✓ A variabilidade de efeitos e de suscetibilidade aos DEs entre as espécies monogástricas e poligástricas evidenciou a necessidade de protocolos específicos para avaliação de DEs nas diferentes espécies animais.
- ✓ A *I. carnea* administrada em uma dose que não promove sintomatologia em caprinos machos púberes (5g/kg/dia de folhas frescas), por 120 dias causou, nestes animais: diminuição dos níveis séricos de hormônios tireoidianos (T3 e T4) resultando em hipotireoidismo; aumento do número de espermatozoides com alterações morfológicas; degeneração vacuolar testicular, sendo estes efeitos produzidos pela suainsonina, que a inclui como um DE para ruminantes.
- ✓ O protocolo aqui empregado para avaliação de possíveis efeitos DEs de xenobióticos em ruminantes se mostrou eficaz; no entanto é necessário incorporar outras metodologias com o objetivo de detectar, com maior sensibilidade, os efeitos adversos de xenobióticos no sistema endócrino de ruminantes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKINGBEMI, T. B.; SOTTAS, M. C.; KOULOVA, I. A.; KLINEFELTER, R. G.; HARDY, P. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary Luteinizing Hormone secretion and decrease steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. **Endocrinology**, v. 145, p. 592-603, 2004.
- AL-HIYASAT, A. S.; DARMANI, H.; ELBETIEHA, A. M. Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. **European journal of oral sciences**, v. 110, n. 2, p. 163-167, 2002.
- ANDERSEN, H. R.; COOK, S. J.; WALDBILLIG, D. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 179, p. 1-12, 2002.
- ANDRIANA, B. B.; TAY, T. W.; HIRAMATSU, R.; AWAL, M. A.; KANAI, Y.; KUROHMARU, M.; HAYASHI, Y. Bisphenol A- induced morphological alterations in Sertoli and spermatogenic cells of immature Shiba goats in vitro: An ultrastructural study. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 3, p. 205-210, 2004.
- ANWAY, M. D.; CUPP, A. S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**, v.308, p.1466-1469, 2005.
- ANWAY, M. D.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. **Endocrinology**, v. 147, v. 6, p. 43-49, 2006.
- ARMÍÉN, A. G.; TOKARNIA, C. H.; VARGAS PEIXOTO, P.; FRESE, K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 170-84, 2007.
- ASANO, N.; KATO, A.; OSEKI, K.; KIZU, H.; MATSUI, K. Calystegins of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae). Structure determination and their glycosidase inhibitory activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 229, n. 2, p. 369-376, 1995.
- AUSTIN, D. F.; HUAMAN, Z. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. **Táxon**, v. 45, p. 3-38, 1996.
- AZIZI, F. Glutamyl Transpeptidase Levels in Thyroid Disease. **Archives Internal Medicine**, v.142, n.1, p.79-81, 1982.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BAGGOT, J. D. Veterinary Dosage Forms In: SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007. p.3941-3977.

BAHAMONDES, L.; FAZANO, F.; LUCIO, M. A.; NEVES, P. A.; BOTTCHE L. F.; LORENZETTI, G. B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. **Andrologia**, v. 33, p 75-77. 2001.

BARBOSA-FERREIRA, M. **Proposta de modelo para estudo de toxicologia perinatal em ruminantes: avaliação dos efeitos tóxicos da Senna occidentalis em caprinos**. 2008. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Iowa State University Press: Ames, 1989.

BELL, E. M.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; BEAUMONT, J. J. A case-control study of pesticides and fetal death due to congenital anomalies. **Epidemiology**, v. 12, p. 148-156, 2001.

BELLINGHAM, M.; MCKINNELL, C.; FOWLER, P. A.; AMEZAGA, M. R.; ZHANG, Z.; RHIND, S. M.; COTINOT, C.; MANDON-PEPIN, B.; EVANS, N. P.; SHARPE, R. M. Fetal and post-natal exposure of sheep to sewage sludge chemicals disrupts sperm production in adulthood in a subset of animals. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 317–329, 2012.

BILES, J. E.; MCNEAL, T. P.; BEGLEY, T. H.; HOLLIFIELD, H. C. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3541–3544, 1997.

BLOM, E. The ultra-structure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BRANDÃO, M.; CALDAS, L. Q. Q.; COSTA, C. H. C.; FERREIRA, P. B. D. F. “Plantas Tóxicas”. **Informe Agropecuário**, v. 14, p. 13-23, 1989.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. Rio de Janeiro: Melhoramentos, 1962. 305 p.

CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed., Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

CHALOUB, M. C. L. **Aspectos ultra-sonográficos e concentração de progesterona na gestação de ovelhas (ovis aries) das raças Bergamácia e Ideal**. 2000. 129 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Área de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

CHAN, P.; TREDWAY, D.; SU, B.; CORSELLE, J.; REN, R. Combined supravital stains and hypoosmotic swelling test. **Human Reproduction** , v. 6, p. 1115-1118, 1991.

CHITRA, K. C.; LATCHOUMYCANDANE, C.; MATHUR, P. P. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. **Toxicology**, v. 185, n. 1-2, p. 119-127, 2003.

CHITRA, K. C.; RAO, K. R.; MATHUR, P. P. Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study. **Asian Journal of Andrology**, v.5, n.3, p.203-208, 2003.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D. **O futuro roubado**. Porto Alegre: Rio Grande do Sul, 2002.

CORREA J. R.; ZAVOS P. M. The hyposmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of frozen-thawed bovine sperm membrane **Theriogenology** v.42, p.351-360,1994.

CREWS, D.; WILLIINGHAM, E.; SKIPPER, J. K. Endocrine disruptors: present issues, future directions. **The Quarterly Review of Biology**, v.75, p. 243-260, 2000.

DAMGAARD, I. N.; SKAKKEBAEK, N. E.; TOPPARI, J.; VIRTANEN, H. E.; SHEN, H.; SCHRAMM, K.W.; PETERSEN, J. H.; JENSEN, T. K.; MAIN, K. M. Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1133-1138, 2006.

DAMIR, A. H.; ADAM, S. E. I.; TARTOUR, G. The effects of Ipomoea carnea on goats and sheep. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 316-319, 1987.

DE BALOGH, K. I. M.; DIMANDE, A. P.; VAN DER LUGT, J. J.; MOLYNEUX, R. J.; NAUDÉ, T. W.; WELMAN, W. G. A lysosomal storage disease induced by Ipomoea carnea in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 266-273, 1999.

DODDS, E. C.; GOLDBERG, L.; LAWSON, W.; ROBINSON, R. Estrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. **Nature**, v. 141, p. 247-248, 1938.

DORLING, P. R.; HUXTABLE, C. R.; VOGEL, P. Lysosomal storage in Swainsona spp. Toxicosis: an induced mannosidosis. **Neuropathology Applied Neurobiology**, v. 4, p. 285-295, 1978.

ELBEIN, A. D. The effects of plant indolizidine alkaloids and related compounds in glycoprotein processing. In: JAMES, L. F.; ELBEIN, A. D.; MOLYNEUX, R. J.; WARREN, C. D. **Swainsonine and related glycosidase inhibitors**. Ames: Iowa University Press, 1989. p. 155-187.

- FERNANDEZ, M. A.; LIMAVERDE, A. M.; CASTRO, I. B.; ALMEIDA, A. C. M.; WAGENER, A. L. R. Ocorrência de Imposex em *Thais Haemastoma*: Possíveis Evidências e Contaminação Ambiental Por Compostos Organotínicos no Rio De Janeiro e em Fortaleza, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 463-476, 2002.
- FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; ROVAY, H.; BORGES, A. M.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V. V.; FRAGA, D. B. M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 436-457, 2001.
- FRY, D. M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 7, p. 165-171, 1995.
- GAD, S. C.; WEIL, C. S. Statistics for toxicologists. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 435-483.
- GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004. 260 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- GARDINER, M. R.; ROYCE, R.; OLDROYD, B. *Ipomoea muelleri* intoxication of sheep in Western Australia. **British Veterinary Journal**, v. 121, p. 272-277, 1965.
- GENTILCORE, D.; PORRECA, I.; RIZZO, F.; GANBAATAR, E.; CARCHIA, E.; MALLARDO, M.; DE FELICE, M.; AMBROSINO, C. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. **Toxicology**, v.304, p.21-31,2013.
- GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W. Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod molluscs. In: Kramer K. J. M. **Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 205-226.
- GONÇALVES, M. L. Convolvulaceae-Custaceae. In: LAUNERT, E. **Flora zambesiaca**. London: Flora Zambesiaca Managing Committee, 1987. p. 117-118.
- GOTARDO, A. T. **Avaliação da toxicidade da *Ipomoea carnea* em caprinos durante o período perinatal: estudos de neuroteratologia**. 2009. 122 p. Tese (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- GOTARDO, A. T.; PFISTER, J. A.; FERREIRA, M. B.; GORNIK, S. L. Effects of prepartum ingestion of *Ipomoea carnea* on postpartum maternal and neonate behavior in goats. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 92, p. 131-138, 2011.
- GOTARDO, A. T.; SCHUMACHER-HENRIQUE, B.; PFISTER, J. A.; TRALDI, A. S.; MAIORKA, P. C.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. The use of ultrasonography to study teratogenicity in ruminants: evaluation of *Ipomoea carnea* in goats. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 95, n. 4, p. 289-295, 2012.

GUILLETE, L. J. J.; PICKFORD, D. B.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 101, p. 32-42, 1996.

GUILLETTE, L. J. J.; WOODWARD, A. R.; CRAIN, A. D.; PICKFORD, D. B.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven florida lakes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 116, p. 356–372, 1999.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; IKEDA, K.; MINAMI, Y.; KATO, A.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; MOLYNEUX, R. J.; ASANO, N. Alkaloidal components in the poisonous plant, Ipomoea carnea (Convolvulaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 4995-5000, 2003.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G. **Toxicologic pathology**. New York: Academic Press, 1998.

HEINDEL, J. J. The fetal basis of adult disease: role of environmental exposures-introduction. **Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology**, v. 73, p. 131-132, 2005.

HITLOCK, A. V. Some modifications of the McMaster helminth eggs; counting technique and apparatus. **Journal Hekminthology**, v. 29, p. 177-180, 1948.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphcars, 1939.

HOSSAIN, A. M.; RIZK, B.; BARIK, S. Time course of hypoosmotic swellings of human spermatozoa: evidence or ordered transition between swelling subtypes. **Human Reproduction**, v.13, p.1578-1583, 1998.

HOWARD, T. W.; PACE, M. M. Seminal evaluations and artifitial examination. In: LAING, J.A.; BRINLEY MORGAN, W.J.; WAGNER, W.C. **Fertility and infertility in Veterinary Practise**. London: Bailliere Tindall, 1988. p. 39-51.

HUEZA, I. M.; GÓRNIK, S. L. The immunomodulatory effects of Ipomoea carnea in rats vary depending on life stage. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1690-1700, 2011.

HUXTABLE, C. R.; DORLING, P. R. Nephrotic syndrome and collagenizing glomerulopathy in PVG/c rats treated with the alfa-mannosidase inhibitor "Swainsonine". **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 727-736, 1983.

IIDA, H.; MAEHARA, K.; DOIGUCHI, M.; MORI, T.; YAMADA, F. Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. **Reproductive Toxicology**, v.17, p.457–464, 2003.

JAMES, J. D.; NIELSON, D. Locoweeds: assessment of the problem on western U.S. rangelands. In: JAMES, L. F.; RALPHS, M. H.; NIELSON, D. B. **The ecology and economic impact of poisonous plants on livestock production**. Boulder: Westview Press, 1988. p. 171-180.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.

JOHANISSON, E.; CAMPANA, A.; LUTHI, R.; AGOSTINI, A. Evaluation of round cells in sêmen analysis: a comparative study. **Human Reproduction Update**, v.6, n. 4, p. 404-412, 2000.

JOHNSON, W. H. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, n.2, p.255-270, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARASUNO, T.; KANAYAMA, Y.; NISHIURA, T.; NAKAO, H.; YONEZAWA, T.; TARUI, S. Glycosidase inhibitors (castanospermine and swainsonine) and neuraminidase inhibit pokeweed mitogen-induced B-cell maturation. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2003-2008, 1992.

KAWAI, K.; TAKEHIRO, N.; NISHIKATA, H.; AOU, S.; TAKII, M.; KUBO, C. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: The effects of fetal exposure to bisphenol A. **Environ Health Perspect**, v. 111, p. 175-178, 2003.

KOJIMA, H.; KATSURA, E.; TAKEUCHI, S.; NIIYAMA, K.; KOBAYASHI, K. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. **Environmental Health Perspectives**, v.112, 524-531, 2004.

KOLPIN, D. W.; THURMAN, E. M.; LINHART, S. M. Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. **Science of the Total Environment**, v. 248, p. 115-122, 2000.

KRISHNAN, A.; STATHIS, P.; PERMUTH, S.; TOKES, L.; FELDMAN, D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, v. 132, p. 2279–2286, 1993.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine sêmen to the hypoosmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.

LI, D. K.; ZHOU, Z.; MIAO, M.; HE, Y.; WANG, J.; FERBER, J.; HERRINTON, L. J.; GAO, E.; YUAN, W. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. **Fertil Steril**, v.95, n.2, p.625-630, 2011.

LEE, K. H.; HESS, R. A.; BAHR, J. M.; LUBAHN, D. B.; TAYLOR, J.; BUNICK, D. Estrogen Receptor α Has a Functional Role in the Mouse Rete Testis and Efferent Ductules. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1873–1880, 2000.

- LEE, H. J.; CHALTOPADHYAY, S.; GONG, E. Y.; AHN, R. S.; LEE, K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. **Toxicology Science**, v.75, n. 1, p. 40-46, 2003.
- LEMAIRE, G.; MNIF, W.; MAUVAIS, P.; BALAGUER, P.; RAHMANI, R. Activation of alpha- and beta- estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. **Life Sciences**, v. 79, p. 1160-1169, 2006.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. São Paulo: Platarum, 1991.
- MALIK, R.; HODGSON, H. The relationship between the thyroid gland and the liver. **QJM**, v.95, n.9, p559-569, 2002.
- MANTZOROS, C. S. Role of leptin in reproduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 900, p. 174-183, 2000.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- MEEKER, J. D.; EHRLICH, S.; TOTH, T. L.; WRIGHT, D. L.; CALAFAT, A. M.; TRISINI, A. T.; YE, X.; HAUSER, R. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. **Reproductive Toxicology**, v.30, n.4, p.532-539, 2010.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987.
- MOSCHOS, S.; CHAN, J. L.; MANTZOROS, C. S. Leptin and reproduction: a review. **Fertility and Sterility**, v. 77, n.3, p. 433-444, 2002.
- MILNES, M. R.; WOODWARD, A. R.; ROONEY, A. A.; GUILLETTE, L. J. Plasma Steroid Concentrations in Relation to Size and Age in Juvenile Alligators From Two Florida Lakes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 131, p. 923-930, 2002.
- MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 2265-2303, 2011.
- NAKAMURA, D.; YANAGIBA, Y.; DUAN, Z.; ITO, Y.; OKAMURA, A.; ASAEDA, N.; TAGAWA, Y.; LI, C.; TAYA, K.; ZHANG, SY.; NAITO, H.; RAMDHAN, D.H.; KAMIJIMA, M.; NAKAJIMA, T. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. **Toxicology Letters**, v.15, v.194, p.16-25, 2010.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERRO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p.721-727, 1999.
- NELSON, B. K.; JAMES, L. F.; SHARMA, R. P.; CHENEY, C. D. Locoweed embryotoxicity in rats. **Clinical Toxicology**, v 16, p. 149-166, 1980.

- NIE, G. J.; WENZEL, J. G. W. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v.55, p.1005-1018, 2001.
- OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C.; KROTH, E.; LARA, G.; SMIDERIE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.375-376, 2003.
- PALANZA, P.; MORELLINI, F.; PARMIGIANI, S.; VOM SAAL, F. S. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: Effects on behavioral development. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.23, n.7, p.1011-1027, 1999.
- PAN, Y. T.; GHIDONI, Y.; ELBEIN, A. D. The effects of castanospermine and swainsonine on the activity and synthesis of intestinal sucrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, p. 134-144, 1993.
- PANTER, K. E.; JAMES, L. F.; HARTLEY, W. J. Transient testicular degeneration in rams fed locoweed (*Astragalus lentiginosus*). **Veterinary and Human Toxicology**, v. 31, p. 42-46, 1989.
- PAUL, C.; RHIND, S. M.; KYLE, C. E.; SCOTT, H.; MCKINNELL, C.; SHARPE, R. M. Cellular and hormonal disruption of fetal testis development in sheep reared on pasture treated with sewage sludge. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 11, p. 1580-1587, 2005.
- POTTENGER, L. H.; DOMORADZKI, J. Y.; MARKHAM, D. A.; HANSEN, S. C.; CAGEN, S. Z.; WAECHTER, J. R. J. M. The Relative Bioavailability and Metabolism of Bisphenol A in Rats Is Dependent upon the Route of Administration. **Toxicological Sciences**, v. 54, p. 3-18, 2000.
- RAMBABU, K.; SHAAFIE, I. A.; ANSARI, A.; BASHA, S. A.; ZIU, M. M. Studies on g-glutamyl transpeptidase in primary idiopathic hypothyroidism patients. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, 46, 140–144; 1991.
- RHIND, S. M.; EVANS, N. P.; BELLINGHAM, M.; SHARPE, R. M.; COTINOT, C.; MANDON-PEPIN, B.; LOUP, B.; SINCLAIR, K. D.; LEA, R. G.; POCAR, P.; FISCHER, B.; ZALM, E.; HART, K.; SCHMIDT, J-S.; AMEZAGA, M. R.; FOWLER, P. A. Effects of environmental pollutants on the reproduction and welfare of ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1227–1239, 2010.
- REYNOLDS, P.; VON BEHREN, J.; GUNIER, R. B.; GOLDBERG, D. E.; HERTZ, A.; HARNLY, M. E. Childhood cancer and agricultural pesticide use, an ecologic study in California. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 319-324, 2002.
- SAKAUE, M.; OHSAKO, S.; ISHIMURA, R.; KUROSAWA, S.; KUROMARU, M.; HAYASHI, Y. Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. **Journal of Occupational Health**, v. 43, p. 185-90, 2001.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M. A.; MAGALHÃES, D. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; PALÁCIO, A. R. S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p. 377-378, 2003.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p. 438-439, 2001.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. Version 9.1 for Windows. **SAS user's guide**: statistics. Cary, NC: SAS Inst. Inc., 2004.

SAVABIEASFAHANI, M.; KANNAN, K.; ASTAPOVA, O.; EVANS, N. P.; PADMANABHAN, V. Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. **Endocrinology**, v.147, n.12, p.5956-5966, 2006.

SCHRICK, K. N.; SURFACE, R. A.; PRITCHARD, J. Y.; DAILEY R. A.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology Reproduction**, v. 49, n. 5, p. 1133-1140, 1993.

SCHUMAHER HENRIQUE, B.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z.; SPINOSA, H. S. Toxicity of long term administration of *Ipomoea carnea* to growing goats: clinical, biochemical, haematological and pathological alterations. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 311-319, 2003.

SCHUMAHER HENRIQUE, B. **Efeitos tóxicos da Ipomoea carnea em caprinos**: estudos de teratogenicidade. 2005. 156 p. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 2003

SILVA JÚNIOR, V. A.; FRANÇA, L. R. Células de Leydig e esteroidogênese em mamíferos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 35, p. 15-29, 2001.

SKAKKEBÆK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome, an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human Reproduction**, v. 16, p. 972-978, 2001.

SNEDCOR, G. W. **Statistical methods**. Ames: College Press, 1946.

SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIK, S. L. Prenatal toxicity of cyanide in goats. A model for teratological studies in ruminants. **Theriogenology**, v. 62, p. 1012-1026, 2004.

SRILATHA, C. H.; GOPAL NAIDU, N. R.; RAMA RAO, P. Pathology of *Ipomoea carnea* toxicity in goats. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 7, n. 3, p. 253-254, 1997.

STAPLES, C. A.; DOME, P. B.; KLECKA, G.M.; OBLOCK, S. T.; HARRYS, L. R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.

STEGELMEIER, B. L.; RALPHS, M. H.; GARDNER, D. R.; MOLYNEUX, R. J.; JAMES, L. F. Serum α -mannosidase and the clinicopathologic alterations of locoweed (*Astragalus mollissimus*) intoxication in range cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 473-479, 1994.

STEGELMEIER, B. L.; JAMES, L. F.; PANTER, K. E.; MOLYNEUX, R. J. Serum swainsonine concentration and alpha-mannosidase activity in cattle and sheep ingesting *Oxytropis sericea* and *Astragalus lentiginosus* (locoweeds). **Veterinary and Human Toxicology**, v. 56, p. 149-154, 1998.

STEVENS, K. R.; GALO, M. Practical considerations in the conduct chronic toxicity studies. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 237-250.

SULTAN, C.; BALAGUER, P.; TEROUANNE, B.; GEORGET, V.; PARIS, F.; JEANDEL, C.; LUMBROSO, S.; NICOLAS, J. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 178, p.99-105, 2001.

SZABO, K. T. **Congenital malformations in laboratory and farm animals**. San Diego: Academic Press, 1989.

TABB, M. M.; BLUMBERG, B. New modes of action for endocrine disrupting chemicals. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 3, p. 475-482, 2006.

TAINAKA, H.; TAKAHASHI, H.; UMEZAWA, M.; TANAKA, H.; NISHIMUNE, Y.; OSHIO, S.; TAKEDA, K. Evaluation of the testicular toxicity of prenatal exposure to bisphenol A based on microarray analysis combined with MeSH annotation. **The Journal of toxicological sciences**, v.37, n.3, p. 539-548, 2012.

TAKAO, T.; NANAMYIA, W.; NAGANO, I.; ASABA, K.; KAWABATA, K.; HASHIMOTO, K. Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in Young mice. **Life Science**, v. 65, n. 22, p. 2351-2357, 1999.

TAYLOR, J. B.; STRICKLAND, J. R. In vitro effect of swainsonine on bovine and ovine lymphoblastogenesis. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2857-2862, 1998.

TIRKEY, K.; YADAVA, K. P.; MANDAL, T. K. Effect of aqueous extract of *Ipomoea carnea* on the haematological and biochemical parameters in goats. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 57, n. 9, p. 1019-1023, 1987.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Estudo experimental sobre a toxidez do "canudo" (*Ipomoea fistulosa* Mart.) em ruminantes. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, v. 3, p. 59-71, 1960.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas que causam perturbações nervosas. In: TOKARNIA, C. H. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. p.120-123.

TRALDI, A. S. **Tópicos em reprodução de caprinos**. São Paulo, [s.n.], 1994. 84 p. Manual Técnico.

TULSIANI, D. R. P.; TOUSTER, O. Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi manosidase II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 224, p. 594-600, 1982.

TULSIANI, D. R.; BROQUIST, H. P.; JAMES, L. F.; TOUSTER, O. Production of hybrid glycoproteins and accumulation of oligosaccharides in the brain of sheep and pigs administred swainsonine or locoweed. **Archieves of Biochemistry Biophysics**, v. 264, p. 607-617, 1988.

US. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. **Federal Register**, v. 56, n. 234, p. 63798-63826, 1991.

US.EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analisis**. Washington D. C.: U.S. Environmental Protection Agency, 1997. Report No.EPA/630/R-96/012.

VAN DER VEN, H. H.; JEYENDRAN, R. S.; AL-HASANI, S.; PEREZ-PELAEZ, M.; DIEDRICH, K.; ZANEVELD, L. I. D. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization. **Journal of Andrology**, v:7, p.190-196, 1986.

VAN KAMPEN, K. R.; JAMES, L. F. Sequential development of cytoplasmatic vacuolation in tissues. **Pathology Veterinary**, v. 7, p. 503-508, 1970.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIGUIÉ, C.; COLLET, S. H.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; PUEL, S.; ROQUES, B. B.; TOUTAIN, P. L.; LACROIX, M. Z. Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. **Endocrinology**, v.154, n.1, p.521-528, 2012.

VINGGAARD, A.M.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V.; LARSEN, J.C. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. **Toxicology in Vitro**, v.14, 227-234, 2000.

VOM SAAL, F. S.; COOKE, P. S.; BUCHANAN, D. L.; PALANZA, P.; THAYER, K. A.; NAGEL, S. C. A physiologicallybased approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. **Toxicology and Industrial Health**, v. 14, n. 12, p. 239-260, 1998.

VOM SAAL, F. S.; HUGHES, C. Na extensive new literature concerning low dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 926-933, 2005.

XIANG, H.; NUCKOLS, J. R.; STALLONES, L. A geographic information assessment of birth weight and crop production patterns around mother's residence. **Environmental Research**, v. 82, p. 160-167, 2000.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disrupters: a human risk?. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, n. 1, p. 2-9, 2005.

WELSHONS, W. V.; THAYER, K. A.; JUDY, B. M.; TAYLOR, T. A.; CURRAN, E. M.; VOM SAAL, F. S. Large effects from small exposure. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 994-1006, 2003.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Principles for the testing of drugs for Teratogenicity**. Geneva: World Health Organization Technical Report Series, 1967. p. 364.

WOLFINGER, R.; CHANG, M. Comparing the SAS GLM and MIXED procedures for repeated measures. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 11 p.