



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILENE LEIVAS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA E POSSÍVEIS
EFEITOS HORMONAIS DO FUNGICIDA PROPICONAZOL
EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS**

Londrina
2017



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILENE LEIVAS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA E POSSÍVEIS
EFEITOS HORMONAIS DO FUNGICIDA PROPICONAZOL
EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS**

MILENE LEIVAS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA E POSSÍVEIS
EFEITOS HORMONAIIS DO FUNGICIDA PROPICONAZOL
EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccato Gerardin.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vieira, Milena Leivas Vieira .

Avaliação da toxicidade reprodutiva e possíveis efeitos hormonais do fungicida propiconazol em duas gerações de ratos / Milena Leivas Vieira Vieira. - Londrina, 2017. 103 f. : il.

Orientador: Damiela Cristina Ceccatto Gerardin Gerardin.

Coorientador: Aba Carolina Inhasz Kiss Kiss.

Coorientador: Ernane Torres Uchôa Uchôa.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução humana. - Tese. 2. Hormônios sexuais. - Tese. 3. Fungicidas. - Tese. 4. Produtos químicos x Efeito fisiológico. - Tese. I. Gerardin, Damiela Cristina Ceccatto Gerardin. II. Kiss, Aba Carolina Inhasz Kiss. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

MILENE LEIVAS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA E EFEITOS
HORMONAIS DO FUNGICIDA PROPICONAZOL EM DUAS
GERAÇÕES DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Daniela Cristina
Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Titulares

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho – UNESP

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Suplentes

Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira
Zaia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 02 de março de 2017

AGRADECIMENTO (S)

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Daniela C.C. Gerardin, não só pela constante orientação neste trabalho, mas por ter acreditado em mim, ter me apoiado e incentivado, e sobretudo pela sua amizade.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela ajuda e apoio nas dúvidas metodológicas, além das contribuições no decorrer do trabalho. Assim como alguns docentes da UEL e das nucleadoras do programa.

Aos colegas de laboratório: Bruno, Nathália O., Simone, Karine, Marina, Bruna, Kennia, Vanessa, Alice e Nathália C., que me ajudaram com trabalho e apoio emocional, assim como os colegas de pós graduação que dividiram comigo angústias e sensações de que não seria possível.

Gostaria de agradecer ao meu esposo Ivan pelo incentivo, paciência, amor e companheirismo de todas as horas. Agradecer à toda minha família que contribuíram ao longo dessa jornada com amor, amizade e compreensão de muitas ausências. Agradeço, finalmente, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

VIERA, Milene Leivas. **Avaliação da toxicidade reprodutiva e efeitos hormonais do fungicida propiconazol em duas gerações de ratos**. 2017. 99 f. Tese (Doutorado no Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Estudos sugerem que o propiconazol (PROP) possa ser um desregulador endócrino (DE) por alterar a atividade da CYP51, que faz parte da biossíntese do colesterol necessário para a produção dos hormônios esteroides sexuais, ou ainda, inibir a enzima aromatase que converte os andrógenos em estrogênios, podendo levar a efeitos negativos nos parâmetros reprodutivos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos do PROP como DE, através do teste uterotrófico (U) e Hershberger (H), e avaliar os efeitos reprodutivos e de desenvolvimento nas gerações F1 e F2 de ratos, machos e fêmeas, com exposição crônica a esse fungicida. Ratas imaturas do teste U receberam PROP por 3 dias e, após 24 h do tratamento, foram eutanasiadas e seus úteros retirados e pesados. Os machos castrados do teste H receberam PROP por 10 dias, após 24 h do tratamento, foram eutanasiados e os órgãos hormônio-dependentes extraídos e pesados. Para exposição crônica, animais da geração F1 foram expostos ao PROP (4 ou 20mg/kg/dia) através de células germinativas (via tratamento da geração parental), intraútero e lactação até o desmame. A partir do dia pós-natal (DPN) 21, os machos foram tratados por gavagem até o DPN 120. As fêmeas foram divididas em 2 grupos (SG1 e SG 2): o SG1 foi tratado do DPN 21 até o DPN 90-100; e o SG2 foi tratado do DPN 21 até o dia lactacional 21. A geração F2 foi exposta através de células germinativas, intraútero e lactação até o DPN 21. Os parâmetros observados nas gerações F1 e F2, de ambos os sexos, foram: peso corporal, distância anogenital, reflexo ontogênico, peso e histomorfologia dos órgãos hormônio-dependentes e dosagem de testosterona (machos). Nos machos da geração F1 foram observados: instalação da puberdade, ganho de peso corpóreo, concentração plasmática de testosterona e estradiol, peso dos órgãos, contagem e morfologia espermática, histomorfometria testicular e comportamento sexual. Nas fêmeas da geração F1: instalação da puberdade, ganho de peso corpóreo, ciclo estral, concentração plasmática de estradiol, peso dos órgãos, histologia de útero e ovário, comportamento sexual, ganho de peso e ingesta de ração materno, comportamento materno e teste de fertilidade. Os resultados encontrados nos testes U e H indicaram que o PROP não apresenta efeitos (anti) estrogênicos ou (anti) androgênicos. Seus efeitos em longo prazo foram uma diminuição da concentração de testosterona nos machos pré-púberes, de ambas as gerações, e no peso do ducto deferente nos machos adultos F1, sem causar alterações na função dos órgãos reprodutivos. E nas fêmeas, PROP causou alterações no comportamento sexual e no ciclo estral da geração F1, mas também sem causar alterações funcionais no sistema reprodutivo. Concluindo que, em exposições prolongadas, esse fungicida pode apresentar efeitos de DE em ratos.

Palavras-chave: Propiconazol. Ducto deferente. testosterona. Ciclo estral. Comportamento sexual

VIERA, Milene Leivas. **Evaluation of reproductive toxicity and hormonal effects of propiconazole fungicide in two generations of rats.** 2017. 99 p. Tese (Doutorado no Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Studies have suggested that propiconazole (PROP) may be an endocrine disruptor (ED). It could alter the activity of the CYP51 enzyme, which is part of the cholesterol biosynthesis that is required for the production of sexual steroid hormones. Another PROP effect is the inhibition of the aromatase enzyme that converts androgens into the estrogens, which could lead to negative effects on the reproductive parameters. Therefore, this present study evaluated the potential effects of PROP through uterotrophic (U) and Hershberger (H) assays and evaluated the reproductive and developmental effects in F1 and F2 generations of male and female rats with chronic exposure to this fungicide. Immature rats from the U test received PROP for 3 days, after 24 h of treatment, they were euthanized and their uteri removed and weighed. The castrated males of the H test received PROP for 10 days, after 24 h of treatment they were euthanized and the hormone-dependent organs removed and weighed. In the chronic exposure, F1 animals were exposed to PROP (4 or 20 mg/kg/day) through germ cells (via parental generation), intrauterine and lactation until weaning. Males were treated, by gavage, from postnatal day (PND) 21 to 120. Females were divided into 2 groups (SG1 and SG2): SG1 was treated from PND 21 to PND 90-100; and SG2 was treated from PND 21 until lactational day 21. The F2 generation was exposed through germ cells, intrauterine and lactation until the PND 21. The parameters observed in F1 and F2 generations, of both sexes, were: body weight, anogenital distance, ontogenic reflex, weight and histomorphology of the hormone-dependent organs and testosterone (male). In males of the F1 generation, were observed: puberty, body weight gain, testosterone and estradiol, organ weight, sperm count and morphology, testicular histomorphometry and sexual behavior. In F1 females: puberty, body weight gain, estrous cycle, estradiol, organ weight, histology of uterus and ovary, sexual behavior, weight gain and maternal dietary intake, maternal behavior and fertility. The results found in the U and H tests indicated that PROP has no (anti) estrogenic or (anti) androgenic effects. The long-term effects on the reproductive function were a decrease in the concentration of testosterone in prepubertal males, of both generations, and decreased the weight of the vas deferens in adult males F1, without disrupting the function of the reproductive organs. And in females, PROP caused changes in the sexual behavior and estrous cycle of the F1 generation, but also without causing functional alterations in the reproductive system. Concluding that, in prolonged exposures, this fungicide may present DE effects in rats.

Key words: Propiconazole. Vas deferens. Testosterone. Estrus cycle. Sexual Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Delineamento experimental do teste uterotrófico e de Hershberger	22
Figura 2 -	Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao PROP nos machos da geração F1 e F2	26
Figura 3 -	Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao PROP nas fêmeas da geração F1 e F2	27
Figura 4 -	Plataforma para avaliação da geotaxia negativa.	30
Figura 5 -	Diferentes graus de lordose	40
Figura 6 -	Rata em posição arqueada de amamentação	41
Figura 7 -	Útero com pontos de implantação e ovários excisados, ambos após desmame, para contagem dos corpos lúteos	42
Figura 8 -	Peso corporal da prole masculina da geração F1 durante o período lactacional	53
Figura 9 -	Peso corporal da prole masculina da geração F2 durante o período lactacional	53
Figura 10 -	Peso corporal dos ratos da geração F1 durante o período de tratamento por gavage com PROP	57
Figura 11 -	Peso corporal da prole feminina da geração F1 durante o período Lactacional.....	63
Figura 12 -	Peso corporal da prole feminina da geração F2 durante o período lactacional	64
Figura 13 -	Peso corporal das ratas da geração F1 durante o período de tratamento gavage com PROP	68
Figura 14 -	Peso corporal das ratas da geração F1 durante o período gestacional e lactacional.....	73
Figura 15 -	Consumo de ração das ratas da geração F1 durante o período gestacional e lactacional.....	73
Figura 16 -	Comportamento materno do DL 1 ao 10 da geração F1	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das fêmeas que participaram do teste uterotrófico para atividade estrogênica.	46
Tabela 2 –	Peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das fêmeas que participaram do teste uterotrófico para atividade antiestrogênica.	47
Tabela 3 –	Peso corporal no primeiro e décimo dia de tratamento, ganho de peso corporal durante o tratamento, peso dos órgãos andrógenos dependentes e peso do fígado, rim direito e glândula adrenal direita dos machos que participaram do teste de Hershberger para atividade androgênica.	49
Tabela 4 –	Peso corporal no primeiro e décimo dia de tratamento, ganho de peso corporal durante o tratamento, peso dos órgãos andrógenos dependentes e peso do fígado, rim direito e glândula adrenal direita dos machos que participaram do teste de Hershberger para atividade antiandrogênica.	51
Tabela 5 –	DAG relativa no DPN 0 e 21, reflexos de endireitamento e geotaxia negativa dos diferentes grupos experimentais.	54
Tabela 6 –	Peso corporal, peso do testículo direito, índice gonadossomático (IGS) e concentrações hormonais dos machos das gerações F1 e F2 no DPN 21.	55
Tabela 7 –	Parâmetros histomorfométricos dos testículos dos machos no DPN 21 das gerações F1 e F2.	56
Tabela 8 –	Comportamento copulatório dos machos da geração F1 no DPN 90-100.	58
Tabela 9 –	Preferência sexual de machos da geração F1 no DPN 90-100.	59

Tabela 10 –	Peso corporal, distância anogenital (DAG), concentrações hormonais e peso dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado dos machos da geração F1 no DPN 120.....	60
Tabela 11 –	Parâmetros espermáticos dos machos da geração F1 no DPN 120.....	61
Tabela 12 –	Parâmetros histomorfométricos dos testículos dos ratos da geração F1 no DPN 120.....	62
Tabela 13 –	DAG relativa no DPN 0 e 21, reflexos de endireitamento e geotaxia negativa dos diferentes grupos experimentais.....	64
Tabela 14 –	Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e índice gonadossomático (IGS) das fêmeas das gerações F1 e F2 no DPN 21.....	65
Tabela 15 –	Quantificação folicular ovariana em fêmeas das gerações F1 e F2 no DPN 21.....	66
Tabela 16 –	Análise morfométrica uterina em fêmeas das gerações F1 e F2 no DPN 21.....	66
Tabela 17 –	Abertura vaginal, peso corporal no dia da abertura vaginal e 1º estro das fêmeas da geração F1.....	67
Tabela 18 –	Ciclo estral das fêmeas da geração F1 a partir do DPN 75.....	69
Tabela 19 –	Peso corporal, DAG, peso de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado e concentração plasmática de estradiol dos diferentes grupos experimentais.....	70
Tabela 20 –	Quantificação folicular ovariana em fêmeas dos diferentes grupos experimentais.....	71
Tabela 21 –	Análise morfométrica uterina em fêmeas da geração F1.	71
Tabela 22 –	Parâmetros avaliados durante o comportamento sexual de fêmeas dos diferentes grupos experimentais a partir do DPN 90.....	72
Tabela 23 –	Teste de fertilidade das fêmeas da geração F1.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOEL	Nível aceitável de exposição ao operador
AR	Receptor de andrógeno
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CHO	Ovário de hamster chinês
CTR	Controle
CTTS	Comprimento total dos túbulos seminíferos
DAG	Distância anogenital
DE	Desregulador endócrino
DG	Dia gestacional
DL	Dia lactacional
DPN	Dia pós natal
EPM	Erro padrão da média
ER	Receptor de estrógeno
F1	Primeira geração
F2	Segunda geração
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HHG	Hipotálamo-hipófise-gônadas
i.p.	Intra peritoneal
LH	Hormônio Luteinizante
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
P	Geração parental
PROP	Propiconazol
PROP20	Propiconazol 20 mg/kg/dia
PROP4	Propiconazol 4 mg/kg/dia
SG	Subgrupo
TESTO	Propionato de testosterona
UEL	Universidade Estadual de Londrina
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
VTS	Volume total dos túbulos seminíferos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE (ANTI) ESTROGÊNICA E ATIVIDADE (ANTI) ANDROGÊNICA DO FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS MACHOS E FÊMEAS	22
3.1.1	Delineamento Experimental	22
3.1.2	Drogas	22
3.1.3	Animais e Tratamento	23
3.1.4	Teste Uterotrófico.....	23
3.1.5	Teste de Hershberger	24
3.2	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO DO PROPICONAZOL NAS GERAÇÕES F1 E F2, SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA	26
3.2.1	Delineamento Experimental	26
3.2.2	Animais e Obtenção das Diferentes Gerações	27
3.2.3	Escolha da dose	28
3.2.4	Tratamento da Geração F1	28
3.2.5	Tratamento da Geração F2	29
3.2.6	Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nos Machos das Gerações F1 e F2	29
3.2.6.1	Desenvolvimento físico da prole masculina	29
3.2.6.2	Desenvolvimento reflexológico (ou comportamental)	30
3.2.6.3	Coleta de sangue, testículos e histomorfometria testicular no DPN 21.....	30
3.2.7	Parâmetros Analisados nos Machos da Geração F1	32
3.2.7.1	Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade	32
3.2.7.2	Comportamento sexual	32
3.2.7.2.1	<i>Comportamento copulatório</i>	32

3.2.7.2.2	<i>Teste de preferência sexual</i>	33
3.2.7.3	Concentração plasmática de testosterona e estradiol, retirada dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado.....	33
3.2.7.4	Parâmetros espermáticos	34
3.2.7.4.1	<i>Contagem espermática</i>	34
3.2.7.4.2	<i>Morfologia espermática</i>	35
3.2.7.5	Parâmetros histomorfométricos do testículo	36
3.2.8	Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nas Fêmeas das Gerações F1 e F2.....	36
3.2.8.1	Desenvolvimento físico da prole feminina	36
3.2.8.2	Desenvolvimento reflexológico (ou comportamental)	36
3.2.8.3	Coleta de órgãos reprodutivos para histomorfometria de útero e ovários e no DPN 21	36
3.2.9	Parâmetros Analisados nas Fêmeas da Geração F1	37
3.2.9.1	Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade	37
3.2.9.2	Acompanhamento do ciclo estral a partir do DPN 75	38
3.2.9.3	Concentração plasmática de estradiol, retirada dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado	38
3.2.9.4	Histomorfometria dos órgãos reprodutivos	39
3.2.9.5	Avaliação do comportamento sexual	39
3.2.9.6	Toxicidade geral materna	40
3.2.9.7	Avaliação do comportamento materno	41
3.2.9.8	Análise de fertilidade	42
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
3.4.1	Avaliação da Atividade (anti) Estrogênica e Atividade (anti) Androgênica do Fungicida Propiconazol em Ratos Machos e Fêmeas	43
3.4.2	Avaliação da Exposição ao Propiconazol nas Gerações F1 e F2, sobre Parâmetros de Toxicidade Reprodutiva	44
4	RESULTADOS	45
4.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE (ANTI) ESTROGÊNICA E ATIVIDADE (ANTI) ANDROGÊNICA DO FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS MACHOS E FÊMEAS	45

4.1.1	Teste Uterotrófico	45
4.1.1.1	Atividade estrogênica	45
4.1.1.2	Atividade antiestrogênica	46
4.1.2	Teste de Hershberger	47
4.1.2.1	Atividade androgênica	47
4.1.2.2	Atividade antiandrogênica	49
4.2	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO DO PROPICONAZOL NAS GERAÇÕES F1 E F2, SOBREPÂMETROS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA.....	52
4.2.1	Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nos Machos das Gerações F1 e F2	52
4.2.1.1	Desenvolvimento físico e comportamental da prole masculina	52
4.2.1.2	Peso corporal e testicular, índice gonadossomático, concentração hormonal e parâmetros histomorfométricos no DPN 21.....	54
4.2.2	Parâmetros Analisados nos Machos da Geração F1	56
4.2.2.1	Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade	56
4.2.2.2	Comportamento copulatório e preferência sexual	57
4.2.2.3	Peso corporal, DAG, concentrações hormonais e peso dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado dos machos da geração F1 no DPN 120.....	59
4.2.2.4	Parâmetros espermáticos e histomorfometria testicular	60
4.2.3	Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nas Fêmeas das Gerações F1 e F2.....	62
4.2.3.1	Desenvolvimento físico e comportamental da prole feminina	62
4.2.3.2	Peso corporal e de órgãos reprodutivos, índice gonadossomático, e parâmetros histomorfométricos de útero e ovário no DPN 21	65
4.2.4	Parâmetros Analisados nas Fêmeas da Geração F1	67
4.2.4.1	Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade	67
4.2.4.2	Acompanhamento do ciclo estral a partir do DPN 75	68
4.2.4.3	Peso corporal, DAG, peso de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado e concentração plasmática de estradiol	69
4.2.4.4	Histomorfometria dos órgãos reprodutivos das fêmeas da geração F1	70

4.2.4.5	Avaliação do comportamento sexual	71
4.2.4.6	Toxicidade geral materna	72
4.2.4.7	Avaliação do comportamento materno	74
4.2.4.8	Análise de fertilidade	75
5	DISCUSSÃO	76
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE (ANTI) ESTROGÊNICA E ATIVIDADE (ANTI) ANDROGÊNICA DO FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS MACHOS E FÊMEAS	76
5.2	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO PROPICONAZOL NAS GERAÇÕES F1 E F2, SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA.....	78
6	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO	99
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais.....	99

1 INTRODUÇÃO

O sistema endócrino é composto por uma série de glândulas e células especializadas em secretar hormônios diretamente na corrente sanguínea para controlar vários processos fisiológicos, como: crescimento e desenvolvimento, metabolismo, regulação do meio interno e reprodução (SILVERTHORN, 2012). Algumas substâncias exógenas encontradas no meio ambiente, quando absorvidas pelo organismo, podem alterar a função dos hormônios, interferindo nos eventos hormonais, como ação, síntese e eliminação (US EPA, 1997). Essas substâncias, chamadas de desreguladores endócrinos (DEs), podem causar efeitos adversos na saúde de um organismo, nos seus descendentes ou em subpopulações específicas (WHO/UENP, 2012).

Dentre as substâncias reconhecidas como DEs, estão os pesticidas usados na agricultura. Os produtos são considerados como tal se forem destinados a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga ou usados como reguladores de plantas, desfolhantes ou dessecantes (US EPA, 2014). Embora os principais efeitos dos pesticidas representem benefícios econômicos, pois seu uso, além de permitir o controle de pragas agrícolas e vetores de doenças de plantas, asseguram o aumento de produção alimentar e o abastecimento seguro de alimentos (COOPER, 2007; SOARES, 2010). Entretanto, muitas dessas substâncias são consideradas prejudiciais ao ecossistema, pois podem persistir em solos e sedimentos aquáticos, bioconcentrar nos tecidos de invertebrados e vertebrados deixando seres humanos e os animais continuamente expostos a uma série desses químicos através do ambiente (MNIF *et al.*, 2011).

Entre 2006 e 2007, aproximadamente 5,2 bilhões de pesticidas foram usados mundialmente (US EPA, 2011b). Países em desenvolvimento, como o Brasil, consumiram a maior parte dessa cota. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu a posição de maior mercado de agrotóxicos do mundo, e, em 2010, o consumo brasileiro representou 19% do mercado global de pesticidas (CARNEIRO, 2012).

Dos pesticidas considerados DEs, 31% são fungicidas (MNIF *et al.*, 2011) entre eles estão os compostos azólicos, como o ciproconazol, epoxiconazol, hexaconazol, tebuconazol e propiconazol (PROP), citados em um estudo de revisão

que identificou 127 agrotóxicos com propriedades de DEs (MCKINLAY *et al.*, 2008). Todos possuem uso autorizado no Brasil (FRIEDRICH, 2013) e, em 2010, representaram 14% do consumo interno (ANVISA; UFPR, 2012).

Os azóis, como o PROP, são fungicidas sintéticos que inibem a enzima fúngica do citocromo P450, lanosina 14 α -desmetilase, codificada pelo gene CYP51. A CYP 51 é comum entre animais, plantas e fungos (NELSON *et al.*, 1996). Essa enzima é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, o principal esterol na membrana celular do fungo. A diminuição na síntese de ergosterol e o acúmulo de 14 α -metil esteróis rompem as cadeias acil agrupadas dos fosfolípídeos nas membranas dos fungos. A desestabilização da membrana fúngica leva a disfunção das enzimas associadas à membrana podendo levar à morte celular (GOLAN, 2014; ZARN *et al.*, 2003). Entretanto, a desmetilação do lanosterol é uma etapa comum aos fungos e mamíferos na biossíntese de seus lipídios de membrana, considerando alguns antifúngicos como DEs. Assim, esses compostos podem inibir a CYP51, que, em mamíferos, incluindo humano, faz parte da via de biossíntese de colesterol, o qual está presente na membrana celular e também é necessário para a produção dos hormônios esteroides sexuais (ROCKETT *et al.*, 2006). Em humanos, a 14 α -desmetilase é expressa em alguns tecidos, como fígado, rins e adrenais (RAUCY *et al.*, 1991).

Sob suspeita de alterar vias do sistema endócrino ligadas aos hormônios derivados do colesterol, alguns estudos *in vitro* têm investigado o efeito da exposição ao PROP, durante 48 horas, utilizando a linhagem celular H295R, que é derivada de células de carcinoma adrenocortical humano e produz uma variedade de hormônios esteroides em quantidades mensuráveis, como testosterona, progesterona e estradiol (KJAERSTAD *et al.*, 2007). Esses estudos encontraram variações nas concentrações hormonais, por exemplo: aumento na produção de testosterona na concentração de 1,6 μ M, e diminuição nas concentrações entre 6,5 e 100 μ M (GOETZ *et al.*, 2009; KJAERSTAD *et al.*, 2007; TAXVIG *et al.*, 2013); em relação à progesterona, houve diminuição na produção em exposições nas concentrações entre 10 e 100 μ M (GOETZ *et al.*, 2009; TAXVIG *et al.*, 2013), ou aumento nas concentrações entre 1 e 50 μ M (KJAERSTAD *et al.*, 2007); e para o estradiol houve aumento na produção na concentração de 3 μ M (GOETZ *et al.*, 2009) e diminuição nas concentrações de 10 a 100 μ M (GOETZ *et al.*, 2009; KJAERSTAD *et al.*, 2007; TAXVIG *et al.*, 2013).

Investigações sobre o efeito do PROP na esteroidogênese *in vivo* também têm sido realizadas. Resultados do nosso laboratório (COSTA *et al.*, 2015) demonstraram que ratos Wistar tratados com 2 doses de PROP (4 e 20 mg/kg), do dia pós-natal (DPN) 50 até o DPN 120, apresentaram uma diminuição da concentração plasmática de estradiol no grupo tratado com 4 mg/kg, e ainda uma redução da concentração plasmática de testosterona, em ambos os grupos, porém sem diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, machos expostos intraútero a partir do dia gestacional (DG) 6 e depois através da ingesta de ração com PROP nas doses de 500 e 2500 ppm (~31,9 a 412,8 mg/kg/dia) apresentaram aumento na concentração de testosterona na idade adulta (GOETZ *et al.*, 2007), sem alteração de estradiol nas fêmeas (ROCKET *et al.*, 2006). Ratas prenhes tratadas por gavagem do DG 7 ao 21 com 50 mg/kg de PROP tiveram aumento nas concentrações plasmáticas do hormônio 17 α -hidroxiprogesterona, que é um subproduto da progesterona, sem alterar as concentrações hormonais testiculares de testosterona e progesterona na prole masculina (TAXVIG *et al.*, 2008). Ou seja, tanto estudos *in vitro* como *in vivo* demonstraram que o PROP é capaz de alterar a produção ou homeostase dos hormônios esteroides dependendo da dose e/ou tipo de exposição.

Sabe-se que o funcionamento do sistema reprodutor é essencialmente controlado pela produção, liberação e interação dos hormônios sexuais com seus receptores específicos, sendo sensível a alterações hormonais. Se um produto, como o PROP, é capaz de alterar a produção ou efeitos desses hormônios, pode também ocasionar desordens dos órgãos hormônio-dependentes. Isso foi demonstrado por estudos em que ratos tratados com PROP tiveram aumento dos pesos da vesícula seminal, ducto deferente na vida adulta (COSTA *et al.*, 2015) e do testículo na fase pré-púbere (GOETZ *et al.*, 2007).

Outro alvo dos componentes azóis é a aromatase (CYP 19) (KJELDSEN *et al.*, 2013; SANDERSON *et al.*, 2002; TRÖSKEN *et al.*, 2006; VINGGAARD *et al.*, 2000), enzima que, na esteroidogênese, converte andrógenos nos estrógenos correspondentes. Alguns estudos *in vitro* mostraram o potencial do PROP em induzir efeitos inibitórios na atividade da aromatase, em que a exposição a 1,9 μ M e 50 μ M foi capaz de inibir a atividade dessa enzima (SANDERSON *et al.*, 2002; VINGGAARD *et al.*, 2000;). Os autores desses trabalhos reforçam que a atividade da aromatase foi inibida em concentrações bem inferiores às que

provocaram os primeiros sinais de citotoxicidade. Outro estudo demonstrou que, na concentração de 5×10^{-5} M, PROP inibiu a atividade da aromatase, enquanto, nas concentrações de 1×10^{-6} M e 1×10^{-7} M, PROP induziu a atividade dessa enzima (KJELDSEN *et al.*, 2013). Ainda, alguns estudos indicam que PROP pode interagir com o receptor de estrógeno (KJAERSTAD *et al.*, 2007) e andrógenos (KJAERSTAD *et al.*, 2007, 2010; KJELDSEN *et al.*, 2013). A importância de androgênios e estrogênios no desenvolvimento dos órgãos reprodutores e da fertilidade é amplamente conhecida, sendo assim, qualquer alteração na expressão e/ou alterações na atividade catalítica da aromatase podem ter efeitos negativos nos parâmetros de reprodução (ZARN *et al.*, 2003). Além da CYP 51 e CYP 19, alguns estudos apontam efeitos do PROP em outras enzimas hepáticas como CYP 17 (TAXVIG *et al.*, 2008), CYP1, CYP2 e CYP 3 (SUN *et al.*, 2005).

Analisando os estudos disponíveis na literatura, pode-se observar que alguns deles indicam uma possível ação de PROP como um DE (COSTA *et al.*, 2015; GOETZ *et al.*, 2007, 2009; KJAERSTAD *et al.*, 2007; TAXVIG *et al.*, 2013). No entanto, há apenas um estudo (FAO/WHO, 1988), não publicado nas bases de dados científicas, sobre o impacto do uso prolongado desse fungicida na primeira (F1) e segunda (F2) gerações de ratos. O estudo (FAO/WHO, 1988) constatou que o tratamento e a exposição a doses elevadas de PROP (100-2500 ppm ~10-250 mg/kg/dia) levaram à redução do peso corporal das progenitoras e das ninhadas F1 e F2, a baixa taxa de sobrevivência durante a lactação em F2 e diminuição do peso de órgão, como testículo e epidídimo, em F1. Ainda, foram encontradas baixas concentrações de PROP no líquido amniótico de ratos (BOSSI *et al.*, 2013), assim como excreção via leite materno de aproximadamente 0,2% da dose ingerida em cabras (FAO/WHO, 2004). Alterações na distância anogenital, no peso corporal e do fígado ao nascimento foram relatadas em ratos expostos ao PROP intraútero (GOETZ *et al.*, 2007; TAXVIG *et al.*, 2008).

Com base nas considerações descritas, percebe-se que são necessários outros estudos que ajudariam esclarecer os efeitos do PROP como DE. Além disso, a maioria dos estudos *in vivo* utilizaram doses acima da ingestão diária aceitável (0,04 mg/kg/dia, ANVISA 2003), e sabe-se que os efeitos dos DE dependem da dose e do tempo de exposição. As doses mais baixas podem causar alterações de parâmetros diferentes quando comparadas com doses altas, pois os mecanismos para esses efeitos dose-específicos são diferentes, como a sinalização

através de receptores de esteroides, devido à não seletividade em doses mais elevadas, regulação negativa do receptor a doses elevadas *versus* regulação positiva em doses baixas, diferenças nos receptores presentes em vários tecidos e citotoxicidade em doses elevadas (VANDENBERG *et al.*, 2012). Sendo assim, esse estudo foi concebido para examinar os potenciais efeitos do PROP como DE, com exposição aguda, através do teste uterotrófico e Hershberger, e exposição crônica, avaliando os efeitos reprodutivos e de desenvolvimento nas gerações F1 e F2 de ratos machos e fêmeas através de células germinativas, exposição intrauterina, via lactação e tratamento por gavage. Além da exposição intrauterina, as células germinativas podem ser diretamente afetadas pelo PROP causando um efeito transgeracional e essas hipóteses ainda não foram investigadas. Assim, a condução deste estudo baseou-se nos guias OCSPP 890.1400 e OPPTS 890.1600 do EPA (US EPA, 2009, 2011a) para avaliar os efeitos do PROP na atividade dos receptores de estrógenos e andrógenos, e no guia da OECD/OCDE (416) que padroniza os procedimentos para avaliação da toxicidade reprodutiva de substâncias em duas gerações (OECD, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o propiconazol apresenta atividade (anti) estrogênica ou (anti) androgênia em ratos, bem como investigar a influência em longo prazo desse praguicida na função reprodutiva de duas gerações de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar os testes uterotrófico e de Hershberger, para a verificação das atividades (anti) estrogênica e (anti) androgênica respectivamente.

Investigar se exposição crônica ao PROP, em duas gerações de ratos, pode alterar:

- nos machos da geração F1,

- O desenvolvimento físico (peso corporal e distância anogenital), reflexos comportamentais, puberdade, concentração plasmática hormonal e histomorfometria do testículo em dois períodos de desenvolvimento, comportamento sexual (copulatório e preferência sexual), motilidade e contagem espermática;

- nos machos da geração F2,

- O desenvolvimento físico (peso corporal e distância anogenital), reflexos comportamentais, concentração plasmática de testosterona e histomorfometria do testículo no DPN 21;

- nas fêmeas da geração F1,

- O desenvolvimento físico (peso corporal e distância anogenital), reflexos comportamentais, histomorfometria do útero e ovário em dois períodos de desenvolvimento, puberdade, ciclo estral, concentração plasmática de estrógeno, comportamentos reprodutivos (sexual e materno), fertilidade e toxicidade materna (peso corporal e ingesta de ração);

- nas fêmeas da geração F2,

- O desenvolvimento físico (peso corporal e distância anogenital), reflexos comportamentais e histomorfometria do útero e ovário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE (ANTI) ESTROGÊNICA E ATIVIDADE (ANTI) ANDROGÊNICA DO FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS, MACHOS E FÊMEAS

Para essa avaliação, foram seguidas as orientações dos guias OCSP 890.1400 e OPPTS 890.1600 do *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) (US EPA, 2009, 2011a).

3.1.1 Delineamento Experimental

O diagrama a seguir resume o delineamento experimental empregado para os testes de avaliação da atividade (anti) estrogênica através do teste uterotrófico (Figura 1.A) e atividade (anti) androgênica através do teste de Hershberger (Figura 1.B).

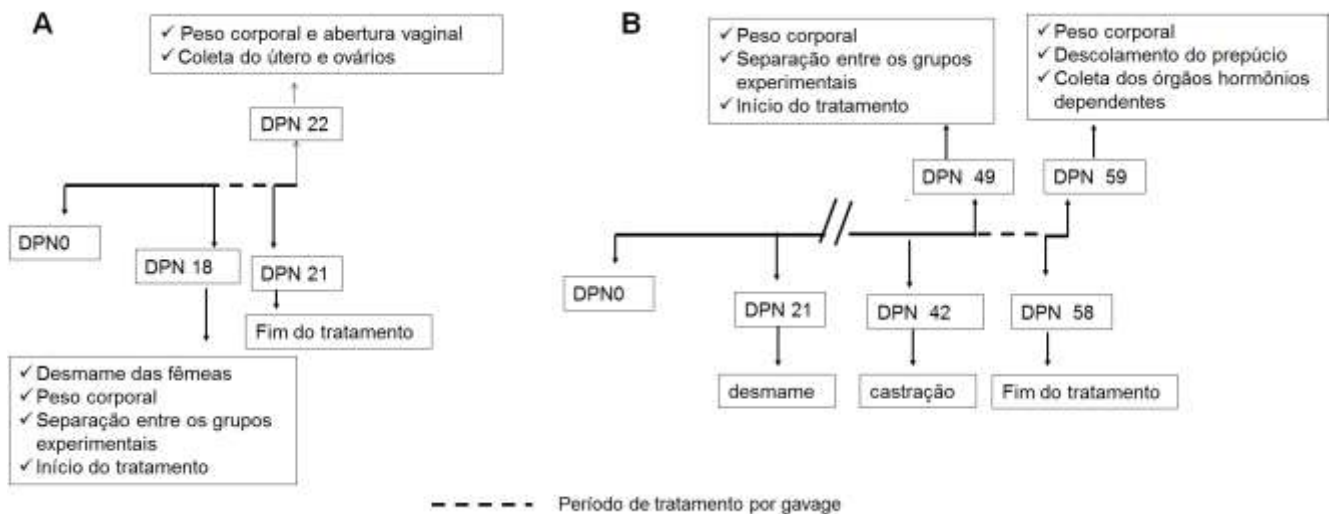


Figura 1. Delineamento experimental do teste uterotrófico (A) e de Hershberger (B). DPN: dia pós-natal.

3.1.2 Drogas

O valerato de estradiol e o citrato de tamoxifeno foram obtidos da Pharma Nostra Comercial (Rio de Janeiro, Brasil), o propionato de testosterona foi obtido da Fragon (São Paulo, Brasil) e o PROP (93% pureza - CAS no. 60207-90-1) foi doado pelo Setor de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O

citrato de tamoxifeno foi dissolvido em água destilada e as outras drogas foram dissolvidas em óleo de milho.

As doses escolhidas para o valerato de estradiol, citrato de tamoxifeno e propionato de testosterona seguiram a orientação dos guias (US EPA, 2009, 2011a). A escolha das doses do PROP será explicada com maiores detalhes no item 3.2.3.

3.1.3 Animais e Tratamento

Ratos Wistar, machos e fêmeas, provenientes da colônia do Biotério Central da UEL e transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas do CCB foram colocados para acasalamento. O dia do nascimento foi considerado DPN 0 e, no DPN 4, o tamanho da ninhada foi ajustado para 10 e, sempre que possível, foi mantido um número igual de machos e fêmeas entre as ninhadas.

As ninhadas foram desmamadas no DPN 18 e separadas por grupo experimental, não sendo usados irmãos no mesmo grupo. Os animais foram colocados em gaiolas coletivas (29x18x13cm), com serragens de madeira como cama e mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvilab®, Colombo, PR) à vontade.

Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e o protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética institucional (CEUA UEL19726.2013.45).

3.1.4 Teste Uterotrófico

No DPN 18, as ratas foram pesadas e distribuídas aleatoriamente para cada grupo experimental, com $n=6/7$ por grupo.

Com o objetivo de avaliar um possível efeito estrogênico do PROP, as ratas foram distribuídas nos seguintes grupos:

- Grupo Veículo (controle negativo): tratado com óleo de milho;
- Grupo Estradiol (controle positivo): tratado com valerato de estradiol na dose de 0,3 mg/kg;

- Grupo PROP4: tratado com PROP na dose de 4mg/kg;
- Grupo PROP20: tratado com PROP na dose de 20 mg/kg;
- Grupo PROP50: tratado com PROP na dose de 50 mg/kg.

Para avaliar a antiestrogenicidade do PROP, as ratas foram distribuídas nos seguintes grupos:

- Grupo Estradiol: tratado com valerato de estradiol na dose de 0,3 mg/kg/dia;
- Grupo Estradiol + Tamoxifeno (controle positivo): tratado com valerato de estradiol na dose de 0,3 mg/kg e tamoxifeno na dose de 10mg/kg;
- Grupo PROP4 + estradiol: tratado com PROP na dose de 4mg/kg e valerato de estradiol na dose de 0,3 mg/kg;
- Grupo PROP20 + estradiol: tratado com PROP na dose de 20 mg/ kg e valerato de estradiol na dose de 0,3 mg/kg;
- Grupo PROP50 + estradiol: tratado com PROP na dose de 50 mg/kg e valerato de estradiol na dose de 0,3 mg/kg.

O tamoxifeno foi escolhido para o teste antiestrogênico por ser um modulador receptivo de estrógeno. As substâncias foram administradas por gavagem depois de 3 horas de restrição alimentar por 3 dias consecutivos (entre 13h e 13h30). Durante o período de tratamento, os animais foram acompanhados diariamente quanto a peso, mortalidade, morbidade ou sinais gerais de toxicidade, como mudanças comportamentais (agitação ou letargia), alterações neurológicas (convulsão, tremor, rigidez muscular e hiper-reflexia) e sinais autonômicos (lacrimejamento, piloereção, alteração pupilar e padrão respiratório alterado). Após 24 horas do último tratamento, os animais foram pesados e inspecionados quanto à abertura vaginal, em seguida, foram submetidos a eutanásia com tiopental sódico (40mg/kg, i.p.). Após a laparotomia, o útero foi retirado e seccionado logo abaixo da sua junção com a cérvix e na junção dos cornos uterinos com os ovários, dissecado cuidadosamente para retirar o tecido conectivo adjacente. Em seguida, o útero foi pesado e posteriormente perfurado com uma agulha, colocado entre duas folhas de papel-filtro para retirada do líquido retido e então pesado novamente.

3.1.5 Teste de Hershberger

No DPN 42, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg i.p.) e realizado o procedimento de castração por incisão no escroto e

remoção de ambos os testículos e epidídimo com ligadura dos vasos sanguíneos e ductos seminais. No DPN 49, os ratos foram pesados e aleatoriamente distribuídos entre os grupos experimentais com n=6 por grupo.

Com o objetivo de avaliar o possível efeito androgênico do PROP, os ratos foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo Veículo (controle negativo): tratado com óleo de milho;
- Grupo TESTO (controle positivo): tratado com propionato de testosterona (TESTO) na dose 0,4 mg/kg;
- Grupo PROP4: tratado com PROP na dose de 4mg/kg;
- Grupo PROP50: tratado com PROP na dose de 50 mg/kg.

Com o objetivo de avaliar o possível efeito antiandrogênico do PROP, os ratos foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo TESTO: tratado com TESTO na dose 0,4 mg/kg;
- Grupo TESTO + Flutamida (controle positivo): tratado com TESTO na dose 0,4 mg/kg mais flutamida na dose de 3 mg/kg;
- Grupo PROP4 + TESTO: tratado com PROP na dose de 4mg/kg e TESTO na dose 0,4 mg/kg;
- Grupo PROP20 + TESTO: tratado com PROP na dose de 20 mg/ kg e TESTO na dose 0,4 mg/kg;
- Grupo PROP50 + TESTO: tratado com PROP na dose de 50 mg/kg e TESTO na dose 0,4 mg/kg.

A flutamida foi escolhida para o teste antiandrogênico por ser antagonista dos receptores de andrógenos. A testosterona foi administrada por via subcutânea, e as demais substâncias foram administradas por gavagem, depois de 3 horas de restrição alimentar, por 10 dias consecutivos (entre 13h e 13h30). Como descrito anteriormente para o teste uterotrófico, os animais foram observados diariamente quanto aos sinais de toxicidade e foi acompanhado o peso corporal. Depois de 24 horas da última dose de tratamento (DPN 59), os animais foram pesados e submetidos a eutanásia com tiopental sódico (40mg/kg, i.p.), em seguida foram retirados e pesados os seguintes órgãos: próstata ventral, vesícula seminal (com fluidos e glândula coaguladora), músculo elevador do ânus, os pares de glândulas bulbouretrais, rins, fígado e glândulas adrenais.

3.2 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO PROPICONAZOL NAS GERAÇÕES F1 E F2, SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA

Esse estudo foi realizado de acordo com o guia da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), OECD/OCDE (416), que padroniza os procedimentos para a avaliação da toxicidade reprodutiva de substâncias em duas gerações (OECD, 2001).

3.2.1 Delineamento Experimental

Os diagramas a seguir resumem o delineamento experimental empregado neste trabalho para a avaliação da exposição ao PROP nas gerações F1 e F2, sobre parâmetros de toxicidade reprodutiva nos machos (Figura 2) e nas fêmeas (Figura 3).

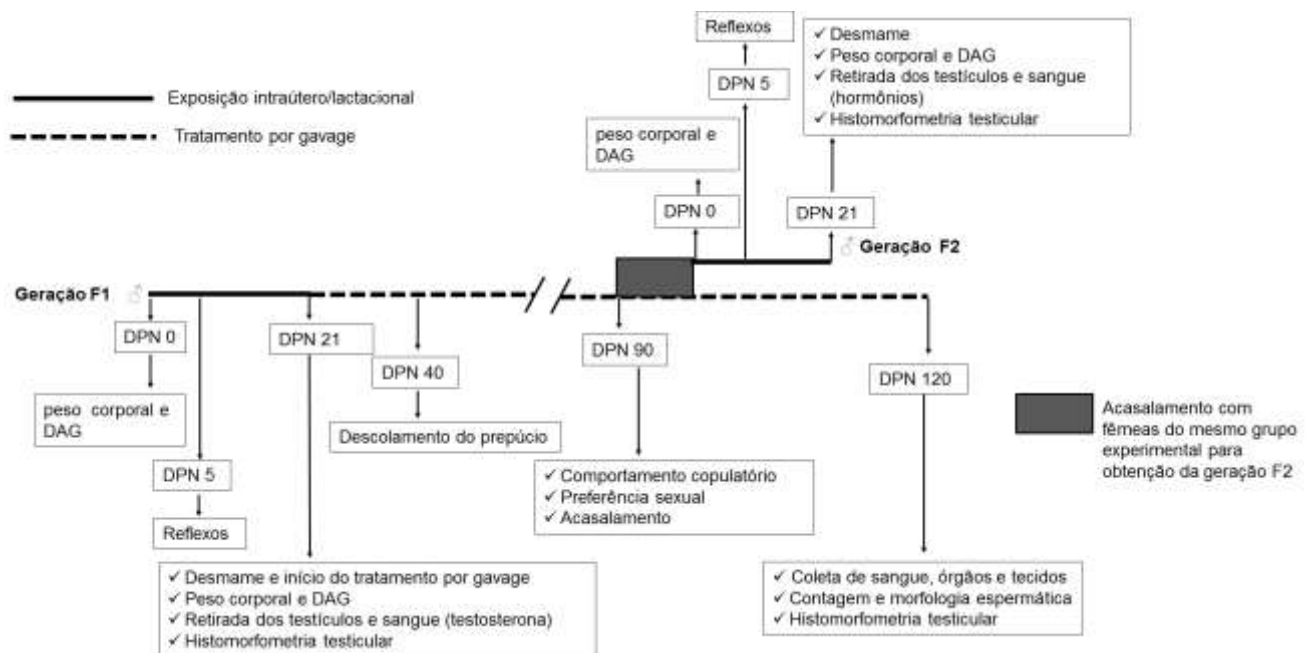


Figura 2. Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao PROP nos machos das gerações F1 e F2. DAG: distância anogenital. DPN: dia pós-natal.

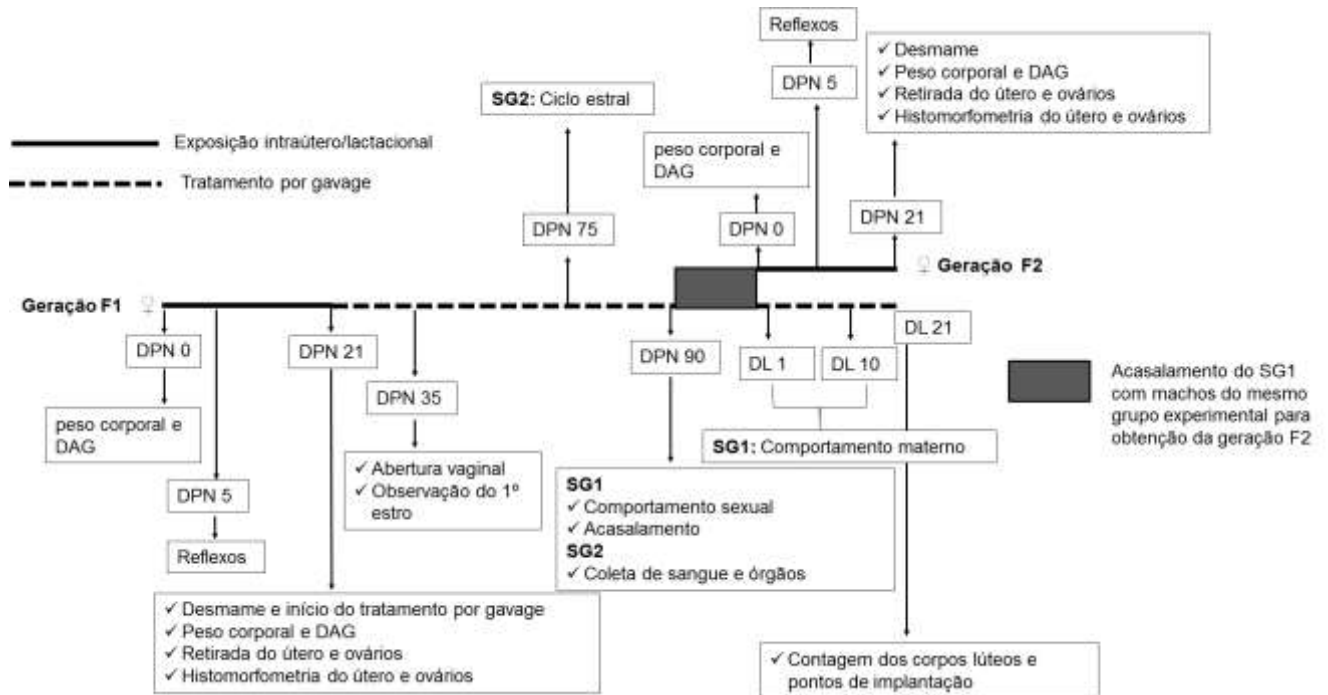


Figura 3. Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao PROP nas fêmeas das gerações F1 e F2. DAG: distância anogenital. DL: dia lactacional. DPN: dia pós-natal. SG: subgrupo.

3.2.2 Animais e Obtenção das Diferentes Gerações

Para obter a geração F1, 26 ratos Wistar, machos e fêmeas (13 animais/sexo), que estavam no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas do CCB foram usados como geração parental (P). Os machos da geração P foram tratados previamente com PROP do DPN 50 até o DPN 120 (COSTA *et al.*, 2015) e as fêmeas foram tratadas do DPN 50 até o desmame dos filhotes (geração F1). Para o acasalamento, cada fêmea foi colocada com um macho do mesmo grupo experimental, porém de ninhadas diferentes. A prenhez foi considerada positiva quando observada, ao microscópio óptico, a presença de espermatozoides e células características da fase estro nas lâminas do esfregaço. Esse dia foi considerado como DG 0, ocasião em que as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais.

Para obtenção da geração F2, machos e fêmeas (13 animais/sexo) tratados com PROP foram coabitados e o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado.

As ratas prenhes tiveram seus filhotes naturalmente. O dia do nascimento foi considerado dia lactacional (DL) 0 para as progenitoras e DPN 0 para

os filhotes. No DPN 4, o tamanho da ninhada foi ajustado para 10 e, sempre que possível, foi mantido um número igual de machos e fêmeas entre as ninhadas. Todos os filhotes das gerações F1 e F2 foram desmamados no DPN 21. Ninhadas menores que 8 filhotes não foram incluídas neste estudo

Os animais foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvilab®, Colombo, PR) à vontade. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA UEL19726.2013.45).

3.2.3 Escolha da dose

A escolha das doses fundamentou-se na avaliação toxicológica do PROP (FAO/WHO, 1988). Estipulou-se como dose diária aceitável, em humanos, de 0-0,04 mg/kg/dia (ANVISA, 2003), baseado no nível de efeito adverso não observado (NOAEL). No entanto, presume-se que os animais são mais resistentes (WHO/IPCS, 2005), então, para este estudo, foi escolhida a dose de 4 mg/kg/dia que corresponde à variação inter e intraespécie da dose permitida. O nível aceitável de exposição do operador (AOEL) ao PROP é 0,1 mg/kg (EUROPEAN COMMISSION, 2003), então foi escolhida a dose de 20 mg/kg, baseada na exposição ocupacional, pois os trabalhadores acabam se expondo a altas concentrações dessa substância.

3.2.4 Tratamento da Geração F1

Os filhotes da geração F1 foram expostos através das células germinativas, intraútero e via lactação até o DPN 21. Para iniciar o tratamento por gavagem, os filhotes machos e fêmeas foram divididos de acordo com o mesmo grupo da geração P (COSTA *et al.*, 2015).

- Grupo Controle (CTR): ratos (13 machos e 26 fêmeas) receberam, por gavagem, óleo de milho.
- Grupo PROP4: ratos (13 machos e 26 fêmeas) receberam, por gavagem, propiconazol na dose de 4,0 mg/kg/dia.
- Grupo PROP20: ratos (13 machos e 26 fêmeas) receberam, por gavagem, propiconazol na dose de 20,0 mg/kg/dia.

O tratamento dos machos foi realizado a partir do DPN 21 até o DPN 120. Para as fêmeas, o tratamento iniciou-se no DPN 21, mas essas foram divididas em 2 subgrupos: o subgrupo 1 foi tratado até o DL 21, ocasião em que ocorreu o desmame da geração F2, para avaliação dos comportamentos sexual e materno e fertilidade; e o subgrupo 2 foi tratado até o DPN 90-100, para avaliação do ciclo estral, peso e histologia dos órgãos.

O tratamento de todos os grupos foi realizado uma vez ao dia, obedecendo sempre à mesma rotina de horários de aplicação (11h-13h) e o propiconazol foi diluído em óleo de milho. Realizou-se o acompanhamento do peso corpóreo para ajuste da dose a cada três dias, bem como para avaliação de toxicidade.

3.2.5 Tratamento da Geração F2

A geração F2 foi exposta ao PROP através das células germinativas, intraútero e via lactação até o DPN 21.

3.2.6 Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nos Machos das Gerações F1 e F2

3.2.6.1 Desenvolvimento físico da prole masculina

Todos os filhotes derivados dos progenitores das gerações P e F1 (gerações F1 e F2, respectivamente) foram examinados o mais cedo possível no dia do nascimento para determinar o número e o sexo dos filhotes, o número de nascidos vivos e nascidos mortos de cada ninhada e anormalidades grosseiras. Os filhotes foram observados diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade e pesados a cada 3 dias até o desmame. Nos DPN 0 e 21, a distância anogenital (DAG, distância do ânus até o tubérculo genital) foi obtida através de um paquímetro. A DAG foi normalizada por meio da sua divisão pela raiz cúbica do peso corporal (GALLAVAN *et al.*, 1999).

3.2.6.2 Desenvolvimento reflexológico (ou comportamental)

Para avaliação do desenvolvimento reflexológico, foi escolhido aleatoriamente um macho de cada ninhada e de cada geração. Estes animais foram submetidos, sempre no mesmo horário, aos testes de:

- Reflexo de endireitamento: a partir do DPN 5, o animal foi colocado em decúbito dorsal sendo medida a ocorrência ou não de resposta. O critério para o registro desse reflexo é que, ao virar-se, o animal fique com as quatro palmas espalmadas na superfície. O período de latência máxima é de 30 segundos.
- Reflexo de geotaxia negativa: a partir do DPN 5, os filhotes foram colocados em uma rampa de aproximadamente 45° de inclinação, a 5 cm do final inferior dessa rampa, com a cabeça direcionada para baixo (Figura 4). O período de latência é de 30 segundos para os animais voltarem à posição oposta. Eles foram avaliados até o dia que apresentaram o reflexo.



Figura 4. Plataforma com inclinação de 45° para avaliação da geotaxia negativa.

3.2.6.3 Coleta de sangue e testículos e histomorfometria testicular no DPN 21

Um macho por ninhada de cada grupo experimental foi eutanasiado por guilhotina após 3 horas do tratamento por gavagem com PROP. Foram coletadas

amostras de sangue para dosagem de testosterona (F1: n=12-9/grupo; F2: n=10-8/grupo). Os testículos foram removidos, dissecados e pesados para determinação do peso absoluto e o índice gonadossomático (peso total dos testículos divididos pelo peso corporal) (F1 e F2: n=10-13/grupo).

O testículo esquerdo foi fixado em solução de Bouin por 24 horas e depois foi estocado em etanol 70°C (F1: n=10-12/grupo; F2: n=7-12/grupo). Posteriormente foi cortado em fragmentos de tecido, desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram feitos cortes com 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina.

A composição dos dados volumétricos do parênquima testicular foi obtida usando contagem de pontos utilizando uma grade de 100 pontos na ocular em aumento final de 400x. Um total de 10 campos escolhidos aleatoriamente (1000 pontos) foram pontuados para cada animal. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em µl, foi estimado a partir do conhecimento do porcentual ocupado por eles no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. Para obter uma medição mais precisa do volume do parênquima testicular, subtraiu-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea (~6,5%). O peso do testículo foi considerado igual ao seu volume uma vez que a densidade do testículo é quase 1,0 (~1,03–0,04) (FRANÇA & GODINHO, 2003).

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido pela mensuração ao acaso de 15 secções transversais de túbulo seminífero por animal escolhido de forma aleatória com perfis redondos ou arredondados. Essa medição foi realizada utilizando-se micrômetro reticular linear (OSM-223287, Olympus), acoplado a um microscópio ocular (aumento de 100x).

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS), expresso em metros (10^6), por testículo, foi calculado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos e da medição do diâmetro tubular obtido para cada animal, de acordo com a seguinte fórmula: $CTTS = VTS / \pi R^2$, em que VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL & COUROT, 1963; DORST & SAJONSKI, 1974).

3.2.7 Parâmetros Analisados nos Machos da Geração F1

3.2.7.1 Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade

Foi realizado o acompanhamento do peso corpóreo depois do desmame a cada três dias, do DPN 21 até o 120. Do mesmo modo foram observados sinais gerais de toxicidade, como lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores.

A partir do DPN 40, foi verificado o dia da separação prepucial como um indicador do início da maturidade sexual, ocasião em que os animais foram pesados novamente.

3.2.7.2 Comportamento sexual

Todas as avaliações comportamentais foram feitas com ratos adultos (DPN 90-100) durante a fase escura do ciclo, sob uma luz vermelha fraca. Quinze dias antes das avaliações, os animais foram transferidos para o biotério com ciclo claro/escuro de 12x12 horas invertido, que possui controle de luminosidade, ruído e temperatura, para a perfeita adaptação das funções fisiológicas. As observações começaram sempre 2/3 horas depois do início da fase escura e foram gravadas por uma câmera de vídeo acoplada a um computador em uma sala adjacente

3.2.7.2.1 *Comportamento copulatório*

Para avaliação do comportamento copulatório, cada macho foi colocado em uma gaiola de acrílico e, depois de 5 minutos, uma fêmea em estro natural foi introduzida na gaiola. Durante 30 minutos, as latências e frequências para intromissão e ejaculação foram observadas como descrito por Gerardin e colaboradores (2006). Caso o macho não apresentasse comportamento de monta dentro de 10 min, a avaliação era interrompida e repetida no dia seguinte com outra fêmea. Machos que falharam na segunda avaliação foram considerados sexualmente inativos.

3.2.7.2 Teste de preferência sexual

Após análise do comportamento copulatório, os machos foram submetidos ao teste de preferência sexual. Nesse teste, foi utilizada uma arena retangular de 50 x 50 x 100 cm (altura x largura x comprimento) apresentando duas aberturas que se comunicavam com duas arenas menores, ambas com 25 cm². As arenas pequenas são diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal é fechada com uma tela de arame. Para o teste, foi colocada uma fêmea em estro natural em uma das arenas pequenas e, na outra, um macho sexualmente ativo. O piso da arena principal possuía duas áreas delimitadas com 25 cm² (zonas) na frente de cada abertura das arenas menores. Essas áreas foram chamadas de zona da fêmea e zona do macho. O macho experimental foi posicionado no centro da arena principal e observado durante 20 min. O número de visitas e o tempo total gasto visitando cada zona foram registrados, também foi calculado o escore de preferência ($[\text{tempo de permanência na zona de fêmea} / \text{tempo total gasto em ambas as zonas}] \times 100$) (AGMO, 2003).

3.2.7.3 Concentração plasmática de testosterona e estradiol, retirada dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado

Para a renovação dos estoques espermáticos, é necessário um intervalo de 15 dias entre o acasalamento e o dia de cirurgia para coleta de material. Passado esse tempo, os machos foram pesados, submetidos a eutanásia com tiopental sódico (40mg/kg, i.p.) e submetidos à laparotomia. Amostras de sangue (n=9-11/grupo) foram coletadas da artéria aorta abdominal em seringas contendo heparina, sempre no mesmo horário, aproximadamente às 14h. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 2°C) e o plasma congelado a - 20°C para posterior análise. A concentração plasmática de testosterona foi obtida por imunoenensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT® 2nd Generation Testosterone), em o coeficiente de variação intraensaio e sensibilidade foram 4,6% e 0,015nmol/L, respectivamente. A análise da concentração plasmática de estradiol foi realizada por imunoenensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT® Estradiol). A sensibilidade do teste é de 10 pg/mL e o erro intraensaio foi de 5,5%.

Após a coleta de sangue, o ducto deferente esquerdo foi retirado para análise da morfologia espermática (3.2.7.4.2). Além dos órgãos hormônio-dependentes (testículos, epidídimos, vesícula seminal com secreção e sem secreção e próstata ventral), foram removidos e dissecados a hipófise e o fígado (n=12-13/grupo). Após secagem em papel-filtro, foram determinados os respectivos pesos úmidos, empregando-se balança analítica. O testículo e o epidídimo direito foram congelados para posterior contagem espermática (3.2.7.4.1). O testículo esquerdo foi preparado para análise dos parâmetros biométricos e análise histológica do testículo (3.2.7.5).

3.2.7.4 Parâmetros espermáticos

3.2.7.4.1 Contagem espermática

O testículo decapsulado e o epidídimo direito (n=10/grupo), dos diferentes grupos experimentais, foram removidos e estocados a -20°C para posterior determinação da concentração de células germinativas.

- Número de espermátides maduras no testículo

Para a realização da contagem das espermátides no testículo, procedeu-se ao descongelamento dos testículos dos ratos dos diferentes grupos experimentais seguido de homogeneização do material, segundo método descrito por Robb e colaboradores (1978) e adaptado por Fernandes e colaboradores (2007). Após o descongelamento do testículo decapsulado, o parênquima testicular pesado foi colocado em um tubo de ensaio com tampa, onde foram adicionados 5 ml de solução contendo NaCl (0,9%), Triton-X (0,05%) e Thimerosal (0,01%). Em seguida, esse tubo foi tampado e pesado novamente para cálculo da primeira diluição. A amostra foi homogeneizada com pistilo 10N em velocidade máxima. Após nova diluição na proporção 1:10 na solução de Triton X100 (100 μl do homogeneizado + 900 μl de solução), uma alíquota foi transferida por meio de uma pipeta Pasteur para a câmara de Neubauer, onde as espermátides resistentes à homogeneização e sonicagem foram contadas (2 câmaras por animal, 5 campos por câmara). Para facilitar a visualização, o número de espermátides maduras no testículo é apresentado

em 10^6 espermátides por testículo e em 10^6 espermátides por grama de testículo.

- Cálculo da produção diária de espermatozoides

O número de espermátides no testículo foi dividido por 6,1, que é o nº de dias em que essas espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio seminífero.

- Número de espermatozoides no epidídimo

Os epidídimos foram inicialmente divididos nas unidades cabeça/corpo e cauda. As porções epididimárias foram separadas logo após a coleta e congeladas a -20° C até a homogeneização e contagem dos espermatozoides de acordo com o mesmo procedimento descrito para o item anterior com a diferença que, antes da homogeneização, as peças foram cortadas em pequenos pedaços com tesoura bem afiada. Esse material foi diluído em 1 ml da mistura contendo Triton X100 para cada 1ml da mistura para cada 200mg de cabeça/corpo. O tecido epididimário foi então homogeneizado, diluído 20 vezes e contado em câmaras de Neubauer. O número de espermatozoides no epidídimo é apresentado em $\times 10^6$ espermatozoides por órgão e em $\times 10^6$ espermatozoides por grama de órgão.

- Tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo

Esse dado foi calculado dividindo-se o número de espermatozoides na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo, pelo valor obtido na produção diária de espermatozoides de cada animal (ROBB *et al.*, 1978), e é apresentado em dias.

3.2.7.4.2 Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática foi realizada de acordo com Fernandes e colaboradores (2007). O ducto deferente esquerdo dos animais foi seccionado nas extremidades anterior e posterior e lavado internamente com o auxílio de agulha e seringa contendo 1,0 ml de formol-salina (10%). O conteúdo foi colhido em um tubo e mantido sob refrigeração. Para análise, o conteúdo foi depositado em lâmina histológica, coberto com lamínula e, após 90 min, de secagem foram analisados 200 espermatozoides por animal em fase de contraste do microscópio (400x) (SEED *et al.*, 1996). Anormalidades morfológicas foram

classificadas em duas categorias gerais: morfologia de cabeça (sem curvatura característica ou forma isolada, ou seja, sem cauda anexada) ou morfologia de cauda (quebrada ou isolada, isto é, sem cabeça anexada) (FILLER, 1993). Esse dado é apresentado em porcentagem de anormalidade.

3.2.7.5 Parâmetros histomorfométricos do testículo

O testículo esquerdo foi dissecado, pesado e fixado em solução de Bouin por 24 horas e depois foi estocado em etanol 70°C (n= 9-7 animais/grupo). Posteriormente foi cortado em fragmentos de tecido, desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram feitos cortes com 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina e mesmo procedimento descrito no item 3.2.6.3 foi realizado.

3.2.8 Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nas Fêmeas das Gerações F1 e F2

3.2.8.1 Desenvolvimento físico da prole feminina

Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.2.6.1 para as fêmeas.

3.2.8.2 Desenvolvimento reflexológico (ou comportamental)

Foi escolhida uma fêmea de cada ninhada e cada geração para avaliação dos reflexos. Os animais escolhidos foram submetidos, sempre no mesmo horário, aos testes descritos no item 3.2.6.2.

3.2.8.3 Coleta de órgãos reprodutivos para histomorfometria de útero e ovários e no DPN 21

Uma fêmea por ninhada de cada grupo experimental foi eutanasiada por guilhotina após 3 horas do tratamento por gavagem com PROP. Foi realizada laparotomia, o útero e os ovários foram removidos, dissecados e pesados para

determinação dos pesos absolutos e o índice gonadossomático (peso total dos ovários divididos pelo peso corporal) (F1 e F2: n=10-13/grupo).

O ovário esquerdo e o útero foram fixados em solução de Bouin por 24 horas e depois estocados em etanol 70°C (F1 e F2: n=5-6/grupo). Os órgãos reprodutivos, depois de fixados, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (F1 e F2: n=6/grupo). Foram obtidos seis cortes de útero e ovário, com a espessura de 7 µm, por animal, que foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina para análise histológica e morfométrica sob microscópio de luz acoplado ao sistema digitalizador de imagem AxioVision 4.8. O ovário foi utilizado para realizar a contagem dos folículos em diferentes fases de maturação (primordiais, em crescimento e antrais) de acordo com a descrição prévia de Pedersen e Peters (1968), apresentada por Plowchalch e colaboradores (1993), nas objetivas de 10x e 40x. Em cada corno uterino foi mensurada a espessura do estroma endometrial e miométrio na porção média do órgão, em relação ao ovário. Para a mensuração das espessuras de estroma e miométrio, foi utilizada a objetiva de 4x.

3.2.9 Parâmetros Analisados nas Fêmeas da Geração F1

3.2.9.1 Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade

Depois do desmame (DPN 21), foi realizado o acompanhamento do peso corpóreo a cada três dias, e do mesmo modo foram observados sinais gerais de toxicidade, como lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores.

Como parâmetro de instalação da puberdade, a partir do DPN 30, as fêmeas foram diariamente observadas para determinação da abertura vaginal, ocasião em que foram pesadas. Começando no dia que ocorreu a abertura vaginal, diariamente foram realizados esfregaços vaginais para determinar o dia do primeiro estro, caracterizado pela predominância de células epiteliais cornificadas.

Esses parâmetros foram avaliados em 2 fêmeas por ninhada e os valores expressos em média da ninhada (n=13/grupo). Depois as fêmeas foram divididas em 2 subgrupos, como já descrito anteriormente (item 3.2.4). O subgrupo 1 foi utilizado para avaliação do comportamento sexual, comportamento materno,

fertilidade e toxicidade materna; o subgrupo 2 foi utilizado para acompanhamento do ciclo estral, concentração plasmática de estradiol, retirada dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado, e histomorfometria de útero e ovários.

3.3.8.2 Acompanhamento do ciclo estral a partir do DPN 75

O ciclo estral das ratas, da linhagem utilizada no presente trabalho, dura de 4 a 5 dias. Para tanto, foram coletadas células da mucosa vaginal, com auxílio de cotonete, previamente embebido em solução fisiológica (salina), sempre no mesmo horário, durante 15 dias (n=13/grupo). O material foi espalhado numa lâmina, umedecido com uma gota de salina e observado ao microscópio óptico para identificação da fase do ciclo estral (proestro, estro e diestro), para obtenção dos seguintes parâmetros: duração do ciclo estral e frequência das diferentes fases.

3.2.9.3 Concentração plasmática de estradiol, retirada dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado

Após o término do acompanhamento do ciclo estral, as fêmeas foram observadas até o próximo estro, ocasião em que foram pesadas, eutanasiadas com tiopental sódio (40 mg/kg i.p.) e submetidas à laparotomia. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal em seringas contendo heparina, sempre no mesmo horário, aproximadamente às 14h. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (2.500 rpm por 20 minutos a 2°C) e o plasma congelado para posterior análise da concentração plasmática de estradiol por imunoensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT® Estradiol) (n=10/grupo). A sensibilidade do teste é de 10 pg/mL e o erro intraensaio foi de 5,5%.

Imediatamente após a coleta de sangue das ratas, foi realizada a coleta dos ovários e útero (com fluido), que foram pesados e fixados em Bouin (n=12-13/grupo). Além dos órgãos reprodutivos, foram removidos e pesados hipófise e fígado.

3.2.9.4 Histomorfometria dos órgãos reprodutivos

Os órgãos reprodutivos, após fixação em Bouin, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados com xilol e incluídos em parafina (n=8-10/grupo). O mesmo procedimento descrito no item 3.2.8.3 foi empregado para análise histológica, com as diferenças de que, nessa idade, no ovário foi possível fazer a contagem dos corpos lúteos e no útero foi possível determinar a espessura do perimétrio. Para a mensuração da espessura do perimétrio, foi utilizada a objetiva de 10x.

3.2.9.5 Avaliação do comportamento sexual

Quinze dias antes das análises comportamentais (DPN 75), os animais foram transferidos para o biotério com ciclo claro/escuro de 12x12 horas invertido, que possui controle de luminosidade, ruído e temperatura, para a perfeita adaptação das funções fisiológicas. Os testes comportamentais foram filmados e analisados por um único experimentador localizado fora do biotério de ciclo de luz invertida.

Para essa metodologia, foram utilizadas 12-13 fêmeas de cada grupo experimental. A análise do comportamento sexual feminino foi realizada a partir do DPN 90 e seguiu a metodologia proposta por Felicio e Nascello (1989). No dia do experimento, foram coletadas células da mucosa vaginal 3 a 4 horas antes do início dos testes. Foram utilizadas apenas as fêmeas na fase de proestro e machos vasectomizados. Os machos (n=10) foram obtidos do biotério central, anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg i.p.) e submetidos à vasectomia bilateral, via bolsa escrotal. O ducto deferente foi ligado em dois pontos diferentes e seccionado por meio de dois cortes entre os locais ligados, resultando em um pequeno fragmento do ducto que foi desprezado. Foi realizada a sutura na bolsa escrotal e os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante 3 dias para recuperação. Após 15 dias do procedimento cirúrgico, o macho foi colocado na gaiola de observação (caixa de policarbonato), onde permaneceu por pelo menos 10 minutos para adaptação. Em seguida, foi introduzida na mesma caixa a fêmea e o teste durou até que 10 montas fossem observadas (RAMIREZ *et al.*, 1979). Foi avaliado o coeficiente de lordose, calculado como: (número de lordoses/10 montas) X 100 (BEACH, 1976) e o

número de observações dos diferentes graus de lordose (numa escala de 0 a 3, na qual 0 equivale à ausência de lordose e 3 corresponde à lordose máxima), conforme mostrado na Figura 5 (HARDY & DEBOLD, 1971).

Finalizada a avaliação do comportamento sexual, as fêmeas foram colocadas com machos tratados do mesmo grupo experimental (de ninhadas diferentes) para acasalamento e obtenção da geração seguinte (F2), conforme o método descrito para acasalamento no item 3.2.2.

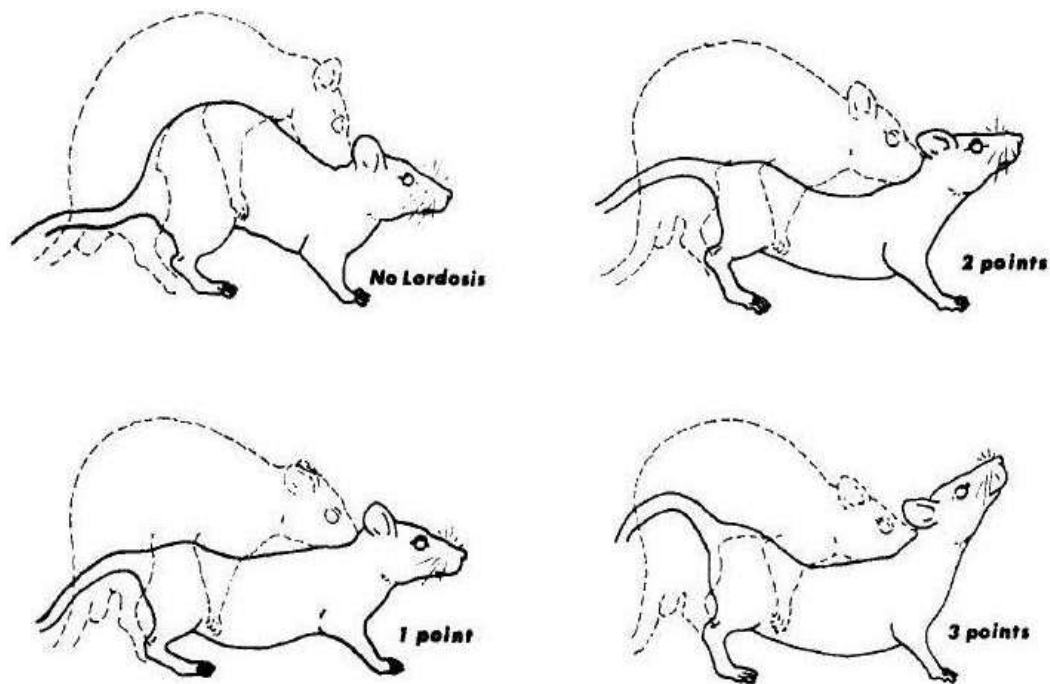


Figura 5. Diferentes graus de lordose (HARDY & DEBOLD, 1971).

3.2.9.6 Toxicidade geral materna

O peso corporal materno foi determinado durante a gestação e lactação a cada três dias para avaliação de toxicidade e ajuste da dose. A ingesta de ração também foi acompanhada durante o mesmo período. Também foram observados sinais de toxicidade, como lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores.

3.2.9.7 Avaliação do comportamento materno

Para verificar se o tratamento com PROP poderia alterar o cuidado com a prole, foi avaliado o comportamento materno (n=11/grupo) de acordo com a metodologia, com modificações, proposta por Champagne e colaboradores (2003). Para avaliação desse parâmetro, foram utilizadas ratas com ninhadas acima de 8 filhotes. A análise foi feita diariamente, do DL 1 ao 10 em períodos de observação de 72 minutos. As observações ocorreram em horários regulares com três períodos durante a fase clara (10h, 13h, 16h) e um período durante a fase escura do ciclo claro/escuro (19h). A observação iniciou-se no tempo zero. As observações posteriores foram realizadas a cada 3 minutos, resultando em 25 observações por período e totalizando 100 observações da mãe por dia, o que equivale a 100% de observações. Uma tabela foi utilizada para pontuar os seguintes comportamentos: mãe fora do ninho, construção do ninho, a ação da mãe de mudar os filhotes de lugar (recuperação dos filhotes), limpeza dos filhotes e amamentação (Figura 6). Somaram-se as observações totais por dia e cada parâmetro foi revertido em porcentagem de observação.



Figura 6. Rata em posição arqueada de amamentação.

3.2.9.8 Análise de fertilidade

Após o desmame dos filhotes no DL 21, as fêmeas (n=6-7/grupo) foram eutanasiadas com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.), colocadas em decúbito dorsal e, em seguida, foi feita uma incisão longitudinal na parede abdominal para visualização dos cornos uterinos. Após a retirada dos cornos uterinos, foram determinados os números de implantações uterinas (Figura 7 A). Adicionalmente, os ovários foram isolados e os corpos lúteos separados e contados (Figura 7 B e C).

A partir da contagem das implantações e dos corpos lúteos, foram determinados os seguintes parâmetros:

- Taxa de implantação = $(\text{n}^\circ \text{ de implantações} \times 100) / \text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}$;
- Taxa de perda pré-implantação = $[(\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações}) \times 100] / \text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}$;
- Taxa de perda pós-implantação = $[(\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}) \times 100] / \text{n}^\circ \text{ de implantações}$;
- Taxa de Viabilidade Fetal = $(\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos} \times 100) / \text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação}$.

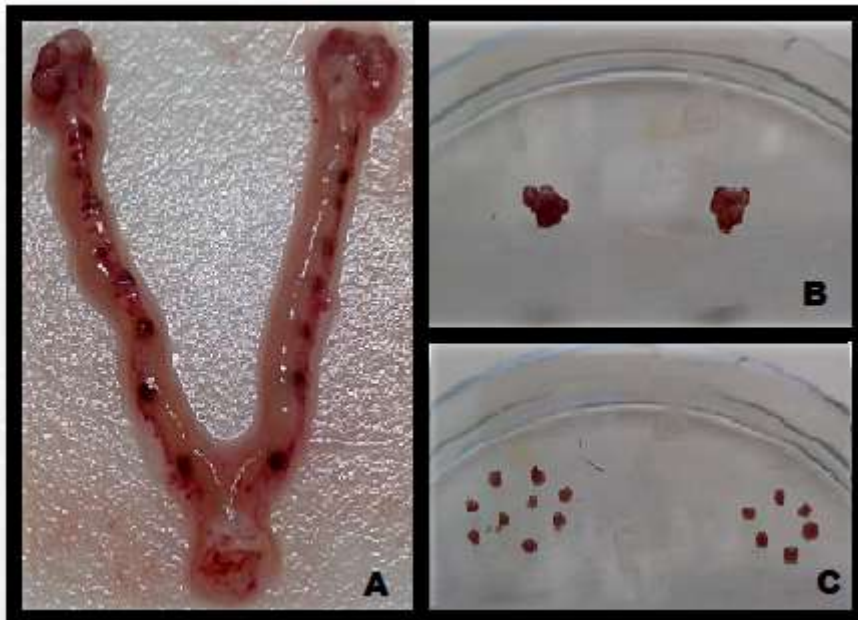


Figura 7. (A) Útero com pontos de implantação. (B) Ovários excisados para (C) contagem dos corpos lúteos. Ambos retirados após desmame DL 21.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov/ Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) para cada variável. Para os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram conduzidas análises paramétricas e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram transformadas a fim de atingir os critérios para a análise paramétrica e, caso ainda não apresentassem normalidade e homogeneidade, os dados foram submetidos aos testes não paramétricos, apresentados como mediana (1º e 3º quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.3.1 Avaliação da Atividade (anti) Estrogênica e Atividade (anti) Androgênica do Fungicida Propiconazol em Ratos, Machos e Fêmeas

O peso corporal inicial e final foi analisado por ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) complementada com teste de Bonferroni.

O peso dos órgãos/glândulas foi analisado por ANOVA complementado com teste de Dunnett, assim como foi realizado uma análise de covariância (ANCOVA) usando o peso corporal final para o teste uterotrófico e o peso corporal inicial para o teste de Hershberger como uma covariável, como sugerido pelos guias seguidos neste estudo (EPA, 2009, 2011a). No entanto, como ANCOVA e ANOVA forneceram resultados semelhantes, os resultados com ANOVA foram escolhidos para serem relatados nos resultados deste estudo. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se o $p < 0,05$.

No teste uterotrófico para atividade estrogênica todos os grupos foram comparados com o grupo tratado com estradiol e, para atividade antiestrogênica, todos os grupos foram comparados com o grupo tratado com estradiol e tamoxifeno.

No teste de Hershberger para atividade androgênica todos os grupos foram comparados com o grupo tratado com testosterona e, para atividade antiandrogênica, todos os grupos foram comparados com o grupo tratado com testosterona e flutamida.

3.3.2 Avaliação da Exposição ao Propiconazol nas Gerações F1 e F2, sobre Parâmetros de Toxicidade Reprodutiva

Os testes estatísticos empregados foram:

- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) complementado com Bonferroni: peso corpóreo, DAG (DPN 0 e 21), ingesta de ração materna e comportamento materno;
- ANCOVA complementado com Bonferroni: peso de órgãos tendo o peso corporal como covariável;
- ANOVA complementado com Bonferroni: reflexo de endireitamento e geotaxia negativa, concentração plasmática de testosterona e estradiol (machos DPN 120 e fêmeas adultas), histomorfometria dos órgãos reprodutivos, descolamento do prepúcio, comportamento copulatório de machos, peso corporal e distância anogenital, parâmetros espermáticos, abertura vaginal, 1º estro, ciclo estral e fertilidade;
- Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn: estradiol machos DPN 21, preferência sexual e coeficiente de lordose;
- Teste de Fisher: grau de lordose das fêmeas;

O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo *software* SPSS (IBM, SPSS statistics 19).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE (ANTI) ESTROGÊNICA E ATIVIDADE (ANTI) ANDROGÊNICA DO FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS, MACHOS E FÊMEAS

4.1.1 Teste Uterotrófico

Nenhum animal utilizado nesse teste teve morte ou apresentou sinais gerais de toxicidade, como mudanças comportamentais (agitação ou letargia), alterações neurológicas (convulsão, tremor, rigidez muscular e hiper-reflexia), e sinais autonômicos (lacrimejamento, piloereção, alteração pupilar e padrão respiratório alterado).

4.1.1.1 Atividade estrogênica

ANOVA indicou que não houve diferença do peso corporal no 1º e 4º dia de tratamento entre os grupos (Tabela 1). Nenhuma fêmea apresentou abertura vaginal durante o teste.

De acordo com ANOVA, complementado com teste de Dunnett, o grupo que recebeu valerato de estradiol apresentou aumento significativo no peso do útero cheio [$f(4,33) = 46,74$; $p=0,001$] e no peso do útero vazio [$f(4,33) = 90,26$; $p=0,001$] em relação ao controle negativo (veículo). PROP não demonstrou ter atividade estrogênica nesse teste, pois não houve diferença no peso do útero cheio e vazio em relação ao controle negativo.

Tabela 1. Peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das fêmeas que participaram do teste uterotrófico para atividade estrogênica.

	Veículo (7)	Estradiol (7)	PROP 4 (6)	PROP 20 (6)	PROP 50 (7)
Peso corporal 1ª dia (g)	26,71±1,09	26,04±0,79	25,93±1,54	26,08±1,32	26,08±0,99
Peso corporal 4ª dia (g)	25,94±1,61	28,08±1,74	27,78±2,52	27,25±2,08	28,98±2,05
Útero cheio (mg)	26,67±6,00	81,86±7,60*	21,00±1,81	16,33±1,48	21,14±2,96
Útero vazio (mg)	22,50±5,86	66,14±4,07*	13,67±1,45	13,50±1,34	15,86±2,14

Dados apresentados como média ± EPM (* p<0,05, comparado ao grupo veículo, ANOVA complementado com teste de Dunnett), números entre parênteses representam o número de animais/grupo. Estradiol: valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia; Veículo: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia; PROP 50: Propiconazol 50 mg/kg/dia.

4.1.1.2 Atividade antiestrogênica

A Tabela 2 mostra os resultados do teste uterotrófico para avaliar possíveis efeitos antiestrogênicos do PROP. ANOVA indicou que não houve diferença do peso corporal no 1º e 4º dia de tratamento entre os grupos. Somente uma fêmea do grupo PROP 50 + estradiol apresentou abertura vaginal durante o teste.

ANOVA complementado com teste de Dunnett demonstrou que o co-tratamento com tamoxifeno preveniu o aumento de peso uterino com fluido [f (4,30) =3,030; p=0,035] e sem fluido [f (4,30) =4,236; p=0,009], ocasionado pelo tratamento com estradiol. O mesmo efeito não foi visto nos grupos tratados com PROP4 + estradiol e PROP 50 + estradiol, demonstrando que nessas doses o PROP não tem atividade antiestrogênica. Entretanto, o grupo PROP 20 + estradiol não apresentou diferença estatística no peso do útero com fluido em relação ao estradiol + tamoxifeno como também não houve diferença nesse mesmo parâmetro em relação ao estradiol.

Tabela 2. Peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das fêmeas que participaram do teste uterotrófico para atividade antiestrogênica.

	Estradiol (7)	Estradiol+ Tamoxifeno (6)	PROP4+ Estradiol (6)	PROP 20+ Estradiol (6)	PROP 50 +Estradiol (6)
Peso corporal 1ª dia (g)	26,04±0,79	25,66±0,71	26,05±0,62	25,72±1,00	26,07±1,21
Peso corporal 4ª dia (g)	28,08±1,74	25,35±1,34	28,52±0,71	29,66±1,41	27,70±1,82
Útero cheio (mg)	81,86±7,60 ^B	45,17±3,33 ^A	88,00±11,41 ^B	73,17±4,59 ^{A, B}	86,33±17,07 ^B
Útero vazio (mg)	66,14±4,07 ^B	38,83±3,19 ^A	68,17±7,72 ^B	63,67±5,38 ^B	60,83±7,33 ^B

Dados apresentados como média ± EPM, números entre parênteses representam o número de animais/grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os valores, $p < 0,05$ comparado ao estradiol+tamoxifeno (ANOVA complementada com teste de Dunnett). Estradiol + tamoxifeno: valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia e tamoxifeno 10 mg/kg/dia; Estradiol: valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia; PROP4+estradiol: Propiconazol 4 mg/kg/dia e valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia; PROP 20+estradiol: Propiconazol 20 mg/kg/dia e valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia; PROP 50+estradiol: Propiconazol 50 mg/kg/dia e valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia.

4.1.2 Teste de Hershberger

Nenhum animal utilizado nesse teste teve morte ou apresentou sinais gerais de toxicidade, como mudanças comportamentais (agitação ou letargia), alterações neurológicas (convulsão, tremor, rigidez muscular e hiper-reflexia), e sinais autonômicos (lacrimejamento, piloereção, alteração pupilar e padrão respiratório alterado).

4.1.2.1 Atividade androgênica

Não houve diferença do peso corporal no 1º e 10º dia de tratamento entre os grupos (Tabela 3, ANOVA complementada com teste de Dunnett).

ANOVA complementada com teste de Dunnet indicou que o tratamento com testosterona aumentou o peso de todos os órgãos andrógeno-dependentes, como as vesículas seminais (direita e esquerda somadas), a próstata, o músculo levantador do ânus, as glândulas bulbouretrais (direita e esquerda somadas) e a glândula do pênis em relação ao veículo. Entretanto o tratamento com o PROP não teve o mesmo efeito androgênico (Tabela 3).

Tabela 3. Peso corporal no primeiro e décimo dia de tratamento, ganho de peso corporal durante o tratamento, peso dos órgãos andrógenos dependentes e peso do fígado, rim direito e glândula adrenal direita dos machos que participaram do teste de Hershberger para atividade androgênica.

	Veículo	TESTO	PROP4	PROP50
Peso corporal 1 ^o dia (g)	183,13±7,29	181,06±6,84	180,85±6,01	180,93±6,74
Peso corporal 10 ^o dia (g)	225,43±8,69	237,46±12,57	221,90±4,48	226,04±5,94
Ganho de peso (g)	42,30±3,13	56,40±6,51	41,05±3,78	45,12±2,73
Vesículas seminais (mg)	25,67±2,87	357,00±31,02*	20,37±4,15	28,17±3,89
Próstata (mg)	23,00±3,43	104,83±9,79*	16,83±3,32	21,83±3,65
Músculo levantador do ânus (mg)	55,83±9,71	122,33±13,67*	46,00±5,49	59,17±10,74
Glândulas bulbouretrais (mg)	5,50±0,72	31,37±2,17*	7,50±0,99	8,00±1,46
Glande do pênis (mg)	31,83±3,00	64,83±8,92*	37,00±4,63	44,67±4,84
Fígado (g)	10,27±0,74	10,97±0,63	10,19±0,26	11,16±0,43
Rim direito (g)	0,83±0,05	0,90±0,06	0,82±0,30	0,84±0,02
Adrenal direita (mg)	23,33±2,01	24,50±2,79	22,33±0,84	23,67±1,61

Dados apresentados como média ± EPM (*p<0,05 comparado ao grupo veículo, ANOVA complementada com teste de Dunnett), 6 animais/grupo. TESTO: propionato de testosterona 0,4 mg/kg/dia; Veículo: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 50: Propiconazol 50 mg/kg/dia.

4.1.2.2 Atividade antiandrogênica

Não houve diferença do peso corporal no 1^o e 10^o dia de tratamento entre os grupos (Tabela 4, ANOVA complementada com teste de Dunnett).

A flutamida reverteu os efeitos da testosterona na maioria dos órgãos hormônio-dependentes, como as vesículas seminais (direita e esquerda somadas), a próstata e glândulas bulbouretrais (direita e esquerda somadas), o PROP não demonstrou o mesmo resultado. Porém no grupo PROP 20 + TESTO, ANOVA complementado com teste de Dunnett demonstrou que nesse grupo o PROP reverteu o efeito da testosterona nas glândulas bulbouretrais [$f(4,29) = 13,00$; $p=0,001$].

Tabela 4. Peso corporal no primeiro e décimo dia de tratamento, ganho de peso corporal durante o tratamento, peso dos órgãos andrógeno- dependentes e peso do fígado, rim direito e glândula adrenal direita dos machos que participaram do teste de Hershberger para atividade antiandrogênica.

	TESTO	TESTO + Flutamida	PROP4+ TESTO	PROP20+ TESTO	PROP50+ TESTO
Peso corporal 1º dia (g)	181,06±6,84	182,52±8,90	176,60±4,95	184,55±6,31	178,92±8,35
Peso corporal 10º dia (g)	237,46±12,57	234,85±11,32	227,76±5,45	238,82±8,09	233,33±12,96
Ganho de peso (g)	56,40±6,51	52,33±4,18	51,16±4,64	54,27±2,29	54,41±4,72
Vesículas seminais (mg)	357,00±31,0	123,17±19,6*	295,83±47,36	261,00±36,08	326,83±51,92
Próstata (mg)	104,83±9,79	47,83±5,75*	96,83±14,41	113,00±6,93	113,40±8,39
Músculo levantador do ânus (mg)	122,33±13,6	80,03±19,73	111,50±14,79	135,20±4,17	123,50±10,33
Glândulas bulbouretrais (mg)	31,37±2,17	15,33±2,28*	25,50±1,18	21,17±1,94*	31,17±1,70
Glande do pênis (mg)	64,83±8,92	69,33±3,54	66,50±3,84	70,40±3,09	72,17±5,17
Fígado (g)	10,97±0,63	10,90±0,72	9,98±0,28	11,42±0,22	11,81±1,12
Rim direito (g)	0,90±0,06	0,83±0,02	0,85±0,02	0,90±0,04	0,89±0,06
Adrenal direita (mg)	24,50±2,79	28,33±2,42	26,50±3,01	25,50±4,25	25,83±1,52

Dados apresentados como média ± EPM (*p<0,05, comparado ao grupo TESTO, ANOVA complementada com teste de Dunnet), 6 animais/grupo. TESTO: propionato de testosterona 0,4 mg/kg/dia; TESTO+Flutamida: propionato de testosterona 0,4 mg/kg/dia e flutamida 3 mg/kg/dia; PROP4+TESTO: Propiconazol 4 mg/kg/dia e propionato de testosterona 0,4 mg/kg/dia; PROP 20+TESTO: Propiconazol 20 mg/kg/dia e propionato de testosterona 0,4 mg/kg/dia; PROP 50+TESTO: Propiconazol 50 mg/kg/dia e propionato de testosterona 0,4 mg/kg/dia.

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO PROPICONAZOL NAS GERAÇÕES F1 E F2, SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA

4.2.1 Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nos Machos das Gerações F1 e F2

4.2.1.1 Desenvolvimento físico e comportamental da prole masculina das gerações F1 e F2

O peso corporal dos filhotes (média da ninhada) das gerações F1 e F2, durante as três primeiras semanas de idade (DPN 0 até DPN 21), está ilustrado na figura 8 e 9, respectivamente. RMANOVA indicou um efeito do dia no peso corporal da geração F1 [$f(7,84)= 2912,27$ $p=0,001$] e geração F2 [$f(7, 70)= 973,54$ $p=0,002$], mostrando que todos os grupos se desenvolveram durante esse período. Entretanto, RMANOVA também indicou interação entre o dia e o tratamento na geração F1, pois a ninhada de machos do grupo PROP 20 apresentou aumento do peso corporal quando comparado com o grupo CTR no DPN 12, 15, 18 e 21 [$f(2,27; 27,27)= 5,38$, $p=0,008$]. Na geração F2, não houve interação dia e tratamento.

A DAG relativa ao peso corporal ($\text{mm/g}^{1/3}$) das gerações F1 e F2 no DPN 0 assim como no DPN 21 não foi influenciada pela exposição ao PROP ($p>0,05$), como indicado pela RMANOVA (Tabela 5).

Não houve diferença significativa no reflexo de endireitamento e no reflexo de geotaxia negativa (ANOVA, $p> 0,05$), como apresentado na Tabela 5.

Nenhum animal apresentou sinais de toxicidade, como piloereção, lacrimejamento ou alterações do padrão respiratório.

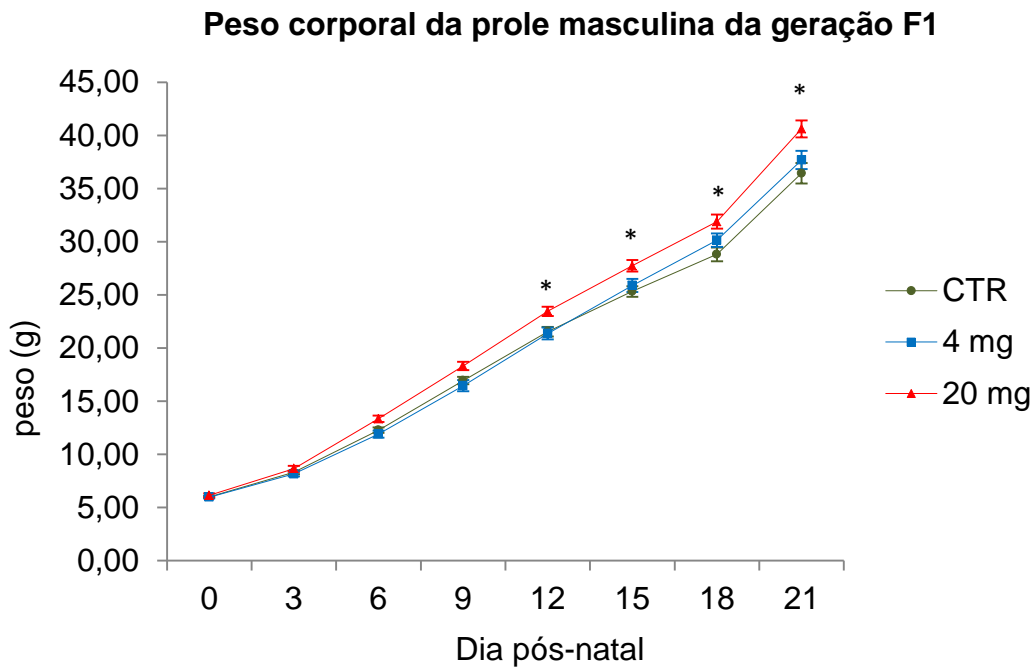


Figura 8. Peso corporal da prole masculina (média da ninhada) da geração F1 durante o período lactacional (DPN 0-21). Dados apresentados como média \pm EPM de 13 ninhadas/grupo. (RMANOVA, $*p < 0,05$ comparado com o CTR). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

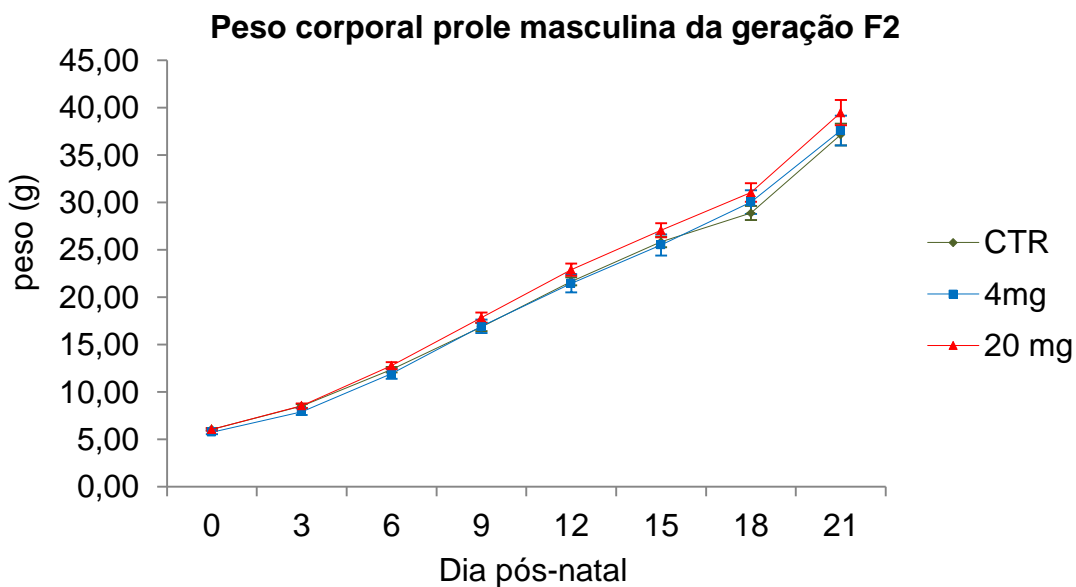


Figura 9. Peso corporal da prole masculina (média da ninhada) da geração F2 durante o período lactacional (DPN 0-21). Dados apresentados como média \pm EPM de 11 ninhadas/grupo. (RMANOVA, $p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Tabela 5. DAG relativa no DPN 0 e 21, reflexos de endireitamento e geotaxia negativa dos diferentes grupos experimentais

Grupos	DAG (mm/g ^{1/3})		Reflexos (dias)	
	DPN 0	DPN 21	Endireitamento	Geotaxia Negativa
Geração F1				
CTR	1,53 ± 0,02	4,20 ± 0,06	5,00 ± 0,00	9,77 ± 0,30
PROP 4	1,57 ± 0,03	4,31 ± 0,06	5,00 ± 0,00	10,00 ± 0,16
PROP 20	1,54 ± 0,04	4,40 ± 0,05	5,07 ± 0,07	10,00 ± 0,41
Geração F2				
CTR	1,57 ± 0,04	3,86 ± 0,18;	5,00 ± 0,00	10,31 ± 0,21
PROP 4	1,53 ± 0,03	4,11 ± 0,10	5,00 ± 0,00	10,73 ± 0,38
PROP 20	1,56 ± 0,03	4,03 ± 0,11	5,07 ± 0,07	9,79 ± 0,28

DAG (distância anogenital) apresentada como média ± EPM (F1:13 ninhadas/grupo; F2: 11 ninhadas/grupo) e analisado por RMANOVA ($p > 0,05$). Reflexos ontogênicos apresentados como média ± EPM (F1:13 filhotes/grupo; F2: 11 filhotes/grupo) e analisado por ANOVA ($p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.1.2 Peso corporal e testicular, índice gonadossomático, concentração hormonal e parâmetros histomorfométricos no DPN 21

O peso corporal e testicular, índice gonadossomático e as concentrações plasmáticas hormonais dos ratos das gerações F1 e F2 no DPN 21 estão apresentados na Tabela 6.

ANCOVA aplicada para o peso testicular, com o peso corporal como covariância, indicou que o PROP não afetou esse parâmetro quando comparado ao grupo CTR ($p > 0,05$).

ANOVA complementado com Bonferroni indicou que não houve diferença significativa no peso corporal e no índice gonadossomático entre os grupos.

Em relação às concentrações hormonais, ANOVA complementado com Bonferroni indicou que não houve diferença significativa na concentração plasmática de estradiol dos grupos PROP em relação ao CTR. Entretanto, esse mesmo teste indicou que a concentração plasmática de testosterona do grupo PROP 4 da

geração F1 e F2 foi menor quando comparado ao grupo CTR [F1: $f(2, 31)= 3,29$ $p=0,051$); F2: $f(2, 26)= 3,41$ $p=0,050$].

Os parâmetros histomorfométricos estão apresentados na Tabela 7. ANOVA complementado com Bonferroni indicou que não houve diferença significativa nos parâmetros histomorfométricos, como o volume testicular, o volume do tecido intersticial, volume, diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos entre os grupos experimentais.

Tabela 6. Peso corporal, peso do testículo direito, índice gonadossomático (IGS) e concentrações hormonais dos machos das gerações F1 e F2 no DPN 21.

	CTR	PROP 4	PROP 20
Geração F1			
Peso corporal (g)	36,01±1,74[10]	37,32±1,02[13]	40,84±1,50[13]
Peso do testículo D (mg)	87,82±3,25[10]	81,15±2,78[13]	82,91±2,91[13]
IGS	0,47±0,05[10]	0,42±0,05[13]	0,43±0,05[13]
Testosterona (ng/ml) ^A	6,80±3,01[12]	0,51±0,09* [9]	2,52±1,65 [11]
Estradiol (pg/ml)	17.88 ± 1.67 [11]	14.80 ± 1.10[10]	16.38 ± 1.23[11]
Geração F2			
Peso corporal (g)	36,79±1,32[13]	39,15±1,54[10]	39,29±1,52[13]
Peso do testículo direito (mg)	82,09±2,13[13]	81,55±2,39[10]	85,71±2,11[13]
IGS	0,43±0,00[13]	0,42±0,01[10]	0,44±0,01[13]
Testosterona (ng/ml) ^A	0,83±0,46[10]	0,51±0,07* [9]	0,57±0,05 [8]
Estradiol (pg/ml)	10.00 (10.00-12.50)[9]	10.00 (10.00-10.50)[9]	10.00 (10.00-11.50)[9]

Dados apresentados como média ± EPM (* $p<0,05$, comparado com o grupo CTR, ANOVA complementada com Bonferroni para peso corporal, índice gonadossomático e a dosagem hormonal; ANCOVA para peso testicular). Dosagem de estradiol da geração F2 apresentado como mediana (1^o – 3^o quartil) e analisado por Kruskal-Wallis. Valores entre colchetes representam o número de animais/grupo. Letra maiúscula indica que a variável foi transformada. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Tabela 7. Parâmetros histomorfométricos dos testículos dos machos no DPN 21 das gerações F1 e F2.

	CTR	PROP 4	PROP 20
Geração F1	[10]	[12]	[12]
Volume testicular (ml)	0,08 ± 0,003	0,07 ± 0,004	0,09 ± 0,003
Volume do tecido intersticial (ml)	0,04 ± 0,002	0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,002
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	0,04 ± 0,002	0,04 ± 0,002	0,04 ± 0,002
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	93,34 ± 2,76	96,23 ± 2,30	100,23 ± 2,06
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	5,92 ± 0,34	5,40 ± 0,30	5,65 ± 0,19
Geração F2	[10]	[7]	[10]
Volume testicular (ml)	0,07 ± 0,003	0,08 ± 0,007	0,08 ± 0,004
Volume do tecido intersticial (ml)	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,003
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	0,04 ± 0,002	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,002
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	88,82 ± 1,73	97,77 ± 3,41	92,77 ± 1,99
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	6,10 ± 0,39	5,15 ± 0,30	5,68 ± 0,34

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA). Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.2 Parâmetros Analisados nos Machos da Geração F1

4.2.2.1 Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade

De acordo com o teste estatístico empregado (ANOVA), PROP não influenciou o dia da separação prepucial dos ratos da geração F1 (CTR: 50,92 ± 1,22; PROP 4: 49,62 ± 0,84; PROP 20: 50,04 ± 1,12) e não causou diferença significativa no peso

corporal entre os grupos no dia da separação prepucial (CTR: $192,66 \pm 5,06$; PROP 4: $198,411 \pm 5,14$; PROP 20: $197,80 \pm 7,42$).

Também não houve diferença no peso corporal, após o desmame e durante o tratamento por gavagem com PROP (DPN 24-120), como demonstrado na Figura 10.

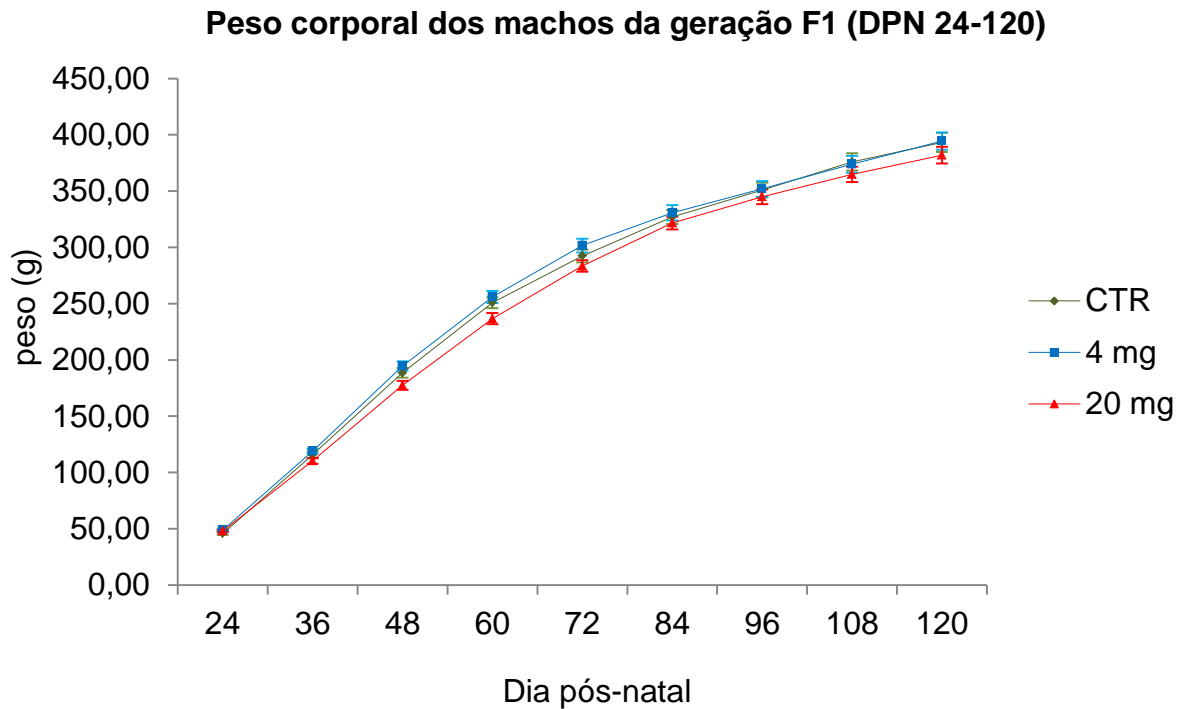


Figura 10. Peso corporal dos ratos da geração F1 durante o período de tratamento por gavagem com PROP (DPN 24-120). Dados apresentados como média \pm EPM de 13 animais/grupo. (RMANOVA, $p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.2.2 Comportamento copulatório e preferência sexual

Na Tabela 8 estão apresentados os parâmetros do comportamento copulatório. Nenhuma diferença estatística foi apontada para latências de intromissão e ejaculação, números de intromissões e números de ejaculações (ANOVA, $p > 0,05$) nos grupos PROP em relação ao CTR.

A preferência sexual está apresentada Tabela 9, não houve diferença estatística no tempo passado na zona do macho, na zona da fêmea, no número de visitas entre zonas e no escore de preferência dos grupos PROP quando comparados ao grupo CTR ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis).

Tabela 8. Comportamento copulatório dos machos da geração F1 no DPN 90-100.

Comportamento copulatório	CTR	PROP 4	PROP 20
Latência 1ª intromissão(s)	224,0 ± 43,31 [13/13]	135,08 ± 32,27 [12/13]	197,63 ± 44,86 [11/13]
Nº de intromissões até 1ª ejaculação	20,30 ± 1,90 [13/13]	18,91 ± 2,15 [12/13]	21,72 ± 1,78 [11/13]
Latência da 1ª ejaculação(s)	700,54 ± 65,72 [13/13]	610,01 ± 106,94 [11/13]	617,50 ± 51,82 [10/13]
Latência da 1ª intromissão pós-ejaculação(s)	355,15 ± 33,19 [13/13]	302,18 ± 17,04 [11/13]	351,30 ± 19,22 [10/12]
Nº de intromissões pós-ejaculação	16,08 ± 1,46 [13/13]	19,18 ± 2,55 [11/13]	20,09 ± 2,50 [10/13]
Nº de ejaculações	2,00 ± 0,16 [13/13]	2,18 ± 0,26 [11/13]	1,20 ± 0,13 [10/13]

Dados apresentados como média ± EPM, ($p > 0,05$, ANOVA). Número entre colchetes representam o número de animais que apresentaram comportamento pelo número total de animais do grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Tabela 9. Preferência sexual de machos da geração F1 no DPN 90-100.

Parâmetros	CTR [13]	PROP 4 [13]	PROP 20 [13]
Tempo (s) na zona do macho	242,00 (215,50-305,75)	278,00 (263,00-323,75)	240,00 (155,00–323,25)
Tempo (s) na zona da fêmea	500,00 (391,50-624,50)	484,50 (399,50-594,00)	587,00 (355,25–706,50)
Nº de visitas na zona do macho	17,00 (14,50 – 20,25)	19,00 (16,25 – 20,00)	18,50 (16,00 – 21,00)
Nº de visitas na zona da fêmea	20,00 (16,50 – 23,50)	20,50 (18,25 – 22,00)	22,00 (18,75 – 25,25)
Escore de preferência %	67,64 (55,56 – 70,65)	63,09 (60,40 – 66,24)	71,91 (55,86 – 80,67)

Dados apresentados como mediana (1º – 3º quartil), $p > 0,05$, Kruskal-Wallis. Números nos colchetes representam os animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.2.3 Peso corporal, DAG, concentrações hormonais e peso dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado dos machos da geração F1 no DPN 120

O peso corporal, a DAG, as concentrações plasmáticas hormonais e o peso dos órgãos reprodutivos estão apresentados na Tabela 10.

ANOVA indicou que não houve diferença estatística no peso corporal, DAG, concentrações plasmáticas hormonais de testosterona e estradiol, peso do fígado e hipófise, entre os grupos PROP quando comparados ao grupo CTR.

Entretanto, ANOVA complementado com Bonferroni, usando o peso corporal final como covariância (ANCOVA), mostrou uma diminuição no peso do ducto deferente no grupo PROP 4 quando comparado ao grupo CTR [$f(3, 37) = 4,357$; $p = 0,021$]. Não houve diferença estatística no peso dos outros órgãos hormônio-dependentes como testículo, epidídimo, próstata e vesícula seminal dos grupos PROP comparados ao grupo CTR (ANCOVA, $p > 0,05$).

Tabela 10. Peso corporal, DAG, concentrações hormonais plasmáticas e peso dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado dos machos da geração F1 no DPN 120.

	CTR [12]	PROP 4 [12]	PROP 20 [13]
Peso corporal (g)	399,93±9,09	398,35±10,80	396,80±13,24
DAG mm/g^{1/3}	5,75±0,13	5,57±0,24	5,67±0,09
Peso de órgãos (g)			
Testículo (direito)	1,54 ± 0,03	1,56 ± 0,03	1,59 ± 0,03
Ducto deferente (mg)	96,42 ± 2,08	83,83 ± 2,98*	87,75 ± 3,58
Epidídimo	0,59 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,60 ± 0,01
Próstata	0,34 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Vesícula seminal cheia	0,71 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,66 ± 0,03
Vesícula seminal vazia	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Fígado	14,54 ± 0,47	14,58 ± 0,44	14,74 ± 0,48
Hipófise (mg)	8,67± 0,59	7,25 ± 0,66	7,69 ± 0,40
Testosterona (ng/ml)	10,73 ± 1,43 [9]	9,85 ± 2,37 [9]	13,67± 2,88 [11]
Estradiol (pg/ml)^A	22,89 ± 1,43 [9]	24,13 ± 1,78 [8]	28,83 ± 4,39 [10]

Dados apresentados como média ± EPM, peso corporal foi comparado usando ANOVA. Peso de órgãos realizado análise de covariância (ANCOVA) com o peso corpóreo como covariável (*p< 0,05, comparado ao grupo CTR). Números nos colchetes representam os animais/grupo. Letra maiúscula indica que a variável foi transformada. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.2.4 Parâmetros espermáticos e histomorfometria testicular

Para comparar os parâmetros espermáticos (Tabela 11), foi aplicado ANOVA complementada com Bonferroni que demonstrou não haver diferença estatística entre os grupos no número de espermátides, número e produção de espermatozoides, trânsito de espermatozoides e anormalidades espermáticas.

A histomorfometria testicular está apresentada na Tabela 12. Não houve diferença estatística entre os grupos no volume testicular, volume do tecido intersticial e volume, diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos.

Tabela 11. Parâmetros espermáticos dos machos da geração F1 no DPN 120.

Parâmetros	CTR [10]	PROP 4 [10]	PROP 20 [10]
Nº de espermátides por testículo (10 ⁶ /testículo)	184,93±5,90	192,65±10,27	178,53±7,64
Nº de espermátides por testículo (10 ⁶ /g/testículo)	115,14±5,02	135,46±10,63	118,68±8,39
Produção diária de espermatozoides	30,32±0,97	31,58±1,68	29,27±1,25
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (x10 ⁶ /órgão)	106,14±9,07	95,62±8,27	91,83±3,22
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (x10 ⁶ /g/órgão)	424,95±21,91	406,21±29,17	431,37±35,36
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (x 10 ⁶ /órgão)	235,31±21,57	205,03±18,91	211,98±18,91
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (x 10 ⁶ /g/órgão)	1030,85±68,69	924,91±57,35	954,81±54,39
Tempo de trânsito de espermatozoides na cabeça/corpo (dias)	3,50±0,27	3,04±0,21	3,17±0,13
Tempo de trânsito na cauda (dias)	7,81±0,69	6,58±0,59	7,35±0,76
Anormalidades de cabeça (%)	16,07±2,14 [13]	15,34±1,48 [13]	16,31±2,36 [13]
Anormalidades de cauda (%)	8,00±1,18 [13]	7,84±1,20 [13]	8,73±1,29 [13]

Dados apresentados como média ± EPM, p>0,05, ANOVA. Números nos colchetes representam os animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Tabela 12. Parâmetros histomorfométricos dos testículos dos ratos da geração F1 no DPN 120.

	CTR [9]	PROP 4 [7]	PROP 20 [7]
Volume testicular (ml)	1,45 ± 0,03	1,45 ± 0,04	1,48 ± 0,06
Volume do tecido intersticial (ml)	0,54 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,56 ± 0,03
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	0,91 ± 0,02	0,90 ± 0,03	0,92 ± 0,03
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	258,39 ± 5,41	259,60 ± 7,22	264,48 ± 6,66
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	17,41 ± 0,63	17,32 ± 1,34	17,03 ± 1,12

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA). Números nos colchetes representam os animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.3 Parâmetros Analisados do Nascimento ao Desmame nas Fêmeas das Gerações F1 e F2

4.2.3.1 Desenvolvimento físico e comportamental da prole feminina das gerações F1 e F2

O peso corporal (média da ninhada) da prole feminina das gerações F1 e F2, durante as três primeiras semanas de idade (DPN 0 até DPN 21), está ilustrado na figura 11 e 12, respectivamente. RMANOVA indicou somente um efeito do dia no peso corporal da geração F1 ($f(7,84) 1931,98 p=0,00$) e geração F2 ($f(7,70) 853,20 p=0,00$), mas sem interação do dia com a exposição ao PROP comparado ao grupo CTR, indicando que todos os grupos, de ambas as gerações, ganharam peso de forma similar.

A DAG relativa ao peso corporal ($\text{mm/g}^{1/3}$) das gerações F1 e F2, no DPN 0 assim como no DPN 21, não foi influenciada pelo tratamento e exposição ao PROP ($p > 0,05$) como indicado pela RMANOVA (Tabela 13).

Não houve diferença significativa no reflexo de endireitamento e no reflexo de geotaxia negativa (ANOVA, $p > 0,05$), como apresentado na Tabela 13.

Nenhum animal apresentou sinais de toxicidade, como piloereção, lacrimejamento ou alterações do padrão respiratório.

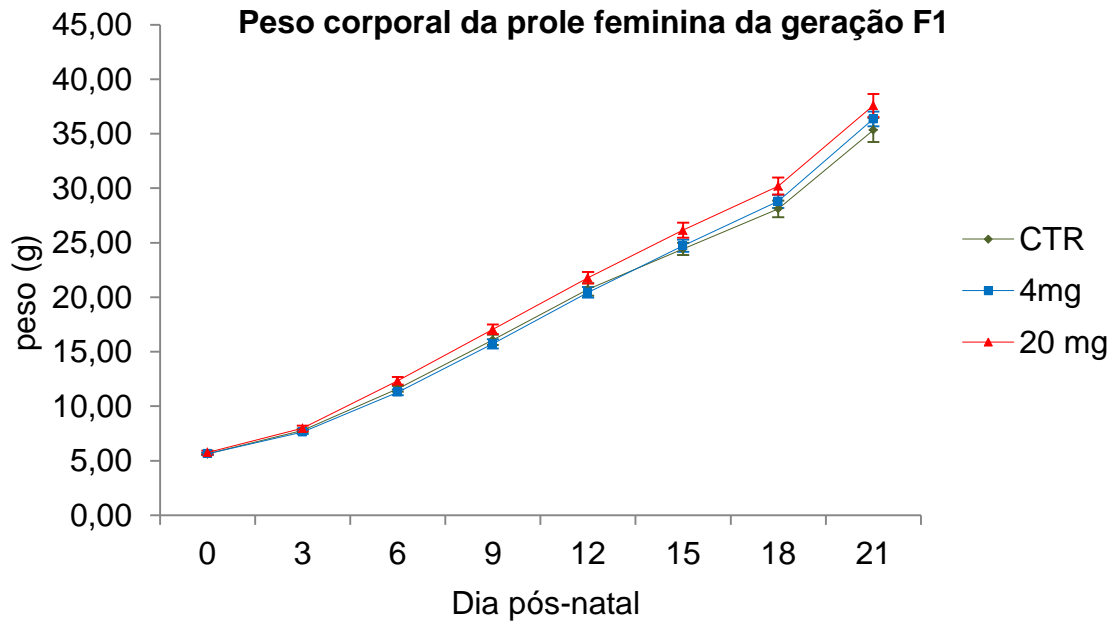


Figura 11. Peso corporal da prole feminina (média da ninhada) da geração F1 durante o período lactacional (DPN 0-21). Dados apresentados como média \pm EPM de 13 ninhadas/grupo. (RMANOVA, $p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

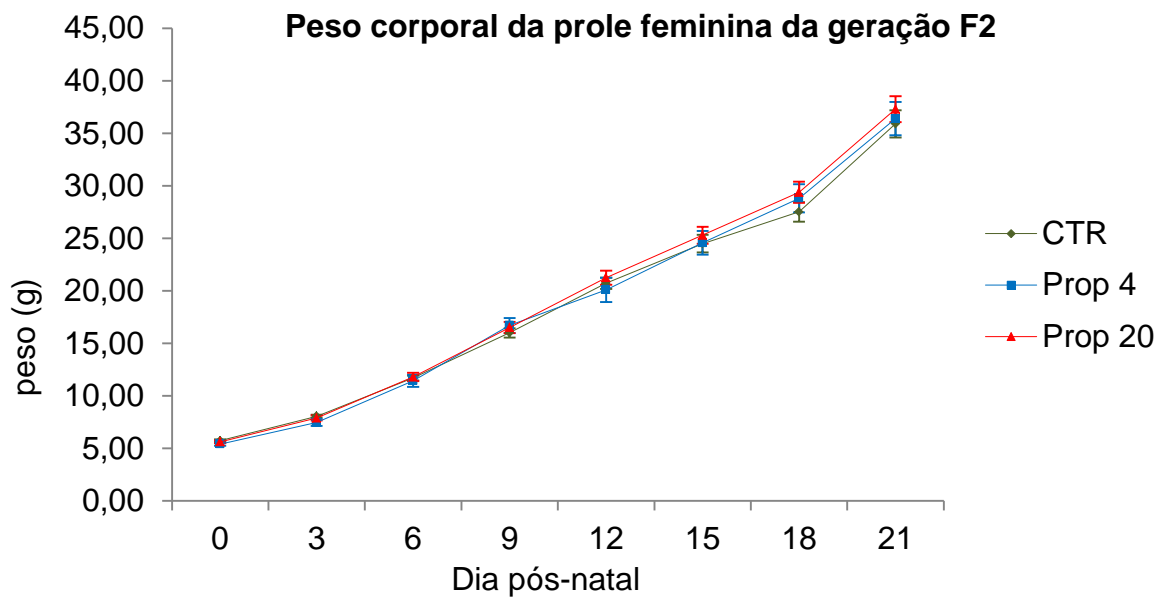


Figura 12. Peso corporal da prole feminina (média da ninhada) da geração F2 durante o período lactacional (DPN 0-21). Dados apresentados como média \pm EPM de 11 ninhadas/grupo. (RMANOVA, $p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Tabela 13. DAG relativa no DPN 0 e 21, reflexos de endireitamento e geotaxia negativa dos diferentes grupos experimentais

Grupos	DAG (mm/g ^{1/3})		Reflexos (dias)	
	DPN 0	DPN 21	Endireitamento	Geotaxia Negativa
Geração F1				
CTR	0,88 \pm 0,01	2,45 \pm 0,04	5,00 \pm 0,00	10,09 \pm 0,19
PROP 4	0,89 \pm 0,01	2,51 \pm 0,05	5,00 \pm 0,00	10,23 \pm 0,30
PROP 20	0,90 \pm 0,02	2,56 \pm 0,06	5,08 \pm 0,08	10,23 \pm 0,26
Geração F2				
CTR	0,87 \pm 0,02	2,33 \pm 0,06	5,00 \pm 0,00	10,09 \pm 0,22
PROP 4	0,87 \pm 0,01	2,33 \pm 0,05	5,00 \pm 0,00	10,55 \pm 0,25
PROP 20	0,87 \pm 0,02	2,35 \pm 0,04	5,07 \pm 0,07	10,27 \pm 0,28

DAG (distância anogenital) relativa apresentada como média \pm EPM (F1:13 ninhadas/grupo; F2: 11 ninhadas/grupo) e analisado por RMANOVA ($p > 0,05$). Reflexos ontogênicos apresentados como média \pm EPM (F1: 13 filhotes/grupo; F2: 11 filhotes/grupo) e analisado por ANOVA ($p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.3.2 Peso corporal e de órgãos reprodutivos, índice gonadossomático, e parâmetros histomorfométricos de útero e ovário no DPN 21

O peso corporal e o de órgãos reprodutivos, além do índice gonadossomático das ratas das gerações F1 e F2 no DPN 21, estão apresentados na Tabela 14. ANOVA demonstrou que não houve diferença significativa no peso corporal, índice gonadossomático, assim como peso de útero e ovários entre os grupos experimentais.

Os parâmetros histomorfométricos de útero e ovário estão apresentados na Tabela 15 e 16, respectivamente. PROP não afetou a quantidade de folículos no ovário assim como a espessura das camadas uterinas quando comparado ao grupo CTR ($p > 0,05$ ANOVA).

Tabela 14. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e índice gonadossomático (IGS) das fêmeas das gerações F1 e F2 no DPN 21.

Geração F1	CTR (10)	PROP 4 (13)	PROP 20 (13)
Peso corporal (g)	35,53 ± 1,61	36,53 ± 0,78	36,87 ± 1,53
Ovário D (mg)	10,57 ± 0,77	9,47 ± 0,67	9,38 ± 0,67
Ovário E (mg)	9,34 ± 0,75	9,05 ± 0,66	9,38 ± 0,66
Útero (mg)	27,76 ± 1,35	25,18 ± 1,18	25,62 ± 1,18
IGS	55,46±3,88	51,25±3,72	51,15± 2,77
Geração F2	CTR (13)	PROP 4 (10)	PROP 20 (13)
Peso corporal (g)	36,99 ± 1,33	36,62 ± 1,32	38,03 ± 1,40
Ovário D (mg)	7,03 ± 0,64	7,27 ± 0,73	8,92 ± 0,64
Ovário E (mg)	7,56 ± 0,59	7,12 ± 0,67	8,33 ± 0,59
Útero (mg)	22,32 ± 1,22	24,12 ± 1,40	22,66 ± 1,23
IGS	39,74±2,90	39,03±3,67	45,87± 2,55

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA para peso corporal e índice gonadossomático; ANCOVA para peso de ovário e útero), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Tabela 15. Quantificação folicular ovariana em fêmeas das gerações F1 e F2 no DPN 21.

Geração F1			
	CTR (5)	PROP 4 (5)	PROP 20 (6)
Folículos primordiais	26,40 ± 9,94	20,00 ± 9,62	18,33 ± 3,16
Folículos em crescimento ^A	23,13 ± 4,76	12,60 ± 2,57	20,00 ± 1,98
Folículos antrais ^A	29,07 ± 4,77	17,93 ± 2,77	23,61 ± 2,94
Geração F2			
	CTR (6)	PROP 4 (6)	PROP 20 (6)
Folículos primordiais	26,28 ± 3,65	16,94 ± 4,10	24,72 ± 7,47
Folículos em crescimento	21,56 ± 1,34	22,39 ± 3,21	21,28 ± 3,50
Folículos antrais	22,72 ± 4,53	25,95 ± 3,67	28,95 ± 3,78

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia. Letra maiúscula indica que o dado foi transformado

Tabela 16. Análise morfométrica uterina em fêmeas das gerações F1 e F2 no DPN 21.

Geração F1			
Espessura (µm)	CTR (6)	PROP 4 (6)	PROP 20 (6)
Endométrio	220,48 ± 18,87	192,13 ± 22,19	215,44 ± 12,37
Miométrio	128,27 ± 14,39	112,44 ± 9,35	129,67 ± 10,00
Epitélio luminal	11,03 ± 0,53	11,20 ± 0,48	11,26 ± 0,29
Geração F2			
Espessura (µm)	CTR (6)	PROP 4 (6)	PROP 20 (6)
Endométrio	220,29 ± 16,25	216,06 ± 15,04	200,42 ± 10,51
Miométrio	118,48 ± 9,32	142,06 ± 8,09	128,41 ± 9,43
Epitélio luminal	11,01 ± 0,75	11,37 ± 1,03	11,46 ± 0,54

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.4 Parâmetros Analisados nas Fêmeas da Geração F1

4.2.4.1 Acompanhamento do peso corpóreo e instalação da puberdade

A instalação da puberdade está apresentada na Tabela 17. ANOVA indicou que PROP não influenciou o dia da abertura vaginal da geração F1, assim como não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos no dia da abertura vaginal. PROP também não influenciou o dia em que as ratas apresentaram o 1º estro depois da abertura vaginal.

Não houve diferença no peso corporal, após o desmame e durante o tratamento por gavagem com PROP (DPN 24- 90), como demonstrado na Figura 13 indicado por RMANOVA.

Tabela 17. Abertura vaginal, peso corporal no dia da abertura vaginal e 1º estro das fêmeas da geração F1.

	CTR (13)	PROP 4 (13)	PROP 20 (13)
Abertura vaginal (dia)	36,44 ± 0,53	35,42 ± 0,72	35,69 ± 0,82
Peso (g)	97,89 ± 3,95	99,09 ± 3,86	105,56 ± 4,10
1º estro (dia)	37,76 ± 0,55	37,96 ± 0,69	36,62 ± 0,81

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

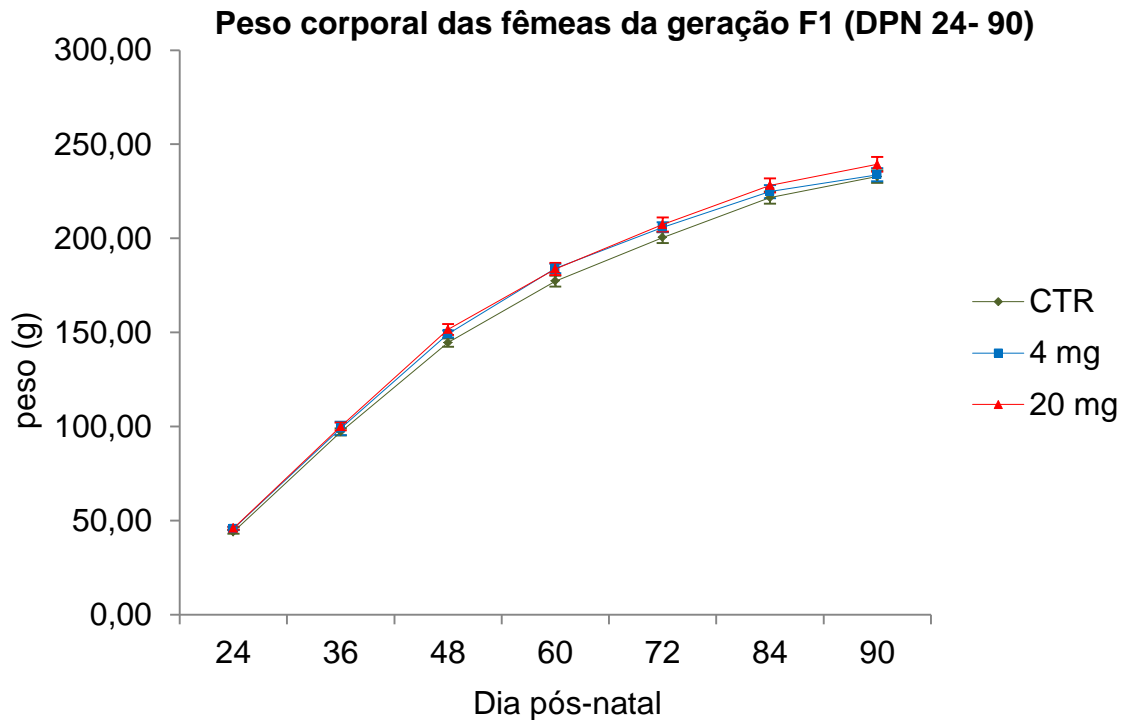


Figura 13. Peso corporal das ratas da geração F1 durante o período de tratamento por gavagem com PROP (DPN 24-90). Dados apresentados como média \pm EPM de 13 animais/grupo. (RMANOVA, $p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.4.2 Acompanhamento do ciclo estral a partir do DPN 75

A Tabela 18 apresenta os dados referentes ao acompanhamento do ciclo estral do DPN 75-90. ANOVA complementada com Bonferroni indicou que não houve alteração na duração do ciclo entre os grupos. Entretanto o grupo PROP4 teve diminuição significativa da fase de proestro comparado ao grupo CTR [$f(2,36) = 3,34$ $p = 0,047$], as outras fases do ciclo, como estro e diestro, não apresentaram diferença entre os grupos.

Tabela 18. Ciclo estral das fêmeas da geração F1 a partir do DPN 75.

	CTR (13)	PROP 4 (13)	PROP 20 (13)
Duração do ciclo estral (dias)	4,90 ± 0,44	4,94 ± 0,37	5,58 ± 0,39
Frequência do proestro	2,85 ± 0,25	1,85 ± 0,30*	2,23 ± 0,28
Frequência do estro	3,31 ± 0,24	3,23 ± 0,23	2,85 ± 0,19
Frequência de metaestro/diestro	8,85 ± 0,41	9,92 ± 0,43	9,92 ± 0,37

Dados apresentados como média ± EPM (*p<0,05, comparado com o grupo CTR, ANOVA complementado com Bonferroni), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.4.3 Peso corporal, DAG, peso de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado e concentração plasmática de estradiol

O peso corporal, a DAG, a concentração plasmática de estradiol, o peso dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado estão apresentados na Tabela 19.

ANOVA demonstrou que tratamento com PROP não afetou o peso corporal, a DAG e a concentração plasmática de estradiol nas ratas adultas.

Entretanto, ANCOVA, utilizando o peso corporal como uma covariância, demonstrou que o peso do fígado apresentou um aumento significativo no grupo PROP 20 em relação ao CTR [$f(3,33)=10,36$ p=0,028]. O peso dos órgãos hormônio-dependentes e da hipófise não foi alterado.

Tabela 19. Peso corporal, DAG, peso de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado e concentração plasmática de estradiol dos diferentes grupos experimentais.

	CTR [12]	PROP 4 [12]	PROP 20 [13]
Peso corporal (g)	237,86 ± 5,11	242,24 ± 4,95	251,69 ± 6,23
DAG mm/g^{1/3}	2,73 ± 0,07	2,80 ± 0,08	2,85 ± 0,05
Peso de órgãos			
Ovário D (mg)	46,05 ± 2,68	44,42 ± 2,64	44,88 ± 2,61
Útero cheio (g)	0,75 ± 0,07	0,68 ± 0,07	0,57 ± 0,07
Útero vazio (g)	0,50 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,49 ± 0,03
Fígado (g)	8,68 ± 0,25	8,92 ± 0,24	9,63 ± 0,24*
Hipófise (mg)	11,34 ± 0,92	12,82 ± 0,87	9,53 ± 0,96
Estradiol (pg/ml)	33,90 ± 5,53	43,44 ± 10,96	46,44 ± 4,38

Dados apresentados como média ± EPM (*p<0,05, comparado com o grupo CTR, ANCOVA complementado com Bonferroni), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.4.4 Histomorfometria dos órgãos reprodutivos das fêmeas da geração F1

A Tabela 20 apresenta a quantificação folicular ovariana e a contagem dos corpos lúteos, demonstrando que não houve diferença estatística entre a quantidade de folículos, assim como de corpos lúteos entre os grupos experimentais (ANOVA, p>0,05).

A análise histomorfométrica uterina está apresentada na Tabela 21. ANOVA indicou que não houve diferença estatística na espessura das camadas uterinas assim como na altura do epitélio luminal entre os grupos experimentais (ANOVA, p>0,05).

Tabela 20. Quantificação folicular ovariana em fêmeas da geração F1.

	CTR (9)	PROP 4 (10)	PROP 20 (10)
Folículos primordiais	6,67 ± 0,61	9,78 ± 1,22	9,82 ± 1,60
Folículos em crescimento	4,74 ± 0,67	6,83 ± 0,79	6,25 ± 0,64
Folículos antrais	9,70 ± 1,60	13,73 ± 2,27	13,50 ± 2,06
Corpos lúteos	5,28 ± 1,08	5,91 ± 1,03	6,18 ± 0,81

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Tabela 21. Análise morfométrica uterina em fêmeas da geração F1.

Espessura (µm)	CTR (9)	PROP 4 (8)	PROP 20 (9)
Endométrio	685,44 ± 20,97	716,20 ± 51,16	614,66 ± 36,26
Miométrio	410,35 ± 20,42	434,02 ± 30,48	366,52 ± 17,93
Perimétrio	11,99 ± 0,62	12,79 ± 0,57	11,35 ± 0,53
Epitélio luminal	25,62 ± 1,53	27,68 ± 2,43	24,46 ± 1,97

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA), número entre parênteses indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.4.5 Avaliação do comportamento sexual

Os parâmetros avaliados durante o comportamento sexual das fêmeas estão apresentados na Tabela 22. A avaliação do comportamento sexual mostrou que, embora o coeficiente de lordose não tenha sido alterado pelo tratamento com PROP (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$), o teste exato de Fisher indicou que houve um aumento no número de observações de lordoses no grau 2 e uma redução no grau de lordose 3 nos grupos tratados com PROP em relação ao grupo CTR.

Tabela 22. Parâmetros avaliados durante o comportamento sexual de fêmeas dos diferentes grupos experimentais a partir do DPN 90.

	CTR [13]	PROP 4 [12]	PROP 20 [13]
Coeficiente de Lordose^a	100 % (90,0-100,0)	100% (95-100,0)	100% (90,0-100,0)
Grau de Lordose 0	5,38% (7/130)	5,83% (7/120)	3,85% (5/130)
Grau de Lordose 1	4,62% (6/130)	9,17% (11/120)	3,85% (5/130)
Grau de Lordose 2	6,15% (8/130)	21,67% (26/120)*	23,08% (30/130)*
Grau de Lordose 3	83,85% (109/130)	63,33% (76/120)*	69,23% (90/130)*

^aValores expressos em mediana (1^o Quartil – 3^o Quartil), Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Número entre parênteses representa o número de observações apresentado em cada grau de lordose/total de observações, * $p < 0,05$ em relação ao CTR comparado pelo teste exato de Fisher. Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.4.6 Toxicidade geral materna

RMANOVA indicou que o peso materno (Figura 14) e a ingestão de ração (Figura 15) durante a gestação e lactação não foram afetados pelo tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg ($p > 0,05$).

As ratas não apresentaram sinais de toxicidade, como piloereção, lacrimejamento ou alterações do padrão respiratório durante o período de prenhez e lactação.

Peso corporal das ratas da geração F1 durante a gestação e lactação

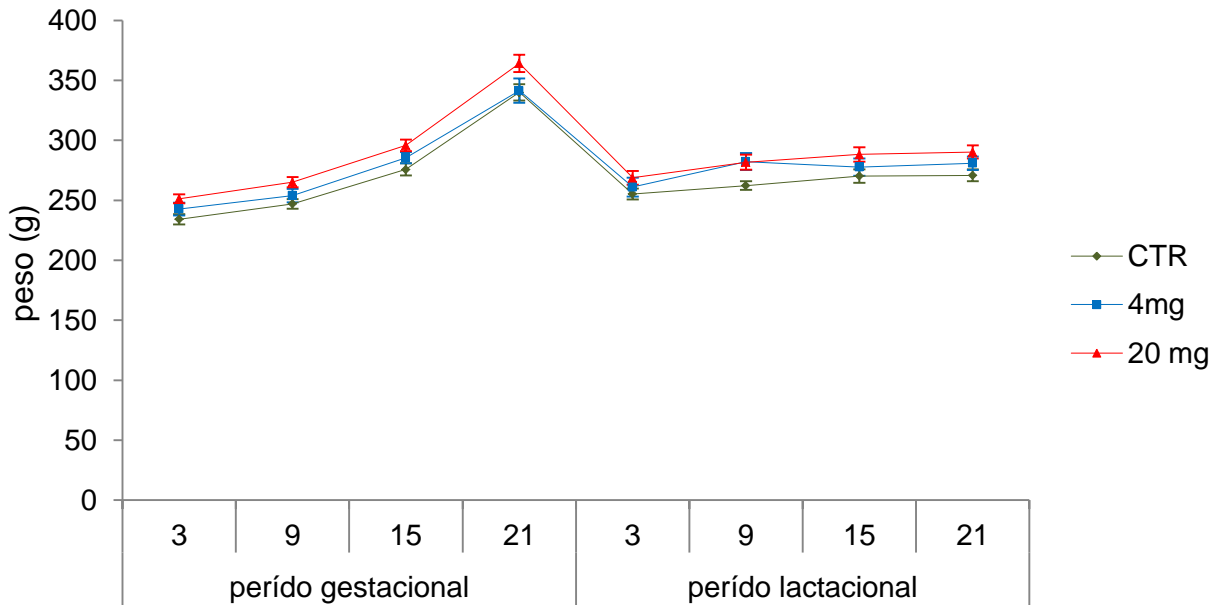


Figura 14. Peso corporal das ratas da geração F1 durante o período gestacional e lactacional. Média \pm EPM de 11 animais/grupo. (RMANOVA, $p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

Consumo de ração das ratas da geração F1 durante a gestação e lactação

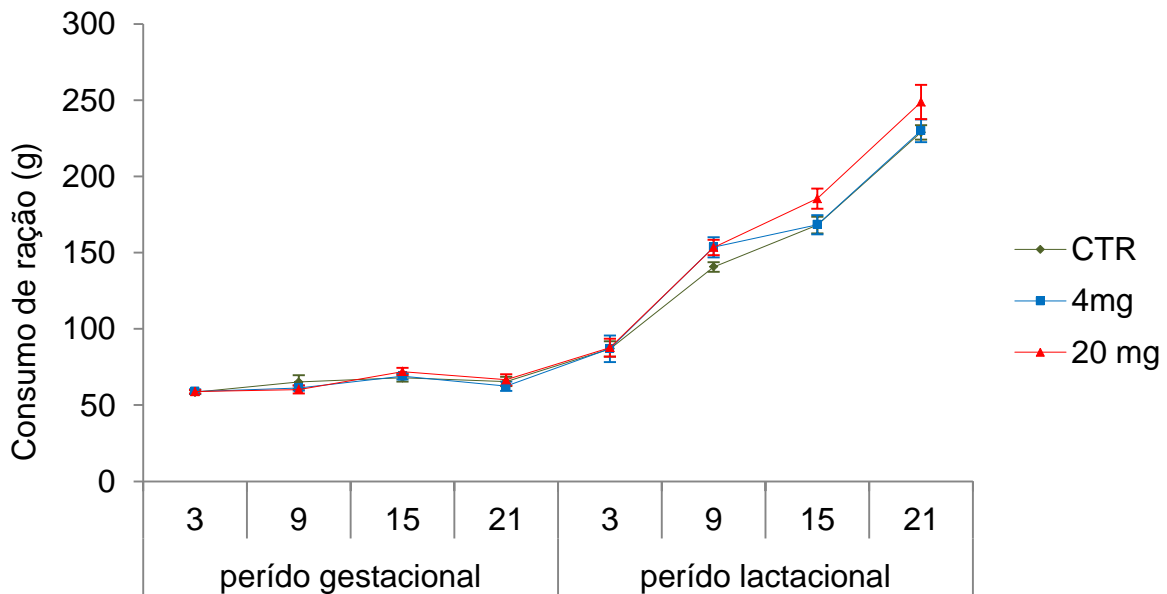


Figura 15. Consumo de ração das ratas da geração F1 durante o período gestacional e lactacional. Média \pm EPM de 11 animais/grupo. (RMANOVA, $p > 0,05$). CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

4.2.4.7 Avaliação do comportamento materno

Os parâmetros do comportamento materno foram analisados por RMANOVA tendo dia de lactação, horário e grupo experimental como variáveis entre sujeitos. Sabe-se que os diversos parâmetros analisados durante o comportamento materno (amamentação, tempo fora do ninho, tempo gasto na limpeza dos filhotes, construção do ninho e recuperação dos filhotes) sofrem mudanças de acordo com o dia da lactação, bem como do horário de observação, sendo assim RMANOVA mostrou que o comportamento das ratas mudou entre os diferentes horários ao longo da lactação, como esperado (dados não apresentados). Não houve interação significativa entre dia de lactação, horário e tratamento entre os grupos PROP comparados ao grupo CTR.

Como não houve diferença entre os grupos e com o objetivo de facilitar a visualização desse dado, as observações foram somadas entre os 4 horários (10h, 13h, 16h e 19h) e dias de avaliação (DL 1-10) e estão apresentadas na Figura 16.

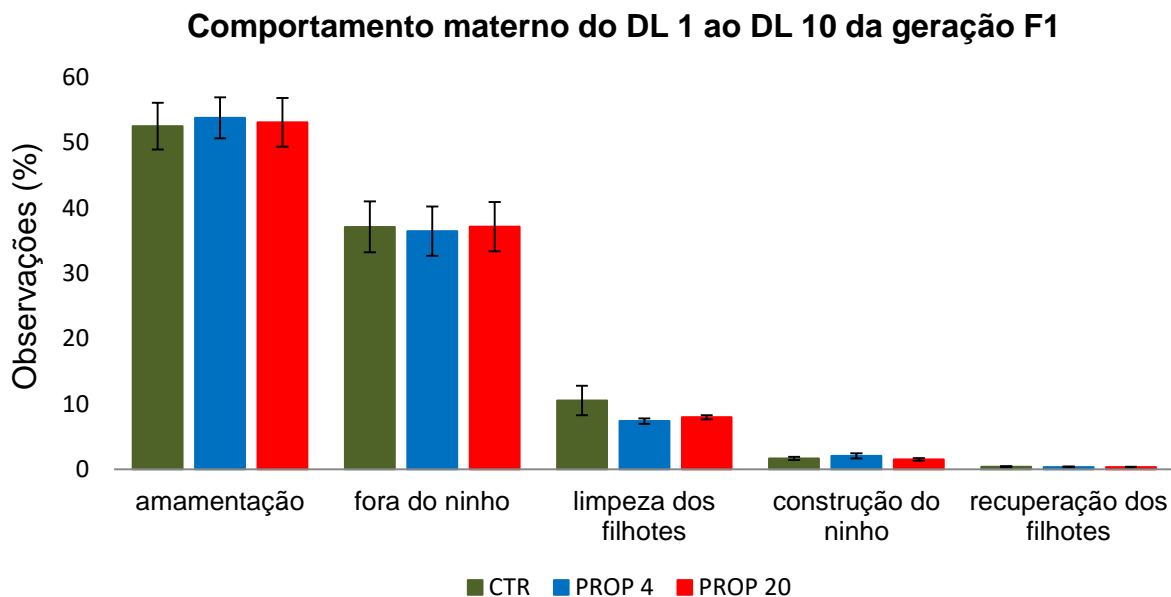


Figura 16. Porcentagem de observações pontuadas durante o comportamento materno do DL 1 ao 10 (n=11/grupo). Valores estão expressos em porcentagem, $p > 0,05$, RMANOVA. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia. DL= dia lactacional

4.2.4.8 Análise de fertilidade

ANOVA indicou que não houve alterações significativas nos parâmetros de fertilidade, como as taxas de implantação, perda pré-implantação, perda pós-implantação e viabilidade fetal entre os grupos PROP e CTR. Os dados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Teste de fertilidade das fêmeas da geração F1

	CTR (6)	PROP 4 (7)	PROP 20 (7)
Taxa de implantação	86,09 ± 3,55	89,29 ± 6,25	88,81 ± 2,68
Taxa de perda pré-implantação	13,91 ± 3,55	12,00 ± 5,67	11,19 ± 2,68
Taxa de perda pós-implantação^A	12,36 ± 2,70	10,59 ± 4,43	3,04 ± 2,22
Taxa de viabilidade fetal	87,64 ± 2,70	89,41 ± 4,43	96,96 ± 2,22

Dados apresentados como média ± EPM ($p > 0,05$, ANOVA), número entre parênteses indica o número de animais/grupo. Letra maiúscula indica que a variável foi transformada. CTR: óleo de milho; PROP 4: Propiconazol 4 mg/kg/dia; PROP 20: Propiconazol 20 mg/kg/dia.

5 DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE (ANTI) ESTROGÊNICA E ATIVIDADE (ANTI) ANDROGÊNICA DO FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS, MACHOS E FÊMEAS

Uma das propostas deste trabalho foi investigar se o PROP apresenta atividade (anti) estrogênica e (anti) androgênica, através dos testes uterotrófico e Hershberger, respectivamente.

De acordo com o *Endocrine Disruptor Screening Program*, para considerar que uma substância afete a função do receptor de estrógenos (ER), são necessários 5 tipos de ensaios, 3 *in vivo* e 2 *in vitro*. Os ensaios *in vitro* fornecem informações mecanicistas sobre como o químico interage no nível celular e os testes *in vivo* fornecem provas confirmatórias dos efeitos do produto químico após as exposições (ENV/JM/MONO, 2010). Os estudos *in vitro* que investigaram a interação do PROP com ER mostraram resultados controversos, pois, em concentrações de 10^{-10} a 10^{-4} M, esse fungicida não se liga aos ER (WILLOUGHBY, 2012 *apud* CLH REPORT FOR PROPICONAZOLE, 2015), mas nas concentrações de 1-100 μ M tem efeito antiestrogênico e nas concentrações de 12,5–50 μ M tem atividade estrogênica fraca, indicando que o PROP pode interagir com o ER (KJAERTAD *et al.*, 2010). Em outro estudo que investigou a interação do PROP na ER ativação transicional mostrou que, nas concentrações de 5×10^{-6} e 3×10^{-5} M, esse fungicida tem uma atividade estrogênica fraca, sem efeitos antiestrogênicos (KJELDSEN *et al.*, 2013).

Entre os estudos *in vivo* sugeridos estão o teste uterotrófico, o teste em roedores púberes e ensaios reprodutivos de curto prazo em peixe. O teste em roedores púberes demonstrou que fêmeas expostas ao PROP via intraútero e pela ingesta de ração, nas doses que variam entre 31,9 e 412,8 mg/kg/dia, apresentam alteração no ciclo estral na primeira e segunda semana após a abertura vaginal, sugerindo um mecanismo de estrogenicidade e inibição da aromatase (ROCKETT *et al.*, 2006). O ensaio reprodutivo de curto prazo em peixes, como 21 dias de exposição ao PROP, mostrou redução na fecundidade e fertilidade, aumento no índice gonadossomático e efeitos na histopatologia gonadal, com aumento da atresia ovócita nas doses de 500 e 1000 μ g (SKOLNESS *et al.*, 2013).

Como existem divergências sobre os efeitos do PROP como substância com atividade nos ER, principalmente quando comparados estudos *in*

vitro e *in vivo*, o presente estudo utilizou o teste uterotrófico em ratas imaturas para verificar se o PROP tem a capacidade de induzir atividade biológica consistente com agonista e antagonista dos estrógenos naturais. Essa metodologia foi escolhida, pois, além de verificar a alteração hormonal, pode oferecer informações sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) que está íntegro nesses animais. Assim, se a substância estimular o eixo HHG, direta ou indiretamente, isso resultará em puberdade e ovulação precoce com antecipação da abertura vaginal (US EPA, 2009). Contudo, o presente trabalho baseou-se em doses de ingestão diária aceitável para humanos, que são mais baixas do que as encontradas em alguns estudos toxicológicos com esse fungicida, evitando assim, doses que poderiam causar toxicidade. Além disso, sabe-se que os DEs podem apresentar uma curva dose-resposta não monotônica, em que há um aumento da resposta na menor dose e uma diminuição da resposta na maior dose (CONOLLY & LUTZ, 2004). De acordo com os resultados encontrados neste estudo, este fungicida não apresenta atividade (anti) estrogênica, assim como não interfere no eixo HHG, pois nenhuma rata apresentou abertura vaginal. Esse dado está em concordância com outro estudo que realizou esse teste em ratas ovariectomizadas com doses de 175, 400 e 500 mg/kg/dia, e o PROP também foi negativo para os efeitos estrogênicos (SAWHNEY CODER, 2012 *apud* US EPA, 2015).

Para os machos são necessárias os mesmos tipos de ensaios para detectar se uma substância pode alterar a atividade do receptor de andrógenos (AR), ativando-o ou inibindo-o, e também da enzima 5 α redutase, que converte testosterona em di-hidrotestosterona (ENV/JM/MONO, 2010; US EPA 2011a). Estudos *in vitro* demonstraram que PROP, nas concentrações de 6,2 μ M, 12 μ M e 25 μ M, tem atividade antagonista no AR (KJAERTAD *et al.*, 2007; 2010; KOJIMA *et al.*, 2004) e inibe a atividade de di-hidrotestosterona (KOJIMA *et al.*, 2004). Entretanto, em ratos púberes, o tratamento com 10, 75 e 150 mg/kg/dia de PROP não alterou o peso de órgãos hormônio-dependentes (TULLY *et al.*, 2006). No ensaio reprodutivo de curto prazo em peixes, apesar de causar aumento do índice gonadossomático, o PROP não alterou as concentrações plasmáticas de testosterona (SKOLNESS *et al.*, 2013). Analisando os estudos citados, é possível perceber que *in vivo* o PROP parece não ser capaz de interagir com AR em exposições de curto prazo, entretanto os resultados divergem quando comparados com estudos *in vitro*, em que o PROP parece ter uma atividade antiandrogênica.

Baseado nesses resultados, também controversos, o presente estudo utilizou o teste de Hershberger para verificar a atividade androgênica ou antiandrogênica do PROP fundamentando-se na mesma justificativa para fêmeas, uma vez que esse teste já foi realizado com doses acima de 50 mg/kg/dia (KJAERTAD *et al.*, 2007; TAXVIG *et al.*, 2008). Este estudo, assim como os citados anteriormente, demonstrou que o PROP não possui atividade androgênica ou antiandrogênica, pois os órgãos andrógeno-dependentes não tiveram alteração de peso. Embora neste trabalho o grupo PROP 20 mais testosterona tenha apresentado uma diminuição do tamanho das glândulas bulbouretrais comparadas ao CTR negativo (grupo tratado com testosterona), sugerindo uma atividade antiandrogênica, seria necessário encontrar diferenças significativas em dois ou mais órgãos hormônio-dependentes para tal conclusão (US EPA, 2011a), o que não ocorreu.

Esses resultados diferentes entre estudos *in vitro* e *in vivo*, tanto em machos quanto em fêmeas, podem indicar que os efeitos *in vivo* sofrem influências de efeitos modulados pelo fígado, pois alguns estudos demonstraram que esse órgão é alvo do PROP (GOETZ *et al.*, 2007; ROCKETT *et al.*, 2006; TULLY *et al.*, 2006) e o mesmo é capaz de alterar a expressão de genes no fígado envolvidos com o metabolismo de xenobióticos, dos ácidos graxos, além do metabolismo de andrógenos e estrógenos (GOETZ & DIX, 2009).

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO PROPICONAZOL NAS GERAÇÕES F1 E F2, SOBRE PARÂMETROS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA

Outro objetivo deste estudo foi investigar, seguindo as orientações do guia OECD/OCDE 416 (OECD, 2001), os potenciais efeitos em longo prazo do PROP na função reprodutiva de duas gerações de ratos, expostos via células germinativas, intraútero, lactacional e tratamento por gavagem. De acordo com Friedman e colaboradores (2016), um estudo de múltiplas gerações em roedores fornece informações endócrinas relevantes, incluindo observações do desempenho reprodutivo, gestação e maturação sexual ao longo de duas gerações. Assim, o organismo pode sofrer influências da exposição repetida ao químico e não apenas efeitos ou considerações de atividade demonstradas nos testes de tratamento agudo (ENV/JM/MONO, 2010).

Para estudos que avaliam a toxicidade reprodutiva de xenobióticos, é importante acompanhar mudanças no peso corporal e sinais de toxicidade geral, uma vez que a presença de uma substância tóxica pode interferir no padrão de crescimento do animal (JOHNSON, 1981). Além disso, a DAG em ratos recém-nascidos é sexualmente dimórfica, sendo hormônio-dependente, e em machos é considerada um marcador de ação androgênica fetal (PLANT & ZELEZNIK, 2015). Neste trabalho, a exposição ao PROP, nas doses de 4 e 20 mg/kg/dia, não alterou o peso corporal e a DAG da prole feminina das gerações F1 e F2, durante a lactação. Resultados similares foram encontrados no estudo de uma geração, em que a exposição materna a 3 doses de PROP (100, 500, 2500 ppm ~7,6- 412,8 mg/kg/dia) também não alterou esses parâmetros ao nascimento (ROCKETT *et al.*, 2007). Os machos, de ambas as gerações, não apresentaram diferença na DAG, no entanto, diferentemente da geração F2, os machos da geração F1 do presente estudo apresentaram aumento no peso corporal, durante a lactação, apenas no grupo PROP 20. Aumento de peso ao nascimento, somente na prole masculina, foi encontrado com a exposição materna ao PROP na dose de 50 mg/kg/dia sem alteração da DAG (TAXVIG *et al.*, 2008). Em doses superiores (~ 144,9 - 412,8 mg/kg/dia), os machos apresentaram aumento da DAG no DPN 0 (GOETZ *et al.*, 2007) e diminuição do peso corporal na lactação (BORDERS *et al.*, 1985 *apud* FAO/WHO 2004; GOETZ *et al.*, 2007). Esses resultados contraditórios mostram que a exposição materna ao PROP em doses elevadas pode levar a efeitos da toxicidade observada pela redução de peso na prole. No entanto, no presente estudo, o aumento de peso corporal da prole masculina, observado a partir do DPN 12, desapareceu após o desmame. Esse fato pode indicar alterações nas vias de metabolismo relacionadas a idade e sexo-dependente, entretanto fica a necessidade de mais estudos nessa área para tal comprovação.

Além da avaliação de peso corpóreo durante o período perinatal, é importante avaliar os reflexos ontogênicos, pois a exposição a qualquer substância química durante o desenvolvimento pode apresentar alguns efeitos não específicos (como alterações no hormônio materno, hipóxia e alterações nutricionais) que também podem ter um impacto no sistema nervoso da prole (SPEAR, 1990). Além disso, essa avaliação permite identificar possíveis alterações neurocomportamentais no início da vida do animal. Neste trabalho, o PROP não alterou os reflexos

comportamentais em machos e fêmeas no período lactacional, indicando que o PROP não teve influência no desenvolvimento do sistema nervoso desses animais.

Com o objetivo de investigar se o PROP poderia alterar parâmetros histomofométricos nas gônadas e identificar em qual período essas alterações já estariam presentes, o presente estudo avaliou esses parâmetros em dois momentos, infância e vida adulta. No primeiro momento (DPN 21), a exposição ao PROP não alterou a histologia de útero e ovários, em ambas as gerações. Não há dados disponíveis na literatura sobre esse parâmetro nas gônadas femininas nessa idade para comparações, entretanto os achados neste trabalho indicam que esses órgãos não foram alvos desse fungicida nessa fase do desenvolvimento. Assim como nas fêmeas, o PROP não alterou a histologia testicular. Corroborando esse resultado, dados da literatura mostram que a exposição materna aos compostos azóis (PROP, epoxiconazol e tebuconazol), também não causa alterações histológicas testiculares em ratos (JACOBSEN *et al.*, 2012; GOETZ *et al.*, 2007), sugerindo que, na infância, o PROP não causa danos nesse órgão de roedores.

As concentrações hormonais de testosterona também foram avaliadas em dois períodos a fim de acompanhar possíveis alterações. Embora não tenha causado comprometimento testicular, a exposição ao PROP na dose de 4 mg/kg diminuiu a concentração de testosterona plasmática, em ambas as gerações, F1 e F2, no DPN 21. Em outros trabalhos, a exposição materna ao PROP, em doses superiores, não alterou esse hormônio tanto nos testículos no nascimento (TAXVIG *et al.*, 2008), quanto no plasma, no DPN 50 (GOETZ *et al.*, 2007). Contudo, outros estudos mostraram que ratos tratados por gavagem com PROP, em diferentes doses (10, 75, 150 e 300 mg/kg/dia), apresentaram um aumento nas concentrações de testosterona plasmática após 1 dia de tratamento (MARTIN *et al.*, 2007), diminuíram após 3 dias de tratamento (GOETZ, 2007; MARTIN *et al.*, 2007) e não tiveram alterações depois de 14 dias de tratamento (TULLY *et al.*, 2006). Isso demonstra que o tratamento com esse fungicida pode causar alterações, que são período e dose-dependente, mas que as concentrações deste hormônio podem retornar a valores fisiológicos com tratamentos prolongados. Sabe-se que o PROP é capaz de induzir a atividade de enzimas hepáticas, como a CYP1A2, CYP2B e CYP3A (SUN *et al.*, 2005), e que um dos mecanismos de ação desse fungicida é a alteração da homeostase de testosterona, principalmente pela indução da CYP2B2 responsável pela catalisação da oxidação de testosterona (GOETZ & DIX, 2009). Entretanto,

essas enzimas exibem diferenças ontogênicas, tanto a CYP1A, quanto a CYP2B apresentam baixa atividade entre DPN 5 e 10, com pico de atividade no DPN 26 para CYP1A, e para CYP2B no DPN 15 (McPHAIL *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2005). Os períodos pré-natal e perinatal são fases vulneráveis à exposição ao DEs, e estudos já demonstraram que o PROP pode ser encontrado no líquido amniótico (BOSSI *et al.*, 2013) e no leite materno (FAO/WHO, 2004) após exposição a esse fungicida. Ou seja, a exposição a um DEs, como o PROP, somada à imaturidade enzimática nos animais pré-púberes pode ter alterado o metabolismo da testosterona no fígado, contribuindo para a diminuição da concentração plasmática desse hormônio durante essa fase do desenvolvimento. Essa alteração hormonal não causou alteração histológica nos tecidos. Embora o PROP cause mudanças na expressão genética de alguns genes testiculares (GOETZ & DIX, 2009), esse resultado reforça que o testículo não é um tecido alvo desse fungicida. A geração F2 só foi acompanhada até o DPN 21, então alterações hormonais e de órgãos hormônio-dependentes em outras fases do desenvolvimento não podem ser afirmadas nem descartadas.

Passada a infância, a puberdade inicia-se no sistema nervoso central, com a liberação pulsátil das gonadotropinas para posterior estímulo da produção dos hormônios esteroides (OJEDA & SKINNER, 2006). Em machos, a progressão da puberdade pode ser avaliada pela separação prepucial sendo testosterona-dependente e indica o início da ativação do eixo reprodutivo nesses animais (SCHNEIDER, 2013). No presente trabalho, o PROP não alterou a instalação da puberdade nos machos da geração F1, assim como o peso corporal no dia dessa avaliação. Esse resultado pode sugerir uma normalização da concentração hormonal, como explicado anteriormente, e esses achados são similares ao estudo de Goetz e colaboradores (2007), em que não houve alteração da separação prepucial em machos expostos e tratados com PROP. Em fêmeas, a progressão da puberdade pode ser avaliada pela canalização da vagina, que normalmente é imperfurada antes da puberdade e depois se torna patente como consequência da estimulação estrogênica, além da ocorrência da primeira ovulação (OJEDA & SKINNER, 2006). Neste estudo, o PROP também não alterou a instalação da puberdade nas fêmeas da geração F1, pois não alterou a abertura vaginal nem o primeiro estro desses animais, assim como o peso corporal no dia da abertura vaginal. Resultados similares foram encontrados por Rockett e colaboradores (2006), em que o PROP não prejudicou a abertura vaginal, assim

como o peso corporal das fêmeas no dia da abertura vaginal. Pelo fato de não haver interferência na instalação da puberdade somada com os resultados do teste uterotrófico, sugere-se a integridade do eixo HHG nesse período.

Para avaliação da toxicidade de qualquer substância no sistema reprodutor, é importante a determinação do peso dos órgãos hormônio-dependentes. Na fase adulta, os machos da geração F1 apresentaram diminuição do peso do ducto deferente no grupo PROP 4. Esse órgão é derivado embrionariamente do ducto de Wolff sendo uma extensão do epidídimo com uma organização diferente. Ele não é enrolado, mas tem um epitélio extensivamente convoluto e várias camadas de músculo liso (PLANT & ZELEZNIK, 2015). É um órgão importante para a fertilidade masculina, uma vez que regula o transporte de espermatozoides do epidídimo e está envolvido na sequência de eventos do reflexo ejaculatório (DE ALMEIDA KIGUTI & PUPO, 2012). Duas hipóteses podem ser sugeridas para a diminuição do peso do ducto deferente. A primeira hipótese seria alterações no desenvolvimento do ducto, pois a baixa concentração plasmática de testosterona encontrada na fase lactacional, que também poderia estar presente na fase intrauterina, pode ter ocasionado uma falha dos ductos para se alongar durante o desenvolvimento, pois concentrações adequadas dos hormônios esteroides são necessários para o desenvolvimento, peso e a função das glândulas acessórias (CAMPION *et al.*, 2012; OJEDA & SKINNER, 2006). Além disso, demonstrou-se que o PROP altera a expressão, no testículo, do gene implicado com o metabolismo do retinol (GOETZ & DIX, 2009). O ácido retinoico está envolvido com o desenvolvimento do ducto de Wolf e mutações nos seus receptores podem culminar em agenesia do ducto deferente, epidídimo e vesícula seminal (HANNEMA & HUGHES, 2007). O ducto deferente é constituído por um revestimento epitelial e uma camada espessa de músculo liso com forte capacidade de contração para facilitar a ejaculação (ZHOU *et al.*, 2007). Acredita-se que, em ratos, a morfologia do músculo do ducto está completamente formada no DPN 35 (BURNSTOCK, 2014). Sendo assim, a outra hipótese seria a hipotrofia da camada muscular lisa, pois estudos demonstraram que o PROP, no testículo, altera a expressão genética de genes envolvidos com o metabolismo dos ácidos graxos e diminui a transcrição genética do receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (GOETZ & DIX, 2009), que está envolvido com o metabolismo de cálcio, ou seja, componentes que são necessários na contração muscular. Além disso, outros fungicidas azóis, como ciproconazol e

tebuconazol, inibem o influxo de cálcio pelos dos canais de cálcio voltagem-dependentes (HEUSINKVELD *et al.*, 2013), sugerindo possível comprometimento na contração da fibra muscular lisa. Entretanto, o resultado encontrado neste trabalho indica uma diferença de peso, não sendo possível afirmar se houve diminuição do diâmetro do tubo, ou até mesmo alterações histológicas como diminuição das camadas celulares.

O peso de outros órgãos, como testículo, próstata e vesícula seminal, não foi alterado, assim como não houve alteração na concentração plasmática de testosterona e estradiol, bem como alterações testiculares na idade adulta. No trabalho de Goetz e colaboradores (2007), ratos expostos intraútero e via ingesta de ração também não apresentaram diferença no peso desses órgãos na idade adulta (DPN 92), entretanto esse autor encontrou aumento na concentração plasmática de testosterona nos machos tratados com PROP 500 e 2500 ppm. Em nosso laboratório, um estudo prévio demonstrou que o tratamento de machos (geração P) com PROP (DPN 50-120) leva a um aumento no peso da vesícula seminal (cheia/vazia), no ducto deferente, anormalidades espermáticas, assim como diminuição na concentração plasmática de estradiol na dose de 4mg/kg/dia (COSTA *et al.*, 2015). Esses resultados divergentes encontrados no ducto deferente demonstram a necessidade de uma investigação mais profunda através de estudos histológicos, moleculares e farmacológicos. Além disso, a alteração no peso desse órgão não prejudicou a função reprodutiva desses animais, uma vez que não foram encontradas alterações nos parâmetros espermáticos.

Em relação às fêmeas, o PROP não alterou o peso e parâmetros histológicos de órgãos hormônio-dependentes, assim como as concentrações plasmáticas de estradiol na idade adulta. Resultados similares foram encontrados em fêmeas expostas e tratadas com PROP em doses mais elevadas (ROCKETT *et al.*, 2006). Esses resultados reforçam que útero e ovário também não são órgãos influenciados pela exposição ao PROP na idade adulta.

Por outro lado, as fêmeas expostas e tratadas com PROP na dose de 20mg/kg/dia apresentaram aumento no peso do fígado. Estudos prévios demonstraram que o fígado é um órgão alvo desse fungicida e que a exposição/tratamento com PROP induz a expressão de genes e receptores responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos e a *clearance* hepática (GOETZ *et al.*, 2007; ROCKETT *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2005; TULLY *et al.*, 2006). Dados na

literatura mostram que fêmeas expostas e tratadas a altas doses de PROP (~144,9-412,8) apresentaram o mesmo resultado que este trabalho (ROCKETT *et al.*, 2006). Estudos com ratos tratados nas doses que variaram de 75 a 326 mg/kg/dia também constataram aumento no peso do fígado (GOETZ *et al.*, 2007; TULLY *et al.*, 2006). Porém, no presente estudo, não foi encontrada essa alteração nos machos. Esse resultado não exclui um possível efeito no fígado também nos machos, uma vez que foi demonstrado que, mesmo em doses mais baixas (10 mg/kg/dia), é possível identificar hipertrofia celular sem alterações no peso (TULLY *et al.*, 2006).

Com relação ao comportamento sexual, o tratamento com PROP não afetou esse parâmetro nos grupos de machos avaliados na geração F1. A motivação sexual e a atividade copuladora são reguladas por neurotransmissores e hormônios gonadais, particularmente a testosterona (CANTERAS, 2011; HULL & DOMINGUEZ, 2006). Embora os resultados prévios do nosso laboratório tenham demonstrado comprometimento no comportamento sexual masculino da geração P na dose de 20 mg/kg/dia (COSTA *et al.*, 2015), a ausência de alteração comportamental, observada no presente estudo, pode estar relacionada ao não comprometimento hormonal nessa fase. A diferença de resultados encontrados pode ser explicada pelo período de exposição. No primeiro estudo (COSTA *et al.*, 2015), o tratamento começou no período da puberdade. Em ratos, esse período vai do DPN 40 até o DPN 60, quando a maturidade sexual é atingida, começando pelo aumento da secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotropina no hipotálamo, resultando na secreção de hormônios esteroides e maturação gonadal (SCHNEIDER, 2013). São necessários eventos hormonais complexos para iniciar a puberdade e a transição para a maturidade sexual, de modo que esse estágio de desenvolvimento pode ser muito suscetível a alterações causadas pelos DEs (CAMPION *et al.*, 2012), como os pesticidas, podendo influenciar o processo de maturação sexual e puberdade (OJEDA & SKINNER, 2006). De acordo com a teoria sobre “origens do desenvolvimento da saúde e da doença”, há períodos importantes de desenvolvimento, como a concepção, desenvolvimento intrauterino, pós-natal e desenvolvimento puberal, e características adaptativas são benéficas para a saúde do indivíduo. No entanto, surgem exceções quando um indivíduo em desenvolvimento está adaptado a um ambiente e é exposto a um ambiente contraditório, como a introdução de novos químicos, podendo aumentar o risco de desenvolver doenças posteriormente (HO *et al.*, 2016). Os animais da geração F1

foram expostos em todas essas janelas de tempo, e, após o desmame, foram tratados com PROP via gavagem, portanto acredita-se que a exposição contínua da infância à idade adulta poderia ter resultado em uma adaptação a essa nova condição. No período escolhido por Costa e colaboradores (2015) ainda ocorre uma fase de crescimento, reorganização estrutural e celular dos tecidos reprodutivos, regulados em grande parte por hormônios esteroides (HO *et al.*, 2016). Assim, esse animal, que estava adaptado a um ambiente sem exposição, foi exposto ao PROP, aumentando a chance de desenvolver as alterações vistas na idade adulta.

Nas fêmeas, o comportamento sexual está intimamente relacionado ao ciclo estral, pois, durante o ciclo, a secreção ovariana de estradiol seguida de progesterona resulta em um período de comportamento sexual fortemente ligado à ovulação, sendo o comportamento sexual programado para o período pré-ovulatório (PLANT & ZELEZNIK, 2015). O ciclo estral em ratas adultas é de 4-5 dias, sendo as mudanças no ciclo divididas em três ou quatro estágios, dependendo do investigador: estro, metaestro, diestro e proestro. O proestro é caracterizado por concentrações crescentes do hormônio folículo-estimulante (FSH) que estimula a produção de estrogênio e progesterona dos folículos ovarianos. À medida que o folículo cresce, as proporções desses esteroides mudam para produzir uma predominância de estrogênio, que então desencadeia um aumento do hormônio luteinizante (LH). A ovulação ocorre cerca de 12 horas após o aumento de LH. A fêmea é receptiva ao acasalamento durante o proestro tardio e estro precoce, pois essas alterações hormonais aprontam os circuitos neurais necessários para resposta sexual (CORA *et al.*, 2015; GOLDMAN *et al.*, 2007; LI & DAVIS, 2007; PLANT & ZELEZNIK, 2015). Além de estrógeno e progesterona, a testosterona também é alta durante a fase de proestro (RUSH & BLAKE, 1982) e, junto com estrógeno, contribui para facilitar o desejo sexual e o comportamento sexual nessa fase (PLANT & ZELEZNIK, 2015), em que alterações nas concentrações de testosterona podem influenciar a receptividade das ratas (FRYE, 2001; PLANT & ZELEZNIK, 2015) e o padrão cíclico do ciclo estral (McDONALD & DOUGHTY, 1972; NASS *et al.*, 1984). Neste trabalho, o PROP não alterou a regularidade do ciclo estral, entretanto as ratas no grupo exposto/tratado com 4 mg/kg/dia apresentaram diminuição dos dias em proestro. Alteração no ciclo estral foi encontrada em ratas púberes expostas e tratadas com doses de 500 e 2500 ppm (31,9-412,8 mg/kg/dia) de PROP, porém essa variação só ocorreu durante 1-2 semanas após a abertura

vaginal, normalizando depois de 9-10 semanas (ROCKETT *et al.*, 2006). Além da alteração na fase de proestro, no presente estudo, as fêmeas expostas/tratadas com 4 e 20 mg/kg/dia de PROP apresentaram aumento da lordose grau 2 e diminuição da lordose grau 3. Como o ciclo estral e o comportamento sexual estão relacionados, esses resultados podem indicar alterações na homeostase dos hormônios esteroides, como estradiol, progesterona ou testosterona (FRYE, 2001; PLANT & ZELEZNIK, 2015). No entanto, essas ratas não apresentaram alterações na concentração de estradiol. Em relação à progesterona, fêmeas prenhes tratadas com 50 mg/kg/dia de PROP apresentaram aumento nas concentrações de 17- α hydroxyprogesterona, um subproduto da progesterona, sugerindo uma alteração na enzima que está envolvida na síntese de hormônios esteroides. Contudo, essas fêmeas estavam no final do período gestacional, o que demanda uma alteração metabólica e hormonal muito diferente das ratas neste estudo dificultando comparações. Embora não tenha sido dosada testosterona nas fêmeas e não haja disponível na literatura outros estudos para comparação, Goetz e Dix (2009) demonstraram que o PROP altera no fígado vias metabólicas de andrógenos e estrógenos, de lipídeos, como ácidos graxos e o transporte de lipídeos. No presente trabalho, o fígado das ratas teve aumento de peso, indicando que esse órgão foi alvo desse fungicida, podendo ter alterado a homeostase de alguns hormônios derivados do colesterol. Como nas ratas os hormônios ovarianos exercem um papel importante na regulação do ciclo e do comportamento sexual (GRAY & GORZALKA, 1979), esses resultados comprometidos não prejudicaram o desempenho sexual desses animais e nenhuma rata apresentou problemas de fertilidade.

A avaliação da toxicidade materna é fundamental em estudos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, em que os principais indicadores não invasivos são o ganho de peso corporal e o consumo de ração. Ratas tratadas via ingesta de ração com 2500 ppm de PROP (~144,9-412,8) apresentaram diminuição na ingesta de ração com 2 semanas de prenhez (ROCKETT *et al.*, 2006), entretanto esse resultado pode estar relacionado tanto com a toxicidade nessa dose quanto ao gosto ou cheiro da ração a que foi incorporado o fungicida. Neste trabalho, o tratamento com PROP não alterou esses indicadores, assim como não houve outros sinais, como piloereção, lacrimejamento ou alteração do padrão respiratório, durante a prenhez e lactação das ratas da geração F1, indicando que, em ambas as doses, esse fungicida não foi tóxico para esses animais.

O comportamento materno é um comportamento reprodutivo controlado por vias neurais, relacionado com neurotransmissores e regiões cerebrais específicas (NUMAN *et al.*, 2006), assim como vias hormonais, com envolvimento de vários hormônios, como prolactina (PLANT & ZELEZNIK, 2015), ocitocina (KIM & STRATHEARN, 2016) e os hormônios esteroides, entre eles testosterona, progesterona e estrógeno (STOLZENBERG & NUMAN, 2011). Como alguns estudos sugerem que o PROP altera a esteroidegênese (GOETZ *et al.*, 2009; KJAERSTAD *et al.*, 2007), e que o comportamento materno pode alterar o desenvolvimento da prole, a observação maternal também foi incluída neste estudo. Entretanto, a exposição e o tratamento com PROP não foram capazes de alterar o comportamento materno nas fêmeas da geração F1, sugerindo que esse fungicida não altera as vias neurológicas nem hormonais envolvidas nesse comportamento.

Neste trabalho, a exposição via células germinativas, intraútero, lactacional e o tratamento por gavagem com PROP demonstraram alterar parâmetros reprodutivos de machos e fêmeas, porém, como o aspecto temporal do sistema reprodutivo difere entre sexos, essas alterações foram em momentos distintos do desenvolvimento. Embora estudos *in vitro* demonstrassem que o PROP tem potencial para inibir a aromatase (KJELDSEN *et al.*, 2013; TRÖSKEN *et al.*, 2006; SANDERSON *et al.*, 2002; VINGGAARD *et al.*, 2000) e a esteroidegênese (GOETZ *et al.*, 2009; KJAERSTAD *et al.*, 2007), estudos *in vivo* ainda são necessários para garantir mais evidências sobre os efeitos na (anti) estrogenicidade e (anti) androgenicidade, e quais enzimas da CYP são afetadas por esse fungicida, correlacionando dose, período e tempo de exposição.

6 CONCLUSÃO

O uso de pesticidas ainda é importante para garantir a produção alimentícia do país, assegurando a quantidade e qualidade do alimento que chega à mesa da população. Porém, também se faz necessário que os indivíduos não fiquem expostos a outros riscos derivados do uso extensivo dessas substâncias, como as alterações no sistema endócrino.

Através dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que o propiconazol não apresenta atividade (anti) estrogênica ou (anti) androgênia demonstrado pelos testes agudos, uterotrófico e Hershberger. Entretanto, seus efeitos em longo prazo na função reprodutiva de duas gerações de ratos causaram alterações hormonais nos machos pré-púberes, de ambas as gerações, e alteração no peso do ducto deferente nos machos adultos, sem causar alterações na função dos órgãos reprodutivos. Nas fêmeas, essa exposição causou alterações no comportamento sexual e no ciclo estral da geração F1, mas também sem causar alterações funcionais. Conclui-se que a exposição e o tratamento crônico com esse fungicida, em ratos, podem apresentar efeitos de um desregulador endócrino.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA BRASIL (ANVISA). Ministério da Saúde, 2003. **Consulta Pública nº 48, de 22 de maio de 2003**. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[4712-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[4712-1-0].PDF). Acessado em 10 de novembro de 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA BRASIL (ANVISA); UFPR, 2012. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. Brasília: ANVISA. <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acessado em 15 de setembro de 2015.

AGMO, A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 1, p. 55–68, 2003.

ATTAL, J.; COUROT, M. Development testiculaire et etablissement de la spermatogenese chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 3, n. 3, p. 219–41, 1963.

BACCHI, A.D.; PONTE, B.; VIEIRA, M.L.; DE PAULA, J.C.C., et al. Developmental exposure to *Passiflora incarnata* induces behavioral alterations in the male progeny. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, n. 5, p. 782-9, 2013.

BEACH, F. A. Prolonged hormone deprivation and pretest cage adaptation as factors affecting the display of lordosis by female rats. **Physiology and Behavior**, v. 16, n. 6, p. 807–8, 1976.

BOSSI, R.; VINGGAARD, A.M.; TAXVIG, C. *et al.* Levels of pesticides and their metabolites in Wistar rat amniotic fluids and maternal urine upon gestational exposure. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 6, p. 2271-81, 2013.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. **Purinergic Signalling**, v. 10, p. 157–87, 2014.

CAMARGO, I. C. C.; GÊNOMA T. C.; MACHADO, M. C. P. *et al.* Administração experimental de esteróide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfométricas nos ovários e útero de ratas adultas. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 4, p. 656-5, 2011.

CAMPION, S.; CATLIN, N.; HEGER, N. *et al.* Male reprotoxicity and endocrine disruption. **EXS**, v.101, p.315-60, 2012.

CANTERAS, N. Hypotalamic Goal-directed Behavior-Ingestive, Reproductive and Defensive. In: Watson, C. *et al.* (Eds). **The Mouse Nervous System**. USA: Academic Press, 2011. p. 538-61,

CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R.M. *et al.* Parte 1 -Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A. *et al.* Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v.79, p.359-371, 2003

CLH report Proposal for Harmonised Classification and Labelling. Based on Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation), Annex VI, Part 2. Substance Name: Propiconazole. Finnish Competent Authority.Finnish Safety and Chemicals Agency (Tukes).Finlândia, 2015.

CONOLLY, R.B.; LUTZ, W.K. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. **Toxicological Sciences**. v. 77, p. 151-7, 2004.

COOPER, J.; DOBSON H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v.26, p.1337-1348, 2007.

CORA ,M.C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Aginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, v. 43, p. 776-93, 2015.

COSTA, N.O.; VIEIRA, M.L.; SGARIONI, V. *et al.* Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. **Toxicology**, v.335, p. 55-61, 2015.

DE ALMEIDA KIGUTI, L.R.; PUPO, A.S. Investigation of the effects of alpha1 adrenoceptor antagonism and L-type calcium channel blockade on ejaculation and vas deferens and seminal vesicle contractility in vitro. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n.1, p. 159–68, 2012.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens wahrend der postnatalen entwicklug. **Monaths Veterinary Medicine**, v. 29, p. 650–2, 1974.

ENVIRONMENT DIRECTORATE JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY (ENV/JM/MONO, 2010). **Workshop Report on OECD Countries Activities Regarding Testing, Assessment and Management of Endocrine Disrupters**. OECD Environment, Health and Safety Publications, Copenhagen, 2009.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Propiconazole SANCO/3049/99**. Reino Unido, 2003.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Pesticide residues in food : 2004 : toxicological evaluations: part II. **Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group**. Rome, 2004.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization), 1988. Propiconazole. **Pesticide Residues in Food –1987 Evaluations. Part II – Toxicology**. FAO Plant Production and Protection Paper, 86, 2, 111–129..

FELICIO, L.F.; NASCELLO, A.G. Effect of acute bromo pride treatment on rat prolactin levels and sexual behavior. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.22, n. 8, p, 1011-14, 1989.

FERNANDES, G.S.A.; ARENA, A.C.; FERNANDEZ, C.D. *et al.* Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n.1, p. 106–12, 2007.

FILLER, R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: Chapin, R.E., Heindel, J.H. (Eds.), **Male Reproductive Toxicology**. San Diego: Academic Press, 1993, pp. 334–43.

FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium, cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p.1554–61, 2003.

FRIEDMAN, K. P.; PAPINENI, S.; MARTY, M. S. *et al.* A predictive data-driven framework for endocrine prioritization: a triazole fungicide case study. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 785–833, 2016.

FRIEDRICH, K. Desafios para avaliação toxicológica no Brasil: desregulação endócrina e imunotoxicidade. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.1, n. 2, p. 2-15, 2013.

FRYE, C. A. The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. **Brain Research Reviews**, v. 37, p. 201–22, 2001.

GALLAVAN, R.H.J.R.; HOLSON, J.F.; STUMP, D.G. *et al.* Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v.13, n.5, p. 383-90, 1999.

GEORGESCU, M.; PFAUS, J. G. Role of glutamate receptors in the ventromedial hypothalamus in the regulation of female rat sexual behaviors I. Behavioral effects of glutamate and its selective receptor agonists AMPA, NMDA and kainite. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 322–32, 2006.

GERARDIN, D.C.C.; BERNARDI, M.M.; MOREIRA, E.G. *et al.* Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 618–23, 2006.

GIAVINI, E.; MEN'EGOLA, E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? **Toxicology Letters**, v. 198, n.2, p. 106-11, 2010.

GOETZ, A. K. **Toxicogenomic study of triazole antifungal modes of action. Dissertation.** 2007. 188 f. Tese (Doutorado em Filosofia), Faculdade de Pós-Graduação da Universidade da Carolina do Norte, Raleigh, 2007.

GOETZ, A. K.; DIX, D. J. Mode of Action for Reproductive and Hepatic Toxicity Inferred from a Genomic Study of Triazole Antifungals. **Toxicological Sciences**, v. 110, n.2, p. 449–62, 2009.

GOETZ, A.K., REN, H., SCMID, J.E. *et al.* Disruption of Testosterone Homeostasis as a Mode of Action for the Reproductive Toxicity of Triazole Fungicides in the Male Rat. **Toxicology Science**, v.95, n.1, p. 227-39, 2007.

GOETZ, A.K., ROCKETT, J.C., REN, H. *et al.* Inhibition of rat and human steroidogenesis by triazole antifungals. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 55, n.5-6, p. 214-26, 2009.

GOLAN, D. Princípios de farmacologia : a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research*, v. part B, n. 80, p. 84–97, 2007.

GRAY, D. S.; GORZALKA, B. B. Adrenal steroid interactions in female sexual behavior : a review. ***Psychoneuroendocrinology***, v. 5, p. 157-75, 1979.

HANNEMA, S. E; HUGHES, I. A. Regulation of Wolffian Duct Development. ***Hormone Research***, v. 67, p.142–51, 2007.

HARDY, D. F.; DEBOLD, J. F. Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. ***Physiology & Behavior***, v. 7, p. 643-645, 1971.

HEUSINKVELD, H.J; MOLENDIJK, J.; VAN DEN BERG, M. et al. Azole fungicides disturb intracellular Ca²⁺ in an additive manner in dopaminergic PC12 cells. ***Toxicological Sciences***, v. 134, n. 2, p. 374–81, 2013.

HO. S.M.; CHEONG, A.; ADGENT, M.A. *et al.* Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. ***Reproductive Toxicology in press***, 2016.

HULL, E.M.; DOMINGUEZ, J.M. Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. ***Brain Research***, v. 1126, p. 66–75, 2006.

JACOBSEN, P. R.; AXELSTAD, M.; BOBERG, J. *et al.* Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. ***Reproductive Toxicology***, v. 34, p 237–50, 2012.

JOHNSON, A.M. Analysis of animal weight gains in chronic toxicity studies. ***Journal of Toxicology and Environmental Health***. v. 7, p. 307–16, 1981.

KIM, S.; STRATHEARN, L. Oxytocin and Maternal Brain Plasticity. ***New Directions for Child and Adolescent Development***, n. 153, p. 59-72, 2016.

KJAERSTAD, M.B.; ANDERSEN, H.R.; TAXVIG, C., *et al.* Effects of azole fungicides on the function of sex and thyroid hormones. **Pesticides Research** **111**. Danish Ministry of the Environment, Environmental Protection Agency. Copenhagen, 2007.

KJAERSTAD, M.B.; TAXVIG, C.; NELLEMAN, C. *et al.* Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. **Reproductive Toxicology**, v. 30, p. 573–82, 2010.

KJELDSEN, L.S.; GHISARI, M.; BONEFELD-JØRGENSEN, E.C. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n.2, p. 453-64, 2013.

KOJIMA, H.; KATSURA, E.; TAKEUCHI, S. *et al.* 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, n. 5, p. 524-31, 2004.

LI, S.; DAVIS, B. Evaluating Rodent Vaginal and Uterine Histology in Toxicity Studies. **Birth Defects Research**, v. part B, n. 80, p. 246–52, 2007.

MARTIN, M.T., BRENNAN, R.J., HU, W. *et al.* Toxicogenomic Study of Triazole Fungicides and Perfluoroalkyl Acids in Rat Livers Predicts Toxicity and Categorizes Chemicals Based on Mechanisms of Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 97, n.2, p. 595-613, 2007.

McDONALD, P. G.; DOUGHTY, C. Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, n. 1, p. 55-62, 1972.

McPHAIL, B; MURALIDHARA, S; ANAND, S. *et al.* Maturation of hepatic cytochrome P450 isozymes in developing Sprague-Dawley rats. **Toxicologist**, v. 84, p. 195, 2005.

McKINLAY, R.; PLANT, J.A.; BELL, J.N. *et al.* Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. **Environment International**, v.34, p. 168-83, 2008.

MNIF, W., HASSINE, A.I., BOUAZIZ, A. *et al.* Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 2265-303, 2011.

NASS, T. E.; MATT, D. W.; JUDD, H. L. *et al.* Prepubertal Treatment with Estrogen or Testosterone Precipitates the Loss of Regular Estrous Cyclicity and Normal Gonadotropin Secretion in Adult Female Rats. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 723-31, 1984.

NELSON, D. R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T. *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, p.1-42, 1996.

NUMAN, M.; FLEMING, A.S.; LEVY, F. Maternal behavior. In: Neil JD (Ed). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3 ed. USA: Elsevier, 2006. p. 1921–93.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the rat. In: Neil JD (Ed). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3 ed. USA: Elsevier, 2006. p. 2061-2126.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). **Guidelines for Testing of Chemicals No. 416: Two-generation Reproduction Toxicity Study**. Paris. 2001.

PAREDES, R. G.; VAZQUEZ, B. What do female rats like about sex? Paced mating. **Behavioural Brain Research**, v. 105, p. 117–27, 1999.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, n. 3, p. 555-7, 1968.

PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Ed). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 4 ed. Londres: Academic Press, 2015. p. 2550.

RAMIREZ, O. A.; CARRER, H. F.; NASELLO, A. G. Prenatal amphetamine exposure: ovulation, sexual behavior and hypothalamic monoamine content in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 11, n. 6, p. 605–9, 1979.

RAUCY, J.L; CARPENTER, S.J; TRZASKOS, J.M. Identification of lanosterol 14 alpha-methyl demethylase in human tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.177, p. 497–503, 1991.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 54, p. 103–7, 1978.

ROCKETT, J.C.; NAROTSKY, M.G.; THOMPSON, K.E. *et al.* Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 647-58, 2006.

RUSH, M. E.; BLAKE, C.A. Serum Testosterone Concentrations during the 4-Day Estrous Cycle in Normal and Adrenalectomized Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 169, p. 216-21, 1982.

SANDERSON, J.T.; BOERMA, J.; LANSBERGEN, G.W. *et al.* Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.182, n. 1, p. 44-54, 2002.

SCHNEIDER, M. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. **Cell and Tissue Research**, v. 354, n.1, p. 99-106, 2013.

SEED, J.; CHAPI, R.E.; CLEGG, E.D. *et al.* Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in therat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 237-44. 1996.

SILVERTHORN, Dee U. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 992 p.

SKOLNESS, S.Y., BLANKSMA, C.A.; CAVALLIN, J.E. *et al.* Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicological Sciences**, v. 132, n.2, p. 284-97, 2013.

SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

SPEAR, L. P. Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 12, p. 489-95, 1990.

STOLZENBERG, D. S.; NUMAN, M. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 826-47, 2011.

SUN, G.; THAI, S.F.; TULLY, D.B. *et al.* Propiconazole-induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver. **Toxicology Letters**, v. 155, p. 277–87, 2005.

TAXVIG, C., HADRUP, N., BOBERG, J. *et al.* In vitro-in vivo correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 757-66, 2013.

TAXVIG, C., VINGGAARD, A.M., HASS, U. *et al.* Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 170-7, 2008.

TAXVIG, C.; HASS, U.; AXELSTAD, M. *et al.* Endocrine-Disrupting Activities In Vivo of the Fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole. **Toxicological Sciences**, v. 100, n.2, p. 464-73, 2007.

TRÖSKEN, E. R., FISCHER, K., VÖLKEL, W., LUTZ, W. K. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC–MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. **Toxicology**, v. 219, n. 1-3, p. 33-40, 2006.

TULLY, D.B.; BAO, W.; GOETZ, A.K. *et al.* Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 215, n.3, p. 260-73, 2006.

US Environmental Protection Agency (US EPA). **Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OCSPP 890.1400: Hershberger Assay**. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC 2011 a.

US Environmental Protection Agency (US EPA). **Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1600: Uterotrophic Assay**. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC., 2009.

U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). **Endocrine Screening Program (EDSP): weight of evidence analysis of potential interaction with estrogen, androgen or thyroid pathways**. Chemical: Propiconazole. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington, DC., 2015.

U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). **Label Review Manual, Chapter 2: What Is a Pesticide?** Washington, DC., 2014.

U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). **Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis**. Office of Research and Development. Washington, DC. , 1997.

US Environmental Protection Agency (US EPA). **Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates**. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. Washington, DC. , 2011 b.

VANDENBERG, L.N.; COLBORN, T.; HAYES, T.B. *et al.* Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 3, p. 378-455, 2012.

VINGGAARD, A.M.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V. *et al.* Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n.3, p. 227-34, 2000.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme On Chemical Safety), 2005. **Chemical-specific Adjustment Factors for Interspecies Differences and Human Variability: Guidance Document for Use of Data in Dose/Concentration–response Assessment**. IPCS Harmonization Project Document No. 2. Geneva, 2005

WHO/UENP (World Health Organization/ United Nations Environment Programme). **State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals**. Geneva, 2012.

ZARN, J.A.; BRUSCHWEILER, B. J.; SCHLATTER, J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n.3, p. 255-61, 2003.

ZHOU, W.L.; ZUO, W.L.; RUAN, Y.C. The role of extracellular ATP in the male reproductive tract. **Acta Physiologica Sinica**, v. 59, n.4, p. 487-94, 2007.

ANEXO A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 171/2013

Londrina, 27 de Setembro de 2013.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 20 de Agosto de 2013 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da toxicidade reprodutiva e possíveis efeitos hormonais do fungicida propiconazol em duas gerações de ratos", processo CEUA, n° 19726.2013.45, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas de sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 85 ratos Wistar, com 75 dias de vida, sendo 35 machos e 50 fêmeas provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo investigar se o propiconazol apresenta atividade (anti)estrogênica ou (anti)androgênica através dos testes uterotrófico e de Hershberger, e investigar se a exposição crônica ao propiconazol em duas gerações de ratos pode causar alterações na puberdade, nos níveis de hormônios, comportamento sexual e fertilidade dos animais. Para isto, os animais serão acasalados para obtenção da geração parenteral. No dia 21 pós-natal os filhotes serão desmamados e a geração parenteral receberá o tratamento, sendo que os machos serão tratados entre os dias 50 e 120 e as fêmeas entre os dias 50 e 90. Os filhotes machos da geração F1 serão tratados a partir do desmame DPN21 até o dia 120, e as fêmeas serão tratadas do DPN 21 até o dia DL21, ocasião qual ocorrerá o desmame da geração F2. As fêmeas serão avaliadas quanto ao acompanhamento do ciclo estral, concentração plasmática de estrógeno, análise dos órgãos reprodutivos, avaliação do comportamento sexual e análise de fertilidade. Os machos serão avaliados quanto ao comportamento copulatório, preferência sexual, concentração plasmática de testosterona, peso corporal e peso úmido dos órgãos, análise de viabilidade espermática, análise da morfologia dos espermatozoides, análise histomorfométrica do testículo, processamento do material para análise histológica e contagem espermática. Também será avaliada a atividade estrogênica e androgênica em ratos machos e fêmeas pré-púberes pelo teste uterotrófico e de Hershberger após tratamento com propiconazol. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 36 meses após aprovação.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Waldiceu Ap. Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardini

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas e Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério do Centro da UEL).