



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATHÁLIA ORLANDINI COSTA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO  
FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS**

---

Londrina  
2015

NATHÁLIA ORLANDINI COSTA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO  
FUNGICIDA PROPICONAZOL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela C. C. Gerardin

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C837a Costa, Nathália Orlandini.

Avaliação da toxicidade reprodutiva do fungicida Propiconazol em ratos /  
Nathália Orlandini Costa. – Londrina, 2015.

67 f. : il.

Orientador: Daniela Cristina Ceccatto Gerardin.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução humana – Efeito dos produtos químicos – Teses. 2. Fungicidas –  
Toxicologia – Teses. 3. Desreguladores endócrinos – Teses. 4. Rato como animal de  
laboratório – Teses. I. Gerardin, Daniela Cristina Ceccatto. II. Universidade Estadual  
de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 612.6:632.95

NATHÁLIA ORLANDINI COSTA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO FUNGICIDA  
PROPICONAZOL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela C. Ceccatto  
Gerardin  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

---

Prof. Dra. Arielle Cristina Arena  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Filho - UNESP

Londrina, 26 de fevereiro de 2015.

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente à Deus, pela possibilidade de realizar o mestrado. Meu coração é grato pela orientação, pelo consolo e pela força encontrada na presença Dele, sem as quais eu não teria chegado até aqui.

Ao meu marido, Douglas, que esteve ao meu lado todos os dias nesses dois anos. Obrigada por acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos, por me incentivar a superar meus limites. Essa conquista também é sua.

Aos meus pais, Vagner e Suely, pelo apoio e investimento que fizeram na minha nesses anos. Sempre fizeram de tudo para me ajudar mesmo de longe. Obrigada por muitas vezes retirarem os espinhos do caminho para eu prosseguir. Agradeço ao amor e compreensão de vocês.

Ao meu irmão, Matheus, por especialmente existir na minha vida e sempre me alegrar.

Às minhas amigas da graduação, (Jade, Rafaela, Paula e Helen), pela amizade devota mesmo com a distância.

À minha orientadora, Profa. Daniela, pela oportunidade dada, pela dedicação e paciência dispensadas durante esses anos. Obrigada pelos ensinamentos tantos profissionais quanto pessoais compartilhados, você é um exemplo de educadora e orientadora.

Às Professoras- Estefânia M., Graziela C. e Eveline Q. - por todos os conhecimentos compartilhados e a auxílios a mim prestados.

As Professoras- Suzana M., Ana C. Kiss e Silvia P.- agradeço pela disponibilidade e contribuições para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório (Alice, Bruna, Bruno, Kennia, Marina, Milene, Nathália C., Vanessa), pelo trabalho em grupo, pelos finais de semana compartilhados e pelas contribuições para a conclusão deste trabalho. Agradeço em especial ao Bruno e a Milene,

pela disponibilidade e pela paciência em compartilhar o conhecimento de vocês. Milene, muito obrigada pelo seus ensinamentos e companheirismo, eu aprendi muito com você.

Agradeço aos colegas do Programa Multicêntrico pelas risadas, viagens e conhecimentos compartilhados.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que não foram aqui citadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

A todos os animais utilizados para o desenvolvimento desse trabalho.

*Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar". Josué 1:9*

COSTA, Nathália Orlandini. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do fungicida propiconazol em ratos**. 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O propiconazol (PROP) é um fungicida extensivamente utilizado na agricultura. Há evidências de que este composto possa ter efeitos como desregulador endócrino. Estudos *in vitro* demonstraram que o PROP tem capacidade de inibir a atividade da CYP 19 (aromatase) que converte andrógenos em estrógenos, além de antagonista do receptor de andrógeno e estrógeno. Desta forma, o presente estudo avaliou a toxicidade reprodutiva do tratamento com PROP em ratos machos e fêmeas adultos. Ratos Wistar, machos e fêmeas, foram divididos em três grupos e tratados diariamente, por gavagem, com óleo de milho (CTR), propiconazol 4mg/kg (PROP 4) e 20mg/kg (PROP 20), do dia pós-natal (DPN) 50 ao 120 (machos) e do DPN 50 ao 95-105 ou dia lactacional (DL) 21 (fêmeas). Foram observados nas fêmeas: 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; enquanto que nos machos, foram observados: ganho de peso corpóreo, concentração plasmática de testosterona e estradiol, peso dos órgãos, contagem e morfologia espermática, histomorfometria testicular, comportamento copulatório e teste de preferência sexual. Houve uma redução da espessura do epitélio luminal nas ratas tratadas em ambas as doses do PROP e uma diminuição do comportamento materno de limpeza dos filhotes nas ratas do grupo PROP 4. Em machos, foi observado um aumento da anormalidade de cauda dos espermatozoides, do peso da vesícula seminal e do ducto deferente, além de uma redução dos níveis de estradiol no grupo PROP 4. Entretanto, apenas o comportamento sexual foi afetado no grupo PROP 20. Os resultados sugerem que o tratamento com PROP induziu alterações em alguns parâmetros reprodutivos, o que pode estar relacionado com uma desregulação endócrina.

**Palavras-chaves:** Desregulador endócrino. Fungicida. Reprodutivo. Rato.

COSTA, Nathália Orlandini. **Evaluation of the reproductive toxicity of the fungicide propiconazole in rats.** 2015. 67p. Dissertation (Master's Degree in Multicentric in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

The propiconazole (PROP) is a fungicide extensively used in agriculture. There are evidences that this compound may cause endocrine disrupting effects. *In vitro* studies have demonstrated that PROP inhibit the activity of CYP 19 (aromatase), responsible for converting androgens into estrogens, as well as showed to be an androgen and estrogen receptor antagonist. Therefore, the present study evaluated the reproductive toxicity of PROP treatment in adult male and female rats. The Wistar rats, male and female, were divided in three groups and were treated daily, by gavage, with corn oil (control group), propiconazole 4mg/kg (PROP 4) and 20mg/kg (PROP 20), from post-natal day (PND) 50 to 120 (males) and from PND 50 to 95-105 or lactacional day (LD) 21(females). It was observed in females: the body weight gain, estrous cycle, estradiol plasmatic level, organs weight, sexual behavior, maternal body weight gain and food intake, maternal behavior and fertility assay; while in males were observed: testosterone and estradiol plasmatic levels, organs weight, sperm count and morphology, testicular histomorphology, copulatory behavior and sexual incentive motivation. There was a decrease in uterine luminal epithelium of female rats treated with both doses of PROP and a decrease in the grooming pup maternal behavior of females in PROP 4 group. In male rats, it was observed an increase in the abnormal tail morphology sperm, seminal vesicle and vas deferens weight, and diminished estradiol levels in PROP 4 group. However, only the sexual behavior was affected in the PROP 20 group. These results suggest that PROP treatment induced alterations in some reproductive parameters, what it could be related with an endocrine disruption.

**Keywords:** Endocrine disrupter. Fungicide. Reproductive. Rat.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>Introdução</b> .....	9
<b>2.</b>	<b>Objetivos</b> .....	12
2.1.	Objetivo geral.....	12
2.2.	Objetivos específicos.....	12
<b>3.</b>	<b>Material e métodos</b> .....	13
3.1.	Delineamento experimental.....	13
3.2.	Animais e tratamento.....	14
3.3.	Parâmetros analisados em fêmeas.....	16
3.3.1.	<i>Ganho de peso corpóreo</i> .....	16
3.3.2.	<i>Acompanhamento do ciclo estral no DPN 80</i> .....	16
3.3.3.	<i>Concentração plasmática de estrógeno</i> .....	16
3.3.4.	<i>Peso corporal e de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado</i> .....	17
3.3.5.	<i>Análise histológica dos órgãos reprodutivos</i> .....	17
3.3.6.	<i>Avaliação do comportamento sexual</i> .....	17
3.3.7.	<i>Toxicidade geral materna</i> .....	19
3.3.8.	<i>Avaliação do Comportamento Materno</i> .....	20
3.3.9.	<i>Análise de fertilidade</i> .....	20
3.4.	Parâmetros analisados em machos.....	22
3.4.1.	<i>Ganho de peso corpóreo</i> .....	22
3.4.2.	<i>Avaliação do comportamento copulatório</i> .....	22
3.4.3.	<i>Preferência sexual</i> .....	22
3.4.4.	<i>Concentração plasmática de testosterona e estradiol, retirada dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado</i> .....	24
3.4.5.	<i>Análise da morfologia dos espermatozoides</i> .....	25
3.4.6.	<i>Contagem espermática</i> .....	25
3.4.7.	<i>Parâmetros biométricos e análise histológica do testículo</i> .....	27
3.5.	Análise estatística.....	29
<b>4.</b>	<b>Resultados</b> .....	31
4.1.	Parâmetros analisados em fêmeas.....	29

4.1.1.	<i>Ganho de peso corpóreo</i> .....	31
4.1.2.	<i>Avaliação do ciclo estral a partir do DPN 80</i> .....	32
4.1.3.	<i>Concentração plasmática de estrógeno durante a fase de estro</i> .....	32
4.1.4.	<i>Peso corporal e de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado</i> .....	33
4.1.5.	<i>Análise histológica dos órgãos reprodutivos</i> .....	34
4.1.6.	<i>Avaliação comportamental sexual</i> .....	36
4.1.7.	<i>Toxicidade geral materna</i> .....	37
4.1.8.	<i>Avaliação do Comportamento Materno</i> .....	39
4.1.9.	<i>Análise de fertilidade</i> .....	41
4.2.	<b>Parâmetros analisados em machos</b> .....	42
4.2.1.	<i>Ganho de peso corpóreo</i> .....	42
4.2.2.	<i>Comportamento copulatório e preferência sexual</i> .....	43
4.2.3.	<i>Concentração plasmática de testosterona e estradiol, peso corporal e de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado</i> .....	46
4.2.4.	<i>Parâmetros espermáticos</i> .....	48
4.2.5.	<i>Parâmetros histomorfométricos de testículo</i> .....	49
<b>5.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Referências</b> .....	<b>59</b>

## 1. Introdução

A população mundial é regularmente exposta a uma infinidade de produtos químicos através de alimentos, água, ar ou contato direto (HCWH, 2002). Dentre estes compostos estão os desreguladores endócrinos (DEs). Esses contaminantes podem alterar uma ou mais funções do sistema endócrino de seres humanos e de outros animais (WARING & HARRIS, 2005) e, conseqüentemente, causar efeitos adversos em um organismo ou em sua descendência (WHO, 2002). Desta forma, essas substâncias têm potencial para alterar a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação de hormônios endógenos, responsáveis pela homeostase (US EPA, 1997, CRAIG et al., 2011). Um dos principais alvos dos DEs são os hormônios esteroidais, portanto a exposição a essas substâncias podem acarretar em problemas reprodutivos assim como outras toxicidades relacionadas ao desenvolvimento sexual (MANTOVANI, 2002).

Pesquisas indicam uma conexão entre a exposição à agrotóxicos e efeitos DEs. Em quarenta anos, as áreas agrícolas do Brasil cresceram 78%, enquanto o consumo de agrotóxico aumentou 700% (SPADOTTO et al., 2004). Conseqüentemente nos últimos anos, o Brasil vem ocupando o lugar de maior consumidor de agrotóxicos do mundo, e os impactos à saúde pública são amplos porque atingem vastos territórios e envolvem diferentes grupos populacionais (CARNEIRO et al., 2012). Um estudo recente no Reino Unido informou que existem aproximadamente 127 destas substâncias com ação desreguladora endócrina (COSTA et al., 2014). Desta forma, tem crescido o interesse por parte de vários países, de se estudar esses agentes químicos, introduzidos ou disseminados pelo homem no ambiente. Em humanos, a exposição a alguns praguicidas causou uma redução na concentração de espermatozoides (PERRY et al., 2007), e

desregulou os ciclos menstruais em mulheres (AXMON et al., 2004; FARR et al., 2004). Já em roedores, contaminantes agrícolas com potencial para afetar o sistema endócrino, como o fenarimol, interferiram na produção ou ação de hormônios comprometendo a fertilidade de machos pela redução do comportamento sexual (HIRSCH et al., 1986; HIRSCH et al., 1987).

Dentre os agrotóxicos utilizados estão os compostos azólicos, como ciproconazol e propiconazol (PROP), que fazem parte de uma grande família de fungicidas sintéticos amplamente usados nas plantações de grãos como trigo, arroz, feijão, e amendoim (ROCKETT et al., 2006; TAXVIG et al., 2007; GIAVINI & MEN'EGOLA, 2010; GOETZ et al., 2007). Em fungos, os azóis agem pela inibição de uma enzima específica do citocromo P450 (CYP), CYP51 (lanosterol-14ademethylase), a qual participa da biossíntese de ergosterol, um esteroide necessário para a síntese da parede celular do fungo (HESTER, 2012; ZARN, 2003). Em mamíferos, estas substâncias podem afetar a expressão dos genes do citocromo P450, assim como a atividade das enzimas do mesmo (SUN et al., 2007). Dentre as enzimas alvo está a CYP51, a qual faz parte da via de biossíntese do colesterol, sendo esse o principal esteroide presente na membrana celular dos mamíferos e também requerido para produção dos hormônios esteroides sexuais (ROCKETT et al., 2006). Esta habilidade em inibir enzimas do CYP envolvidas na biossíntese de hormônios esteroidais podem potencialmente produzir efeitos colaterais endócrinos, como a depleção de testosterona (SCHURMEYER & NIESCHLAG, 1984) e aumentar os riscos de efeitos adversos durante a gravidez (MENEGOLA et al. 2005; NAROTSKY & KAVLOCK, 1995).

Além disso, a CYP 19 (aromatase) é outra enzima alvo dos compostos azólicos (SANDERSON et al., 2002; VINGGAARD et al., 2000). Estudos realizados *in vitro*, em células de câncer de mama MCF-7 com expressão de aromatase, demonstraram que

o PROP tem capacidade de inibir a atividade da CYP 19 e age como um antagonista de receptor de estrógeno (ER), tendo como consequência um efeito antiestrogênico, além de antagonista do receptor de andrógeno (AR) (KJÆRSTAD et al. 2010).

Dessa forma, é sugerido que o PROP tenha potencial para afetar a homeostase dos hormônios esteroides *in vivo*. O equilíbrio fisiológico entre hormônios esteroides sexuais é essencial para o desenvolvimento, manutenção e função do sistema reprodutivo. A exposição ao PROP, a partir do dia gestacional (DG) 6 até a idade adulta, ocasionou, em ratos machos, aumento no peso testicular no período peripuberal e na concentração de testosterona (GOETZ et al. 2007), bem como redução da fertilidade e hepatomegalia, e em fêmeas, irregularidades no ciclo estral (ROCKETT et al., 2006). Em contrapartida em um estudo de duas gerações de ratos, o tratamento com PROP reduziu o peso do testículo e epidídimo da geração F1 (INCHEM, 1987). Embora esses estudos indiquem possível ação do propiconazol como desregulador endócrino, existe uma escassez de estudos sobre o impacto do uso em longo prazo desse praguicida na fase adulta.

Assim, considerando que 1) a diferenciação e o desenvolvimento do sistema reprodutivo são dependentes da ação de hormônios (DEUT, 2007), portanto praguicidas como PROP podem alterar as funções reprodutivas; 2) há um crescimento do uso de praguicidas e a população está sendo cada vez mais exposta; 3) existe uma preocupação sobre os potenciais efeitos que DEs possam influenciar no sistema endócrino, além da escassez de estudos sobre o impacto do uso em longo prazo do PROP; o presente estudo justifica-se pela busca de possíveis alterações funcionais no sistema reprodutivo desencadeadas pela exposição ao PROP em ratos machos e fêmeas.

## **2. Objetivo**

### 2.1. Objetivo geral

Este estudo foi conduzido em ratos machos e fêmeas com o objetivo de avaliar se o tratamento com PROP pode resultar em alterações sobre a função reprodutiva.

### 2.2. Objetivos específicos

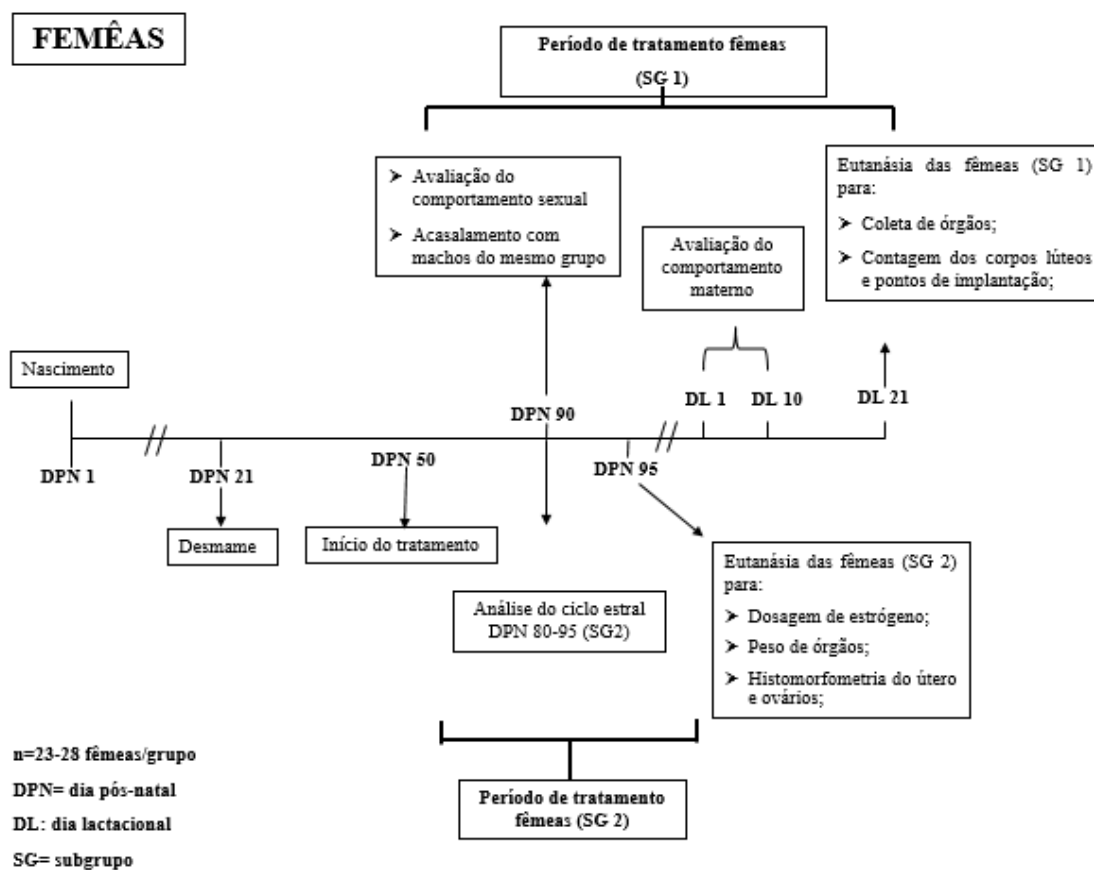
Investigar se exposição crônica ao propiconazol pode alterar em ratos:

- Fêmeas: ciclo estral, concentração plasmática de estrógeno, histologia do útero e ovário, comportamento sexual, peso corpóreo e ingestão alimentar materna, comportamento materno e fertilidade.
- Machos: concentração plasmática de testosterona e estradiol, comportamento sexual (copulatório e preferência sexual), histomorfometria do testículo, morfologia e contagem espermática.

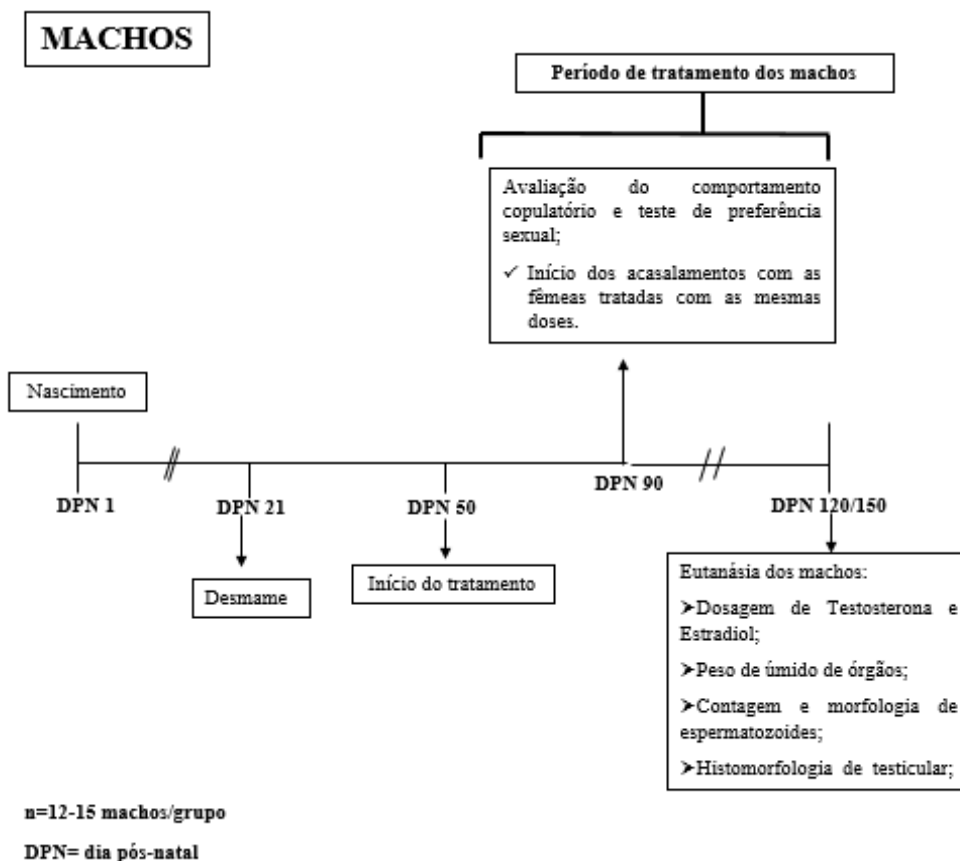
### 3. Material e métodos

#### 3.1. Delineamento experimental

Os diagramas abaixo resumem o delineamento experimental empregado para as fêmeas (Figura 1) e machos (Figura 2) nesse trabalho.



**Figura 1.** Delineamento experimental das fêmeas.



**Figura 2.** Delineamento experimental dos machos.

### 3.2. Animais e tratamento

Foram utilizados ratos Wistar (DPN 85-90), machos e fêmeas, provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas do CCB, onde 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.

Para o acasalamento, foi colocado um macho para cada duas fêmeas em cada gaiola ao final da tarde. Na manhã do dia seguinte, o macho foi retirado da gaiola das fêmeas e foram coletadas células da mucosa vaginal através de esfregaço. A prenhez foi considerada positiva quando observado, 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. No dia do desmame, dia pós-natal 21 (DPN 21), os filhotes machos e fêmeas desses acasalamentos foram separados por gênero e divididos em três grupos experimentais, sendo que apenas um único filhote por ninhada de cada gênero foi utilizado para compor cada grupo:

Grupo Propiconazol 4mg/Kg (PROP 4): ratos (12 machos e 24 fêmeas) receberam, por gavagem, propiconazol na dose de 4,0 mg/kg/dia (ANVISA, 2003), diluído em óleo de milho.

O tratamento dos machos foi realizado a partir do DPN 50 até o DPN 120. Esse período foi escolhido porque abrange um ciclo espermático completo, como sugerido pelo guideline OECD/OCDE 416 (2001).

As fêmeas foram divididas em 2 subgrupos: um subgrupo foi tratado a partir do DPN 50 até o dia lactacional (DL 21), ocasião onde ocorreu o desmame da geração F1, para avaliação dos comportamentos sexual e materno e fertilidade; e o outro foi tratado do DPN 50 até o DPN 95-105, para avaliação do ciclo estral, peso e histologia dos órgãos.

Grupo Propiconazol 20mg/Kg (PROP 20): ratos (15 machos e 28 fêmeas) receberam, por gavagem, propiconazol na dose de 20,0 mg/kg/dia. O período de tratamento dos animais foi conforme descrito anteriormente.

Grupo Controle (CTR): ratos (12 machos e 23 fêmeas) receberam, por gavagem, óleo de milho no mesmo período.

O tratamento foi realizado uma vez ao dia, obedecendo sempre à mesma rotina de horários de aplicação (12:00-14:00). Foi realizado o acompanhamento do peso corpóreo para ajuste da dose a cada três dias, bem como para avaliação de toxicidade.

Todos os procedimentos nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA 16381.2012.45).

### 3.3. Parâmetros reprodutivos analisados nas fêmeas.

#### 3.3.1. *Ganho de peso corpóreo*

Foi realizado o acompanhamento do peso corpóreo do DPN 50 até 95-105 (n=23-28/grupo), e além disso, foram observados sinais gerais de toxicidade como lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores.

#### 3.3.2. *Acompanhamento do ciclo estral no DPN 80*

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=11-12/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, metaestro e diestro), para obtenção dos seguintes parâmetros: duração do ciclo estral e frequência das diferentes fases.

#### 3.3.3. *Concentração plasmática de estrógeno*

Após o término da visualização do ciclo estral, as fêmeas foram acompanhadas até o próximo estro, ocasião onde foram pesadas, anestesiadas com éter etílico e submetidas à laparotomia. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal em seringas contendo heparina, sempre no mesmo horário. 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 imunoenensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT® Estradiol) (n=10/grupo). A sensibilidade do teste é de 10 pg/mL e o erro intra-ensaio foi de 5,5%.

#### *3.3.4. Peso corporal e de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado*

Imediatamente após a coleta de sangue das ratas, foi realizada a coleta dos órgãos reprodutivos, ovários e útero (com fluido), que foram pesados e fixados em Bouin (n=11-16/grupo). Além dos órgãos reprodutivos, foram removidos e pesados hipófise e fígado.

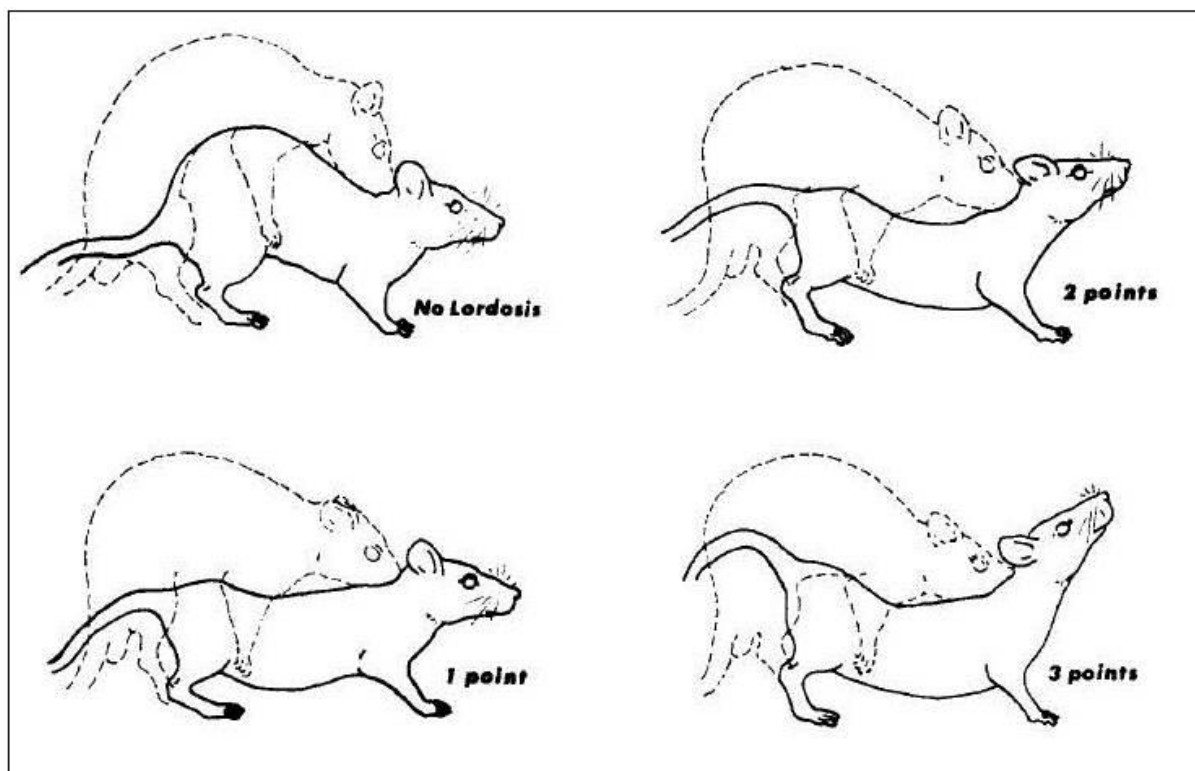
#### *3.3.5. Análise histológica dos órgãos reprodutivos*

Os órgãos reprodutivos, após fixação em Bouin, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados com xilol e incluídos em parafina (n=6-9 /grupo). Seis cortes de 7 µm separados por 70 µm de distância foram obtidos por animal, 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® Release 4.8.2 (SP3). Foram contados os corpos lúteos e folículos em diferentes fases (primordiais, em crescimento e antrais) de acordo com a descrição prévia de Pedersen & Peters (1968), apresentada por Plowchalch, Smith & Mattison (1993)- nas objetivas de 10x e 40x. Em cada corno uterino foram mensuradas a altura do epitélio luminal, espessura do estroma endometrial, miométrio e perimétrio na porção média do órgão, em relação ao ovário.

#### *3.3.6. 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 experimentador localizado fora do biotério de ciclo de luz invertida.

Para essa metodologia foram utilizadas 11-12 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. Machos (n=15) obtidos do biotério central, foram anestesiados com éter etílico 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: número de lordoses/10 montas X 100 (BEACH, 1976b) 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 3 (HARDY & DEBOLD, 1971).



**Figura 3.** Diferentes graus de lordose (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 (F1), conforme o método descrito para acasalamento no item 3.2.

### *3.3.7. Toxicidade geral materna*

O peso corporal materno foi determinado durante a gestação (DG 3, DG 9, DG 15, DG 21) e lactação (DL 3, DL 9, DL 15, DL 21). Assim como a ingesta de ração foi acompanhada durante o mesmo período. Também foram observados sinais de toxicidade como lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores.

### *3.3.8. Avaliação do Comportamento Materno*

Para verificar se o tratamento com PROP poderia alterar o cuidado com a prole foi avaliado o comportamento materno de acordo com a metodologia, com modificações, proposta por Champagne et al. (2003). 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 (10:00, 13:00, 16:00 h) e um período durante a fase escura do ciclo claro / escuro (19:00 h). A observação iniciou-se no tempo zero, e as posteriores realizadas a cada 3 minutos, resultando em 25 observações por período e totalizando 100 observações da mãe por dia. 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 (n=11-12/grupo).

### *3.3.9. Análise de fertilidade*

Após o desmame dos filhotes no DL 21, as fêmeas foram anestesiadas com éter etílico 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 4A). Adicionalmente, os ovários foram isolados e os corpos lúteos separados e contados (Figura 4B e C) (n=10-12/grupo).



**Figura 4.** (A) Útero com pontos de implantação após desmame (DL 21). (B) Ovários excisados após desmame (DL 21) (C) para contagem dos corpos lúteos.

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

$$\text{Taxa de implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}}$$

$$\text{Taxa de perda pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}}$$

$$\text{Taxa de perda pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}}$$

$$\text{Taxa de Viabilidade Fetal} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação}}$$

### 3.4. Parâmetros reprodutivos analisados nos machos.

#### 3.4.1. *Ganho de peso corpóreo*

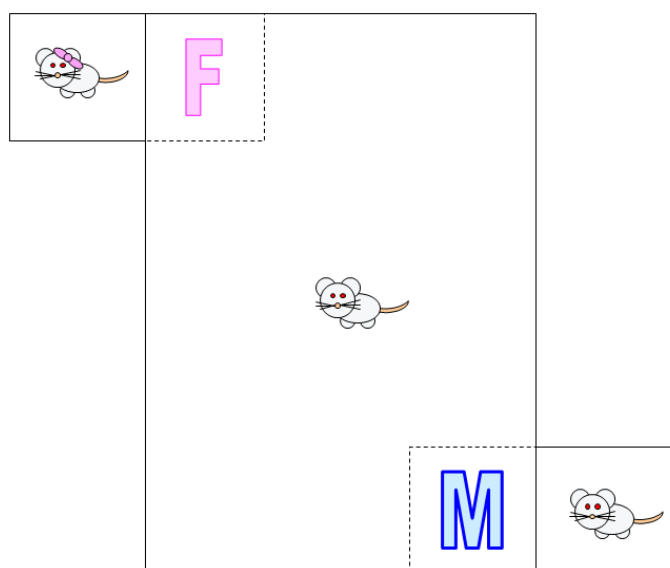
Foi realizado o acompanhamento do peso corpóreo do DPN 50-119, e do mesmo modo foram observados sinais gerais de toxicidade como lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores (n=10-15/grupo).

#### 3.4.2. *Avaliação do comportamento copulatório*

Quinze dias antes das análises comportamentais (DPN 75) os animais (n=11-12/grupo) 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 experimentador localizado fora do biotério de ciclo de luz invertida. Os testes foram realizados sempre 4h após o início da fase escura e foram capturados por câmera conectada a um monitor em sala adjacente. A partir do DPN 90, cada macho foi inicialmente colocado na gaiola de observação (caixa de policarbonato) e após 10 min de aclimação uma fêmea em estro natural foi introduzida na mesma caixa. Durante 30 minutos, as latências e frequências para intromissão e ejaculação foram observadas como descrito em Gerardin et al. (2006). Caso o macho não apresentasse comportamento dentro de 10 min, a avaliação era interrompida e repetida no dia seguinte. Machos que falharam na segunda avaliação foram considerados sexualmente inativos.

#### 3.4.3. *Preferência sexual*

Após análise do comportamento copulatório, os machos foram submetidos ao teste de preferência sexual. Neste 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 cm<sup>2</sup>. As arenas pequenas são diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal é fechada com uma tela de arame (Figura 5). Para o teste, foi colocada uma fêmea em estro natural (incentivo sexual) em uma das arenas pequenas, e na outra, um macho sexualmente ativo (incentivo social). O piso da arena principal possuía duas áreas delimitadas com 25 cm<sup>2</sup> (zonas) na frente de cada abertura das arenas menores. Estas áreas foram chamadas de zona de incentivo sexual (zona da fêmea) e zona de incentivo social (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 de incentivo foram registrados, e calculado o escore de preferência ( $[\text{tempo de permanência na zona de fêmea} / \text{tempo total gasto em ambas as zonas de incentivo}] \times 100$ ) (AGMO, 2003).



**Figura 5.** Representação esquemática da vista superior da arena do teste de preferência sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea (sexual) e do macho (social), respectivamente.

#### *3.4.4. Concentração plasmática de testosterona e estradiol, retirada dos órgãos reprodutivos, hipófise e fígado*

Após 15 dias do acasalamento com as fêmeas dos mesmos grupos experimentais, os machos foram pesados, anestesiados com éter etílico e submetidos à laparotomia. Amostras de sangue (n=9-10/grupo) foram coletadas da artéria aorta abdominal em seringas contendo heparina, sempre no mesmo horário. 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), onde o coeficiente de variação intra-ensaio 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 intra-ensaio foi de 5,5%.

Após a coleta de sangue, o ducto deferente esquerdo foi retirado para análise da morfologia dos espermatozoides (3.4.5). Além dos órgãos da reprodução (testículos, epidídimos, vesícula seminal com secreção e sem secreção e próstata ventral) foram removidos e dissecados a hipófise e o fígado (n=12-15/grupo). Após secagem em papel de filtro, foram determinados os respectivos pesos úmidos, empregando-se balança analítica. O testículo e o epidídimo direito foram congelados para posterior contagem espermática (3.4.6) e o testículo esquerdo foi preparado para análise dos parâmetros biométricos e análise histológica do testículo (3.4.7).

#### *3.4.5. Análise da morfologia dos espermatozoides*

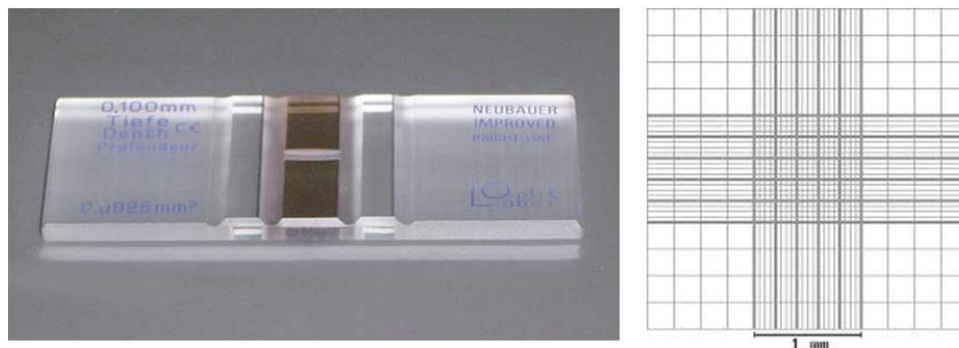
A avaliação da morfologia dos espermatozoides foi realizada de acordo com Fernandes et al. (2007). O ducto deferente esquerdo dos animais (n=13-15/grupo) foi seccionado nas extremidades anterior e posterior e lavado internamente com o auxílio de agulha e seringa contendo 1,0 ml de formol-salina (10%). O conteúdo foi colhido em um tubo e mantido sob refrigeração para posterior análise. Para análise, o conteúdo foi depositado 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).

#### *3.4.6. Contagem espermática*

O testículo decapsulado e o epidídimo direito (n=10-12/grupo), dos diferentes grupos experimentais, foram removidos e estocados a  $-20^{\circ}$  C para posterior determinação da concentração de células germinativas.

- *Número de espermátides maduras no testículo e cálculo da produção diária de espermatozoides:* Para a realização da contagem das espermátides no testículo, procedeu-se o descongelamento dos testículos dos ratos dos diferentes grupos experimentais seguido de homogeneização do material, segundo método descrito por Robb et al. (1978) e adaptado por Fernandes et al. (2007). Após o descongelamento do testículo decapsulado, o parênquima testicular pesado foi colocado em um tubo de

ensaio com tampa, onde foram adicionados 5ml de solução contendo NaCl (0,9%), Triton-X (0,05%) e Thimerosal (0,01%). Em seguida, este tubo foi tampado e pesado novamente para cálculo da primeira diluição. A amostra foi homogeneizada com pistilo 10N em velocidade máxima e, posteriormente, levado a um sonicador na potência 6, com 80mA por 30 segundos. Após nova diluição na proporção 1:10 na solução de Triton X100 (10 $\mu$ l do homogeneizado + 900 $\mu$ l de solução), uma alíquota foi transferida por meio de uma pipeta Pasteur para a câmara de Neubauer (Figura 6), onde as espermátides resistentes à homogeneização e sonicagem foram contadas (2 câmaras por animal, 5 campos por câmara). Para calcular a produção espermática diária, 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.



**Figura 6.** Câmara de Neubauer utilizada para contagem espermática. À esquerda, foto do modelo utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior, através do microscópio de uma das câmaras do aparelho.

- *Número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo:* Os epidídimos direitos 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 1ml 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 tempo de transito dos espermatozoides pelo epidídimo 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).

#### *3.4.7. Parâmetros biométricos e análise histológica 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= 8-9 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 7µm de espessura, corados com Hematoxilina e Eosina.

A composição dos dados volumétricos do parênquima testicular foi obtida usando contagem de pontos utilizado 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 pelos mesmos 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 pelo 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–,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 escolhidos 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 calculada 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;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos ( $R$  = diâmetro tubular/2) (ATTAL & COUROT, 1963; DORST & SAJONSKI, 1974).

### 3.5. 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). Para fins de análise, os dados restantes foram transformados em raiz quadrada ou logaritmo natural, e caso ainda não apresentassem normalidade e homogeneidade foram submetidos aos testes não-paramétricos, apresentados como mediana (1° e 3° quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

- ANOVA de três-vias complementado com Tukey: comportamento materno.
- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) complementado com Bonferroni: peso corpóreo e ingesta de ração materna.
- ANCOVA complementado com Bonferroni: peso de órgãos.
- ANOVA complementado com Bonferroni: ganho de peso das fêmeas, concentração plasmática de estradiol, histologia de ovário e útero, comportamento materno de limpeza dos filhotes, contagem espermática, histomorfometria testicular.
- Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn: ciclo estral, coeficiente de lordose, fertilidade, ganho de peso dos machos, latência para primeira ejaculação no teste de comportamento copulatório, número de intromissões após a primeira ejaculação no teste de comportamento copulatório, preferência sexual, concentração plasmática de testosterona, número de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo, morfologia espermática.

- Teste de Fisher: grau de lordose fêmeas.

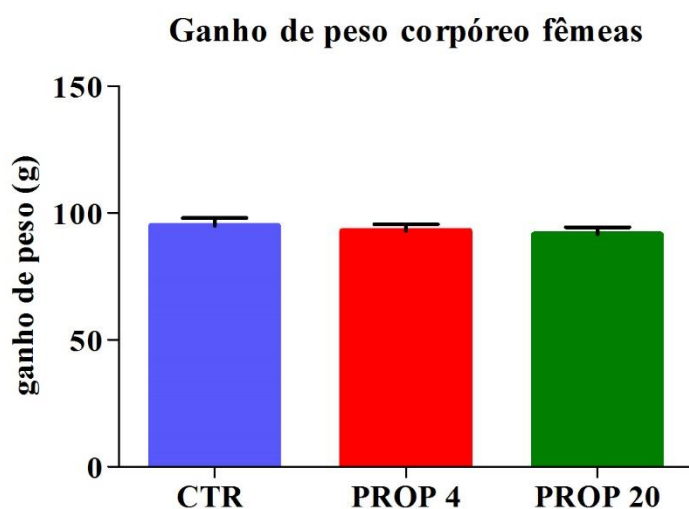
O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo software SPSS (IBM, SPSS statistics 19) e GraphPad Prism 6.

## 4. Resultados

### 4.1. Parâmetros reprodutivos analisados nas fêmeas.

#### 4.1.1. Ganho de peso corpóreo

O tratamento com propiconazol do DPN 50 ao 95-105 não alterou o ganho de peso corpóreo (g) das fêmeas comparadas ao controle [CTR:  $94,88 \pm 3,24$  /n=23; PROP 4:  $92,96 \pm 2,63$  /n=24; PROP 20:  $91,60 \pm 2,82$  /n=28] como indicado por ANOVA complementada com Bonferroni,  $p > 0,05$  (Figura 7).



**Figura 7.** Ganho de peso corpóreo de fêmeas durante o período de tratamento. Dados estão apresentados em média  $\pm$  EPM. ANOVA ( $p > 0,05$ ). CTR (n=23): grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4 (n=24): grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20 (n=28): grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

#### 4.1.2. Avaliação do ciclo estral a partir do DPN 80

A Tabela 1 apresenta os dados referentes à avaliação do ciclo estral do DPN 80-95. O teste de Kruskal-Wallis não indicou diferença entre os grupos experimentais ( $p>0,05$ ).

**Tabela 1. Avaliação do ciclo estral em fêmeas dos diferentes grupos experimentais.**

	CTR [11]	PROP 4 [12]	PROP 20 [12]
<b>Duração do ciclo estral (em dias)</b>	3,7 (3,7-5,0)	3,7 (3,7-5,0)	3,7 (3,7-5,0)
<b>Frequência do proestro</b>	3,0 (2,0-4,0)	3 (1,2-3,0)	3 (2,0-3,7)
<b>Frequência do estro</b>	4,0 (3,0-4,0)	4,0 (3,0-4,0)	4,0 (3,0-4,0)
<b>Frequência de metaestro/diestro</b>	8,0 (7,2-9,0)	8,5 (8,0-9,7)	8,0 (8,0-9,0)

Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em mediana (1° Quartil-3° Quartil),  $p>0,05$  Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

#### 4.1.3. Concentração plasmática de estrógeno durante a fase de estro

ANOVA indicou que não houve diferença nas concentrações plasmáticas de estradiol (pg/ml) entre os grupos experimentais [CTR:  $66,30 \pm 11,45$ ; PROP 4:  $66,10 \pm 8,61$ ; PROP 20:  $59,40 \pm 7,40$ ]  $n=10$ /grupo ( $p>0,05$ ).

#### 4.1.4. Peso corporal e de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado

O peso corporal e o peso dos órgãos das fêmeas estão apresentado na Tabela 2. Tanto o peso corpóreo (ANOVA,  $p>0,05$ ) quanto os pesos de órgãos (ANCOVA,  $p>0,05$ ) não foram afetados pelo tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg.

**Tabela 2. Peso corporal e peso dos órgãos das fêmeas dos diferentes grupos experimentais.**

	CTR [11]	PROP 4 [12]	PROP 20 [16]
<b>Peso corporal (g)</b>	247,6 ± 6,2	258,9 ± 4,6	250,74 ± 4,2
<b>Peso de órgãos (g)</b>			
<b>Útero</b>	0,78 ± 0,08	0,79 ± 0,08	0,87 ± 0,07
<b>Ovário (direito)</b>	0,04 ± 0,003	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,002
<b>Fígado</b>	8,84 ± 0,22	9,50 ± 0,21	9,49 ± 0,18
<b>Hipófise</b>	0,014 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,013 ± 0,001

Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, peso corporal foi comparado por ANOVA complementado com Bonferroni e o peso de órgãos foi comparado por ANCOVA com peso do corporal como covariável,  $p>0,05$ . CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

#### 4.1.5. Análise histológica dos órgãos reprodutivos

As tabelas 3 e 4 apresentam a quantificação folicular ovariana e a análise morfométrica uterina, respectivamente. O teste de ANOVA, seguida de Bonferroni, indicou uma redução na altura do epitélio luminal uterino nos grupos PROP 4mg/kg e 20mg/kg, em relação ao grupo CTR (Figura).

**Tabela 3. Quantificação folicular ovariana em fêmeas dos diferentes grupos experimentais.**

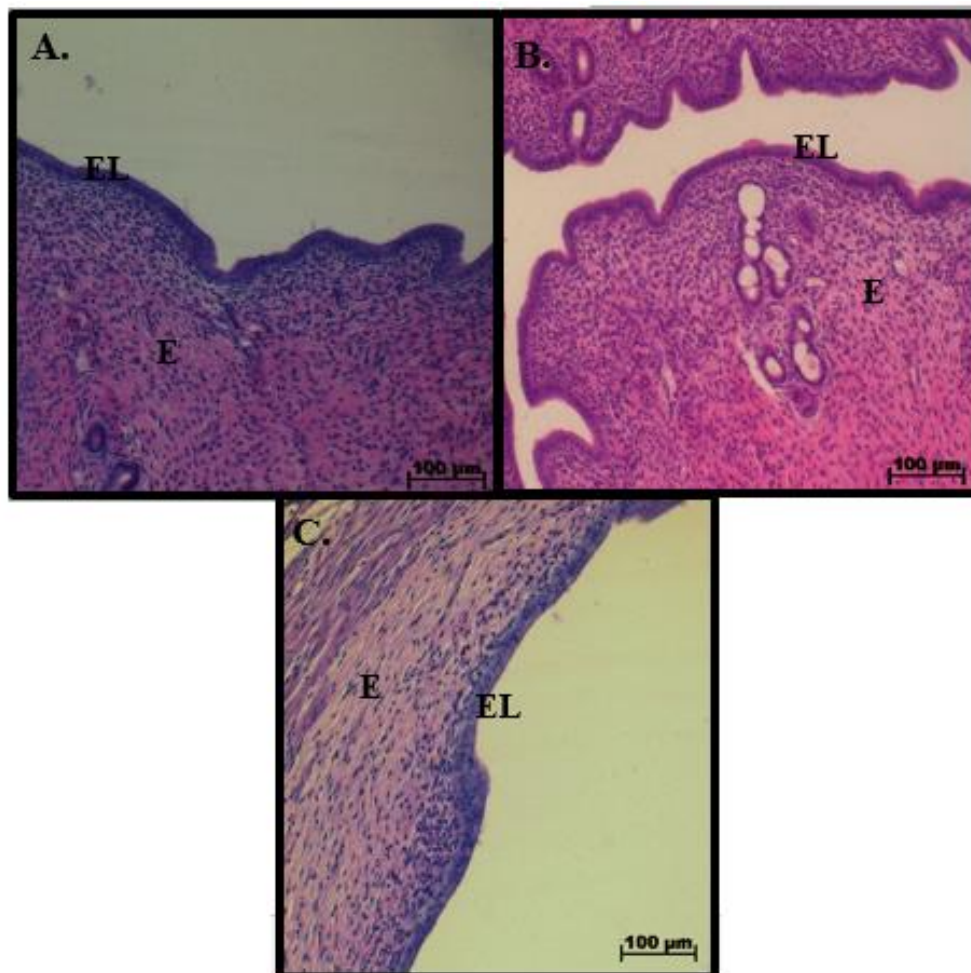
	CTR [9]	PROP 4 [8]	PROP 20 [6]
<b>Folículos primordiais</b>	9,36 ± 1,07	8,15 ± 1,43	11,47 ± 1,28
<b>Folículos em crescimento</b>	6,23 ± 0,68	5,97 ± 0,84	8,55 ± 0,76
<b>Folículos antrais</b>	6,82 ± 0,61	8,28 ± 1,43	9,13 ± 1,14
<b>Corpos lúteos</b>	5,77 ± 0,56	5,23 ± 0,25	5,59 ± 0,42

Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média ± EPM, ANOVA complementado com Bonferroni ( $p > 0,05$ ). CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

**Tabela 4. Análise morfométrica uterina em fêmeas dos diferentes grupos experimentais**

	CTR [6]	PROP 4 [7]	PROP 20 [6]
<b>Altura do epitélio luminal</b>	22,18 ± 1,76	16,54 ± 0,45*	17,28 ± 1,24*
<b>Espessura do estroma</b>	626,00 ± 36,61	589,60 ± 40,63	581,27 ± 35,08
<b>Espessura do miométrio</b>	351,07 ± 14,76	342,81 ± 26,32	365,53 ± 27,71
<b>Espessura do perimétrio</b>	11,64 ± 0,29	11,59 ± 0,65	11,77 ± 0,74

Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média ± EPM, ANOVA complementado com Bonferroni ( $*p < 0,05$  em relação ao CTR). CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.



**Figura 8.** Fotomicrografias das secções uterinas de ratas na fase de estro do grupo CTR (A), PROP 4 (B) e PROP 20 (C), coradas com hematoxilina eosina. E: Endométrio; EL: Epitélio luminal. Escala de barra: 100µm. Aumento final: 400x.

#### 4.1.6. Avaliação comportamental sexual

A Tabela 5 apresenta os parâmetros avaliados durante o comportamento sexual das fêmeas. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5. Parâmetros avaliados durante o comportamento sexual de fêmeas dos diferentes grupos experimentais DPN 90.**

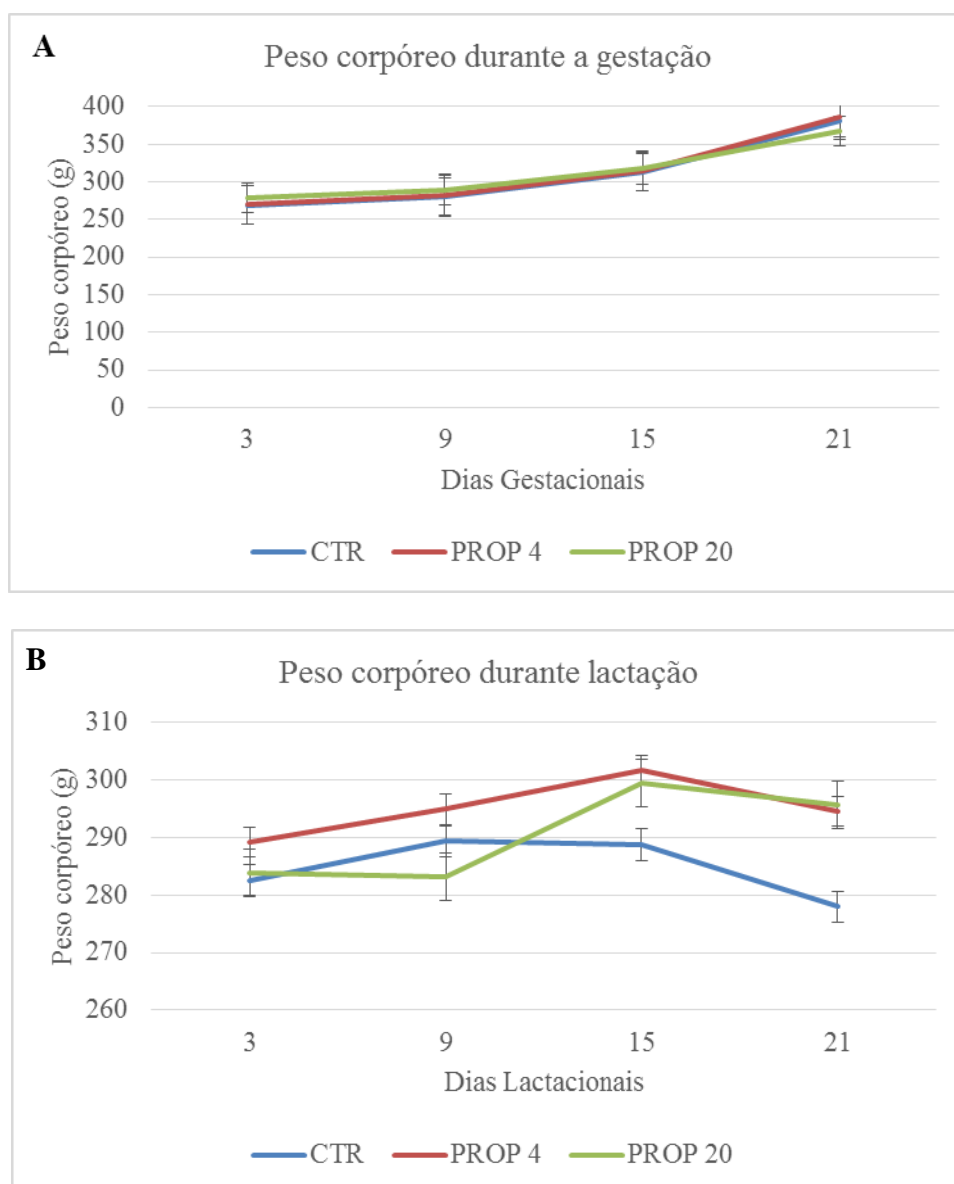
	CTR [11]	PROP 4 [12]	PROP 20 [12]
<b>Coefficiente de Lordose<sup>a</sup></b>	100 (90,0-100,0)	100 (92,5-100,0)	100 (85,0-100,0)
<b>Grau de Lordose 0</b>	5,8% (7/120)	6,7% (8/120)	7,5% (9/120)
<b>Grau de Lordose 1</b>	4,2% (5/120)	0,8% (1/120)	0,8% (1/120)
<b>Grau de Lordose 2</b>	9,2% (11/120)	12,5% (15/120)	15,8% (19//120)
<b>Grau de Lordose 3</b>	80,8% (97/120)	80,0% (96/120)	75,9% (91/120)

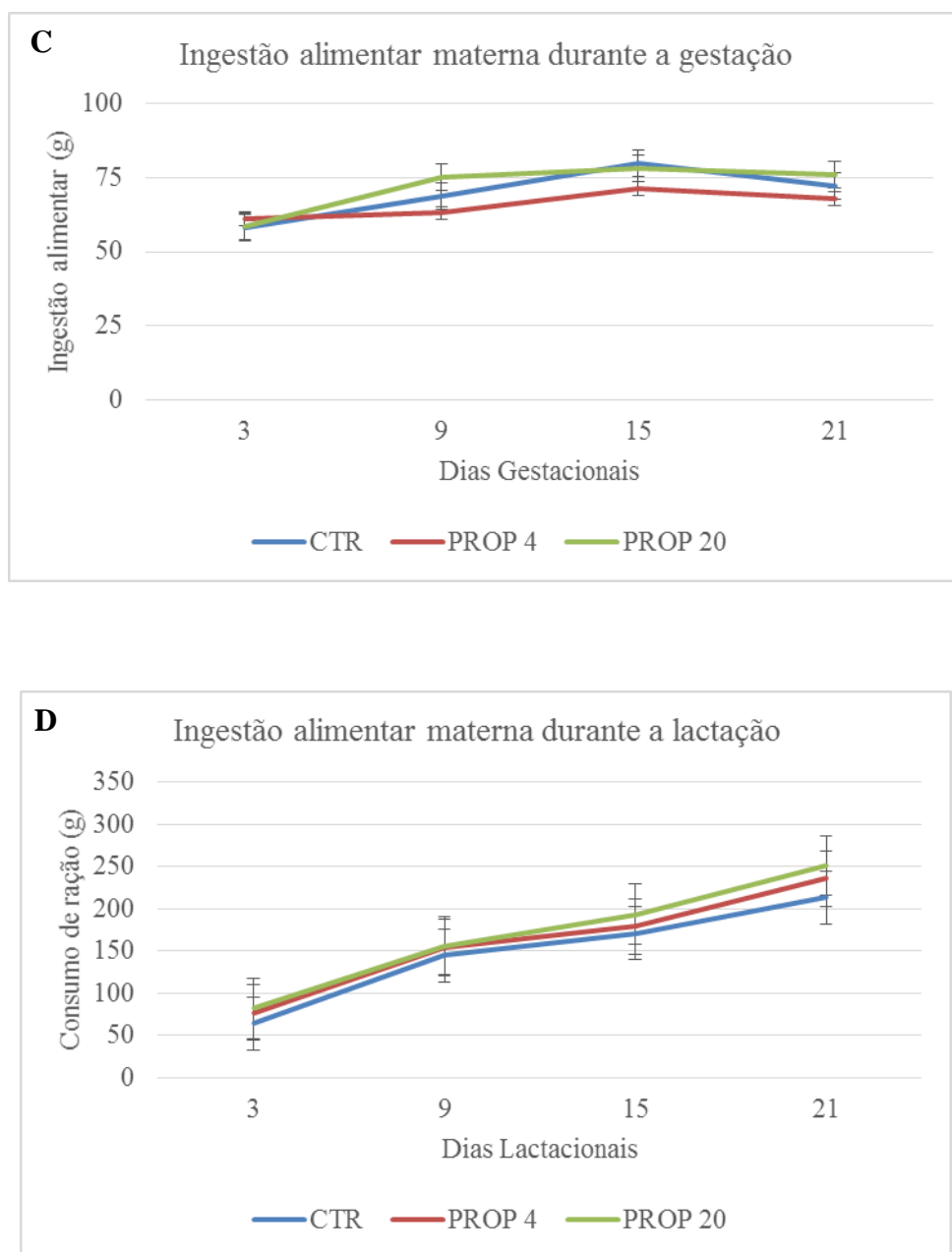
Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores dos graus de lordose expressos em porcentagem e o número entre parênteses representa o número de observações apresentado em cada grau de lordose/total de observações,  $p > 0,05$  comparado pelo teste de Fisher. CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

<sup>a</sup>Valores expressos em mediana (1° Quartil – 3° Quartil), Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn,  $p > 0,05$ .

#### 4.1.7. Toxicidade geral materna

RMANOVA indicou que o peso (Figura 9 A-B) e a ingestão alimentar materna (Figura 9 C-D) não foram afetados pelo tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg durante a gestação e lactação ( $p>0,05$ ).





**Figura 9.** Peso corpóreo materno na gestação (A) e lactação (B). Consumo de ração das mães durante a gestação (C) e lactação. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM  $n=8$ /grupo (RMANOVA,  $p>0,05$ ). CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

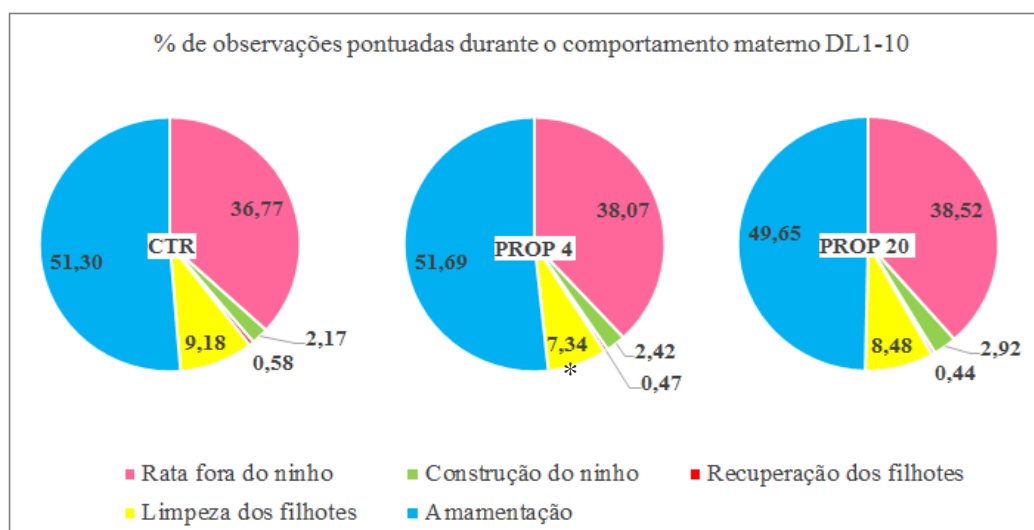
#### 4.1.8. Avaliação do Comportamento Materno

Os parâmetros do comportamento materno foram analisados por ANOVA de três vias com o dia de lactação como variável dentro de sujeitos e horário e grupo experimental como variáveis entre sujeitos.

Como esperado os diversos parâmetros do comportamento materno analisados sofreram mudanças de acordo com o dia da lactação, bem como, com o horário de observação (dados não apresentados), assim como houve interação significativa entre dia de lactação e horário (dados não apresentados) mostrando que o comportamento das ratas mudou nos diferentes horários ao longo da lactação, como esperado.

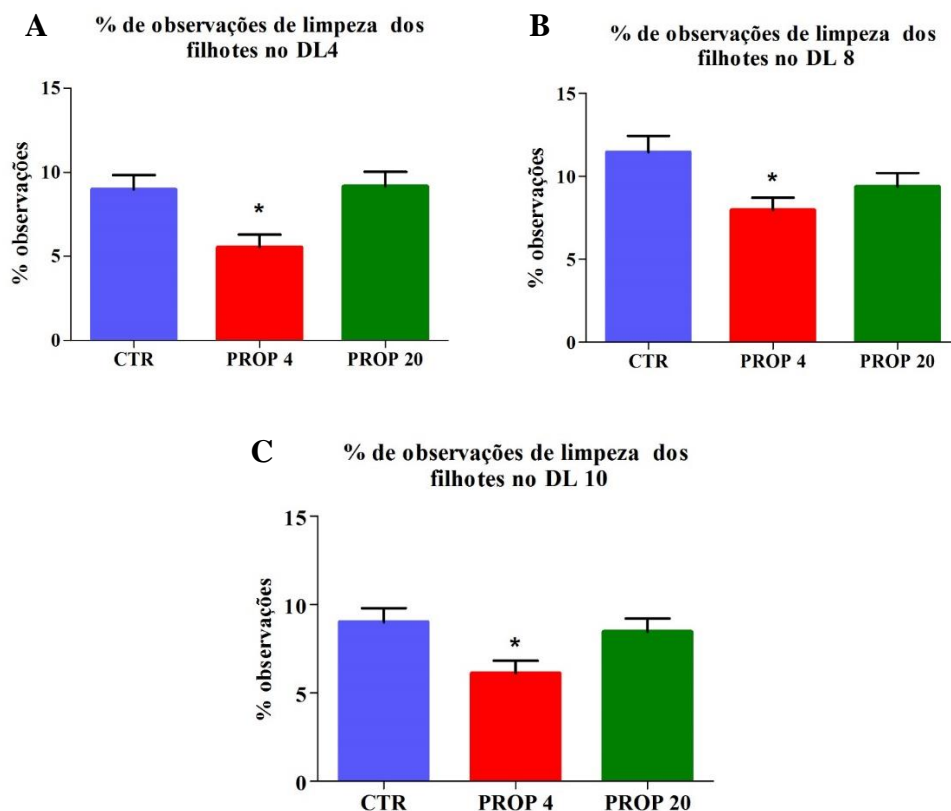
ANOVA de três vias seguida de Tukey indicou que as mães do grupo PROP 4mg/kg apresentaram uma redução na porcentagem de observação no parâmetro de limpeza dos filhotes quando comparado ao CTR ( $p < 0,05$ ) (Figura 10). Desta forma, ANOVA complementada com Bonferroni indicou diferença estatística neste parâmetro nos DL 4 (Figura 11 A), 8 (Figura 11 B) e 10 (Figura 11 C),  $p < 0,05$ .

Entretanto, os outros parâmetros do comportamento materno não foram afetados pelo tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg. (Figura 10).



**Figura 10.** Porcentagem de observações pontuadas durante o comportamento materno do DL 1 ao 10 (n=11-12/grupo). Valores estão expressos em porcentagem, \* $p < 0,05$  (comparado ao CTR)

por RMANOVA seguida de Tukey. CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.



**Figura 11.** Porcentagem de observações de limpeza dos filhotes pontuadas durante o comportamento materno do DL 4 (A), DL 8 (B) e DL 10 (C). Valores estão expressos em porcentagem, \* $p < 0,05$  (comparado ao CTR) por ANOVA seguida de Bonferroni ( $n=11-12$ /grupo). CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

#### 4.1.9. Análise de fertilidade

O teste de Kruskal-Walis não indicou alterações significativas nos parâmetros da análise de fertilidade entre os grupos PROP e o CTR, os dados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6. Teste de fertilidade das fêmeas dos diferentes grupos experimentais.**

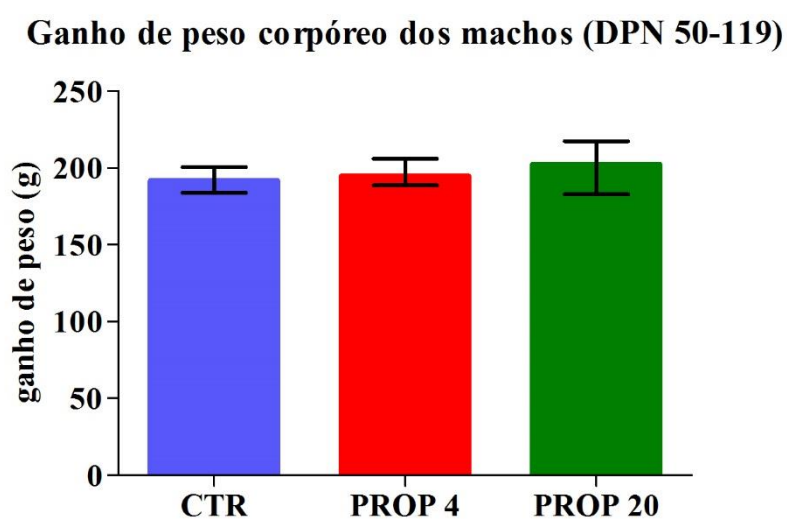
	<b>CTR [12]</b>	<b>PROP 4 [12]</b>	<b>PROP 20 [10]</b>
<b>Taxa de implantação</b>	96,7 (81,2-100,0)	93,1 (90,2-100,0)	93,3 (77,1-100,0)
<b>Taxa de perda pré- implantação</b>	3,3 (0,0-18,7)	6,9 (0,0-9,8)	6,9 (0,0-22,9)
<b>Taxa de perda pós- implantação</b>	7,1 (0,0-7,7)	2,9 (0,0-8,9)	0,0 (0,0-1,8)
<b>Taxa de viabilidade fetal</b>	92,8 (92,3-100,0)	97,0 (91,1-100,0)	100,0 (98,2-100,0)

Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em mediana (1° Quartil-3° Quartil),  $p > 0,05$  Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

## 4.2. Parâmetros analisados nos machos

### 4.2.1. Ganho de peso corpóreo

O ganho de peso corpóreo (g) não foi influenciado pelo tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg [CTR: 191,5 (183,8-200,6) n=12; PROP 4: 194,4 (188,6-206,0) n=12; PROP 20: 202,1 (182,9-217,5) n=15;  $p>0,05$ ], indicado pelo teste de Kruskal-Wallis complementado com Dunn (Figura 12).



**Figura 12.** Ganho de peso corpóreo dos machos durante o período de tratamento. Dados estão apresentados em mediana (1°-3° quartil), Kruskal-Wallis complementado com Dunn;  $p>0,05$ . CTR (n=12): grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4 (n=12): grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20 (n=15): grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

#### 4.2.2. Comportamento copulatório e preferência sexual

Em relação ao comportamento copulatório dos machos, dados apresentados na Tabela 7, o tratamento com PROP aumentou a latência para primeira ejaculação no grupo PROP 20mg/kg em relação ao CTR (ANOVA complementada com Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Entretanto não foi observada diferença estatística nos parâmetros de preferência sexual entre os grupos experimentais (Tabela 8) (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

**Tabela 7. Comportamento copulatório de ratos dos diferentes grupos experimentais.**

	<b>CTR</b>	<b>PROP 4</b>	<b>PROP 20</b>
Latência para 1 <sup>a</sup> intromissão (s)	75,0 (22,5-156,0) [9/11]	81,0 (46,0-166,0) [7/10]	142,5 (115,8-175,3) [8/12]
Nº de intromissões até 1 <sup>a</sup> ejaculação	23,90 ± 5,30 [9/11]	26,14 ± 2,90 [7/10]	31,60 ± 4,90 [8/12]
Latência para 1 <sup>a</sup> ejaculação (s)	577,20 ± 101,90 [8/11]	528,00 ± 75,30 [7/10]	1043,80 ± 146,00* [6/12]
Latência para 1 <sup>a</sup> intromissão pós-ejaculação (s)	329,60 ± 23,72 [8/11]	277,00 ± 14,40 [7/10]	309,40 ± 17,20 [5/12]
Nº de intromissões pós-ejaculação	18,0 (15,0-24,5) [8/11]	28,0 (21,0-40,0) [7/10]	18,0 (8,0-18,0) [5/12]
Nº de ejaculações	2,4 ± 0,4 [8/11]	2,6 ± 0,3 [7/10]	1,7 ± 0,3 [5/12]

Números entre colchetes indicam o número de animais que apresentaram comportamento pelo número total de animais por grupo. Dados apresentados como média ± EPM (ANOVA complementada com Bonferroni), \* $p < 0,05$  comparado ao CTR. Latência para primeira intromissão e o número de intromissões pós-ejaculação estão apresentados como mediana (1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> quartil) e foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ . CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.



**Tabela 8. Preferência sexual de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.**

	<b>CTR [11]</b>	<b>PROP 4 [10]</b>	<b>PROP 20 [12]</b>
Tempo na zona do macho (s)	238.00 (190.50 – 300.00)	217.50 (185.50 – 250.25)	249.00 (171.75 – 366.25)
Tempo na zona da fêmea (s)	589.00 (453.50 – 681.00)	683.00 (632.50 – 689.50)	636.50 (557.25 – 718.5)
Nº de visitas na zona do macho	17.00 (15.50 – 19.00)	19.00 (16.00 – 20.00)	17.00 (12.50 – 17.50)
Nº de visitas na zona da fêmea	20.00 (16.50 – 24.50)	22.00 (19.25 – 25.50)	19.500 (14.75 – 21.25)
Escore de preferência	71.83 (55.64 – 78.61)	75.87 (69.66 – 79.59)	71.63 (60.35 – 80.47)

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como mediana (1º-3º quartil) e foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com Dunn,  $p > 0,05$ . CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

#### *4.2.3 - Concentração plasmática de testosterona e estradiol, peso corporal e de órgãos reprodutivos, hipófise e fígado*

Não houve diferença estatística na concentração plasmática de testosterona (ng/ml) entre os grupos experimentais [CTR: 10,60 (6,87-35,99) / n=10; PROP 4: 6,86 (3,20-13,30) / n=10; PROP 20: 4,05 (3,76-9,96) / n=9], Kruskal-Wallis complementado com Dunn ( $p > 0,05$ ). Entretanto foi observada uma redução na concentração plasmática de estradiol (pg/ml) no grupo PROP 4mg/kg comparado ao CTR [CTR:  $21,88 \pm 1,20$  / n=9; PROP 4:  $17,11 \pm 0,87^*$  / n=9; PROP 20:  $19,90 \pm 1,63$  / n=10], ANOVA complementada com Bonferroni ( $*p < 0,05$ ).

O peso corporal e dos órgãos dos machos estão apresentados na Tabela 9. ANCOVA complementada com Bonferroni, utilizando o peso corpóreo final como covariável, indicou um aumento no peso do ducto deferente e da vesícula seminal (cheia/vazia) no grupo PROP 4mg/kg comparado ao grupo CTR ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9. Peso corporal e dos órgãos dos machos dos diferentes grupos experimentais.**

	<b>CTR [12]</b>	<b>PROP 4 [12]</b>	<b>PROP 20 [15]</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	405,40 ± 7,14	423,09 ± 7,48	426,37 ± 9,60
<b>Peso órgãos (g)</b>			
Testículo (direito)	1,59 ± 0,04	1,54 ± 0,04	1,60 ± 0,03
Ducto deferente	0,091 ± 0,004	0,109 ± 0,004*	0,099 ± 0,004
Epidídimo	0,59 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,61 ± 0,01
Próstata	0,44 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,44 ± 0,02
Vesícula seminal cheia	0,74 ± 0,02	0,90 ± 0,02*	0,80 ± 0,02
Vesícula seminal vazia	0,22 ± 0,01	0,27 ± 0,01*	0,25 ± 0,01
Hipófise	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,010 ± 0,001
Fígado	15,24 ± 0,35	15,33 ± 0,34	15,54 ± 0,31

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, peso corporal foi comparado por ANOVA complementado com Bonferroni e o peso de órgãos foi comparado por ANCOVA com peso do corporal como covariável (\*p<0,05 comparado ao CTR). CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

### 4.2.3 Parâmetros espermáticos

Os resultados da contagem e morfologia espermática estão apresentados na Tabela 10. O tratamento com PROP, nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg, não afetou os parâmetros avaliados na contagem. No entanto, houve um aumento na porcentagem de espermatozoides com anormalidades de cauda nos animais do grupo PROP 4mg/kg quando comparado ao grupo CTR (Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 10. Parâmetros espermáticos dos machos.**

Parâmetros	CTR [10]	PROP 4 [10]	PROP 20 [12]
Nº de espermátides ( $10^6$ /testículo)	155,00 ± 7,64	166,90 ± 7,44	172,03 ± 7,28
Nº de espermátides ( $10^6$ /g/testículo)	99,91 ± 5,32	106,27 ± 5,14	106,52 ± 4,72
Produção espermática diária	25,49 ± 1,25	27,36 ± 1,22	28,20 ± 1,19
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo ( $10^6$ /órgão)	110,36 ± 10,26	93,48 ± 6,43	102,44 ± 7,68
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo ( $10^6$ /g/órgão)	404,2 (337,9-449,2)	355,7 (324,0-387,3)	377,9 (309,8-480,1)
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo ( $10^6$ /órgão)	214,00 ± 8,60	210,23 ± 14,47	203,82 ± 15,75
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo ( $10^6$ /g/órgão)	930,91 ± 73,90	851,15 ± 46,21	827,75 ± 38,14
Tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo do epidídimo (dias)	4,43 ± 0,44	3,48 ± 0,28	3,66 ± 0,27
Tempo de trânsito espermático na cauda (dias)	8,00 ± 0,23	7,81 ± 0,65	7,25 ± 0,55
Espermatozoides com cabeça anormal	23,15 (16,80-33,51) [13]	32,62 (17,07-47,67) [14]	26,32 (18,96-36,57) [15]
Espermatozoides com cauda anormal	5,37 (3,33-6,76) [13]	11,65* (5,77-20,52) [14]	9,39 (4,90-14,50) [15]

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM e mediana (1º-3º quartil). \* $p < 0,05$  comparado com o CTR (Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn). CTR: grupo controle tratado com óleo de milho; PROP 4: grupo tratado com Propiconazol 4mg/kg; PROP 20: grupo tratado com Propiconazol 20 mg/kg.

#### 4.2.4. Parâmetros histomorfométricos de testículo

Os volumes dos componentes do parênquima testicular dos machos estão apresentados na Tabela 11. ANOVA não indicou diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p>0,05$ ).

**Tabela 11. Composição volumétrica e parâmetros morfométricos do parênquima testicular de ratos dos diferentes grupos experimentais.**

	<b>CTR [9]</b>	<b>PROP 4 [9]</b>	<b>PROP 20 [8]</b>
Volume testicular (ml)	1,46 ± 0,03	1,47 ± 0,02	1,50 ± 0,03
Volume do tecido intersticial (ml)	0,56 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,60 ± 0,02
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	0,89 ± 0,02	0,91 ± 0,02	0,89 ± 0,02
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	267,64 ± 6,29	269,52 ± 5,43	263,74 ± 6,88
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	16,3 ± 0,85	16,16 ± 0,65	16,72 ± 1,04

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

## 5. Discussão

O PROP é um agrotóxico extensivamente utilizado na agricultura, desta forma, a população vem sendo exposta a esse composto que possui potenciais efeitos desreguladores endócrinos (GOETZ et al., 2007; SUN et al., 2007). Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do PROP nas funções reprodutivas de ratos machos e fêmeas na idade adulta.

Em estudos que visam avaliar a toxicidade reprodutiva de xenobióticos, é crítico que se avalie mudanças no peso corporal assim como sinais de toxicidade geral, uma vez que a presença de uma substância tóxica pode interferir no padrão de crescimento de um animal (JOHNSON, 1981). No presente estudo, o tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg, do DPN 50 ao 95-105, não afetou o ganho de peso das fêmeas, resultado também observado em ratas tratadas com doses de 10, 50 e 240mg/kg, durante o período de vida intrauterino até a idade adulta (ROCKETT et al., 2006). Sendo assim, sugerimos que o tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg não foram tóxicas ao organismo uma vez que não foram observados sinais de toxicidade (lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores).

O ciclo estral de ratas tem duração de 4 a 5 dias, e é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (MARCONDES et al., 2002). No ciclo de 4 dias: são 2 dias de metaestro/diestro seguidos por um dia de proestro, e um dia de estro; já no ciclo de 5 dias: 3 dias de metaestro/diestro, um dia de proestro e 1 dia de estro, ou 2 dias de metaestro/diestro, 1 dia de proestro e 2 dias de estro (GOLDMAN et al., 2005). Ciclos que diferem desses padrões geralmente se enquadram na categoria de prolongado ou anormal (GOLDMAN et al., 2005). No presente estudo, o tratamento com PROP nas diferentes doses não alterou a ciclicidade e a duração de cada fase, embora um estudo de Rockett et al. (2006) tenha demonstrado que ratas tratadas com doses maiores (50 e

240mg/kg) e por um tempo maior, desde o período intrauterino até a idade adulta, apresentaram uma alteração na ciclicidade. Sendo assim pode-se sugerir que a diferença das doses e dos períodos de tratamento poderiam justificar a diferença nos resultados obtidos.

O peso de órgãos está frequentemente associado com a toxicidade de uma droga (SELLERS et al., 2007). Há indicativos que tratamento com PROP possa promover mudanças no perfil dos hormônios sexuais, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram uma atividade antiestrogênica (KJÆRSTAD et al., 2010; TAXVIG et al, 2013), podendo comprometer o peso de órgãos hormônio dependentes. Entretanto no presente estudo, o peso dos órgãos hormônio dependentes (útero e ovário), hipófise e fígado não foram alterados, bem como os níveis plasmáticos de estradiol nos grupos tratados com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg. Dados na literatura demonstram que o tratamento de ratas, com doses maiores (50 e 240mg/kg) não alteraram o peso dos órgãos reprodutivos, no entanto, houve um aumento significativo no peso do fígado (ROCKETT et al., 2006) o que pode estar relacionado com uma maior dose e conseqüentemente uma maior toxicidade. Assim, sugere-se que as doses utilizadas nesse estudo não comprometeram os níveis hormonais e não alteraram o peso dos órgãos analisados. Com relação à quantificação folicular ovariana e análise morfométrica uterina, o tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg reduziu a espessura do epitélio luminal em comparação ao grupo CTR. O epitélio luminal é a camada uterina mais interna, composta por células cilíndricas. Sabe-se que os ERs estão presentes neste epitélio (SAUNDERS, 1997), porém não há dados na literatura evidenciando as possíveis causas para a redução do mesmo. Acredita-se que a diminuição da espessura do epitélio luminal não traga grandes prejuízos à fertilidade das ratas, uma vez que não foi identificado no presente estudo redução da fertilidade das

ratas tratadas com PROP. Entretanto, esse resultado demonstra a necessidade de mais experimentos a fim de avaliar os mecanismos pelos quais o tratamento com PROP reduz a espessura dessa camada uterina.

O comportamento sexual de fêmeas é regulado através da integração do sistema nervoso central, da informação hormonal e estímulos sensoriais, tátil e olfatório (MICEVYCH & DEWING, 2011). Existem três elementos do comportamento sexual: atratividade, proceptividade e receptividade (BEACH, 1976a). Segundo Beach (1976a), a atratividade é o comportamento que estimula a resposta sexual do macho, dentre eles estão comportamentos como o de mexer a orelha e saltar (BLAUSTEIN, 2008). A proceptividade é o comportamento que estimula o macho a estabelecer ou manter a interação sexual. As demonstrações mais comuns da proceptividade: aproximação da fêmea (a fêmea se aproxima do macho assumindo comportamento de convite, dependendo da espécie), alternar entre abordagem e retirada (fêmea aborda o macho e se retira); outro é o da monta realizada pela fêmea (a fêmea monta no macho e executa movimentos pélvicos) (BEACH, 1976a). A receptividade é necessária para a ocorrência da transferência de esperma do macho para fêmea (BLAUSTEIN, 2008). O estrógeno controla primariamente a atratividade e receptividade, já a proceptividade é aumentada quando adicionado um estímulo androgênico (BEACH, 1976a). A receptividade sexual pode ser quantificada através do coeficiente de lordose e mensurada através de seu grau, quanto maior o grau de lordose apresentado pelo animal, maior a sua receptividade. No presente estudo não foi observada alterações nos parâmetros avaliados do comportamento sexual das ratas, o que está de acordo com a normalidade dos níveis plasmáticos de estrógeno obtidos.

A avaliação da toxicidade materna é fundamental em estudos de toxicidade reprodutiva. Uns dos principais indicadores não-invasivos são o ganho de peso corpóreo

e o consumo de ração (BACCHI et al., 2013). O tratamento com PROP, em ambas as doses, não alterou o peso corporal, bem como o consumo de ração das ratas durante o período de gestação e lactação, assim como, não houve comprometimento da fertilidade. Esses resultados estão em concordância com estudo prévio de Taxvig et al. (2008), em que ratas prenhas tratadas com PROP na dose de 50mg/kg não apresentaram alterações no peso corpóreo e na taxa de fertilidade.

O comportamento materno em ratos é dependente de mudanças hormonais no final da gestação que incluem elevações nos níveis de estradiol (MOLTZ et al., 1970) e o aumento concomitante dos ERs nas regiões do cérebro, tais como a área pré-óptica medial (GIORDANO et al., 1989). O efeito estrogênico é importante para outros mediadores do comportamento materno, como a prolactina e oxitocina (BRIDGES, 1996; PEDERSEN, 1997). Como este comportamento é hormônio-dependente e dados da literatura indicam uma possível ação do PROP como DEs, o presente estudo teve como objetivo avaliar também o comportamento materno, uma vez que em mamíferos a relação estabelecida com mãe e filhote é importante para o desenvolvimento físico e psicológico da prole (WALKER et al., 2004). No entanto, apenas o comportamento de limpeza dos filhotes foi alterado na dose de 4mg/kg. Este parâmetro do comportamento materno é motivacional, sendo assim duas hipóteses poderiam explicar as alterações observadas no comportamento materno: a) um efeito antiestrogênico do PROP na dose de 4mg/kg sobre a fisiologia do sistema neuroendócrino, ou b) uma alteração do comportamento e desenvolvimento do filhote, que resultaria em um diferente estímulo inicial e manutenção do comportamento materno, durante a lactação. Entretanto, para realmente correlacioná-lo com o tratamento com PROP, outros testes mais específicos devem ser realizados no intuito de se verificar se a qualidade e quantidade desse

comportamento tem um impacto substancial sobre aspectos comportamentais, endócrinos e do desenvolvimento neural dos filhotes (KAFFMAN et al., 2007).

Em relação aos machos, no presente estudo, o tratamento com diferentes doses PROP não afetou o ganho de peso dos animais, assim como nas fêmeas. Todavia, foi observada uma diminuição do peso corpóreo em ratos tratados por um período e dose maior (250mg/kg) (GOETZ et al., 2007), como a alteração de peso corpóreo foi observada apenas com uma dose superior as utilizadas neste estudo, acredita-se que o tratamento com PROP nas doses de 4mg/kg e 20mg/kg não foram tóxicas aos animais, já que não foram observados sinais de toxicidade.

Embora o peso corporal não tenha sido alterado, o tratamento aumentou o peso da vesícula seminal (cheia/vazia) e do ducto deferente. As vesículas seminais secretam um líquido no ducto ejaculatório que contém frutose, ácido cítrico e outras substâncias nutritivas, bem como prostaglandinas e fibrinogênio. Já o ducto deferente, armazena a maioria dos espermatozoides produzidos, transfere os espermatozoides para uretra, secreta de fluidos para facilitar o transporte e possivelmente é responsável pela reabsorção dos espermatozoides remanescentes do lúmen (KOSLOV & ANDERSSON, 2013). Bioensaios em camundongos utilizam o crescimento da vesícula seminal como indicador de atividade antiestrogênica (SKARDA & KÖHLEROVÁ, 2006). Neste sentido, é sugerido no presente estudo que o PROP possa ter uma atividade antiestrogênica, por inibição da aromatase, uma vez que em um ensaio com células de câncer de mama MCF-7 com expressão de aromatase, o PROP apresentou um efeito antiestrogênico (KJÆRSTAD et al., 2010). Reforçando nossa hipótese, os níveis de testosterona não foram alterados, no entanto, houve uma redução nos níveis de estrógeno nos machos tratados com a dose de 4mg/kg. Outra hipótese é uma possível alteração na contratilidade/excitabilidade da musculatura lisa desses órgãos, uma vez

que o status hormonal influencia nas respostas da musculatura lisa (MARTINS & VALLE, 1939; WILCKE, 1937). Picarelli & Valle (1969) demonstrou que a presença de estrógeno pode facilitar a interação entre as drogas simpatomiméticas e parassimpatomiméticas e seus receptores na musculatura lisa genital de machos. Sendo assim, este estudo sugere que uma baixa atividade estrogênica poderia comprometer o mecanismo contratilidade e excitabilidade, e conseqüentemente aumentam a quantidade o fluido da vesícula seminal e do ducto deferente. Por fim, a terceira hipótese seria uma alteração das células epiteliais desses órgãos, uma vez que estudos demonstraram que as ações de estrógenos sobre a próstata alteram a proliferação celular (COWIN et al., 2007). No entanto, estudos complementares são necessários para entender o mecanismo envolvido.

Além dos andrógenos, os testículos também são fonte de estrógeno e seu nível intratesticular pode ser maior do que no plasma de fêmeas adultas (HESS, 2000; CARREAU, 2001). Embora o papel dos andrógenos no sistema reprodutor masculino seja bem caracterizado, o papel dos estrógenos nos machos não é muito compreendido. Os dois tipos de ER nucleares, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , são encontrados ao longo dos órgãos do trato reprodutivo dos ratos. Estudos com imunoreagentes demonstraram que os ER $\alpha$  estão localizados em poucos tipos celulares, em contrapartida ER $\beta$  é extensivamente expresso ao longo do trato genital e glândulas acessórias de ratos (YAMASHITA, 2004; HESS et al., 1997). Foi reportada a presença de ER $\alpha$ , mas predominantemente ER $\beta$  nas células envolvidas no processo de espermatogênese de roedores (SAUNDERS et al., 1998; VAN PELT et al., 1999). Nossos resultados mostraram que o tratamento com PROP na dose de 4mg/kg alterou a morfologia espermática (aumento da anormalidade de cauda dos espermatozoides) e poderia estar relacionado com uma atividade antiestrogênica, considerando que a maioria das células envolvidas na espermatogênese

no testículo tem ER. Adicionalmente, a espermiogênese, o processo de maturação do espermatozoide e a motilidade espermática são dependentes da alta concentração de estrógeno (STOCCO, 2002). Entretanto, Goetz et al. (2007) demonstrou que o tratamento com PROP nas doses de 100, 500, 2500 ppm (aproximadamente 10, 50 e 240mg/kg/dia) não alterou a morfologia espermática. A divergência entre os resultados pode estar relacionada com os diferentes pontos de coleta dos espermatozoides, uma vez que os pesquisadores coletaram o conteúdo da cauda do epidídimo e nesse estudo foi coletado do ducto deferente. Além disso, a alteração na morfologia espermática também pode estar relacionada com uma alteração na contratilidade do ducto como sugerido anteriormente.

No entanto, apesar do testículo ser uma fonte de estrógeno, a histologia deste órgão não foi afetada pelo tratamento com PROP. Esses resultados também foram observados por Goetz et al. (2007), com doses superiores as utilizadas neste estudo.

O comportamento sexual masculino depende do funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Dentre muitas espécies de vertebrados, esse comportamento é ativado pela testosterona mas também requer atividade estrogênica (NAFTOLIN et al., 1975), uma vez que a administração sistêmica de antiandrogênicos, antiestrogênicos e inibidores de aromatase reduz o comportamento sexual (ROSELLI & RESKO, 1997). No presente estudo, machos tratados com PROP na dose de 20mg/kg apresentaram um aumento na latência para primeira ejaculação. Embora não tenha sido observada uma diferença estatística nos níveis de testosterona entre os grupos, os animais tratados com PROP 20mg/kg apresentaram menores níveis de testosterona, o que pode ter comprometido o comportamento copulatório. Já em relação ao teste de preferência sexual, o tratamento com PROP não alterou os parâmetros analisados.

Os DEs podem apresentar uma curva dose-resposta não-monotônica (CDRNM), onde há um aumento da resposta na menor dose e uma diminuição da resposta na maior dose (CONOLLY & LUTZ, 2004), o que poderia explicar os diferentes padrões de resposta entre o PROP 4mg/kg e 20mg/kg. CDRNM pode estar relacionada a diversos mecanismos desencadeados pelos DEs, incluindo diferentes expressões de ER ou afinidade a receptores diferentes (VANDENBERG et al., 2012). Sabe-se que o ER $\beta$  é mais expresso ao longo do trato genital masculino (YAMASHITA, 2004) e o ER $\alpha$  é predominante no hipotálamo e controla a reprodução de roedores (FAN et al., 2010).

Uma vez que os níveis de estradiol se mostraram reduzidos nos machos tratados com PROP 4, sugere-se que o PROP tenha uma atividade antiestrogênica pela inibição da enzima aromatase *in vivo*. A aromatase é amplamente expressada nos ovários, cérebro, placenta, tecido adiposo, bem como nos testículos e espermatozoides de muitas espécies (CARREAU et al., 2011). Embora as regiões do cérebro que expressam essa enzima sejam similares em ambos os sexos, existem diferenças importantes em seus níveis de expressão (STANIC et al., 2014). Em várias regiões cerebrais de camundongos foram observadas uma maior atividade da aromatase em machos do que em fêmeas, e ainda em suínos essa atividade é quatro vezes maior no hipotálamo do macho pós-puberdade do que no das fêmeas (STANIC et al., 2014; CORBIN et al., 2009). Sendo assim, a atividade da aromatase pode ser variável entre os gêneros e a possível ação do PROP como inibidor da aromatase, poderiam indicar que os efeitos do estrógeno são mais proeminentes nos machos do que fêmeas. Entretanto, a escassez de estudos na literatura restringe essa discussão.

Neste estudo, os diferentes padrões de resposta entre os grupos PROP não esclarecem quais mecanismos poderiam estar envolvidos e os nossos resultados ressaltam a necessidade de mais pesquisas para entender os mecanismos envolvidos.

## 6. Conclusão

Este trabalho demonstrou que o tratamento com PROP durante a vida adulta interferiu em fêmeas: na histologia uterina e no comportamento materno de ratas, observado pela redução do epitélio luminal uterino em ambas as doses e a diminuição do comportamento de limpeza dos filhotes. Em relação aos machos, o tratamento com PROP levou a um aumento do peso da vesícula seminal (cheia/vazia), ducto deferente, da anormalidade de cauda dos espermatozoides e diminuiu os níveis plasmáticos de estradiol. Assim como alterou o comportamento copulatório dos machos. Sugere-se que o tratamento com PROP tenha um efeito desregulador endócrino, e conseqüentemente pode causar danos ao aparelho reprodutor. Logo, destaca-se a necessidade de mais estudos, uma vez que a população é continuamente exposta a esta substância.

## 7. Referências

1. 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 2012.
2. AGMO, A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. *Behavior Neuroscience*. v. 117, n. 1, p. 55-68, 2003.
3. 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.
4. AXMON, A.; RYLANDER, L.; STRÖMBERG, U.; HAGMAR, L. Altered menstrual cycles in women with a high dietary intake of persistent organochlorine compounds. *Chemosphere*. v. 56, n. 8, p. 813-819, 2004.
5. 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. 782-789, 2013.
6. BEACH, A. Sexual Attractivity, Proceptivity, and Receptivity in Female Mammals. *Hormones and Behavior*. v.7, p.105-138,1976a.
7. 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. 807-808, 1976b.
8. BLAUSTEIN, J. D. Neuroendocrine regulation of feminine sexual behavior: lessons from rodent models and thoughts about humans. *Annual Review of Psychology*. v. 59, p.93-118, 2008.
9. BRIDGES, R.S. Biochemical basis of parental behavior in the rat. *Advances in the Study of Behavior*. v. 25, p. 215-242, 1996.
10. CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R.M.; AUGUSTO, L.G.S.; RIZZOLO, A.; et al. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos

agrotóxicos na saúde. Parte 1 -Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro, 2012.

11. CARREAU, S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 178, p. 65-72, 2001.
12. CARREAU, S.; BOIS, C.; ZANATTA, L.; SILVA, F.R.M.B.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sciences*. v. 89, p. 584-587, 2011.
13. CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A.; MEANEY, M. J. 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.
14. CONOLLY, R.B.; LUTZ, W.K. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences*. v. 77, p. 151-157, 2004.
15. CORBIN, C.J.; BERGER, T.; FORD, J.J.; ROSELLI, C.E.; SIENKIEWICZ, W.; et al. Porcine hypothalamic aromatase cytochrome P450: isoform characterization, sex dependent activity, regional expression, and regulation by enzyme inhibition in neonatal boars. *Biology of Reproduction*. v. 81, p. 388-395, 2009.
16. COSTA, E.M.; SPRITZER, P.M.; HOHL, A.; BACHEGA, T.A.S.S. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. v. 58, n. 2, p. 153-161, 2014.
17. COWIN, P.A.; FOSTER, P.M.D.; RISBRIDGER, G.P. Endocrine Disruption in the Male. In: GORE, A.C. *Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice*. Totowa: Humana Press Inc., p. 33-62, 2007.
18. CRAIG, Z.R.; WANG, W.; FLAWS, J.A. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction*. v.142, p. 633-646, 2011.
19. DENT, M.P. Strengths and limitations of using repeat-dose toxicity studies to predict effects on fertility. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 48, p. 241-258, 2007.

20. DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens wahrend der postnatalen entwicklug. *Monaths Veterinary Medicine*. v. 29, p. 650–2, 1974.
21. FAN, X.; XU, H.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. Chapter 13 – ER $\beta$  in CNS: New Roles in Development and Function. *Progress in Brain Research*. v. 181, p. 233-250, 2010.
22. FARR, S.L.; COOPER, G.S.; CAI, J.; SAVITZ, D.A.; SANDLER, D.P. Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*. v. 160, n. 12, p. 1194-1204, 2004.
23. 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.
24. FERNANDES, G.S.A.; ARENA, A.C.; FERNANDEZ, C.D.; MERCADANTE, A.; BARBISAN, L.F.; KEMPINAS, W.G. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*. v. 23, n. 1, p.106-112, 2007.
25. FILLER, R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: Chapin RE, Heindel JH, editors. *Male reproductive toxicology*. San Diego, California: Academic Press; p. 334-343, 1993.
26. FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis morphometry, seminiferous epithelium, cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Feliscatus*). *Biology of Reproduction*. v. 68, n. 5, p. 1554–61, 2003.
27. GERARDIN, D.C.C; BERNARDI, M.M.; MOREIRA, E.G.; PEREIRA, O.C.M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. v. 83, n. 4, p. 618-623, 2006.
28. GIAVINI, E.; MEN'EGOLA, E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? *Toxicology Letters*. v. 198, n. 2, p. 106-111, 2010.
29. GIORDANO, A.L.; SIEGEL, H.I.; ROSENBLATT, J.S. Nuclear estrogen receptor binding in the preoptic area and hypothalamus of pregnancy-terminated rats: correlation with the onset of maternal behavior. *Neuroendocrinology*. v.50, p.248-258, 1989.
30. GOETZ, A.K.; REN, H.; SCHMID, J.E.; BLYSTONE, R.C.; THILLAINADARAJAH, I.; et al. Disruption of Testosterone Homeostasis as a

- Mode of Action for the Reproductive Toxicity of Triazole Fungicides in the Male Rat. *Toxicological Sciences*. v. 95, n. 1, p. 227-239, 2007.
31. GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. Evaluations of rodent vaginal cytology in toxicological studies of female reproductive biology. In: Chapin, R.; Davis, B. editors. *Female Reproductive Toxicology*. Washington, DC: ILSI Press; 2005.
  32. 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.
  33. HEALTH CARE WITHOUT HARM (HCWH). Aggregate exposure to phthalates in humans, 2002. Disponível online em [http://www.noharm.org/library/docs/Phtalate\\_Report.pdf](http://www.noharm.org/library/docs/Phtalate_Report.pdf). Acesso em:
  34. HESS, R.A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Reviews of Reproduction*. v. 5, p. 84-92, 2000.
  35. HESS, R.A.; GIST, D.H.; BUNICK, D.; LUBAHN, D.B.; FARRELL, A.; BAHR, J.; et al. Estrogen receptor ( $\alpha$  &  $\beta$ ) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of Andrology*. v. 18, p. 602–611, 1997.
  36. HESTER, S.; MOORE, T.; PADGETT, W.T.; MURPHY, L.; WOOD, C.E.; NESNOW, S. The hepatocarcinogenic conazoles: cyproconazole, epoxiconazole, and propiconazole induce a common set of toxicological and transcriptional responses. *Toxicological Sciences*. v. 127, n. 1, p. 54-65, 2012.
  37. HIRSCH, K.S.; ADAMS, E.R.; HOFFMAN, D.G.; MARKHAM, J.K.; OWEN, N.V. Studies to elucidate the mechanism of fenarimol induced infertility in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 86, n. 3, p. 391-399, 1986.
  38. HIRSCH, K.S.; WEAVER, D.E.; BLACK, L.J.; FALCONE, J.F.; MACLUSKY, N.J. Inhibition of central nervous system aromatase activity: A mechanism for fenarimol induced infertility in the male rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 91, n. 2, p. 235-245, 1987.
  39. INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (INCHEM). Pesticide residues in food: evaluations Part II Toxicology 1987. Available at <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v87pr13.htm> [Accessed May 22, 2014].
  40. JOHNSON, A.M. Analysis of animal weight gains in chronic toxicity studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. v. 7, p. 307–316, 1981.

41. KAFFMAN, A.; MEANEY, M.J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. v. 48, n. 3-4, p. 224-244, 2007.
42. KJÆRSTAD, M.B.; TAXVIG, C.; NELLEMAN, C.; VINGGAARD, A.M.; ANDERSEN, H.R. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reproductive Toxicology*. v. 30, n. 4, p. 73-82, 2010.
43. KOSLOV, D.S.; ANDERSSON, K.E. Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens an update. *Frontiers in Pharmacology*. v. 4, n. 101, p. 1-7.
44. MANTOVANI, A. Hazard identification and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to development effects. *Toxicology*. v. 181, p. 367-370, 2002.
45. MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.
46. MARTINS, T.; VALLE, J.R. Endocrine control of the motility of the male accessory genital organs. *Endocrinology*. v. 25, p. 80-90, 1939.
47. MENEGOLA, E.; BROCCIA, M.L.; DI RENZO, F.; MASSA, V.; GIAVINI, E. Study on the common teratogenic pathway elicited by the fungicides triazole derivatives. *Toxicology In Vitro*. v.19, n.6, p.737-748, 2005.
48. MICEVYCH, P. E.; DEWING, P. Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Frontiers in Endocrinology*. v. 2, p. 1-9, 2011.
49. MOLTZ, H.; LUBIN, M., LEON, M.; NUMAN. M. Hormonal Induction of Maternal Behavior in the Ovariectomized Nulliparous Rat. *Physiology & Behavior*. v. 5, p. 1373-1377, 1970.
50. NAFTOLIN, F.; RYAN, K.J.; DAVIES, I.J.; REDDY, V.V.; FLORES, F.; PETRO, Z.; et al. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Progress in Hormone Research*. v. 31, p. 295-319, 1975.
51. NAROTSKY, M.G.; KAVLOCK, R.J. A multidisciplinary approach to toxicological screening: II Developmental toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. v.45, n.2, p. 145-171, 1995.
52. OECD/OCDE (Organization for Economic Co-operation and Development).Guideline for testing of chemicals 416: Two-Generation Reproduction Toxicity Study 2001.

53. PEDERSEN C.A. Oxytocin control of maternal behavior. Regulation by sex steroids and offspring stimuli. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 807, p.126–145, 1997.
54. 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. 555-557, 1968.
55. PERRY, M.; VENNERS, S.; BARR, D.; et al. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. *Reproductive Toxicology*. v. 23, p. 113-118, 2007.
56. PICARELLI, Z.P.; VALLE, J.R. Hormonal regulation of rat seminal vesicle sensitivity to adrenaline, noradrenaline, acetylcholine and acetyl-H-methylcholine. *British Journal of Pharmacology*. v.35, p. 468-475, 1969.
57. PLOWCHALCH, D.R.; SMITH, B.J.; MATTISON, C.R. Assessment of toxicity to the ovary using follicle quantitation and morphometrics. In: HEINDEL, K.; CHAPLIN, R.E. (Eds.) *Methods in Toxicology. Female Reproductive Toxicology*. New York: Academic Press Inc., p. 57-68, 1993.
58. 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.
59. 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.
60. ROCKETT, J.C.; NAROTSKY, M.G.; THOMPSON, K.E.; THILLAINADARAJAH, I.; BLYSTONE, C.R.; GOETZ, A.K.; et al. Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. *Reproductive Toxicology*. v. 22, n. 4, p. 647-658, 2006.
61. ROSELLI, C.E.; RESKO, J.A. Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 61, n. 3-6, p. 365-374, 1997.
62. SANDERSON, J.T.; BOERMA, J.; LANSBERGEN, G.W.; VAN DEN BERG, M. 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.

63. SAUNDERS, P.T.K.; FISHER, J.S.; SHARPE, R.M.; MILLAR, M.R. Expression of oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *Journal of Endocrinology*. v. 156, p. R13–R17, 1998.
64. SAUNDERS, P.T.K.; MAGUIRE, S.M.; GAUGHAN, J.; MILLAR, M.R. Expression of oestrogen receptor beta (ER-beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *Journal of Endocrinology*. v.154, p. 13-16, 1997.
65. SCHURMEYER, T.; NIESCHLAG, E. Effect of ketoconazole and other imidazole fungicides on testosterone biosynthesis. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*. v.105, n.2, p.275–280, 1984.
66. SEED, J.; CHAPI, R.E.; CLEGG, E.D.; DOSTAL, L.A.; FOOTE, R.E.; HURTT, M.E.; KLINEFELTER, G.R.; et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology*. v. 10, n. 3, p. 237-244, 1996.
67. SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic Pathology*. v. 35, n. 5, p. 751–5, 2007.
68. SKARDA, J.; KÖHLEROVÁ, E. Mouse Bioassay for in vivo Screening of Oestrogen and Progesterone Antagonists. *Journal of Veterinary Medicine*. v. 53, p. 145-153, 2006.
69. SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F., LUCHINI, L. C., & ANDRÉA, M. M. de. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. *Embrapa Meio Ambiente*, p. 1-29, 2004.
70. STANIC, D.; DUBOIS, S.; CHUA, H.K.; TONGE, B.; RINEHART, N.; et al. Characterization of Aromatase Expression in the Adult Male and Female Mouse Brain. *PLoS ONE*. v. 9, n. 3, p. 1-22, 2014.
71. STOCCO, C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids*. v. 77, n. 1-2, p. 27–35, 2012.
72. SUN, G.; GRINDSTAFF, R.D.; THAI, S.F.; LAMBERT, G.R.; TULLY, D.B.; DIX, D.J.; NESNOW, S. Induction of cytochrome P450 enzymes in rat liver by two conazoles, myclobutanil and triadimefon. *Xenobiotica*. v. 37, p. 180-193, 2007.

73. TAXVIG, C.; HADRUP, N.; BOBERG, J.; AXELSTAD, M.; BOSSI, R.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C.; VINGGAARD, A. M. In vitro-in vivo correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 272, p. 757–766, 2013.
74. TAXVIG, C.; HASS, U.; AXELSTAD, M.; DALGAARD, M.; BOBERG, J.; ANDEASEN, H.R.; VINGGAARD, A.M. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sciences*. v. 100, n. 2, p. 464-473, 2007.
75. TAXVIG, C.; VINGGAARD, A.M.; HASS, U.; AXELSTAD, M.; METZDORFF, S.; NELLEMAN, C. Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *International Journal of Andrology*. v, 31, n. 2, p. 170-7, 2008.
76. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. Washington, DC: Office of Research and Development, EPA/630/R-96/012, 1997.
77. VAN PELT, A.M.M.; DE ROOIJ, D.G.; VAN DER BURG, B.; VAN DER SAAG, P.T.; GUSTAFSSON, J.A.; KUIPER, G.G.J.M. Ontogeny of estrogen receptor- B expression in rat testis. *Endocrinology*. v. 140, p. 478–483, 1999.
78. 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.
79. VINGGAARD, A.M.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V.; LARSEN, J.C. Screening of Selected Pesticides for Inhibition of CYP19 Aromatase Activity In Vitro. *Toxicology in Vitro*. v, 14, n. 3, p. 227-234, 2000.
80. WALKER, C.; DESCHAMPS, S.; PROULX, K.; TU, M.; SALZMAN, C.; WOODSIDE, B.; LUPIEN, S.; GALLO-PAYET, N.; RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Journal of Psychiatry Neuroscience*. v. 29, p. 364–382, 2004.
81. WARING, R.H.; HARRIS, R.M. Endocrine disrupters: a human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 244, n.1-2, p. 2–9. , 2005.

82. WILCKE, J. The mobility of the seminal vesicle under the influence of hormones. *Acta Brevia Neerl Physiol Pharmacol Microbiol E A.* v. 7 p. 122-123, 1937.
83. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva: World Health Organization; 2002.
84. YAMASHITA, S. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *The anatomical record.* v. 279, p. 768–778, 2004.
85. 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, p. 255–261, 2003.