



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ANA CAMILA FERREIRA DE MENEZES

**EXPOSIÇÃO MATERNA ORAL AO CYANTRANILIPROLE DURANTE
OS PERÍODOS GESTACIONAL E LACTACIONAL ALTERA O
SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E MASCULINO DA PROLE
PÚBERE E ADULTA DE RATOS Wistar**

Londrina
2024

ANA CAMILA FERREIRA DE MENEZES

**EXPOSIÇÃO MATERNA ORAL AO CYANTRANILIPROLE
DURANTE OS PERÍODOS GESTACIONAL E LACTACIONAL
ALTERA O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E MASCULINO
DA PROLE PÚBERE E ADULTA DE RATOS Wistar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa Dra Glauro Scantamburlo Alves Fernandes

Londrina
2024

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

Menezes, Ana Camila Ferreira de.

Exposição uterina e lactacional ao cyantraniliprole altera o sistema reprodutor feminino e masculino da prole púber e adulta de ratas Wistar / Ana Camila Ferreira de Menezes. - Londrina, 2024.
90 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Coorientador: Daniela Cristina Ceccato Gerardim.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2024.

Inclui bibliografia.

1. toxicologia do desenvolvimento - Tese. 2. gestação - Tese. 3. agrotóxicos - Tese. 4. sistema reprodutor - Tese. I. Fernandes, Glaura Scantamburlo Alves. II. Gerardim, Daniela Cristina Ceccato. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

ANA CAMILA FERREIRA DE MENEZES

**EXPOSIÇÃO MATERNA ORAL AO CYANTRANILIPROLE
DURANTE OS PERÍODOS GESTACIONAL E LACTACIONAL
ALTERA O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E MASCULINO
DA PROLE PÚBERE E ADULTA DE RATOS Wistar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa Dra Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

BANCA EXAMINADORA

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

Profa Dra Graziela Scaliani Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa Dra Marina Trevizan Guerra
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

Profa Dra Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de janeiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, que contribuiu de diversas formas para que eu pudesse alcançar mais esse objetivo. Meu marido Augusto, que não mediu esforços para que eu pudesse fazer meu doutorado, além de sempre me encorajar, me animar quando eu precisava e caminhar sempre de mãos dadas comigo para dividir os fardos. Meus pais, Pedro e Cibele, que sempre priorizaram a minha educação, fazendo sempre do possível e impossível para que eu pudesse continuar aqui, proporcionando até ajuda como babá sempre que precisei. Meu irmão, Pedro, que atuou como meu agente de T.I. por muitas vezes e ajudou a tornar a caminhada leve. Agradeço também ao meu filho, Artur, que embora muitas vezes tenha tornado tudo mais difícil, se tornou minha principal razão para continuar.

Não poderia deixar de agradecer a professora Glaura, que acreditou em mim e me aceitou como aluna. Ela que sempre foi muito mais do que uma orientadora, foi uma mãe científica, uma amiga nas horas difíceis. Agradeço pelo seu apoio, sua orientação, os conhecimentos compartilhados, a compreensão e o carinho dispensados pelo caminho.

Agradeço também a todas as minhas parceiras de laboratório, que sempre me ajudaram e me ensinaram quando foi preciso. Muitas delas que dividiram comigo o fardo das análises e também se tornaram amigas para levar para a vida. Foram muitas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar aqui, e sou eternamente grata a cada uma delas.

Agradeço também ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da UEL, por todo conhecimento passado com excelência e pela oportunidade de fazer o doutorado com Bolsa de estudos. Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

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

Albert Einstein

RESUMO

Desde 2008 o Brasil vem sendo o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, tendo vários casos de intoxicação notificados. Dentre os vários efeitos colaterais que podem ser causados devido exposição crônica a essas substâncias podemos destacar a infertilidade, a impotência sexual, abortos e malformações, neurotoxicidade, alterações hormonais e maior risco de câncer. O cyantraniliprole surgiu como uma proposta de nova moléculas inseticidas menos nociva. Esse tóxico possui modo de ação sistêmico, atuando por ingestão e contato, através da ativação dos receptores de rianodina, ocasionando uma massiva liberação de cálcio. De acordo com a bula do produto registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não apresenta toxicidade aguda significativa pelas vias de exposição oral, dérmica e inalatória para mamíferos. Porém, por ser uma substância nova, não há estudos na literatura sobre os efeitos a longo prazo na saúde de humanos e outros mamíferos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar se a exposição ao cyantraniliprole durante os períodos gestacional e lactacional podem trazer prejuízos para o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e masculino da prole de ratos Wistar. Para isso, ratas Wistar foram colocadas para acasalar e ao diagnóstico de prenhez foram divididas nos grupos experimentais: Controle (C), Cyantraniliprole 1 mg/kg/dia (C1), Cyantraniliprole 10 mg/dia (C10) e Cyantraniliprole 150 mg/kg/dia (C150). O presente trabalho foi aprovado pela CEUA-UEL, ofício 20/2020. Foram avaliados os parâmetros gestacionais, o comportamento materno e o desenvolvimento físico da prole ao nascer. Após atingirem a puberdade e a idade adulta, foram feitas as eutanásias e foram coletados os úteros e os ovários das fêmeas para análise histológica e bioquímica de estresse oxidativo, e os testículos e epidídimos dos machos para análise histopatológica. Os dados obtidos foram analisados quanto normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e posteriormente através de ANOVA com teste de Tukey a posteriori. Foi utilizado o nível de significância de 5%. Foi possível verificar que a dose de 150 mg/kg/dia é inviável para esse delineamento experimental. A análise do comportamento materno com perturbação mostrou que a mãe apresenta maior contato com os filhotes, menor tempo de autolimpeza e de limpeza dos filhotes nos grupos C1 e C10, e no grupo C10 as mães ainda

apresentaram maior tempo amamentando e menor tempo sem interação com os filhotes. As análises histológica e de estresse oxidativo dos ovários das fêmeas púberes e adultas não indicaram alterações em nenhum dos grupos e nenhuma das idades. Já a análise dos úteros indicou alteração estrutural, A análise de morfometria uterina indicou um espessamento do perimétrio dos animais de ambas as idades, nos grupos C1 e C10 quando comparados com o controle. Já na análise do miométrio foi possível observar um espessamento apenas nos animais púberes do grupo C1 e nos animais adultos do grupo C10, quando comparados os dados ao controle. O endométrio apresentou espessamento nos animais púberes dados grupos C1 e C10 comparados ao controle, enquanto os adultos não apresentaram alteração significativa. Dessa forma é possível concluir que a ingestão de cyantraniliprole pelas mães durante prenhez e lactação é capaz de alterar o desenvolvimento uterino e pós-natal da prole, alterando a estrutura e a bioquímica do útero de ratas púberes e adultas.

Palavras-chave: agrotóxicos; sistema reprodutor; gestação; lactação; toxicologia.

ABSTRACT

Pesticides are the products and agents of physical, chemical or biological processes, used to kill insects, larvae, fungi, ticks under the justification of controlling diseases caused by these vectors and regulating plant growth. Since 2008, Brazil has been the largest consumer of pesticides in the world, with several cases of poisoning reported. Among the various side effects that can be caused by chronic exposure to these substances, we can highlight infertility, sexual impotence, miscarriages and malformations, neurotoxicity, hormonal changes, cancer and effects on the immune system. Due to side effects, several studies looking for new, less harmful insecticidal molecules have been emerging, including cyantraniliprole. This toxicant has a systemic mode of action, acting through ingestion and contact. According to the product leaflet registered with MAPA, it does not present significant acute toxicity through oral, dermal and inhalation routes of exposure. However, as it is a new drug, there are no studies in the literature on its long-term effects on the health of humans and other mammals. Therefore, the objective of the work was to evaluate whether exposure to cyantraniliprole during the gestational and lactational periods could harm the development of the female reproductive system of the offspring of Wistar rats. For this, Wistar rats were placed to mate and upon diagnosis of pregnancy they were divided into experimental groups: Control (C), Cyantraniliprole 1 mg/kg/day (C1), Cyantraniliprole 10 mg/day (C10) and Cyantraniliprole 150 mg/kg /day (C150). This work was approved by CEUA-UEL, number 20/2020. The gestational and physical development parameters of the offspring at birth were evaluated. After reaching puberty and adulthood, euthanasia was performed and the uteri and ovaries were collected for histological and biochemical analysis of oxidative stress. The data obtained were analyzed for normality using the Shapiro-Wilk test and subsequently using ANOVA with a posteriori Tukey test. A significance level of 5% was used. It was possible to verify that the ingestion of cyantraniliprole by mothers was capable of generating miscarriages and other

outcomes that caused the loss of the C150 group. It was also observed lower weight of C1 offspring at birth, higher weight of offspring of pubescent and adult C1 males, while the weight of females at both ages was maintained. Histological and oxidative stress analyzes of the ovaries of pubescent and adult females did not indicate changes in any of the groups. Analysis of the uteri indicated structural changes, with thickening of the uterine layers, while biochemical analysis indicated increased levels of oxidative stress. Therefore, it is possible to conclude that the ingestion of cyantraniliprole by mothers during pregnancy and lactation is capable of altering the uterine and postnatal development of the offspring, altering the structure and biochemistry of the uterus of pubescent and adult rats. More studies are needed to unravel the mechanisms involved and verify whether such changes are capable of interfering with fertility and the functioning of the organ.

Keywords: pesticides; reproductive system; pregnancy; lactation; toxicology.

LISTA DE ABREVIACÕES

Fiocruz – Fundação Osvaldo Cruz

OMS – Organização Mundial de Saúde

OIT – Organização Internacional do Trabalho

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INCA – Instituto Nacional do Câncer

UE – União Europeia

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

EPA – *Environmental Protection Agency*

FDA – *Food and Drug Administration*

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Uso de pesticidas, em toneladas, por continente em 2020 e percentual de mudança desde 1999 (Fonte: Atlas dos Pesticidas, 2022).....	p. 3
Figura 2: Porcentagem de pesticidas altamente perigosos utilizados por país e número de substâncias banidas na UE utilizadas (Fonte: Atlas dos Pesticidas, 2022).....	p. 5
Figura 3: Mecanismo de ação das diamidas.....	p. 6
Figura 4: Classificação toxicológica e classificação do potencial de periculosidade ambiental do cyantraniliprole.....	p. 7
Figura 5: Representação dos órgãos internos que compõem o sistema reprodutor feminino humano.....	p. 11
Figura 6: Representação esquemática do ciclo uterino, ou menstrual.....	p. 13
Figura 7: Estrutura uterina de roedores.....	p. 15
Figura 8: Fotomicrografias de esfregaço vaginal não corado de ratas para determinação da fase do ciclo estral.....	p. 16
Figura 9: Órgãos componentes e estrutura anatômica do sistema reprodutor masculino.....	p. 17
Figura 10: estrutura anatômica do epidídimo.....	p. 19

Sumário

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL	1
2. DIAMIDAS E O CYANTRANILIPROLE	5
3. CANAIS DE CÁLCIO	8
3.1 Receptores de Rianodina (RyR)	9
4. SISTEMA REPRODUTOR FEMININO	11
4.1 Ciclo menstrual	12
4.2 Morfologia uterina e ciclo estral de roedores	14
5. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	16
6. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR	19
7. CYANTRANILIPROLE E O SISTEMA REPRODUTOR	23
JUSTIFICATIVA	24
OBJETIVOS	26
1. OBJETIVOS GERAIS	26
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ARTIGO 1:	33
ORAL ADMINISTRATION OF CYANTRANILIPROLE TO <i>WISTAR</i> RATS DURING PREGNANCY AND LACTATION ALTERS MATERNAL BEHAVIOR AND HARMS THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF PUBERTAL AND ADULT OFFSPRING	33
ARTIGO 2:	58
INTRAUTERINE AND LACTATIONAL EXPOSURE TO CYANTRANILIPROLE CAUSES CHANGES IN THE SPERM AND IN THE HISTOLOGY OF THE TESTICLE AND EPIDIDYMIS OF <i>WISTAR</i> RATS	58
CONCLUSÃO	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética - UEL.....	79
--	-----------

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL

De acordo com a Lei 7.802/89 agrotóxicos são definidos como:

“os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. (Art. 2; § 1, item a).”.

Em números absolutos, o Brasil é o terceiro país com maior uso de pesticidas no mundo, dado que pode ser explicado pelo fato do país ter a terceira maior área de agropecuária do planeta (HESS; NODARI, 2022). De acordo com o INCA (2021), o Brasil despeja mais de um milhão de toneladas de agrotóxicos em lavouras por ano, representando em média cinco quilos para cada habitante.

Até 2006, os registros de sintomas associados a intoxicação por agrotóxicos eram pouco relatados, porém em 2007 as ocorrências começaram a ser notificadas. No período entre 2007 e 2012, os dados sobre os primeiros sintomas praticamente dobraram, chegando à marca de 5.283 casos em 2012. Em 2017 foi ultrapassado o número de 7.199 casos. No período compreendido entre 2007 e 2017, houve um aumento crescente do número de intoxicações, relacionado tanto ao aumento do uso de agrotóxicos e seu uso inadequado, quanto ao surgimento dos efeitos ocasionados pela exposição crônica. (TAVARES, et al., 2020). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), efeitos crônicos são aqueles aparecem após exposições repetidas a pequenas quantidades de agrotóxicos por um período prolongado). Podem-se relatar os seguintes sintomas: dificuldade para dormir, esquecimento, aborto, impotência sexual, depressão, problemas respiratórios graves, alteração do funcionamento do fígado e dos rins, anormalidades na síntese de hormônios tireoidianos, ovarianos e prostáticos incapacidade de gerar filhos, malformação e problemas no desenvolvimento intelectual e físico de crianças.

Estudos apontam grupos de agrotóxicos como prováveis e possíveis carcinogênicos (BRASIL, 2018). Considera-se como exposição crônica aquela que ocorre após repetidas exposições, por um período longo de tempo, podendo ser variável de acordo com a substância e o organismo analisado (OGA, SEIZI E CAMARGO, 2008).

A associação entre exposição a agrotóxicos e desenvolvimento de câncer ainda gera polêmicas, principalmente porque os indivíduos estão expostos a diversas substâncias, sem contar outros fatores genéticos. Porém, é importante salientar que estudos vêm mostrando o potencial de desenvolvimento de câncer relacionado a diversos agrotóxicos, justificando a recomendação de precaução para com o uso e contato (BRASIL, 2018).

Decorrente do desenvolvimento do agronegócio no setor econômico, o país vem enfrentando sérios problemas quanto ao uso de agrotóxicos, como a permissão de agrotóxicos já banidos em outros países e venda ilegal de agrotóxico que já foram proibidos (CARNEIRO et al., 2015). Várias entidades de renome estão se pronunciando a respeito, entre as quais o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2019), que publicou nota pública, que em parte diz o seguinte:

“No atual cenário mundial, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos e, em dez anos, o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190%. Destaca-se, porém, na literatura científica nacional e internacional, que o modelo atual de cultivo, com o intensivo uso de agrotóxicos, gera insegurança alimentar e outros malefícios, como poluição ambiental, contaminação de mananciais, do solo, do ar e intoxicação de trabalhadores rurais e da população em geral. Dentre os efeitos sobre a saúde humana associados à exposição aos agrotóxicos, os mais preocupantes são as intoxicações crônicas, caracterizadas por infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, manifestada através de distúrbios cognitivos e comportamentais e quadros de neuropatia e desregulação hormonal, ocorrendo também em adolescentes, causando impacto negativo sobre o seu crescimento e desenvolvimento dentre outros desfechos durante esse período.”

O novo Atlas dos Pesticidas, publicado em 2022, mostra que o uso de pesticidas tem aumentado mundialmente, porém com um uso ainda mais expressivo na América do Sul e na África (Figura 1). Muitos dos pesticidas que são utilizados mundialmente são considerados como altamente perigosos e seu comércio e uso são

proibidos na União Européia (UE). Porém, mesmo com o uso banido, a produção e venda desses produtos para países fora da UE é permitido e altamente lucrativo para as empresas produtoras (Atlas dos Pesticidas, 2022).

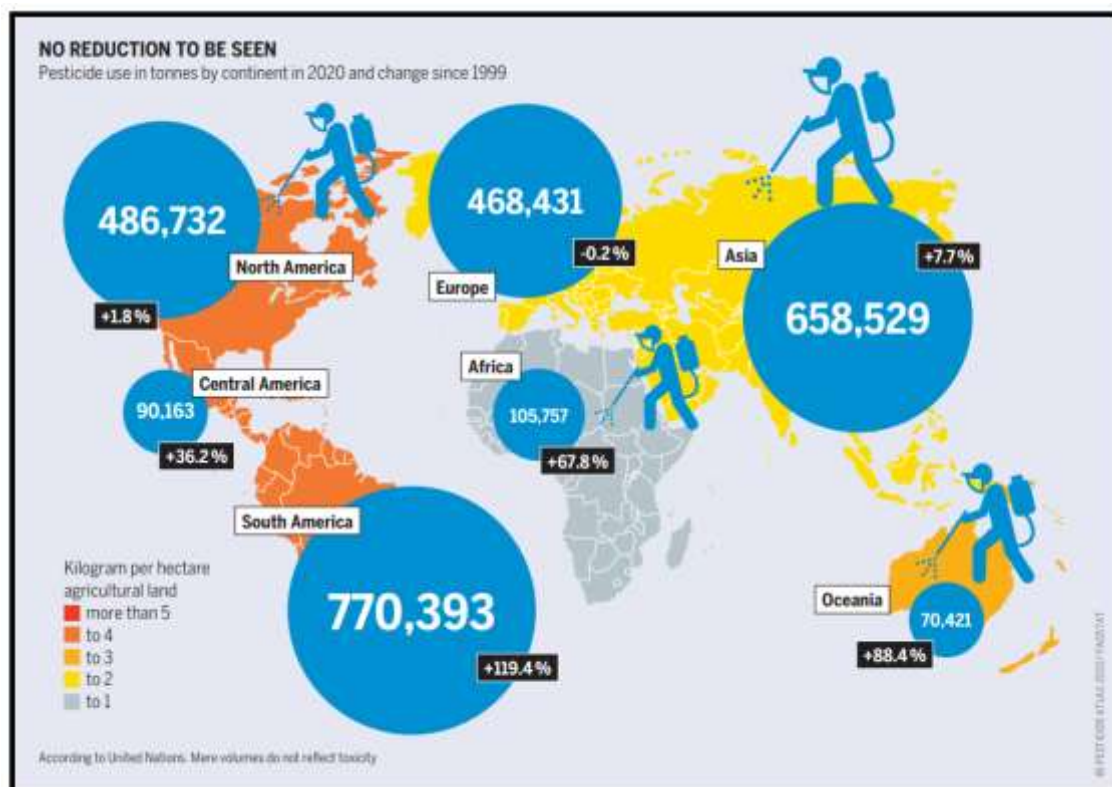


Figura 1: Uso de pesticidas, em toneladas, por continente em 2020 e percentual de mudança desde 1999 (Fonte: Atlas dos Pesticidas, 2022).

Todo defensivo agrícola e seus componentes precisam ser registrados para que a sua produção, uso e comercialização no Brasil sejam autorizados. Para isso, existem normas estabelecidas pelos órgãos federais responsáveis pelos setores de agricultura, saúde e meio ambiente. Essa regulamentação é conduzida pela ANVISA, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MORAES, 2019).

Cada um desses órgãos realiza um determinado tipo de avaliação do produto, de modo independente do outro. São solicitados: (1) Testes agronômicos: Para a avaliação da eficiência do produto no controle de pragas ou plantas daninhas; (2)

Testes toxicológicos: Contemplam os diversos estudos em laboratório para medir o potencial tóxico do produto na saúde humana (os efeitos de intoxicações aguda e crônica, o potencial cancerígeno e mutagênico e os impactos no sistema endócrino); (3) Testes ecotoxicológicos: Contemplam as avaliações dos possíveis impactos ambientais provocados pelo produto; (4) Caracterização físico química: Reúnem os estudos para caracterizar o produto de forma detalhada como: tempo de permanência da substância no solo, solubilidade em água, entre outros; (5) Testes de metabolismo e degradação: Consistem nos estudos sobre o comportamento do produto na planta, depois de aplicado (MORAES, 2019).

Porém, mesmo com a fiscalização bem estabelecida, no Brasil, cerca de 29% dos pesticidas utilizados em lavouras são considerados como altamente perigosos, e 18 deles tiveram seu uso proibido na UE (Figura 2) (Atlas dos Pesticidas, 2022). Além disso, testes que analisam a influências de tais substâncias sobre o sistema reprodutor e sobre o feto durante a gestação não são requeridos.

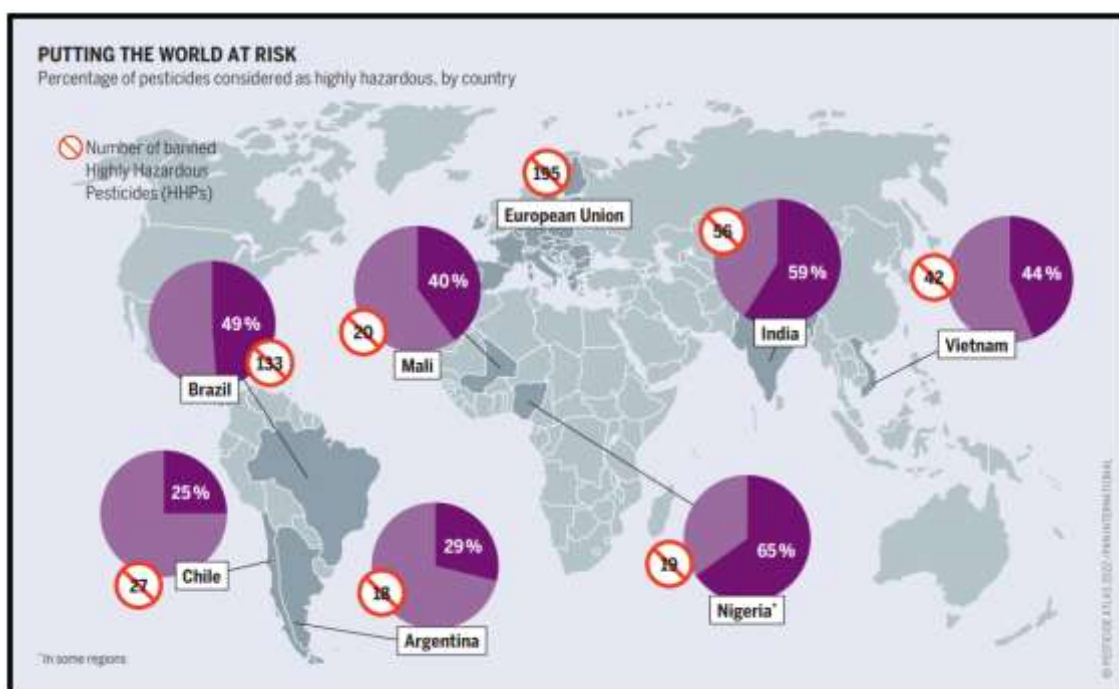


Figura 2: Porcentagem de pesticidas altamente perigosos utilizados por país e número de substâncias banidas na UE utilizadas (Fonte: Atlas dos Pesticidas, 2022).

2. DIAMIDAS E O CYANTRANILIPROLE

Devido à grande toxicidade dos agrotóxicos e as grandes polêmicas geradas devido aos seus efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, várias pesquisas são feitas buscando novas moléculas inseticidas com menos efeitos colaterais. Um novo grupo dessas novas moléculas são as diamidas (RIBAS E MATSUBARA, 2013).

O estudo das diamidas da classe dos rianóides começou com a descoberta de que os extratos da casca da planta de *Ryania speciosa*, uma espécie nativa da América Central e do Sul, apresentavam propriedades paralisantes no músculo estriado do inseto alvo (EDWARDS et al., 1948). Atribuiu-se essa atividade a Rianodina, um alcaloide natural tóxico. Tempo depois, observou-se que o efeito de paralisia se repetia quando as diamidas entravam em contato com insetos, principalmente, da ordem Lepidóptera (LAHM et al., 2005). Essas descobertas colocaram essa classe de inseticidas como a mais promissora e investigada (LAHM; et al., 2009).

O mecanismo de ação das diamidas no alvo está direcionado a inibição do funcionamento correto dos canais de cálcio (JEANGUENAT, 2012). Quando o inseticida entra em contato com o alvo, seja por ingestão ou por contato, ocorre uma alteração nos depósitos intracelulares de cálcio (FILL & COPELLO, 2002), pois o tóxico ativa o canal, ocasionando a sua liberação, de forma definitiva, impedindo que ele se feche (WILLIAMS, et al., 2001; QI, et al., 2014). Esse processo gera a liberação rápida e massiva de íons cálcio, ocasionando uma interrupção na alimentação, e como consequência resulta em letargia, paralisia e posteriormente a morte (HANNING et al., 2009). O início dos sintomas é quase imediato, com a maior taxa de mortalidade entre 1 e 3 dias, aproximadamente. Estudos mostram que as diamidas exibem uma seletividade 500 vezes maior sobre os receptores dos insetos comparado com os dos mamíferos, resultando numa ferramenta eficaz para o controle de pragas e relativamente segura para os humanos (CORDOVA et al., 2006; LAHM et al., 2007). Tais inovações promoveram um crescimento significativo no estudo do uso de diamidas. O modo de ação destes inseticidas no alvo é esquematizado na Figura 3.

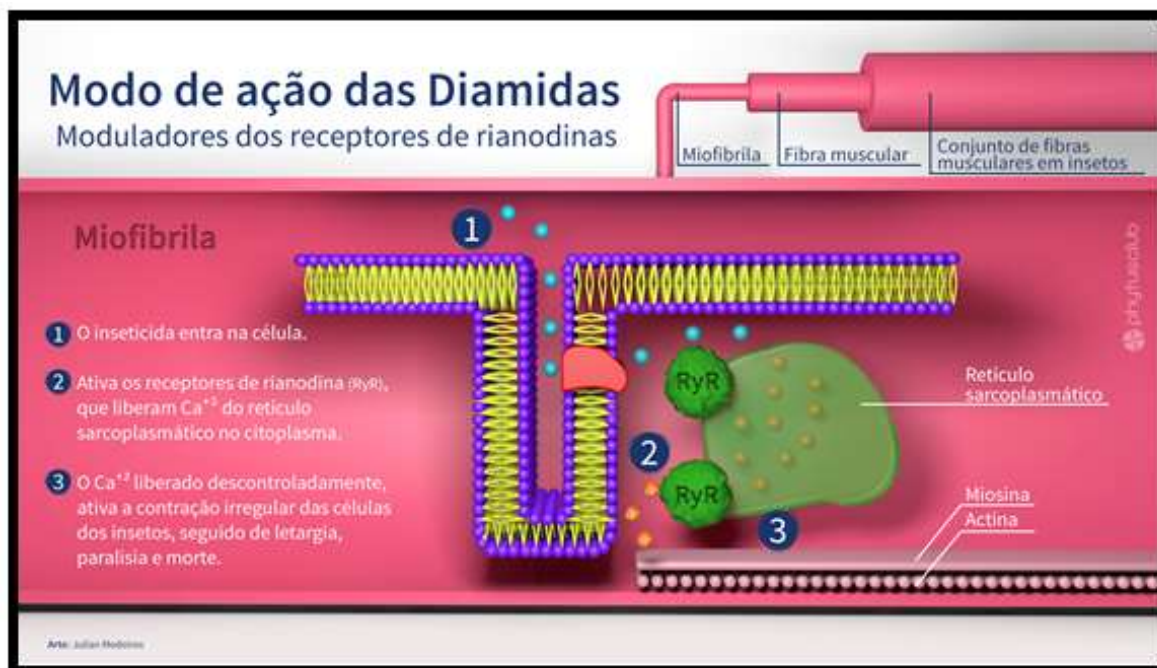


Figura 3: Mecanismo de ação das diamidas.

Após o inseticida entrar na célula (1) ele se liga de maneira definitiva aos receptores de rianodina (2), causando sua abertura. Isso leva a uma liberação massiva dos íons cálcio que estavam dentro do retículo sarcoplasmático para o citoplasma. O aumento na concentração intracelular de cálcio ativa o processo de contração (3). Como esse quadro não é revertido, ocorre a imobilização do inseto, gerando letargia, paralisia e morte. (Fonte: Elevagro, disponível em: <https://elevagro.com/materiais-didaticos/inseticidas-diamidas/>)

O grupo de diamidas secundárias, ou antranílicas, é derivado do ácido antranílico, sendo o chlorantraniliprole e o cyantraniliprole os seus dois principais representantes. Tais moléculas são efetivas contra insetos de ordens como lepidópteros (que incluem as borboletas), coleópteros (que incluem os besouros), afídios (que incluem os pulgões), tisanópteros e dípteros (que incluem as moscas) (CORDOVA, et al., 2006).

Em 2007, nas Filipinas, foi registrado o clorantraniliprole, o primeiro inseticida da classe das diamidas antranílicas que até o final de 2008 já era utilizado para o controle de lepidópteros em mais de 10 países, podendo ser utilizados em várias culturas (LAHM et al. 2009). Neste mesmo ano, a DuPontTM anunciou o desenvolvimento comercial da segunda diamida antranílica, o cyantraniliprole, com maior espectro de ação dentro da Ordem Hemiptera (DuPont 2008, Lahm et al. 2009). Devido ao sucesso da sua atividade inseticida, a empresa DuPontTM trabalhou com uma classe similar de compostos, sendo pioneira no uso das amidas antranílicas

(LAHM et al., 2009). Essa classe de inseticidas também atua diretamente na regulação dos canais de cálcio (QI, CASIDA, 2013).

No Brasil, o cyantraniliprole (número CAS 736994-63-1) é vendido sob o nome comercial Benevia®, registrado no MAPA sob o nº 13915, em 2016. Seu nome de acordo com a IUPAC é (3-Bromo-1-(3-chloro-2-pyridinyl)-N-[4-cyano-2-methyl6(methylcarbamoyl)phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide) (HARDKE et al., 2011; FOSTER et al., 2012). Possui modo de ação sistêmico e pertence ao grupo químico 28 (IRAC), atuando por ingestão e contato. É seletivo para as culturas da abóbora, abobrinha, agrião, alface, algodão, alho, almeirão, batata, berinjela, brócolis, café, cebola, chalota, chicória, chuchu, citros, couve, couve-chinesa, couve-de-bruxelas, couve-flor, espinafre, feijão, jiló, maxixe, melancia, melão, pepino, pimenta, pimentão, quiabo, repolho, rúcula, soja e tomate. É um produto não classificado quanto a classificação toxicológica e pertencente a classe III quanto ao potencial de periculosidade ambiental (produto perigoso ao meio ambiente) (Figura 5) (FMC Química do Brasil LTDA). O cyantraniliprole, tem sido de grande utilização por apresentar alto potencial no controle de insetos sugadores e mastigadores, além de ser mais eficiente comparado com o chlorantraniliprole (ZHANG et al., 2015)



Figura 5: Classificação toxicológica e classificação do potencial de periculosidade ambiental do cyantraniliprole (Fonte: FMC Química do Brasil LTDA).

De acordo com a bula do produto registrada no MAPA, em estudos feitos com roedores, o cyantraniliprole não tem toxicidade aguda significativa pelas vias de exposição oral, dérmica e inalatória e não é um irritante dérmico ou ocular. Além disso, não são conhecidos mecanismos específicos de toxicidade desta substância em

humanos nem em outras espécies de mamíferos, nenhum reporte de efeito adverso à saúde foi relatado e nenhum sintoma específico da toxicidade de cyantraniliprole a humanos é conhecido (BL BENEVIA®). Porém, poucos estudos são relatados na literatura e o uso desse tóxico ainda é recente no Brasil, não podendo ter dados concretos sobre os efeitos a longo prazo na saúde humana.

3. CANAIS DE CÁLCIO

O cálcio (Ca) é o mineral mais abundante no corpo humano, sendo responsável por cerca de 1 a 2% do peso corporal total (SILVA & COZZOLINO, 2007), sendo que o corpo humano ao nascer contém cerca de 25–30 g de cálcio e ao atingir a maturidade, 1000-1500 g. Além da sua função estrutural, uma vez que 99% de sua concentração encontra-se nos ossos e dentes, este elemento é essencial na contração muscular, propagação do impulso nervoso, coagulação sanguínea, entre outras funções (AWUMEY & BUKOSKI, 2006). O Ca^{2+} é ainda considerado como o segundo mensageiro intracelular universal, que tem por função modular fenômenos celulares fisiológicos. A concentração de Ca^{2+} intracelular é heterogênea, e ocorre em forma de ondas ou picos, já que altas concentrações por longos períodos são nocivas à célula (BOOTMAN et al., 2001). O gradiente de concentração de Ca^{2+} é mantido por canais existentes na membrana plasmática, que move ativamente o Ca^{2+} para fora da célula. Este íon pode ser ainda resgatado para o retículo endoplasmático pela bomba Ca^{2+} - ATPase, dependente de ATP (ALBERTS et al., 2002).

Sabe-se que desde o início da vida é necessária a atuação do cálcio, desde a fecundação até o desenvolvimento embrionário e continuando por toda a vida (BOOTMAN et al., 2001). Durante a fertilização é necessário que haja comunicação entre o espermatozoide e os oócitos, havendo sinais de curto e de longo alcances, que são emitidos pelo oócito e que influenciam a ação espermática, levando a interações distintas entre os gametas e finalmente à fecundação (DARSON, LIÉVANO, BELTRÁN, 1996). Posteriormente o cálcio atua por todo o organismo, como nos processos de formação do esqueleto ósseo e mineralização (RICCARDI et al., 2013; KONG, et al., 2014), no desenvolvimento dos pulmões e fígado (GILBERT et al., 2011; RICCARDI et al., 2013) na formação e manutenção de circuitos neurais e na memória de longo prazo (LECLERC et al., 2011). Os receptores sensíveis ao Ca^{2+}

(CaSR) controlam a secreção de hormônios, como o hormônio paratireoideiano (PTH), que por sua vez exerce ação sobre o Ca^{2+} via células de tecidos alvo como nos rins, intestino e osso (BROWN, 2013).

3.1 Receptores de Rianodina (RyR)

Os receptores de rianodina são canais de cátion de alta condutância que liberam Ca^{2+} dos estoques intracelulares, tais como o retículo endo/sarcoplasmático (RE/RS) (MACKRILL, 2010). Essa liberação ocorre de maneira cálcio dependente, uma vez que o próprio cálcio é o íon ativador destes receptores. Os RyRs são onipresentes em todos os tipos de células e estão envolvidos em uma variedade de processos celulares (acoplamento excitação-contração muscular, neurotransmissão, secreção, entre outros) (FILL; COPELLO, 2002). Tal receptor pode ser encontrado em três diferentes isoformas encontradas em mamíferos, classificadas de acordo com o tecido em que inicialmente foram identificadas. RyR1 é a isoforma dominante no músculo esquelético, comumente referido como receptor de rianodina esquelético; RyR2 é encontrado no músculo cardíaco, também conhecido como receptor de rianodina cardíaco; e RyR3 é expresso em baixos níveis em muitos tecidos, mas é principalmente associado ao diafragma e ao cérebro (FILL; COPELLO, 2002; BALSHAW; YAMAGUCHI; MEISSNER, 2002).

Os RyRs são homotetrâmeros com massa molecular de aproximadamente 560 kDa e são caracterizados por apresentar uma forma de sino (KOVACS et al., 2010). Apresentam cerca de 70% da sequência de aminoácidos homólogos e o maior nível de semelhança está na região C-terminal. Em todas as isoformas a porção C-terminal da proteína contém os domínios transmembranas. Segundo análises sistemáticas, sugere-se entre quatro e 12 segmentos transmembranares por subunidade do RyR (MEISSNER, 2004). Há também um grande domínio N-terminal citoplasmático, contendo sítios de ligação para proteínas e outros canais moduladores (ex. canais de Ca^{2+}) que controlam o estado de atividade do RyR (MARKS, 2002). As substâncias fisiológicas e exógenas que já foram reconhecidas como moduladoras dos canais RyR estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Lista das substâncias fisiológicas e exógenas que regulam os canais de rianodina.

Substâncias fisiológicas conhecidas						
Nome comum	Natureza química	Efeito na atividade dos RYRs	Intervalo de concentração	Comentários	Referências	
Ca ²⁺ citosólico	Íon	+/-	μM/mM	Inibe ou bloqueia dependendo da concentração	Fill e Copello ⁴	
ATP	Nucleotídio	+	mM	RyR1 é mais sensível ao ATP que os outros subtipos de RyR	Copello e col. ²⁰	
Mg ²⁺	Íon	-	mM	O Mg ²⁺ compete com o Ca ²⁺ pelo seu sítio de ativação no RyR1	Copello e col. ²⁰ , Steele e Duke ²¹	
Estado REDOX	Estado oxidante ou redutor	+/-	-	Estado oxidante aumenta a atividade do canal e estado redutor diminui	Voss e col. ²²	
ADP-ribose cíclico	Metabólito da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADP)	+	-	Pode ativar a Ca ²⁺ -ATPase, o que indiretamente ativa o receptor RYR	Copello e col. ²⁰ , Lukyanenko e col. ²³	
Fosforilação	Adição de um grupo fosfato	+/-	-	Proteína cinase A (PKA) ativa e proteína fosfatase 1 (PP1) bloqueia o RYR	Reiken e col. ²⁴	
Calmodulina	Proteína acessória	+/-	nM	Ativa com baixos níveis de Ca ²⁺ ou bloqueia com altos níveis de Ca ²⁺	Balshaw e col. ⁷ , Hamilton e col. ²⁵	
Calsequestrina	Proteína acessória	+/-	nM	Necessidade de mais estudos	Fill e Copello ⁴ , Beard e col. ²⁶	
FKPB12	Proteína acessória	-	-	Diminui a probabilidade de abertura e a frequência do RyR	Mackrill ⁶	
Caltabina1	Proteína acessória	-	-	Estabiliza o estado fechado do RyR	Bellinger e col. ²⁷	

Substâncias exógenas conhecidas						
Nome comum	Natureza química	Efeito na atividade dos RYRs	Intervalo de concentração	Uso farmacológico ou clínico	Referências	
Rianodina	Alcaloide	+/-	nM-mM	Inadequado	Fill e Copello ⁴	
4-cloro-meta-cresol (CmC)	Fenol clorado	+	μM-mM	Fungicida	Mackrill ⁶ , Fessenden e col. ¹⁷	
Cafeína	Metilxantina	+	mM	Estimulante	Mackrill ⁶	
Dantrolene	Derivados da hidantoína	-	μM	Tratamento de hipertermia maligna, espasticidade muscular	Mackrill ⁶ , Paul-Pletzer e col. ¹⁸	
Procaína e tetracaína	Aminoéster	-	μM-mM	Anestésico local	Mackrill ⁶ , Brum e col. ¹⁹	
Vermelho de rutênio	Corante policatiônico	-	nM-μM	-	Mackrill ⁶	

4. SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

O sistema reprodutor feminino se localiza na cavidade pélvica e é protegido pelos ossos do quadril. É formado basicamente por 2 ovários, 2 tubas uterinas, útero, vagina (Figura 6) e a vulva na parte externa (MOORE, 2008).

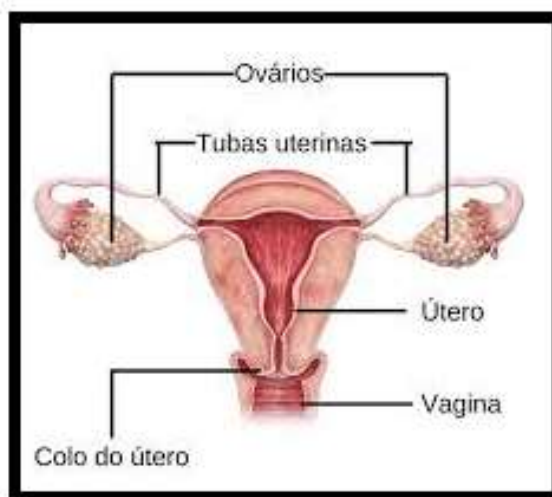


Figura 6: Representação dos órgãos internos que compõem o sistema reprodutor feminino humano.

Os ovários se localizam na cavidade pélvica superior, um de cada lado do útero, e medem cerca de 2 a 4 cm de comprimento, apresentando forma elíptica. Histologicamente são formados por 3 regiões distintas: a) córtex: revestido por epitélio germinativo e constituído por tecido conjuntivo e folículos, onde se encontram os ovócitos; b) região medular: uma camada inervada e vascularizada composta por células heterogêneas; e c) hilo: formado por células produtoras de esteroides (LEVY, KOEPPEN, STANTON, 2006). Sua função é relacionada a ovogênese, que corresponde a produção dos gametas femininos (ovócitos), sua maturação e liberação (ovulação), além da secreção de hormônios sexuais e esteroidais (ADONA et al., 2015).

As tubas uterinas são ductos que ligam o ovário ao útero. Cada uma termina em uma estrutura chamada fimbria, que é formada por projeções digitiformes, responsáveis pela comunicação dos ovários com o útero (SILVA, 2014). A função da

tuba uterina é receber o ovócito e fornecer todas as condições necessárias para a sua fecundação. Além disso, os batimentos ciliares e os movimentos peristálticos das tubas conduzem os gametas femininos até o útero (OLIVEIRA et al., 2005).

O útero é um órgão muscular situado na cavidade pélvica, entre a bexiga urinária e o reto. Sua parede é formada por 3 camadas teciduais diferentes: a) perimétrio: uma camada conjuntiva externa responsável pelo revestimento epitelial do órgão; b) miométrio: uma camada muscular intermediária; c) endométrio: uma camada mucosa interna constituída por um revestimento epitelial e tecido conjuntivo (estroma endometrial) (RIBEIRO, 2013).

4.1 Ciclo menstrual

O ciclo menstrual, também chamado de ciclo uterino, reflete as mudanças causadas pela ação hormonal (estrógeno e progesterona) sobre o endométrio e o ovário e tem duração média de 28 dias (Figura 7) (GORE, 2008). A influência hormonal sobre o ovário cria o ciclo ovariano, formado por 3 fases: 1) folicular: que ocorre entre o 1º e o 13º dia do ciclo e é quando ocorre o crescimento, o desenvolvimento e a maturação dos folículos; 2) ovulatória: que ocorre no 14º dia do ciclo e é marcada pela ruptura do folículo maduro; e 3) fase lútea: correspondendo a todo o período final do ciclo, quando ocorre a formação do corpo lúteo (FOX, 2007; SILVA, 2012).

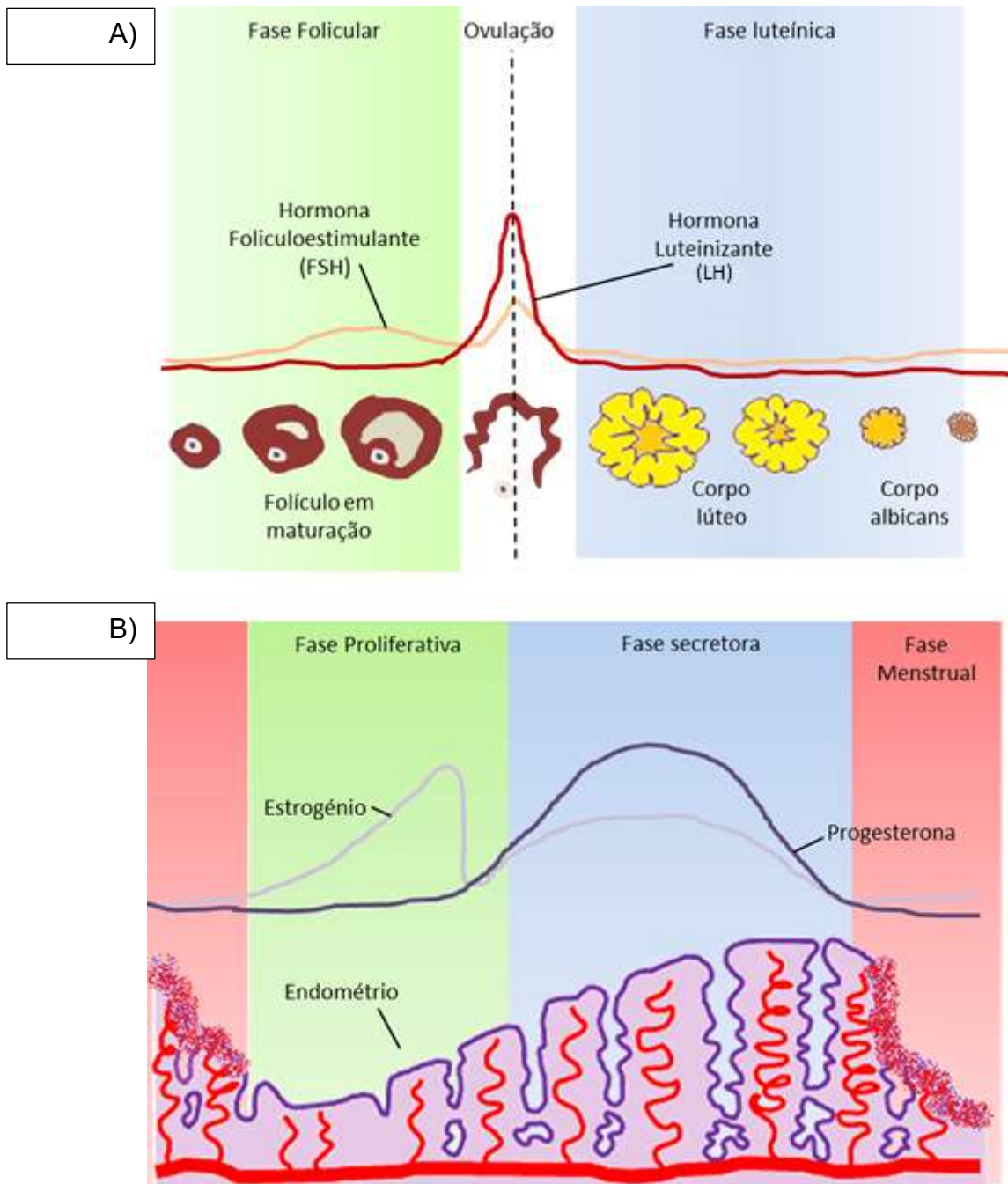


Figura 7: Representação esquemática do ciclo uterino, ou menstrual.

Representação das alterações encontradas no ciclo uterino, com representação gráfica dos níveis hormonais de FSH e LH (A) e progesterona (B). A) Desenvolvimento folicular no decorrer das fases folicular, ovulação e luteínica. B) Evolução do endométrio no decorrer das 3 fases do ciclo uterino (fase proliferativa, fase secretora e fase menstrual. (Fonte: http://www.metis.med.up.pt/index.php/O_Ciclo_Sexual_da_Mulher)

Quanto as alterações uterinas, o ciclo também apresenta 3 fases distintas: fase menstrual, fase proliferativa e fase secretora. A fase menstrual tem uma duração aproximada de 5 dias que correspondem ao período de descamação do endométrio. Essa descamação causa uma ruptura dos vasos sanguíneos formando o fluxo menstrual, característico dessa fase. Já a fase proliferativa tem duração de aproximadamente 9 dias e é período em que ocorre o aumento da espessura do endométrio e o desenvolvimento das artérias espirais, reconstituindo a estrutura endometrial. Por último temos a fase secretora, com duração de 14 dias. Durante essa fase a parede uterina atinge sua espessura máxima e, além disso, as glândulas presentes no endométrio produzem secreções, preparando o útero para receber o embrião. Caso não ocorra fecundação, o ciclo se reinicia (GORE, 2008).

4.2 Morfologia uterina e ciclo estral de roedores

Em roedores, o útero se apresenta disposto em formato de Y, composto por dois cornos uterinos que estão separados em suas extremidades e se fundem na altura do corpo uterino em direção à vagina. Esses cornos são rodeados por musculatura formando um pequeno corpo uterino, e logo abaixo é encontrado a cérvix uterina. Além disso, estão presentes na porção superior dos cornos uterinos as tubas e os ovários (Figura 8) (HASCHEK; ROUSSEAU; WALLIG, M., 2010; WRAY; PRENDERGAST, 2019). Nas ratas, o útero possui as mesmas camadas do órgão em humanos, o perimétrio, miométrio e endométrio. Embora estruturalmente existam diferenças na organização do sistema reprodutor feminino de roedores para o de humanos, suas composições celulares e teciduais são semelhantes. Ademais, uma das principais diferenças observadas estruturalmente ocorre no miométrio, que em ratas o músculo liso está disposto em duas camadas uma longitudinal externa e uma circular interna, o que promove um padrão de contrações diferenciados (MICHALAKIS; SEGARS, 2010; RIBEIRO, 2013).

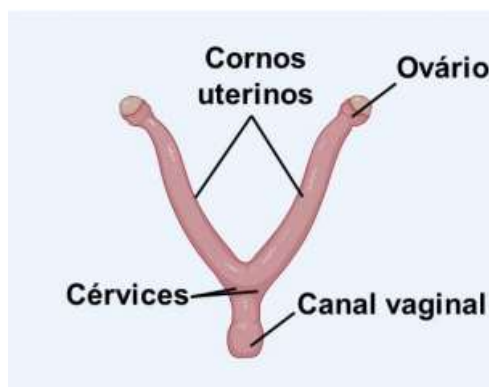


Figura 8: Estrutura uterina de roedores. (Adaptado de Lacerda-Junior, 2022).

Devido a curta duração do seu ciclo estral (4 a 5 dias), as ratas constituem bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo. O ciclo estral das ratas é formado por 4 fases – proestro, estro, metaestro e diestro – diferenciadas por sua composição celular (MARCONDES et al., 2001). Para determinação e estudo das fases do ciclo, é necessário o uso da metodologia de esfregaço ou lavado vaginal, que consiste na lavagem da parte mais externa da vagina das ratas com solução salina e observação do material ao microscópio ótico. Três tipos de células podem ser observados: células redondas e nucleadas são identificadas como células epiteliais; células irregulares sem núcleo são identificadas como células cornificadas; e as pequenas e redondas células anucleadas são identificadas como leucócitos. A proporção entre elas é utilizada para identificar a fase do ciclo (MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002). A fase de proestro consiste predominantemente de células epiteliais nucleadas; a fase de estro consiste principalmente em células cornificadas anucleadas; a fase de metaestro consiste na mesma proporção entre leucócitos, células epiteliais cornificadas e nucleadas; e a fase de diestro consiste predominantemente de leucócitos (Figura 9) (MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002).

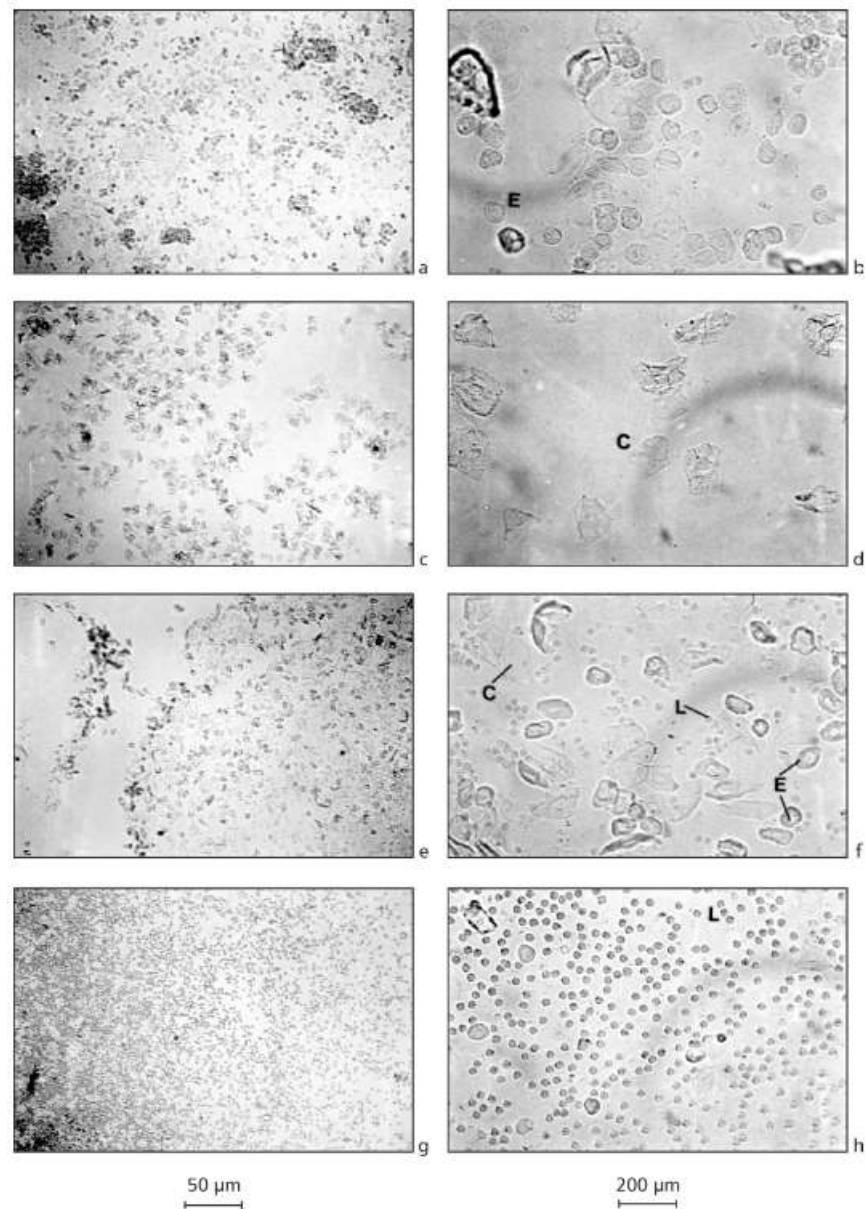


Figura 9: Fotomicrografias de esfregaço vaginal não corado de ratas para determinação da fase do ciclo estral.

Fotomicrografias de esfregaço vaginal não corado de ratas em proestro (a, b), estro (c, d), metaestro (e, f) e diestro (g, h). São indicados leucócitos (L), células epiteliais (E) e cornificadas (C). 50 x (painel esquerdo) e 200 x (painel direito painel). Fonte: MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002.

5. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino é formado por genitália externa, glândulas acessórias, ductos e testículos (Figura 10). A genitália externa é formada por pênis e escroto. As glândulas acessórias masculinas incluem a próstata, vesículas

seminais e glândulas bulbouretrais. Os ductos compreendem todos os canais que participam na condução de secreções e de espermatozoides na uretra (SILVERTHORN, 2003).

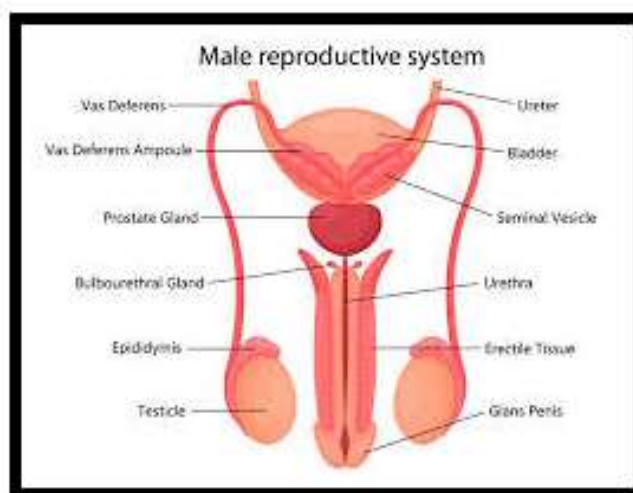


Figura 10: Estrutura anatômica do sistema reprodutor masculino.

Os testículos se localizam no interior do escroto e são compostos por duas regiões principais. A primeira região é formada pelos túbulos seminíferos e a segunda é o compartimento intersticial. A região dos túbulos é responsável pela espermatogênese (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999) e os túbulos seminíferos são compostos principalmente por epitélio germinativo, constituído por células de Sertoli e células germinativas (FOLEY, 2001).

A região intersticial consiste principalmente de tecido conjuntivo e tem como principal função a esteroidogênese (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999). O compartimento intersticial é formado por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, macrófagos residentes e as células de Leydig (RUSSEL, 1990). As células de Leydig são responsáveis pela produção de andrógenos, cujo principal é a testosterona (RUSSEL, 1990). Essas células possuem formato poligonal, retículo endoplasmático liso, citoplasma eosinofílico, diâmetro de cerca de 20µm, núcleo arredondado ou alongado com grande parte da cromatina condensada e pode apresentar um ou dois nucléolos (PELLINIEMI *et al.*, 1996).

Os hormônios produzidos pelas células de Leydig têm papel fundamental no funcionamento do sistema genital masculino, tanto na maturação desse sistema como um todo quanto na diferenciação da genitália externa na fase fetal (PELLINIEMI *et al.*,

1996). O principal desses hormônios é a testosterona, importante para o surgimento dos caracteres sexuais secundários durante a puberdade (RICHMOND; ROGOL, 2007). Em adultos a testosterona continua tendo funções importantes, ela é responsável por manter a barreira hematotesticular e estimular a espermatogênese e a espermiogênese (MRUK; CHENG, 2015).

As células de Sertoli são responsáveis pela manutenção da espermatogênese no epitélio seminífero. Elas atuam regulando a proliferação das células de Leydig e também a produção de hormônios esteróides no início do desenvolvimento (COOKE, 1996).

Outro tipo celular comumente encontrado em associação com as células de Leydig é o macrófago. Esta interação pode estar relacionada à ação dos macrófagos na transformação de alguns esteróides produzidos pela célula de Leydig, com a consequente produção e liberação de testosterona e diidrotestosterona (HALES, 2002).

O epidídimo é um órgão anatomicamente dividido em cabeça, corpo e cauda (Figura 12) (Reid and Cleand, 1957; Cosentino and Cokett, 1986; Gatti et al., 2004; França et al., 2005; Sullivan et al., 2005). Suas funções são o transporte dos espermatozóides que chegam do testículo (Orgebin-Crist, 1969; Brooks, 1983) a estocagem, proteção, concentração e maturação dos gametas (Cosentino and Cokett, 1986; Hermo and Robaire, 2002). Os espermatozóides dos mamíferos que saem do testículo possuem uma morfologia altamente especializada, mas são imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito II (Brooks, 1983; Hermo and Robaire, 2002; Gatti et al., 2004). É durante a passagem pelo ducto epididimário que ocorre o processo de maturação, conferindo aos gametas a capacidade de uma vigorosa motilidade e a habilidade para sofrer a reação acrossômica, interagir com a zona pelúcida, reconhecer e fundir-se com a membrana plasmática do ovócito II (Jones, 1999; Cuasnicú et al., 2002; Gatti et al., 2004, Sullivan et al., 2005).

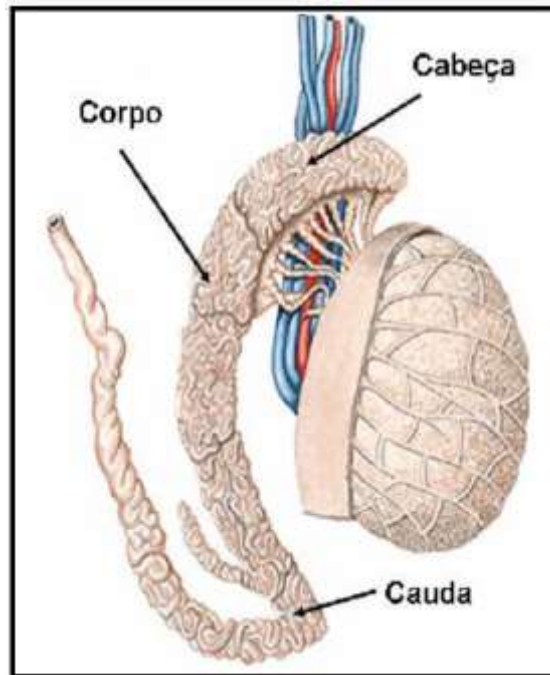


Figura 11: estrutura anatômica do epidídimo.

No mamífero adulto, o epidídimo é formado por um ducto único e enovelado que liga os dúctulos eferentes ao ducto deferente (Cosentino and Cokett, 1986; Hermo and Robaire, 2002). A função secretora e de reabsorção das células principais, juntamente com as junções oclusivas entre elas, garantem a manutenção do micro-ambiente intraluminal onde ocorre a maturação dos espermatozoides. Há uma camada de músculo liso que envolve esse epitélio epididimário, que é mais fina na região da cabeça e corpo, e mais espessa na cauda. A contração dessas fibras musculares é importante para definir o trânsito espermático e a expulsão dos espermatozoides da região da cauda para o ducto deferente (Kaleczyc et al., 1968; Ricker, 1998).

6. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR

O desenvolvimento do sistema reprodutor em mamíferos se inicia nos primeiros dias de gestação, porém se estende até a puberdade. Esse prolongado período de desenvolvimento, crescimento e diferenciação promove uma ampla janela de suscetibilidade para ação de desreguladores endócrinos químicos (HO et al., 2017).

Apesar do sexo cromossômico e genético de um embrião ser determinado já na fertilização, as características masculinas e femininas só começam a se desenvolver na sétima semana do embrião (MOORE & PERSAUD, 2004).

A linhagem germinativa é originária dos gonócitos, que se formam no endoderma do saco vitelino. Os gonócitos são células grandes que migram para o local onde as gônadas se formam e são idênticos em ambos os sexos. Eles se misturam com células epiteliais proliferantes e juntos formam os cordões sexuais primitivos (JUNQUEIRA & ZAGO, 1982). Essas estruturas se formam na parede do saco vitelino durante a quarta semana e migram para as gônadas em desenvolvimento, onde se diferenciam em células germinativas (ovogônias ou espermatogônias) (MOORE & PERSAUD, 2004).

No desenvolvimento do sistema reprodutor masculino, na 6ª semana a região cortical das gônadas começa a se degenerar e a região medular inicia uma formação tubular (que irá originar os túbulos seminíferos). Essa estrutura contém as células germinativas migratórias e as células mesenquiais derivadas do epitélio superficial, que darão origem às células de sustentação, chamadas de células de Sertoli (ALMEIDA, 1999).

A partir da sétima semana os cordões sexuais se desenvolvem e invadem a medula da gônada (JUNQUEIRA & ZAGO, 1982). O mesênquima intertubular surge nessa fase e dá origem a um mesênquima intertubular diferenciado, com células potencializadas para formação de um grupo de células endócrinas (as células intersticiais de Leydig, que na 8ª semana começam a secretar testosterona) e as células conjuntivas. As espermatogônias são originárias das células germinativas primordiais no interior dos túbulos seminíferos (ALMEIDA, 1999). Os cordões testiculares separam-se da superfície que lhes deu origem e abaixo desta aparece uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a albugínea (JUNQUEIRA & ZAGO, 1982).

Gradualmente o testículo em crescimento se separa do mesonefro em degeneração e se torna suspenso pelo seu próprio mesentério, chamado mesorquidio (MOORE & PERSAUD, 2004). Os cordões testiculares permanecem sólidos até o sexto mês, quando também formam os túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testicular (JUNQUEIRA & ZAGO, 1982). Os túbulos seminíferos sofrem canalização e

adquirem luz, ao mesmo tempo em que às células germinativas primordiais dão origem a duas categorias de espermatogônias: espermatogônias do tipo A, que originam as células tronco; e as do tipo B, que formam os espermatócitos primários (ALMEIDA, 1999).

Na 8ª semana, os túbulos mesonéfricos iniciam um processo de desenvolvimento no qual sua parte proximal se estrutura em ductos eferentes e porção epididimária, enquanto a distal constitui os canais deferentes e a porção corresponde ao ducto ejaculatório, além das vesículas seminais (ALMEIDA, 1999). Evaginações múltiplas de porção prostática da uretra em formação crescem e constituem a porção epitelial glandular da próstata. Já na porção membranosa da uretra, desenvolvem-se evaginações que levam a formação das glândulas de Cowper. O pênis se forma com o desenvolvimento do seio urogenital. O mesenquima forma as saliências genitais, que se diferenciarão em saliências escrotais para formar o escroto, que ficam separados um do outro pelo septo escrotal (ALMEIDA, 1999).

Já no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, os ovários, situados um em cada lado da linha média do corpo, têm origem semelhante à dos testículos, considerando-se que de sua formação tomam parte as células germinativas primordiais e as saliências genitais até a fase gonadal indiferenciada, na qual os cordões sexuais primitivos ocupam as regiões cortical e medular das estruturas gonadais em desenvolvimento. Deste modo, não temos como distingui-los dos testículos, antes do primeiro mês de vida fetal. Nestas gônadas, os cordões sexuais primitivos que brotam do seu epitélio superficial e mergulham no mesênquima formam na região medular em desenvolvimento a *rete ovarii* que degenera posteriormente (ALMEIDA, 1999).

Com a degeneração da porção cordonal medular, o córtex se estrutura através de novos cordões mergulhados no mesênquima subjacente (cordões corticais) aos quais são incorporadas as células germinativas primordiais no 3º mês de vida pré-natal. Mais tarde, após a desagregação das células cordonais, grupos isolados destas células se dispõem ao redor de células germinativas primordiais, dando origem as ovogônias. Estas apresentam grande atividade mitótica e muitas delas se degeneram durante a vida fetal. As células restantes aumentam ligeiramente de volume e se transformam nos ovócitos (ALMEIDA, 1999; JUNQUEIRA & ZAGO, 1982). É somente

no 7º mês de vida intra-uterina que estes ovócitos, que já entraram na primeira divisão meiótica e permanecem na fase de diplóteno até a puberdade, são circundados por células planas oriundas da desagregação cordonal, formando nesta região os folículos primordiais. Os ovócitos encontrados nestes folículos são os ovócitos primários. Alguns destes folículos podem se degenerar antes da puberdade, enquanto outros podem entrar em degeneração somente nesta época. Já alguns podem experimentar o crescimento e maturação sob a influência hormonal (ALMEIDA, 1999).

A estrutura conhecida como gubernáculo prende-se ao útero, próximo ao local de ligação da tuba uterina. A parte cranial do gubernáculo torna-se o ligamento ovariano enquanto a parte caudal forma o ligamento redondo do útero (MOORE & PERSAUD, 2004).

As tubas uterinas se originam nos ductos paramesonéfricos (ductos de Müller) respondendo pela formação das camadas de tecido conjuntivo e muscular. Das porções cefálicas destes ductos é derivado o epitélio tubário e as porções caudais fundem-se originando o epitélio uterino e o epitélio da parte superior da vagina. O mesênquima circundante se encarrega de originar o restante da parede de ambos os órgãos. Com esta fusão, ocorre a aproximação das duas pregas peritoneais, formando os ligamentos largos direito e esquerdo e as bolsas retouterinas e vesicouterinas (ALMEIDA, 1999).

A parte superior da vagina surge com a fusão dos ductos paramesonéfricos, e o restante do seu epitélio é derivado do endoderma do seio urogenital. A fusão dos ductos de Muller também forma o conduto uterovaginal, que fica em contato com o seio urogenital e origina o tubérculo do seio. Essa nova estrutura induz a formação dos bulbossinovaginais que posteriormente se fundem e dão origem a placa vaginal. As células centrais se desintegram formando a luz vaginal e as periféricas parecem contribuir para a formação do epitélio dos dois terços inferiores da vagina (ALMEIDA, 1999).

As pregas urogenitais não se fundem, exceto na parte posterior, onde elas se unem para formar o frênulo dos pequenos lábios enquanto as partes não fusionadas formam os pequenos lábios. A maior parte das pregas labioescrotais também permanece não fusionada, formando duas grandes pregas de pele que são os grandes lábios (MOORE & PERSAUD, 2004). Enquanto isso o clitóris surge com

discreto alongamento do tubérculo genital (ALMEIDA, 1999). Já o hímen é formado devido a uma invaginação da parede posterior do seio urogenital que resulta na expansão da porção caudal da vagina (MOORE & PERSAUD, 2004).

7. CYANTRANILIPROLE E O SISTEMA REPRODUTOR

O processo de reprodução em mamíferos é altamente complexo e pode ser dividido em 4 etapas: pré e pós-natal, amadurecimento sexual e acasalamento (Figura 13). Por esse motivo, os ensaios de toxicidade reprodutiva visam avaliar os efeitos tóxicos de uma determinada substância em cada uma dessas fases. Pode também avaliar o seu potencial em interferir sobre o sistema reprodutor masculino e feminino e de causar danos que sejam capazes de comprometer a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embriofetal, o parto ou o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até que atinjam a maturidade sexual (LEMÔNICA et al., 2008).

De acordo com as normas da *Environmental Protection Agency* (EPA) e recomendadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) e *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), os estudos de toxicidade reprodutiva compreendem três segmentos que foram adaptados da seguinte maneira:

a) segmento I: compreende os estudos de toxicidade crônica, avaliando os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas, sendo os machos tratados antes e durante o acasalamento e as fêmeas, durante a gestação e lactação;

b) segmento II: compreende os estudos de toxicidade pré-natal (ou teratogenicidade), avaliando as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese;

c) segmento III: compreende os estudos de toxicidade peri e pós-natal, avaliando os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal da progênie exposta durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

A realização desses estudos é importante porque permite avaliar o efeito de uma substância sobre o processo reprodutivo em diferentes fases do desenvolvimento, abrangendo desde o período neonatal até a idade adulta e reprodutiva. (HOLLENBACH, 2008; KUNTZE et al., 2012; SANTOS, 2014). Baseado

nesses conceitos, não existem até o momento na literatura estudos que possam avaliar os efeitos do cyantraniliprole no sistema reprodutor tanto feminino quanto masculino, ressaltando a importância do presente trabalho.

Porém, um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, feito com fêmeas adultas que foram tratadas com cyantraniliprole por 28 dias consecutivos, nas doses de 10 e 150 mg/kg/dia, demonstrou que ratas *Wistar* adultas expostas ao cyantraniliprole causou toxicidade hepática, desbalanceou o sistema colinérgico no útero, danificou a arquitetura histológica ovariana e uterina, estimulou produção anormal de progesterona e alterações induzidas na duração do ciclo estral. Esta foi a primeira vez que a toxicidade reprodutiva, bem como a ação do cyantraniliprole como desregulador endócrino foi demonstrada, sendo a maioria dos resultados causado pela sua capacidade de gerar estresse oxidativo (SCARTON et al., 2022). Esses achados nos levam à hipótese de que outras alterações também possam ser geradas, em ambos os sexos.

JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Secretaria de Relações Internacionais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SRI/Mapa), a atividade do setor agrícola no Brasil é uma das mais importantes da economia, sendo responsável pela movimentação de cerca de R\$100 bilhões em exportações, em conjunto com a pecuária. Para manter a alta qualidade dos produtos e também uma alta produção, os produtores fazem uso de agrotóxicos, colocando o país na posição de maior consumidor dessa substância no mundo, chegando à média de 7,3L por pessoa/ano.

É sabido que os agrotóxicos são nocivos tanto para o ambiente quanto para a saúde humana, e por isso existem vários estudos sobre o potencial tóxico de diferentes substâncias desenvolvidas, aos diferentes sistemas biológicos de mamíferos. Dessa forma, novos agrotóxicos com a promessa de serem menos nocivos chegam ao mercado constantemente, como é o caso do cyantraniliprole. Esta molécula tem sido usada em países como Brasil e China e talvez por isso que ainda não existam estudos robustos sobre seus efeitos em sistemas vitais e reprodutivos que possibilitam a perpetuação das espécies. Os estudos são escassos e com doses elevadas que não refletem a realidade de exposição ambiental, ou ainda realizados em sistemas inorgânicos e utilizando invertebrados.

Portanto, esse trabalho justifica-se pela falta de estudos prévios sobre os possíveis efeitos tóxicos do cyantraniliprole sobre os sistemas biológicos de mamíferos, além do fato de não ser encontrado na literatura nenhum dado referente a intoxicação com essa substância, sendo assim, não se pode dizer que ele seja “menos nocivo para o ambiente e para mamíferos”. Dessa forma, os dados resultantes do estudo fornecerão informações sobre o potencial tóxico desse agrotóxico e os possíveis riscos que a exposição a oral pode oferecer à saúde e poder auxiliar as agências regulatórias.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se a exposição ao cyantraniliprole durante os períodos de gestação e lactação podem trazer prejuízos para a gestação, o desenvolvimento físico uterino e pós-natal, e também ao desenvolvimento do sistema reprodutor da prole masculina e feminina de ratos Wistar.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se o cyantraniliprole administrado às mães durante os períodos de prenhez e lactação pode causar prejuízos a gestação e alterações no comportamento materno;
- Determinar se a exposição ao cyantraniliprole durante o período uterino e lactacional pode causar alterações no desenvolvimento pós-natal imediato da prole;
- Determinar os efeitos do cyantraniliprole sobre o desenvolvimento intra-uterino e lactacional do sistema reprodutor feminino e masculino da prole de ratas *Wistar* durante os períodos peripuberal e adulto através da avaliação de parâmetros de instalação da puberdade, dos marcadores de estresse oxidativo e dos parâmetros histopatológicos;
- Contribuir com dados sobre os efeitos e mecanismos de ação da exposição ao cyantraniliprole no desenvolvimento intra-uterino dos testículos, espermatozoides, ovários e útero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Miranda M dos S, Ohashi OM. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. J. Health Sci. [Internet]. 2º de julho de 2015 [citado 9º de outubro de 2023];15(3). Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/691>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Monografias autorizadas**. Brasília, DF: ANVISA, 2018.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, 4 ed., New York: Garland Science, 2002.

ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. Journal of ethnopharmacology, v. 73, n. 1, p. 53-60, 2000.

ALMEIDA, J.M. Embriologia Veterinária Comparada. 1a. ed. GuanabaraKoogan, Rio de Janeiro, 176p. 1999.

Atlas de Pesticidas 2022. Disponível em: https://www.arc2020.eu/wp-content/uploads/2022/10/PesticideAtlas2022_Web_20221010-1.pdf

AWUMEY, E.M.; BUKOSKI R.D. Cellular functions and fluxes of calcium. In: WEAVER C.M.; HEANEY, R.P. Calcium in human health. Totowa: Springer, 2006. Cap.3, p.13-35.

BOOTMAN, M.; COLLINS, T. J.; PEPPIATT, C. M.; PROTHERO, L. S.; MACKENZIE, L.; SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEY, S. C.; SEO, J. T.; BERRIDGE, M. J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signaling - an overview. Cell & Developmental Biology, v. 12, p. 3-10, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde, Departamento de Saúde Ambiental, do Trabalhador e Vigilância das Emergências em Saúde Pública. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2018.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, [...] e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.** Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ano 139, n. 5, p. 1-12, 8 jan. 2002.

BRITO-SILVA, K. et al.. Integralidade no cuidado ao câncer do colo do útero: avaliação do acesso. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 2, p. 240–248, abr. 2014.

BROWN, E. M. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 27, n. 3, p. 333–343, 2016.

CARNEIRO, Fernando Ferreira et al (Org.). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CORDOVA, D., BENNER, E. A.; SACHER, M. D.; RAUH, J. J.; SOPA, J .S.; LAHM, G. P.; SELBY, T. P. 2006. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry Physiology*, Maryland Heights, v. 84, n.1, p.196-214.

da Silva Scarton SR, Tsuzuki F, Guerra MT, Dos Santos DP, Dos Santos AC, Guimarães ATB, Simão ANC, Beu CCL, Fernandes GSA. Cyantraniliprole impairs reproductive parameters by inducing oxidative stress in adult female wistar rats. *Reprod Toxicol*. 2022 Jan;107:166-174. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.12.009. Epub 2021 Dec 27. PMID: 34968715.

DARSZON, A.; LIÉVANO, A.; BELTRÁN, C. Ion Channels: Key Elements in Gamete Signaling. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 34, p. 117-167, 1996.

EDWARDS, G.A.; WEIANT, E.A.; SLOCOMBE, A.G.. The action of ryanodine on the contractile process in striated muscle. *Science* , Washington, v.108, p. 330–332, 1948.

ELLINGER, I. The Calcium-Sensing Receptor and the Reproductive System. *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. 371, p. 1-18, 2016.

FILL, MICHAEL.; COPELLO, J. A. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 893–922, 2002.

FOSTER, S. P., DENHOLM, I., RISON, J.-L., PORTILLO, H. E., MARGARITOPOULIS, J., & SLATERE, R. (2012). Susceptibility of standard clones and European field populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*, and the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), to the novel anthranilic diamide insecticide cyantraniliprole. *Pest Management Science*, 68(4), 629-633. <https://doi.org/10.1002/ps.2306>.

FOX, S. I. *Fisiologia Humana*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2007.

GILBERT, T.; LECLERC, C.; MOREAU, M. Control of kidney development by calcium ions. *Biochimie*, v. 93, n. 12, p. 2126–2131, 2011.

GORE, A.C. (2008): Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.*, 29, 358-374.

HANNING, GREG T.; ZIEGLER, MELISSA.; MARÇON, P. Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. *Pest Management Science*, v. 65, n. May, p. 969–974, 2009.

HARDKE, JARROD.; TEMPLE, JOSHUA.; LEONARD, ROGERS; JACKSON, R. Laboratory toxicity and field efficacy os selected insecticides against fall armyworm (Lepidoptera: noctuidae). *Insecticide Toxicity Against Fall Armyworm*, v. 94, n. June, p. 272–278, 2011.

HO SM, CHEONG A, ADGENT MA, VEEVERS J, SUEN AA, TAM NNC, LEUNG YK, JEFFERSON WN, WILLIAMS CJ. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reprod Toxicol*. 2017 Mar;68:85-104. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.07.011. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27421580; PMCID: PMC5233640.

HOLLENBACH, C. B. Estudo da toxicidade reprodutiva de duas formulações fitoterápicas comerciais contendo soja [glycine max (L.) merr] em ratos Wistar. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Exposição no trabalho e no ambiente. **Agrotóxico**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios, Rio de Janeiro: INCA, 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/ambiente-trabalho-e-cancer-aspectos-epidemiologicos-toxicologicos-e-regulatorios>.

JEANGUENAT, A. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides (Review). *Pest Management Science*, v. 69, n. October, p. 7–14, 2012.

JUNQUEIRA & ZAGO. *Embriologia Médica e Comparada*. RJ: Koogan, 1984

KONG, W. Y.; TONG, L. Q.; ZHANG, H. J.; CAO, Y. G.; WANG, G. C.; ZHU, J. Z.; KOVACS, C. S. Bone development and mineral homeostasis in the fetus and neonate: roles of the calciotropic and phosphotropic hormones. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 4, p. 1143–1218, 2014.

KUNTZE, L. B.; KONDO, A. K.; BEZERRA, B. T. S.; PINTO, T.; CAMARGO, I. C. C. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* CA Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n.1, p. 34-42, 2012.

LAHM, G. P., STEVENSON, T. M., SELBY, T. P., FREUDENBERGER, J. H., CORDOVA, D., FLEXNER, L., BELLIN, C. A., DUBAS, C.M., SMITH, B. K., HUGHES, K. A., HOLLINGSHAUS, J. G., CLARK, C. E., & BENNER, E. A. (2007). Rynaxypyre: a new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 6274–6279.

LAHM, G. P.; CORDOVA, D.; BARRY, J. D. New and selective receptor activators for insect control. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 4127-4133, 2009.

LAHM, George P. et al. Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 22, p. 4898-4906, 2005.

- LANE, M.; BAVISTER, B. D. Calcium homeostase in early hamster preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, v. 59, n. 5, p. 1000-1007, 1998.
- LECLERC, C.; NÉANT, I.; MOREAU, M. Early neural development in vertebrates is also a matter of calcium. *Biochimie*, v. 93, n. 12, p. 2102–2111, 2011.
- LEMÔNICA I. P.; OGA, S.; CAMARGO M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. Editora Atheneu, v. 3, p. 59-71, 2008.
- LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Berne & Levy, fundamentos de fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2006**. 815 p.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE .. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, abr. 2018.
- MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 1-6, 2002.
- MARCONDES, F. K., MELLO, L. L., SPADARI-BRATISFICH, R. C. Estrous cycle influence the response of female rats in the elevated pluz-maze. *Physiol. Behav.*, New York, v. 74, n. 4-5, p. 15-20, 2001.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 536 p.
- MOORE, Keith L.; PERSAUD, T. V. N.; MATHILES, Andréa Leal Affonso. Embriologia básica. 7 Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008, 365 p.
- MORAES, R. F. Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Brasília: IPEA, Texto para discussão, 2019.
- OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, A. F. C.; GALVÃO, M. T. G. Mulheres vivenciando o adoecer em face do câncer cérvico-uterino. *Acta Paul Enferm. Ceará*, 18(2): 150- 5, 2005.
- PINOTTI, M. M. Z. e SANTOS, J. C. P., From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. *Ciência Rural*, v. 43, n. 10, p. 1797-1803, 2013.

QI S, CASIDA JE. Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor. *Pestic Biochem Physiol*. 2013 Nov;107(3):321-6. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.09.004. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24267693.

QI, SUZHEN; LÜMMEN, PETER; NAUEN, RALF; CASIDA, J. E. Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 18, p. 4077–4082, 2014.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, [S. l.], v. 10, n. 14, p. 149–158, 2013.

RIBEIRO, Camila de Miranda. Relação entre doença periodontal em gestantes com parto prematuro e o nascimento de bebês de baixo peso. *Revista Saúde e Desenvolvimento*. v. 4, n. 2, p.1-18, 2013.

RICCARDI, D.; BRENNAN, S. C.; CHANG, W. The extracellularcalcium - sensing receptor, CaSR, in fetal development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 27, n. 3, p. 443–453, 2013.

SANTOS, M. C. Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato de *Cordia ecalyculata* Vell: em ratos Wistar. 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências. Universidade Estadual Paulista. Assis.

SILVA, A.G.H.; COZZOLINO, S.M.F. Cálcio. In: COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. 2.ed. Barueri: Manole, 2007. Cap.22, p.456-481.

SILVA, J. P. Dr, José Pereira da Silva – Saúde Sexual: Importância da contracepção. 2012. Disponível em: josepereiradasilva.com/pt/especialidades/importancia-da-contracepcao

TAVARES, D. C. G.; SHINODA, D. T.; MOREIRA, S. S. da C.; FERNANDES, A. da C. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações . **Sistemas & Gestão**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 2–10, 2020. DOI: 10.20985/1980-5160.2020.v15n1.1532.

TERRA, Fábio Henrique Bittes. A indústria dos agrotóxicos no Brasil. 2008. 156p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimentos econômico). Departamento de

Economia, Setor de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

WILLIAMS, ALAN J. et al., Light at the end of the Ca²⁺ release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 34, p. 61–104, 2001.

ZHANG, R., LIU, K., CUI, Y., ZHANG, W., HE, L., GUO, S., CHEN, Y., LI, Q. X., LIU, S., WANG, B. Development of a monoclonal antibody-based ELISA for the detection of the novel insecticide cyantraniliprole. *RSC Advances*, v. 5, p. 35874–35881, 2015.

ARTIGO 1:

ORAL ADMINISTRATION OF CYANTRANILIPROLE TO *WISTAR* RATS DURING PREGNANCY AND LACTATION ALTERS MATERNAL BEHAVIOR AND HARMS THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF PUBERTAL AND ADULT OFFSPRING

ORAL ADMINISTRATION OF CYANTRANILIPROLE TO *WISTAR* RATS DURING PREGNANCY AND LACTATION ALTERS MATERNAL BEHAVIOR AND HARMS THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF PUBERTAL AND ADULT OFFSPRING

ABSTRACT

Brazil, the third largest global user of pesticides, dumps more than one million tons annually, generating an increase in poisoning and environmental contamination. Between 2007 and 2017, chronic exposure to these substances generated side effects such as infertility, impotence, miscarriages, neurotoxicity and increased risk of cancer. Faced with concerns, new insecticidal molecules, such as cyantraniliprole, are

introduced. Its mechanism of action is dependent on the molecule binding to ryanodine receptors, causing its activation and consequently a rapid and massive release of calcium ions. As it is a new molecule on the market, studies in the literature on possible effects on mammals are scarce, with no concrete data on long-term effects on human health. Therefore, the work seeks to evaluate the impacts of oral administration of cyantraniliprole during periods of pregnancy and lactation on maternal behavior and the reproductive system of female offspring. This work was approved by CEUA-UEL (OF. CIRC. CEUA n. 20/2020). Wistar rats were placed for mating and after pregnancy diagnosis, they were divided into control groups, C1, C10 and C150 (n = 10), which received water and cyantraniliprole at concentrations of 1 mg/kg/day, 10 mg/kg/day and 150 mg/kg/day, respectively. Maternal behavior, physical development parameters of the offspring, uterine and ovarian histology and oxidative stress levels of both organs at pubertal and adult ages were analyzed. The mother's oral exposure to a dose of 150 mg/kg/day was toxic to the pregnancy, causing the loss of the experimental group. The analysis of maternal behavior indicated that females in groups C1 and C10 showed significant changes, with increased contact with the pups, longer breastfeeding time and shorter cleaning time (of themselves and the pups) and shorter time without pups. There was no change in the physical development of the offspring of groups C1 and C10 when compared to the control. Histological and oxidative stress analysis of the ovaries showed no changes in any of the groups and any of the ages. Analysis of the uterus indicated a thickening of the organ and increased levels of oxidative stress in both groups and both ages. It is possible to conclude that the concentration of 150 mg/kg/day is unfeasible for this experimental design. Furthermore, exposure also causes histological changes and increased levels of oxidative stress in the uterus of female offspring, which is an organ-dependent action, since the ovary has not suffered its effects.

Key-words: pesticide; intra-uterus exposition; toxicology

INTRODUCTION

Pesticides, or agricultural pesticides, are chemical, physical and biological products used in agriculture to increase production and avoid health problems in crops

(INCA, 2015). In absolute numbers, Brazil is the third country with the highest use of pesticides in the world, which can be explained by the fact that the country has the third largest agricultural area on the planet (HESS; NODARI, 2022). According to INCA (2021), Brazil dumps more than one million tons of pesticides on crops per year, representing an average of five kilos for each inhabitant. The wide application of pesticides, associated with aggravating factors such as little-known risks, non-use (or incorrect use) of personal protective equipment, disregard for current legislation and social problems, are increasing the number of poisonings and environmental contamination in the country (Bassani et al., 2018).

In the period between 2007 and 2017, an increasing raise in the number of poisonings was recorded, related both to the increase in the use of pesticides and their inappropriate use, and to the emergence of effects caused by chronic exposure (TAVARES, et al., 2020). Among the various side effects due to chronic exposure to these substances, infertility, sexual impotence, miscarriages and malformations, neurotoxicity, hormonal changes, increased risk of cancer and effects on the immune system stand out (INCA, 2021).

Due to the great toxicity of pesticides and the great controversies generated due to their harmful effects on human health and the environment, new insecticide molecules have been registered, with the proposal of having fewer side effects (HALFELD-VIEIRA et al., 2016). Among these molecules is cyantraniliprole, an insecticide belonging to the class of anthranilic diamides, which acts through contact and ingestion (BL BENEVIA®). Its mechanism of action is dependent on the molecule binding to ryanodine receptors, causing its activation and consequently a rapid and massive release of calcium ions, resulting in lethargy, paralysis and subsequent death of the target organism (QI, et al., 2014).

According to the product leaflet registered with MAPA, cyantraniliprole does not have significant acute toxicity in mammals through oral, dermal and inhalation exposure routes and is not a dermal or ocular irritant. Furthermore, the specific mechanisms of toxicity of this substance in humans or other mammalian species are not known, no reports of adverse health effects have been reported and no specific symptoms of its toxicity to humans are known (BL BENEVIA®). However, as it is a new molecule on the market, studies in the literature on possible effects on mammals are scarce, with no concrete data on long-term effects on human health. However,

previous studies by our research group indicated that adult Wistar rats exposed to cyantraniliprole in doses of 10 and 150 mg/kg/day, for 28 consecutive days, presented liver toxicity, imbalance of the cholinergic system in the uterus, damage to the ovarian histological architecture and uterine, abnormal production of progesterone and changes in the duration of the estrous cycle (SCARTON, et al., 2022; data not published), indicating that the molecule may indeed present a risk to human health. Therefore, the objective of the study was to verify whether the oral administration of cyantraniliprole to mothers during periods of pregnancy and lactation is capable of causing changes in maternal behavior and in the reproductive system of pubertal and adult female offspring.

MATERIALS AND METHODS

This research project was approved by the CEUA of the State University of Londrina, according to OF. CIRC. CEUA n. 20/2020.

Experimental Design

Female (80 days old) and male (90 days old) Wistar rats were obtained from the central vivarium of UEL and after acclimatization in the vivarium of the Laboratory of Toxicology and Metabolic Disorders of Reproduction, mating began (1 male and 2 females per box) overnight. Pregnancy was confirmed the following morning, through a vaginal smear, and those in which sperm were found and an indication of estrus phase in the smear were considered pregnant.

On this day, called gestational day 0 (DG0), the females (n=10/group) were allocated to individual cages and divided to form the following experimental groups: I) Control (C); II) Cyantraniliprole 1 mg/kg/day (C1); III) Cyantraniliprole 10 mg/kg/day (C10); and IV) Cyantraniliprole 150 mg/kg/day (C150). The pesticide was administered via gavage, from the 5th day after pregnancy diagnosis (GD5), to ensure that the pesticide did not harm embryo implantation, until lactational day 21 (DL21). The control group received only water.

The doses of 10 and 150 mg/kg/day were chosen due to previous information found in the product leaflet, which informs about previous studies by the manufacturer that used these concentrations (Cyantraniliprole [Bula]). The dose of 1 mg/kg/day was chosen after adapting the Acceptable Daily Intake (ADI) dose, reported by ANVISA, to Wistar rats. It is assumed that animals are more resistant (WHO/IPCS, 2005), and for

this study the dose of 1 mg/kg corresponds to 100 times the dose allowed for humans (inter and intra species conversion) (COSTA et al., 2015) was chosen.

After birth, the litter was reduced to 8 pups, 4 males and 4 females, whenever possible. Controlled conditions were maintained throughout (12h light/dark cycle; temperature $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$), standard diet and water ad libitum.

Assessment of maternal toxicity and maternal behavior

The animals were monitored daily for general well-being (tearing, piloerection, tremors, abnormal breathing pattern or any abnormal event that could be observed), and from GD 0 the mothers' weight and food consumption were monitored weekly until the DL21.

General maternal behavior was observed from GD18 onwards. Disturbed maternal behavior was analyzed using the adapted Kiss et al. (2012) methodology, at DL5, peak maternal care (Aleixo et al., 2012). To do this, the mother was removed from her box and the nest was dismantled. After 30 min, the mother was placed back in the box and the mother-cub interaction was filmed for 30 min and evaluated. All analyzes of this behavior were carried out using the Countee app (Krushka Design) on an Android platform.. The following parameters were analyzed: latency to search for the 1st pup, return the pup to the nest (contact number to search for the pup), time spent on self-cleaning, time spent on cleaning the pup, time spent on building the nest, time breastfeeding and time without interaction with the pups.

Analysis of offspring development:

The external physical characteristics of the pups were evaluated: the anogenital distance (AGD) at birth and at the onset of puberty; the opening of the ear pinnae; the eruption of incisor teeth; the appearance of fur; nipple retention; the onset of puberty; and weight monitoring from birth to adulthood.

To determine the onset of puberty in female pups, the average day per litter was determined on which complete vaginal opening and the onset of the first estrus occurred (Marcondes et al., 2002), starting investigations from the PNDPND30.

Estrous cycle in adulthood

In adult females (PND80), the investigation of the regularity of the estrous cycle was carried out through analyzes of vaginal washings (Marcondes et al., 2002). The females were evaluated for fifteen consecutive days to comprise three estrous cycles.

From these data, the number of estrous cycles, the duration of each cycle (in days) and the frequency of proestrus, estrus, metestrus and diestrus were calculated.

Material collection

From pubescent and adult females, the ovaries and uterus were collected. The organs were removed and weighed on a precision scale. The uterus and ovaries were stored at -80°C for later assessment of oxidative stress levels, or fixed in Alfac solution (85% alcohol, 10% formaldehyde and 5% glacial acetic acid) for 24 hours for later histopathological evaluation. For histopathological evaluation, the fixed organs were embedded in paraffin, cut with a microtome at 5µm thickness (three non-serial sections per animal) and stained with hematoxylin and eosin.

At both ages, the right ovary was used to count corpora lutea, as well as to classify and count follicles by section area. The classification was based on the different stages of follicular development, the morphology of the follicles and the number of layers of granulosa cells (BORGEEST et al., 2002; TALSNESS et al, 2005), being divided into: primordial, primary, pre- antrals and antrals. The left ovary was stored for oxidative stress methodologies.

Regarding the uterus of these animals, one of the uterine horns was used for histopathological and morphometric evaluation (endometrium height, luminal and glandular epithelium height and number of glands count) and the other was separated for oxidative stress. In each histological section, ten different regions were analyzed, giving a total of thirty measurements.

Oxidative profile analysis

Quantification of substances reactive to thiobarbituric acid

Levels of malondialdehyde (MDA), an intermediate product of lipid peroxidation, were determined by the difference between absorbance at 535 and 572 nm. The results were expressed as nmol of MDA per milligram of protein (Federici et al. 2007).

Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Assessment of SOD activity was performed according to the method described by Senthilkumar et al. (2021). The reaction consists of quantifying the complex formed between superoxide anions by the addition of NBT and $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ with a yellow color and the reduction of NBT, forming a blue color reading at 560 nm. Samples were read every 15 seconds for 2 minutes.

Catalase Activity

The enzymatic activity of CAT was determined by the degradation of hydrogen peroxide into oxygen and water. After determining the protein concentration (normalized to 1.0 mg/ml in PBS), 297 μ l of reaction medium was placed in a UVvis microplate and the reading was taken at 240nm for 15 seconds for 1 minute (AEBI, 1984).

Glutathione S-transferase (GST) Activity

Glutathione-S-transferase activity was evaluated by spectrophotometry with CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) according to Keen and collaborators (1976) based on its conjugation with glutathione.

Assessment of reduced glutathione (GSH) concentration, GSSG and Oxidative Stress Index

GSH concentration was determined according to the method proposed by Rahman et al. (2007), with some modifications, using 5,5'-dithiobis 20-nitrobenzoic acid in the homogenate, evidenced by the formation of the yellow color. GSH levels were measured at 412 nm and results expressed as μ mol/mg protein.

Concentration of antioxidants by the FRAP method

To evaluate the iron reducing power, the method of Benzi and Strain (1996) with adaptations is used. For this, the FRAP solution was prepared by adding 25.0 mL of 0.3 M acetate buffer to 2.50 mL of 20.0 mM ferric chloride hexahydrate and 2.50 mL of 10.0 mM TPTZ. For the test, already standardized samples were used (1 mg of protein per mL of sample). In a microplate, 150 μ l of FRAP reagent was added to 50 μ l of sample. The reading was taken immediately after adding the reagent, at 595 nm. The antioxidant potential of the tissues was determined based on a calibration curve, plotted using Trolox at concentrations ranging between 0.0325 mM and 0.5 mM.

Statistical analysis:

The data obtained were subjected to the Shapiro-Wilk test to verify normality. As all data were considered normal, they were analyzed using ANOVA and subsequent Tukey test. A significance level of 5% was adopted and analyzes were carried out using the GraphPad Prism® Software.

RESULTS

1. Acute toxicity

The parent females of groups C, C1 and C10 did not show any signs of acute toxicity during administration or the subsequent period. However, females in the C150 group presented piloerection and agitation after administration.

2. Maternal parameters

There was no significant change in maternal weight gain or food intake between the groups analyzed. However, the C150 group showed changes inconsistent with reproductive and developmental toxicity studies, as there were abortions (3/10), eating of offspring (1/10), uterine extrusion after birth (1/10) and loss of all pups up to PND23 (3/10). Therefore, the C150 group was excluded and the other results only take into account the control groups, C1 and C10.

3. Maternal behavior

The analysis of maternal behavior with disturbance showed that the mother had a greater number of contact with the pups, less time spent self-cleaning and cleaning the pups in groups C1 and C10, and in the C10 group the mothers also showed more time breastfeeding and less time without breastfeeding interaction with the pups.

Table 2: Results of the assessment of maternal behavior with disturbance on the 5th day.

Parameters evaluated	Control	C1	C10
Time to recovery of the first pup(s)	5.3 ± 0.7	7.1 ± 0.836	9.6 ± 2.10
Pups contact number	3.8 ± 0.4667	6 ± 0.4216 *	7.1 ± 0.7063 *
Self-cleaning(s)	199.7 ± 12.21	73.6 ± 15.32 *	32.9 ± 7.287 *
Cleaning the pups(s)	356.3 ± 42.57	236.7 ± 11.94 *	30.7 ± 4.766 *
Construction of the nest(s)	96.9 ± 11.92	217.3 ± 51.29	254.2 ± 68.18
Breastfeeding(s)	444.63 ± 89.66	489.41 ± 37.22	1362.753 ± 14.506*
No interaction with the offspring(s)	797.3 ± 28.13	931.6 ± 70.06	226.7 ± 27.02 *

Data expressed as Mean $\pm$ standard deviation. *Significant values ($p \leq 0.05$). Time represented in seconds (s). Groups analyzed: control, exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day (C1) and exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day (C10).

4. Parameters of offspring development

Animals in group C1 showed a significant reduction in birth weight when compared to the control group, while group C10 remained unchanged (Figure 2). However, upon reaching pubertal and adult ages, the difference did not remain. There were no significant changes between the AGDof offspring from different groups either at birth or after the onset of puberty, and developmental milestones were observed on the correct days in all groups, as well as the age at onset of puberty (Table 2) .

Table 2: Data obtained from observational analysis of offspring development parameters.

Development parameters	Control	C1	C10
Ear opening	PND2-3	PND2-3	PND2-3
Incisor tooth eruption	PND7 – 8	PND6 – 8	PND6 - 8
Appearance of hair	PND7 – 8	PND7 – 8	PND7 - 8
Eye opening	PND10	PND10 – 11	PND9 – 11
Nipple retention	PND12	PND12	PND12
Onset of puberty	PND35 - 38	PND35 – 38	PND35 - 38

Groups analyzed: control, exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day (C1) and exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day (C10).

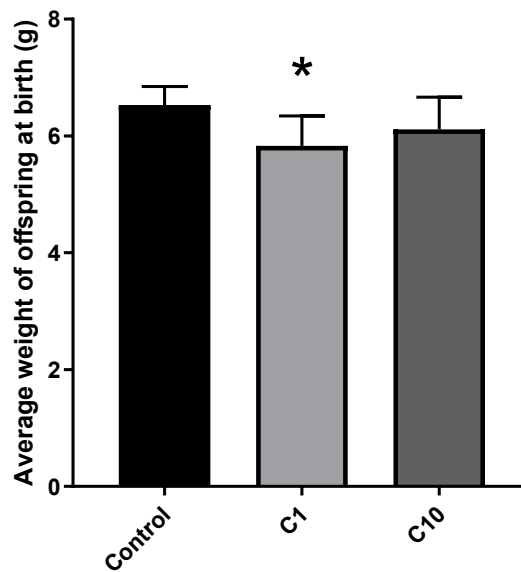


Figure 2: Graph representing the weight of female offspring at birth on control, C1 (exposed to 1 mg/kg/day of cyantraniliprole) and C10 (exposed to 10 mg/kg/day cyantraniliprole) animals. * indicates significant difference ($p \leq 0.05$). Data presented as Mean $\pm$ Standard deviation, in g.

5. Histopathological analysis of the ovaries

There were no significant differences when comparing the quantities of primordial, primary, pre-antral and antral ovarian follicles when comparing the three experimental groups at both ages (data not shown).

The analysis of ovarian morphometry indicated that only pubescent animals in group C1 showed significant changes, with a reduction in oocyte diameter (Figure 4). While the follicular diameter did not show significant changes in any of the groups and at any of the ages (Figure 5).

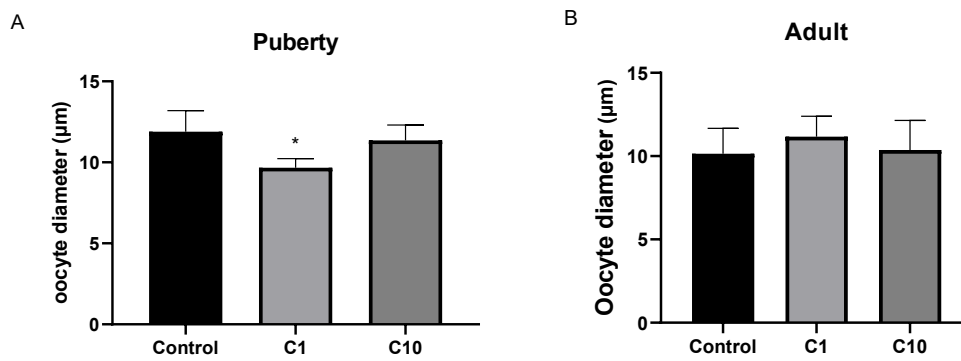


Figure 5: Diameter of oocytes from A) pubescent females and B) adult females from groups control, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation. *Significant data ($p \leq 0.05$).

6. Histopathological Analysis of the Uterus

The uterine gland count did not show any changes when comparing the control groups, C1 and C10, in animals of both ages (Figure 6). There were also no significant differences when comparing the measurement of the glandular epithelium between the groups, at both ages (Figure 7).

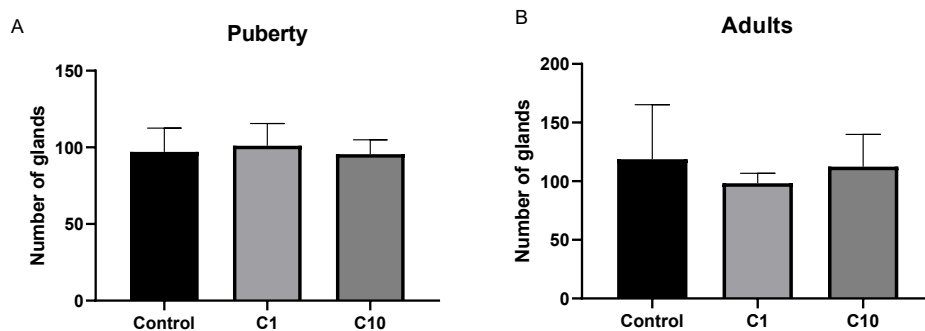


Figure 6: Number of uterine glands in A) pubescent females and in B) adult females of control group, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation.

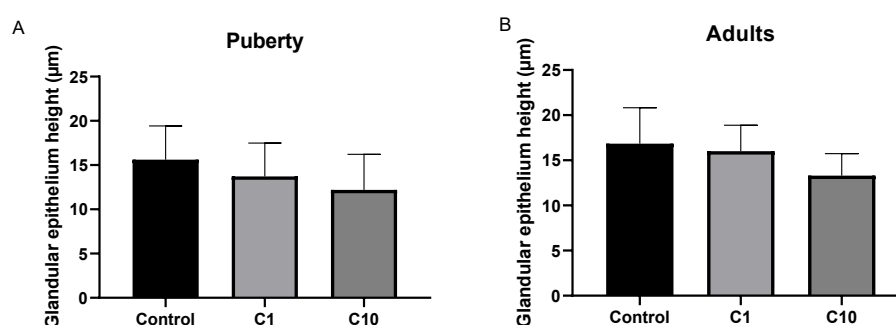


Figure 7: Height of the uterine gland epithelium in A) pubescent females and B) adult females of control group, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation.

Uterine morphometry analysis indicated a thickening of the perimeter of animals of both ages, in groups C1 and C10 when compared to the control (Figure 8). When analyzing the myometrium, it was possible to observe thickening only in pubescent animals from group C1 and in adult animals from group C10, when comparing the data to the control (Figure 9). The endometrium showed thickening in pubescent animals in groups C1 and C10 compared to the control, while adults showed no significant change (Figure 10).

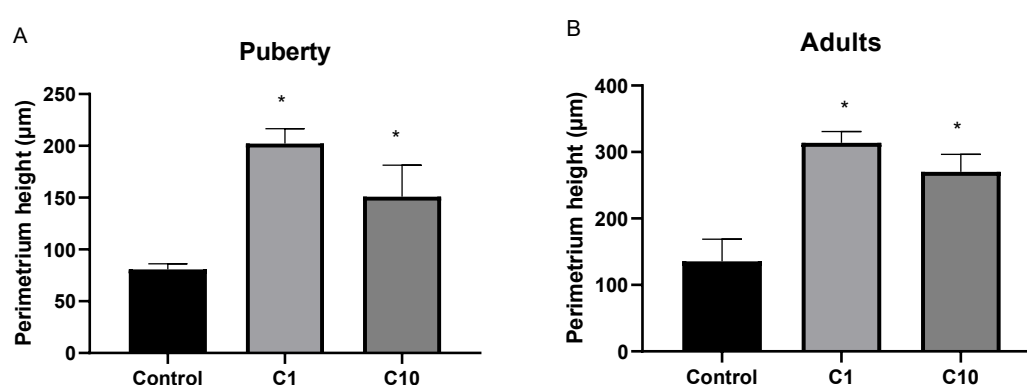


Figure 8: Thickness of the uterine perimetrium, in μm , in A) pubescent and B) adult females of control group, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation. *Significant data ($p \leq 0.005$).

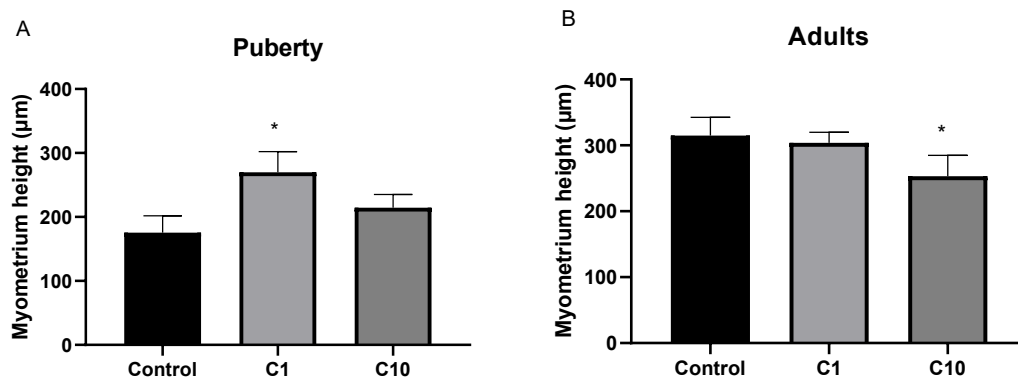


Figure 9: Thickness of the uterine myometrium, in μm , in A) pubescent and B) adult females of control group, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation. *Significant data ($p \leq 0.005$).

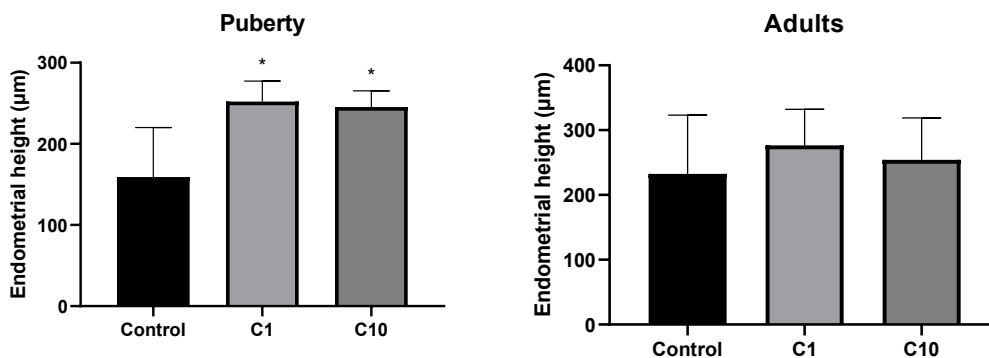


Figure 10: Thickness of the uterine endometrium, in μm , in A) pubescent and B) adult females of control group, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation. *Significant data ($p \leq 0.005$).

Oxidative stress

The results of the biochemical analysis of oxidative stress levels in the ovary did not demonstrate significant changes in pubescent and adult animals from either group when compared to the control (data not shown).

The analysis of the uterus indicated a significant increase ($p < 0.05$) in catalase and SOD activity in groups C1 and C10 when compared to the control (Figure 11) and the maintenance (without significant difference) of TBARS levels, enzyme activity GSH

and GST and tissue antioxidant activity (FRAP) in pubescent females (data not shown). Adult females showed a significant increase in catalase, SOD and GSH activity in groups C1 and C10, and in TBARS levels in group C10 when compared to the control (Figure 12), with the remaining parameters maintained (data not shown).

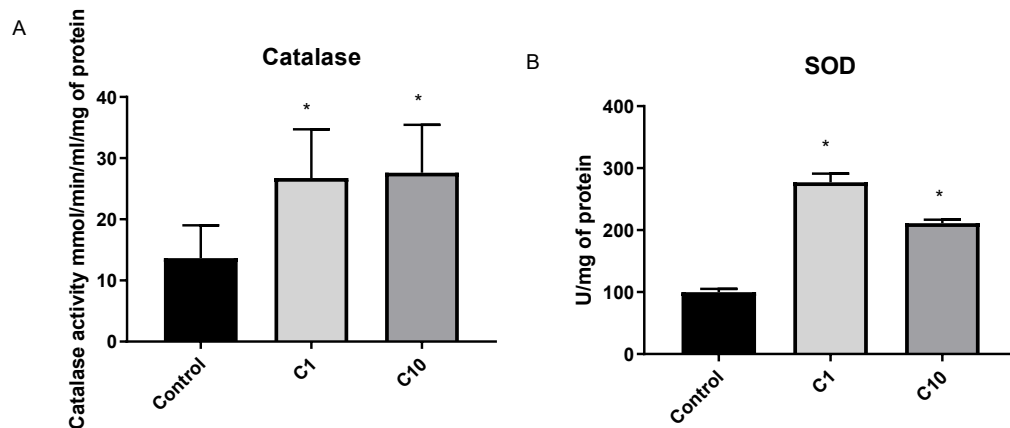
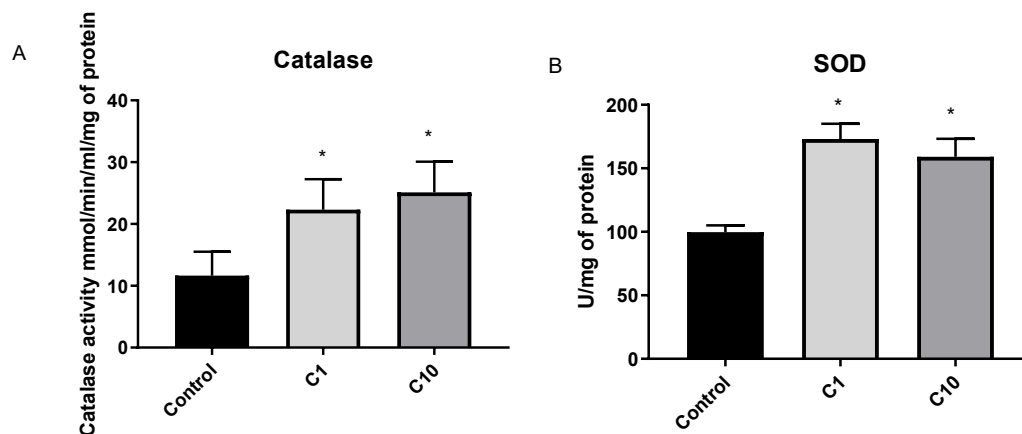


Figure 11: Graphs representing the activity of A) catalase and B) SOD in the uterus of pubescent females of control group, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation. *Significant data ($p \leq 0.005$).



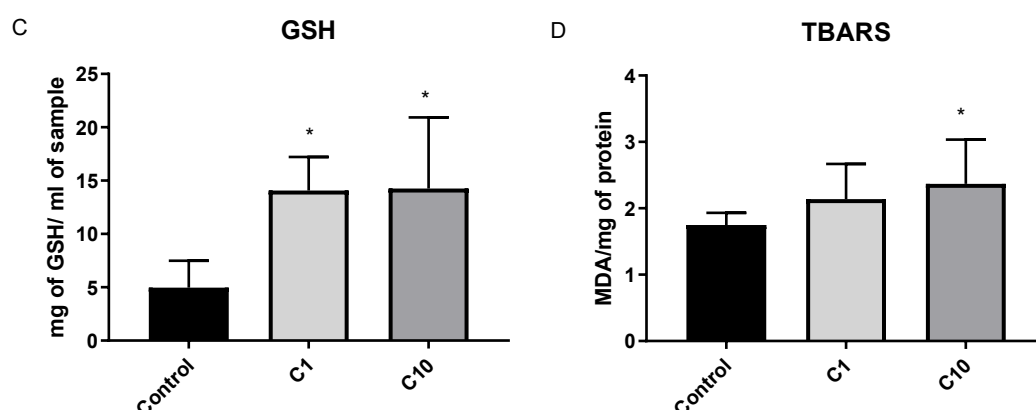


Figure 12: Graphs representing the activity of A) catalase, B) SOD, C) GSH and D) TBARS levels in the uterus of adult females of control group, C1 (exposed to cyantraniliprole 1 mg/kg/day) and C10 (exposed to cyantraniliprole 10 mg/kg/day). Data presented as mean $\pm$ standard deviation. *Significant data ($p \leq 0.005$).

DISCUSSION

The results obtained in this study indicate that the ingestion of cyantraniliprole during periods of pregnancy and lactation impairs maternal behavior and the development of the female offspring's reproductive system.

In reproductive and developmental toxicity studies, assessment of maternal toxicity is essential and the main non-invasive methods of maternal toxicity indicators are body weight gain and food intake (BACHI et al. 2013). In the present study, the maintenance of these parameters indicates that cyantraniliprole did not cause acute gestational toxicity, therefore making it feasible to evaluate both the mother and the offspring. Contrary to these results, the group exposed to a dose of 150 mg/kg/day of cyantraniliprole became unviable due to the reported results. It is important to highlight that the choice of this dose was obtained through the pesticide's leaflet, which stated that it was safe for toxicity tests on adult rats. Previous studies from our laboratory using the same doses as this study in adult rats (SCARTON et al., 2022) and showed experimental feasibility.

In the present study, the behaviors of carrying the pup around the box and the change in nest location indicate a more reckless behavior in mothers exposed to cyantraniliprole. The search behavior of pups for their mother is a parameter that consists of a repetitive, dopamine-dependent motor sequence (SJOEHOLM et al., 2011). According to Erickson and colleagues (1992), dopamine release is calcium

dependent. Dopamine vesicles are anchored close to the membrane of the pre-synaptic neuron and through membrane depolarization, voltage-sensitive Ca^{2+} channels open, leading to the influx of the mineral and consequently the release of neurotransmitters (Binda et al., 2005). The presence of RyR3-type ryanodine receptors in brain tissue, as well as in other organs in smaller quantities (FILL; COPELLO, 2002; BALSHAW; YAMAGUCHI; MEISSNER, 2002), and the possible alteration in their functioning due to exposure to cyantraniliprole may explain the behavioral abnormalities found in the present study. Therefore, daily oral intake of cyantraniliprole may be responsible for altering dopaminergic release, thus altering the maternal impulse to retrieve the pups and take them to the nest.

Breastfeeding can be considered primarily as a reflex or an automatic maternal response to the stimulation caused by the proximity of the offspring (NUMAN, 2004; NUMAN; STOLZENBERG, 2009). The aforementioned changes, which cause greater proximity between the mother and her offspring, may be responsible for the longer breastfeeding time found in the C10 group. All these facts together explain why the mothers in this group recorded less time outside the nest and without contact with the pup, since there may have been an overstimulation of the central nervous system, causing the mother to get closer to the pup.

Regarding changes in female offspring, it was possible to identify that oral exposure to cyantraniliprole during the gestational and lactational periods causes morphometric changes in the uterine layers of pubertal and adult offspring, as well as an imbalance in biochemical parameters related to oxidative stress, at both ages.

Unlike the uterus, whose composition and function make it highly dependent on calcium for its functioning, the ovary is mostly composed of connective tissue, being less influenced by changes in the functioning of calcium channels (SANTOS, 2009), which may explain the no morphometric changes in this organ after exposure to cyantraniliprole. Analysis of biomarkers of oxidative stress in the ovary also did not show any changes. These results prove that exposure to the toxicant during pregnancy and lactation does not alter ovarian development and maturation. As hormonal production is influenced by the ovary (RESENDE et al., 2010), the absence of changes in this organ corroborates the maintenance of the normal estrous cycle.

It is known that endocrine disruptors, such as pesticides, cause changes in the female reproductive system, functionally or morphologically, due to their hormonal

effect (GORE et al., 2015). Regarding the morphometric parameters of the uterus, it was observed that the lowest dose of cyantraniliprole somehow programmed the perimetrium to become thicker in pubertal age, as well as in adulthood. The same was observed at the higher dose, showing a maintenance of the toxic effect in the long term. Therefore, even though the stimulus was stopped on DL21, the repercussions extend into adulthood. In the myometrium, the lowest dose of cyantraniliprole caused an acceleration of the development of this layer in pubertal age, which is no longer noticeable in adulthood. Therefore, its development was probably delayed/blocked at this stage, remaining the same as the control group in adulthood. However, at the highest dose, there is normal development of the myometrium at pubertal age. However, this group also appears to have a delay/block in its development, as it is less thick compared to the control group. In relation to the endometrium, there is a similarity in the effect of both doses on this layer, since there is an acceleration in the development of this layer, which is lost in adulthood.

On the contrary, a previous study by our research group did not show morphometric changes in the uterus of adult rats exposed to doses of 10 and 150 mg/kg/day of cyantraniliprole (SCARTON et al., 2022). This indicates a greater susceptibility to exposure to cyantraniliprole during pregnancy and lactation on the morphology of the developing uterus, in relation to exposure to adult organs, indicating that exposure to cyantraniliprole influenced the development process of these layers, probably through metabolic programming. As the development of the reproductive system in mammals begins in the first days of pregnancy and continues until puberty, this prolonged period of development, growth and differentiation promotes a wide window of susceptibility to the action of endocrine disruptors (HO et al., 2017).

Oxidants are constantly produced in our body through normal metabolic processes, like cyclooxygenation, lipoxygenation, lipid peroxidation (Nimse and Pal, 2015), which are neutralized through the body's antioxidant strategies, such as the glutathione system and the enzymes SOD and catalase (Circu and AW, 2010). The increase in levels of such enzymes may be related to the increased production of oxidants by the body, however, it does not indicate that any cellular damage is being caused (Persson et al., 2014). However, high levels of TBARS indicate plasma membrane damage (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). This increase associated with the increase in antioxidant systems indicates an injury caused by oxidative stress

(Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). The biochemical parameters of oxidative stress in the uterus of females of pubertal age indicate only an attempt by the organ to prevent the formation of a state of oxidative stress, evidenced by the increase in the enzymatic activity of catalase and SOD. Although exposure to cyantraniliprole ceased after the lactation period, the increase in antioxidant systems was maintained until adulthood, evidenced by the sustained increase in the activity of catalase, SOD, GSH enzymes. However, unlike pubescent females, it is inferred that the body's antioxidant system was unable to continue maintaining the redox balance, causing damage to the cell membrane, demonstrated by the increase in TBARS levels. The condition of oxidative stress is harmful to the body and can cause several health and fertility problems (AGARWAL et al., 2003).

To date, there are no published articles investigating the action of cyantraniliprole in the uterus of the offspring of rats whose mothers were exposed to cyantraniliprole or similar toxicants. However, previous studies from our laboratory have already indicated that cyantraniliprole is also capable of inducing changes in the levels of oxidative stress in the uterus of adult rats that were exposed to the toxin for 28 consecutive days, causing imbalance in the cholinergic system in the uterus, damaging the histological architecture ovarian and uterine, abnormal production of progesterone, in addition to inducing changes in the duration of the estrous cycle. (SCARTON et al., 2022). The combination of results from both studies highlights the influence of cyantraniliprole on uterine tissue, mainly causing changes in oxidative levels.

Conclusion

It is concluded that oral exposure to cyantraniliprole during periods of pregnancy and lactation causes significant changes in maternal behavior and that a concentration of 150 mg/kg/day is unfeasible for this experimental design. Furthermore, exposure also causes histological changes and increased levels of oxidative stress in the uterus of female offspring, which is an organ-dependent action, since the ovary has not suffered its effects.

REFERENCES

- AEBI, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- AGARWAL A, SALEH RA, BEDAIWY MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003 Apr;79(4):829-43. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04948-8. PMID: 12749418.
- ALEIXO, J.F., PEREIRA, M., MONTAGNINI, B.G., PEREIRA, M., FORCATO, S., MOREIRA, E.G., CERAVOLO, G.S., VIEIRA, M.L., KISS A., GERARDIN D.C.C., Effect of paracetamol treatment on maternal care and reproductive outcomes in female rat offspring, *Reprod. Fertil. Dev.* 32 (2012) 1311–1325, <https://doi.org/10.1071/RD20007>.
- ARAÚJO, A. J. DE . et al.. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115–130, jan. 2007.
- BACCHI, A. D. *et al.* Developmental exposure to *Passiflora incarnata* induces behavioural alterations in the male progeny. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 25, n. 5, p. 782-789, 2013. DOI: 10.1071/RD11307
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BASSANI, D.; SILVA, L. R.; BIRK, L.; FRANCO DE OLIVEIRA, S. C. W. S. E.; DALLEGRAVE, E.; OLIVEIRA, T. F. Pesticides in Brazil: a viewpoint about the poison law. *J. Agric. Food Chem.*, 66 (46), 12153-12154, 2018. doi:10.1021/acs.jafc.8b05669
- BENZIE, I. AND STRAIN, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- BINDA, AV; KABBANI, N; LEVENSON, R. Regulation of dense core vesicle release from PC12 cells by interaction between the D2 dopamine receptor and calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS). *Biochem Pharmacol.*, vol. 69, n. 10, 2005. p. 1451-1461

BODENSTEINER, K. J., GHIRALDI, L. L., & MINER, S. S. (2012). Differential effects of short- and long term early maternal separation on subsequent maternal behavior in rats. *Journal of General Psychology*, 139(2), 78–99.

BORGEEST, C., SYMONDS, D., MAYER, L. P., HOYER, P. B., FLAWS, J. A. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol Sci*, v. 68, p. 473–8, 2002.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 36, p. 178-196, 2015.

CARRARA, I.M., MELO, G.P., BERNARDES, S.S., NETO, F.S., RAMALHO, L.N.Z., MARINELLO, P.C., LUIZ, R.C., CECCHINI, R., CECCHINI, A.L., 2019. Looking beyond the skin: Cutaneous and systemic oxidative stress in UVB-induced squamous cell carcinoma in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 195, 17–26.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

COSTA, N.O.; VIEIRA, M.L.; SGARIONI, V. PEREIRA, M.R.; MONTAGNINI, B.G. 2014, Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. *Toxicology*, 335, 55-61.

CRISÓSTOMO, N. L.; MONTE, R.; NAVARRO, F.; NETO, J. S. Relação da Obesidade e Cálcio: Uma Abordagem de Estudos Realizados, *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 1, n. 4, p. 16-24, São Paulo, julho/agosto. 2007.

EGELMAN DM, MONTAGUE PR. Calcium dynamics in the extracellular space of mammalian neural tissue. *Biophys J.* 1999 Apr;76(4):1856-67. doi: 10.1016/s0006-3495(99)77345-5. PMID: 10096884; PMCID: PMC1300162.

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E.; HOFFMAN, B. J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 89, n. 22, 1992. p. 10993-10997

FEDERICI, G., SHAW, B. J., & HANDY, R. D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84(4), 415–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>

FILL, MICHAEL.; COPELLO, J. A. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 893–922, 2002.

FREITAS, D. M. O. ; MARTINO, H.S.D.; RIBEIRO, S.M.R.; ALFENAS, R. C.G. Calcium ingestion and obesity control *Nutrición Hospitalaria*, vol. 27, núm. 6, noviembre-diciembre, 2012, pp. 1758-1771

GEMIP: Grupo de Estudos em Manejo Integrado de Pragas. Disponível em: <<http://www.gemip.com.br/index.php/ensino/sobre-o-mip/16-sobre-o-mip/49-resistencia-deplantas-a-insetos>>

GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. As bases farmacológicas da terapêutica. 8 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.

GORE, A.C., CHAPPELL V.A., FENTON, S.E., FLAWS, J.A., NADAL, A., PRINS, G.S., TOPPARI, J.; ZOELLER, R.T., EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals, *Endocr. Rev.* 36 (2015) 1–150, <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MARINHO-PRADO, JS; NECHET, K. de L.; MORANDI, MAB; BETTIOL, W. Natural agricultural pesticides: use and perspectives. Brasília, DF: Embrapa, 2016. Chapter 19.

HESS, S. C.; NODORI, R. **Agrotóxicos no Brasil: panorama dos produtos entre 2019 e 2022**. *Revista Ambientes em Movimento*, [S.I.], v. 2, n. 2, p. 39-52, dez. 2022.

HO, S. M.; CHEONG, A.; ADGENT, M. A.; Environmental Factors, Epigenetics, and Developmental Origin of Reproductive Disorders. *Reprod Toxicol*, 68:85-104, 2017.

HURLEY WL, DOANE RM. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J Dairy Sci.* 1989 Mar;72(3):784-804. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79170-0. PMID: 2654228.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios, Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/ambiente-trabalho-e-cancer-aspectos-epidemiologicos-toxicologicos-e-regulatorios>.

JANIS, R. A.; SILVER, P. J.; TRIGGLE, D. J. Drug action and cellular calcium regulation. *Advances in Drugs Research*, v. 16, p. 309-591, 1987.

- JEANGUENAT, A. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides (Review). *Pest Management Science*, v. 69, n. October, p. 7–14, 2012.
- KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive Oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, v.155, n.2, p.81-103, 2007.
- KEEN, J. H., HABIG, W. H., & JAKOBY, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183–6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- KISS, A. C. et al. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of wistar rats. *Physiol Behav*, v. 107, p. 292-300, 2012.
- LENZ, K. M.; SENGELAUB, D. R. Maternal care effects on the development of a sexually dimorphic motor system: the role of spinal oxytocin. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 558-575, 2010.
- LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida / Flavia Londres. Imprensa: Rio de Janeiro, ANA, RBJA, 2012. Descrição Física: 190 p. : il., fots. Referência: 2012.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE .. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em Debate*, v. 42, n. 117, p. 518–534, abr. 2018.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*. 2007 May;173(3):502-11. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.06.005. Epub 2006 Aug 17. PMID: 16914330.
- MA H, WANG J, ABDEL-RAHMAN SZ, BOOR PJ AND KHAN MF. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. *ToxicolApplPharmacol* 2008;233:247-253.
- MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 1-6, 2002.
- McDONALD, S D t al. Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: systematic review and meta-analyses. *BMJ*, London, v.341, p. c348, Jul 2010. Claris O, Beltrand J, Levy-Marchal C. Consequences of intrauterine growth and early neonatal catch-up growth. *Semin Perinatol*. 2010 Jun;34(3):207-10. doi: 10.1053/j.semperi.2010.02.005. PMID: 20494737.

NEUMANN, I. D.; TOSCHI, N.; OHL, F.; LANDGRAF, R. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. *European Journal of Neuroscience*, v. 13, p. 1016-1024, 2001.

NGÔ C, CHÉREAU C, NICCO C, WEILL B, CHAPRON C, BATTEUX F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol*. 2009 Jul;175(1):225-34. doi: 10.2353/ajpath.2009.080804. Epub 2009 Jun 4. PMID: 19498006; PMCID: PMC2708809.

NIITSU, A. Calcium is essential for ATP-induced steroidogenesis in bovine adrenocortical fasciculata cells. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 60, n. 3, p. 269-274, 1992.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry, Reino Unido*, v. 5, p. 27986-28006, 2015.

NUMAN M, STOLZENBERG DS. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front Neuroendocrinol*. 2009 Jan;30(1):46-64. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.10.002. Epub 2008 Nov 5. PMID: 19022278.

PARENT, C.; WEN, X.; DHIR, S.K.; RYAN, R.; DIORIO, J.; ZHANG, T.Y. Maternal care associates with differences in morphological complexity in the medial preoptic area. *Behavior Brain Research*, v.326, p.22-32, 2017.

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

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, New York, v. 2014, p 1-11. 2014.

PINOTTI, M. M. Z. e SANTOS, J. C. P., From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. *Ciência Rural*, v. 43, n. 10, p. 1797-1803, 2013.

QI, SUZHEN; LÜMMEN, PETER; NAUEN, RALF; CASIDA, J. E. Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 18, p. 4077–4082, 2014.

RAHMAN, I., KODE, A., & BISWAS, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>

RESENDE, L. O. T. DE . et al.. Concentração dos hormônios esteroides no fluido folicular de folículos ovarianos maduros e imaturos de pacientes com síndrome dos ovários policísticos submetidas à fertilização in vitro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 9, p. 447–453, set. 2010.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato, [S. l.]*, v. 10, n. 14, p. 149–158, 2013.

SANJULIANI AF, TORRES, MRSG. Efeitos do cálcio dietético sobre a perda ponderal, obesidade abdominal, perfil metabólico e níveis de pressão arterial em obesos submetidos à restrição calórica. 2007. Dissertação. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2007.

SANTOS LC et al. Ingestão de cálcio e indicadores antropométricos entre adolescentes. *Revista de Nutrição*. 2007, 20(3): 275-283.

SANTOS, M. C. Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato de *Cordia ecalyculata* Vell: em ratos Wistar. 2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências. Universidade Estadual Paulista. Assis.

SANTOS, T.A. "Fisiologia do ovário e da reprodução". In *Manual de ginecologia*, 39-56. Lisboa, Portugal: Permanyer Portugal, 2009.

SCARTON SRDAS, TSUZUKI F, GUERRA MT, DOS SANTOS DP, DOS SANTOS AC, GUIMARÃES ATB, SIMÃO ANC, BEU CCL, FERNADES GSA. Cyantraniliprole impairs reproductive parameters by inducing oxidative stress in adult female wistar rats. *Reprod Toxicol*. 2022 Jan;107:166-174. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.12.009. Epub 2021 Dec 27. PMID: 34968715.

SENTHILKUMAR, M., AMARESAN, N., & SANKARANARAYANAN, A. (2021). Plant-Microbe Interactions. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0>

SILVA PMC, CABRAL JUNIOR CR, VASCONCELOS SML. Ingestão do cálcio na obesidade de mulheres atendidas pelo Sistema Único de Saúde. *Revista de Nutrição*. 2010, 23(3): 357-367.

SJOEHOLM, A.; BRIDGES, R. S.; GRATTAN, D. R.; ANDERSON, G. M. Region-, neuron-, and signaling pathwayspecific increases in prolactin responsiveness in

reproductively experienced female rats. *Endocrinology*, v. 152, n. 5, p. 1979-1988, 2011.

TALSNESS, C. E., SHAKIBAEI, M., KURIYAMA, S.N., GRANDE, S. W., STERNER-KOCK, A., SCHNITKER, P., et al. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicol Lett*, v. 157, p. 189–202, 2005.

TEODOROV E, BERNARDI MM, FERRARI MF, FIOR-CHADI DR, FELICIO LF. Plasticity of opioid receptors in the female periaqueductal gray: multiparity-induced increase in the activity of genes encoding for mu and kappa receptors and a post-translational decrease in delta receptor expression. *J Mol Neurosci*. 2011;43(2):175-81

TERRA, Fábio Henrique Bittes. A indústria dos agrotóxicos no Brasil. 2008. 156p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimentos econômico). Departamento de Economia, Setor de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

Valko, M., et al. (2007) Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.

WEINSTOCK, M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiology of Stress*, v. 6, p. 3–13, 2017.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme On Chemical Safety), *Toxicology* 389 (2017) 85–93, 2005. Chemical-Specific Adjustment Factors for Interspecies Differences and Human Variability: Guidance Document for Use of Data in Dose/Concentration–response Assessment. (IPCS Harmonization Project Document No. 2).

ZEMEL MB. Mechanisms of Dairy Modulation of Adiposity. *American Society for Nutritional Sciences*. 2003; 0022- 3166/03: 252-256

ARTIGO 2:

INTRAUTERINE AND LACTATIONAL EXPOSURE TO CYANTRANILIPROLE CAUSES CHANGES IN THE SPERM AND IN THE HISTOLOGY OF THE TESTICLE AND EPIDIDYMIS OF *WISTAR* RATS

SUMMARY

Cyantraniliprole is a pesticide that acts by binding the molecule to ryanodine receptors, causing its activation and consequently a rapid and massive release of calcium ions. Although it is considered a safe molecule, it is also a new molecule on the market and studies in the literature on possible effects on mammals are scarce, with no concrete data on long-term effects on human health. Therefore, the work seeks to evaluate the impacts of oral administration of cyantraniliprole during periods of pregnancy and lactation on maternal behavior and the reproductive system of female offspring. This work was approved by CEUA-UEL (OF. CIRC. CEUA n. 20/2020). Wistar rats were placed for mating and after pregnancy diagnosis were divided into control groups, C1 and C10 (n = 10), which received water and cyantraniliprole at

concentrations of 1 mg/kg/day and 10 mg/kg/day, respectively. The weight of the animals was monitored from birth to adulthood, histopathological analyzes of the testicles and epididymis were carried out and sperm parameters were evaluated. The offspring of group C1 had low birth weight and higher weight when reaching puberty and adulthood, when compared to the control group. No significant differences were found in sperm motility, count and epididymal transit, or kinetics in any of the groups. The C10 group showed a significant reduction in the number of normal sperm when compared to the control. Group C1 had a lower quantity of sperm classified as DABI and a greater quantity of sperm classified as DABII. The number of spermatids and spermatozoa in the testicles of pubescent and adult C1 group animals was reduced when compared to the control, while the C10 group showed no significant difference, as did PDE. Adult animals in the C10 group had a greater number of Sertoli cells and a lower number of Leydig cells. Pubescent animals in groups C1 and C10 showed a significant reduction in the number of Leydig cells. Pubescent animals in both groups showed an increase in the height and diameter of the seminiferous tubules, while adult animals in group C1 only showed an increase in diameter and animals in group C10 increased height. Pubertal and adult C10 group animals showed a decrease in the epithelial compartment of the epididymis and an increase in the interstitium and lumen compartments, both in the head and tail of the organ. Therefore, it is possible to conclude that uterine and lactational exposure to cyantraniliprole causes histopathological changes in the testis and epididymis of adult and pubescent rats, and also a metabolic program capable of causing weight gain after puberty and until adulthood.

Key words: pesticides; male reproductive system; sperm.

INTRODUCTION

Brazil is the third country with the highest use of pesticides in the world in absolute numbers (HESS; NODARI, 2022) dumping more than one million tons of pesticides on crops per year, representing an average of five kilos for each inhabitant (INCA, 2021). Among the various side effects due to chronic exposure to these substances, infertility, sexual impotence, miscarriages and malformations,

neurotoxicity, hormonal changes, increased risk of cancer and effects on the immune system stand out (INCA, 2021).

Cyantraniliprole is a pesticide belonging to the class of anthranilic diamides, which acts through contact and ingestion (BL BENEVIA®). Its mechanism of action is dependent on the molecule binding to ryanodine receptors, causing its activation and consequently a rapid and massive release of calcium ions, resulting in lethargy, paralysis and subsequent death of the target organism (QI, et al., 2014) .

According to the product leaflet registered with MAPA, cyantraniliprole does not have significant acute toxicity in mammals through oral, dermal and inhalation exposure routes and is not a dermal or ocular irritant. Furthermore, the specific mechanisms of toxicity of this substance in humans or other mammalian species are not known, no reports of adverse health effects have been reported and no specific symptoms of its toxicity to humans are known (BL BENEVIA®). However, as it is a new molecule on the market, studies in the literature on possible effects on mammals are scarce, with no concrete data on long-term effects on human health. Therefore, the objective of the study was to verify whether the oral administration of cyantraniliprole to mothers during periods of pregnancy and lactation is capable of causing changes in the histology of the testicle and epididymis of pubertal and adult offspring.

MATERIALS AND METHODS

This research project was approved by the CEUA of the State University of Londrina, according to OF. CIRC. CEUA n. 20/2020.

Experimental Design:

Female (80 days old) and male (90 days old) Wistar rats were obtained from the central vivarium of UEL and after acclimatization in the vivarium of the Laboratory of Toxicology and Metabolic Disorders of Reproduction, they were placed for mating (1 male and 2 females per cash, overnight).

The following morning, pregnancy was confirmed through a vaginal smear, and those in which sperm were found and an indication of estrus phase in the smear were considered pregnant. On this day, called gestational day 0 (GD0), the females

(n=10/group) were allocated to individual cages and randomly divided to compose the following experimental groups: I) Control (C, n = 10); II) Cyantraniniprole 1 mg/kg/day (C10, n = 10); and III) Cyantraniniprole 10 mg/kg/day (C10, n = 10). The pesticide was administered via gavage, from the 5th day after pregnancy diagnosis (GD5), to ensure that the pesticide did not harm embryo implantation, until lactational day 21 (DL21). The control group received only water.

The doses of 10 and 150 mg/kg/day were chosen due to previous information found in the product leaflet, which informs about previous studies that were carried out using these concentrations. The dose of 1 mg/kg/day was chosen after adapting the Acceptable Daily Intake (ADI) dose, reported by ANVISA, to Wistar rats.

Controlled conditions were maintained throughout (12h light/dark cycle; temperature $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$), standard diet and water ad libitum. The weight of the animals was monitored from birth until they reached adulthood.

COLLECTION OF BIOLOGICAL MATERIAL

Material collection was carried out at DPN 55 for pubescent animals and at DPN 80 for adult animals. On the day of euthanasia, the rats were anesthetized with the association of xylazine and ketamine and subjected to euthanasia. The testicles and right epididymis were removed, weighed on a precision analytical balance and frozen at -20°C for later determination of the number of mature spermatids. The right vas deferens was weighed and spermatozoa were obtained from it to evaluate sperm morphology. Spermatozoa from the left vas deferens were used to evaluate motility and mitochondrial activity. The testicles and epididymis were used for histopathological and morphometric analyzes (n=5).

SPERM COUNTS, CALCULATION OF DAILY SPERM PRODUCTION AND SPERM TRANSIT TIME THROUGH THE EPIDIDYMIS

After weighing, the animals' right testis and epididymis were used for sperm counts. Spermatids resistant to the testicular homogenization process (stage 19 of spermatogenesis) and spermatozoa present in the head-body and tail of the epididymis were counted as described by Robb et al. (1978), with adaptations adopted by Fernandes et al. (2007). The decapsulated and previously weighed testes were

homogenized in 5mL of 0.9% NaCL containing 0.5% Triton X 100, followed by sonication for 30 seconds. After a 10-fold dilution, a sample was transferred to the Neubauer chamber (4 fields per animal), and mature spermatids were counted. To calculate daily sperm production (PDE), the number of mature spermatids was divided by 6.1, which is the number of days this type of spermatids remain in the seminiferous epithelium. The head-body and tail portions of the epididymis were cut into small fragments with the aid of scissors and homogenized for sperm counting, as described for the testis. The sperm transit time through the epididymis was determined by dividing the number of sperm in each region of the organ by the PDE.

SPERM MOTILITY AND MORPHOLOGY

Sperm motility was evaluated according to Perobelli et al. (2010), in sperm collected from the right vas deferens. With the aid of a needle and syringe, spermatozoa were removed from the vas deferens through washing with 1.0 ml of HTF medium modified with gentamicin (Human Tubal Fluid, IrvineScientific®) at 34°C, and were classified in a Mackler, regarding his mobile and immobile motility.

To evaluate sperm morphology, the left vas deferens was collected and washed internally with 1.0 mL of buffered formaldehyde solution. The samples were kept at 4°C until analysis, where smears were made on histological slides. 200 spermatozoa per animal were evaluated under a phase contrast microscope at 400X magnification (SEED et al., 1996). Morphological abnormalities were classified into two categories: head abnormalities (no curvature, no characteristic curvature, straight head and isolated head) and tail abnormalities (curled or broken) (FILLER, 1993).

ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL ACTIVITY OF SPERMATOZOA

To evaluate the mitochondrial activity of spermatozoa, a method was used based on the selective incorporation of the DAB dye by the active mitochondria present in the intermediate part of the spermatozoa (HRUDKA, 1987). Sperm were collected from the vas deferens in PBS. An aliquot of 100 µL of the spermatozoa was added to 200 µL of the DAB (3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride) dye solution. After incubating

this solution for one hour at 37°C, a smear was prepared and fixed in PBS with formaldehyde (10%). 200 cells were counted and classified into:

- DAB class I: 100% of the intermediate piece stained;
- DAB class II: more than 50% of the intermediate piece stained;
- DAB class III: less than 50% of the intermediate piece stained;
- DAB class IV: absence of color in the intermediate piece.

The result was expressed as a percentage.

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF THE TESTICLES

The histopathological evaluation was carried out using cross-sections of the organ (3 non-consecutive sections per animal), with the aid of a light microscope (magnifications of 100, 200 and 400X). The images for photodocumentation were captured on a microcomputer.

Histopathological inspection was carried out quantitatively, analyzing 100 sections of seminiferous tubules per animal and classifying them as normal or abnormal. The tubules were considered abnormal in the presence of acidophilic cells, multinucleated cells, retained spermatids, degeneration of cell types, vacuolation of the epithelium or exfoliation of cells in the lumen. The appearance of the tubular interstitium was also evaluated, but in a qualitative way.

DIAMETER OF THE SEMINIFEROUS TUBULES AND HEIGHT OF THE GERMINATIVE EPITHELIUM

To evaluate the diameter of the seminiferous tubules and the thickness of the germinal epithelium ten sections of seminiferous tubules were evaluated per animal in stage IX of spermatogenesis. For this purpose, a microscope was used, magnification of 100X using an image analyzer.

EVALUATION OF THE SPERMATOGENETIC PROCESS (DYNAMICS OF SPERMATOGENESIS)

100 transverse sections of seminiferous tubules per animal were analyzed, which will present the most regular and circular shape possible, in stages I-VI, VII-VIII, IX-XIII and XIV, being characterized as follows:

- Stages I-VI: presents two generations of spermatids;
- Stages VII-VIII: presents mature spermatids located at the edge of the lumen;
- Stages IX-XIII: presents only one generation of spermatids;
- Stage XIV: presents secondary spermatocyte.

COUNTING THE NUMBER OF SERTOLI CELLS AND LEYDIG CELLS

Under light microscopy (X40), the nuclei of the cells were counted. Sertoli in 20 seminiferous tubules per rat ($n = 10$ animals/group) at stage VII of spermatogenesis (FAVARETO et al, 2011). To count the number of Leydig cells, the nuclei of these cells were counted in 10 fields per photo (X40), per rat ($n = 10$ animals/group).

HISTOPATHOLOGICAL AND STEREOLOGICAL ANALYSIS OF EPIDIDYMS

This review was performed using transverse sections of the organ (3 non-consecutive sections per animal), with the aid of a microscope (magnifications of 100 and 400X). The images for photo documentation were captured by a microscope coupled to a digital camera and a microcomputer. In the histopathological analysis, the appearance of the epithelium and interstitium of the epididymis was analyzed qualitatively. The stereological analysis was carried out according to Weibel's method (1963), in which a test system of lines and points is used in a graticulate with 168 points and 60 lines. Thus, the proportion of the section occupied by the lumen, epithelium and interstitium was obtained.

STATISTICAL ANALYSIS OF RESULTS

The data were subjected to the Shapiro-Wilk test to verify normality. As all data were classified as normal, they were compared using the ANOVA test, with Tukey's a

posteriori test. A significance level of 5% was adopted. All analyzes were performed using GraphPad Prism® software.

RESULTS

Body weight tracking

Animals in group C1 had lower birth weight when compared to the control group, while group C10 showed no significant difference (Figure 1a). When analyzed at puberty (Figure 1b) and in adulthood (Figure 1c), animals in group C1 showed a significant increase in weight when compared to the control group, while group C10 continued without showing a significant difference. The organs analyzed did not show a significant difference in weight at any dose and at any age (data not shown).

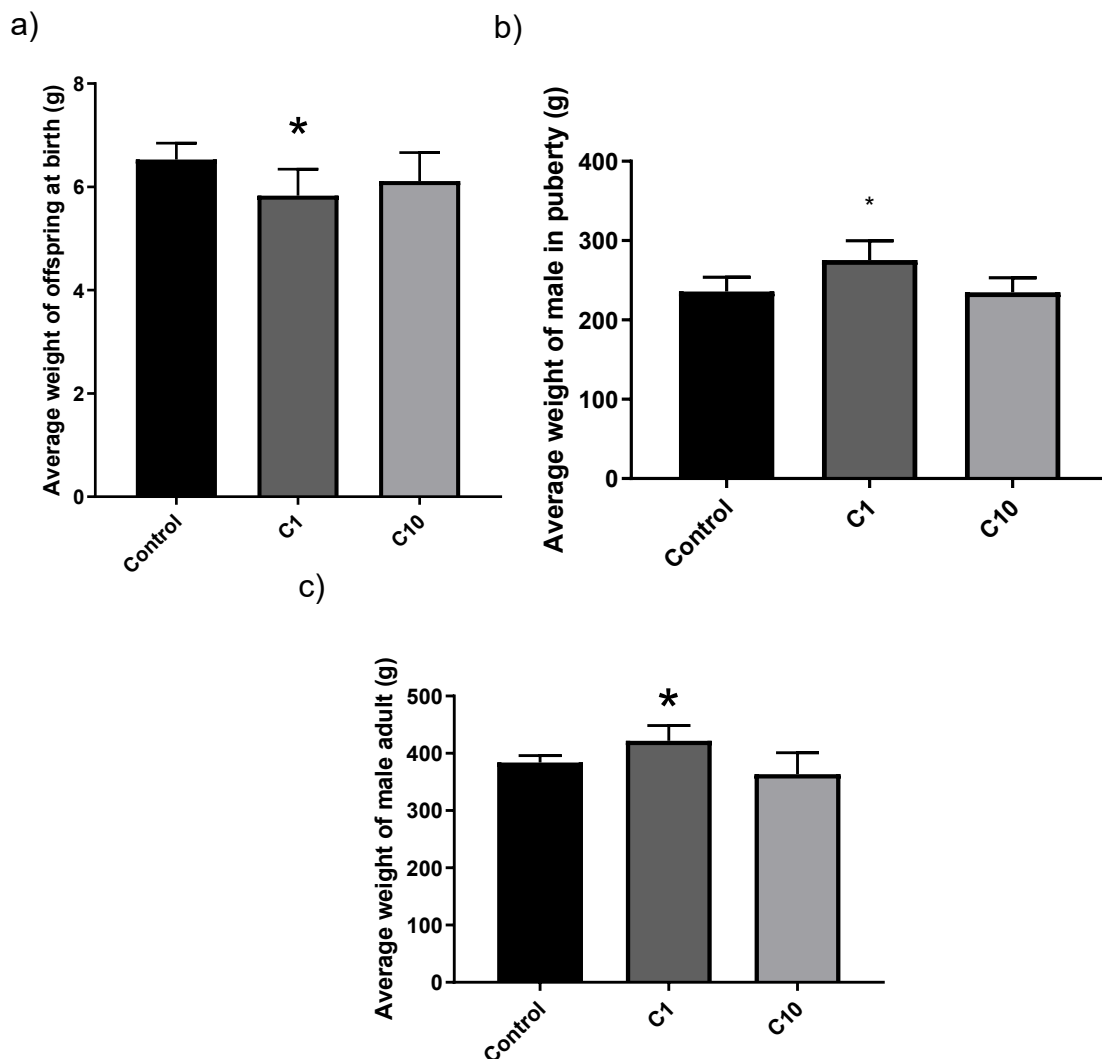
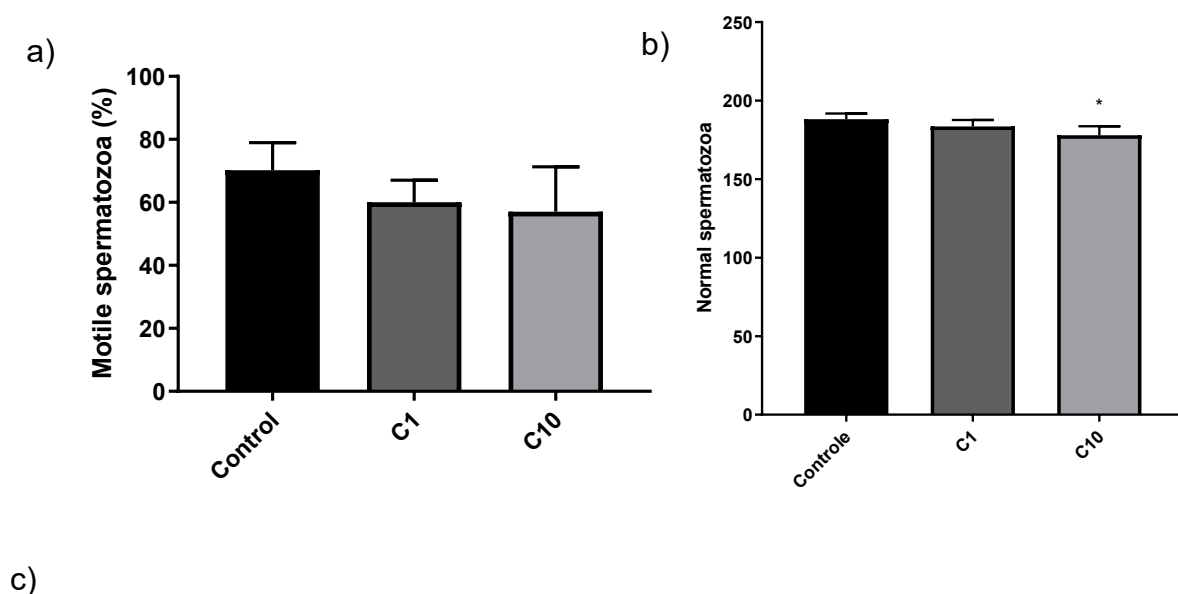


Figure 1: Graph representing the average weight of male offspring a) at birth; b) at puberty; and c) adults. Data presented as mean $\pm$ SEM. Unpaired t test. $p < 0.05^*$

Sperm Parameters

The analyzes of sperm parameters were carried out only on adult animals, as at the time of euthanasia of the pubescent animals they did not yet show sperm production. No significant differences were found in the number of motile sperm when comparing groups C1 and C10 to the control (Figure 2a). The C10 group showed a significant reduction in the number of normal sperm when compared to the control (Figure 2b), with head abnormalities being found in greater quantities (data not shown). Group C1 had a lower quantity of sperm classified as DABI (Figure 2c) and a greater quantity of sperm classified as DABII (Figure 2d).

The number of spermatids and spermatozoa in the testicles of pubescent and adult C1 group animals was reduced when compared to the control, while the C10 group showed no significant difference, as did PDE. None of the groups showed a significant difference in either the head or tail of the epididymis (Table 1).



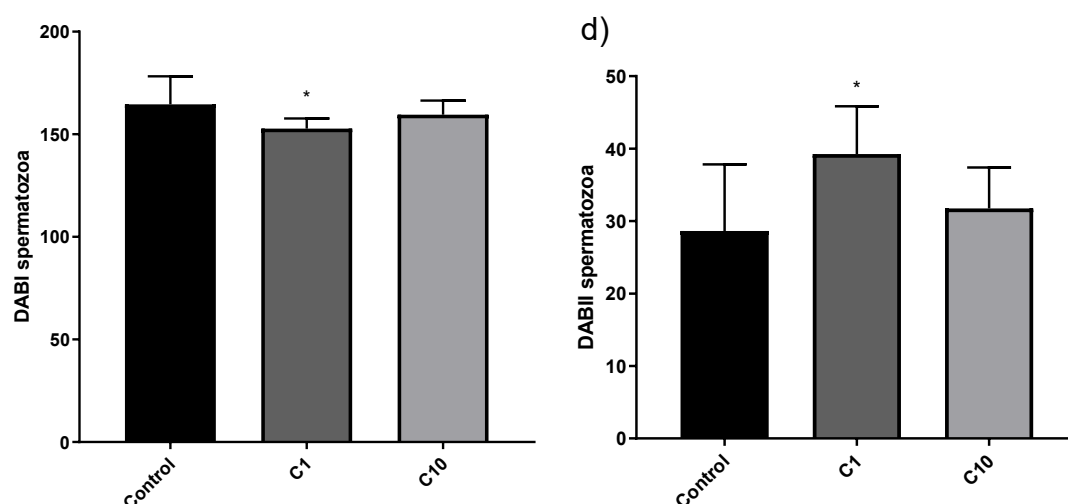


Figure 2:Graphs of sperm parameter analysis results. A) Analysis of sperm motility; B) Analysis of sperm morphology; C) Analysis of mitochondrial activity – DABl; and D) Analysis of mitochondrial activity – DABII. Data presented as mean ± SEM. Unpaired t test. $p < 0.05^*$

Table 1:Sperm parameters in testis and epididymis.

Parameters	Control	C1	C10
Tests			
Spermatids number (x106)	131.6 ± 2.95	98.9 ± 12.59*	124.0 ± 2.54
DSP (x106)	21.6 ± 0.302	16.21 ± 0.696*	20.33 ± 0.279
Epididymal caput/corpus			
Spermatids number (x106)	106.8 ± 28.36	90.8 ± 8.76	99.7 ± 6.57
Spermatic transit (x106)	4.94 ± 1.326	5.61 ± 0.439	4.91 ± 0.978
epididymal tail			
Spermatids number (x106)	85.1 ± 18.32	68.4 ± 12.77	78.7 ± 15.21

Spermatic transit (x106)	4.1 ± 0.924	4.22 ± 0.847	3.87 ± 0.748
---------------------------------	-------------	--------------	--------------

Data presented as mean ± SEM. Unpaired t test. p<0.05*

Kinetics of spermatogenesis

The analysis of spermatogenesis kinetics did not show changes in any of the groups in pubescent animals (Table 2) or in adult animals (Table 3).

Table 2.Kinetics of spermatogenesis in 60-day-old animals

Stages	Control	C1	C10	p-value
I SAW	40.8 ± 2.95	39.0 ± 2,345	42.6 ± 2,074	0.1132
VII – VIII	41.8 ± 3,564	41.8 ± 0.8367	39.4 ± 3,286	0.3377
IX – XIII	14.6 ± 3,209	16.0 ± 2,449	13.8 ± 3,962	0.5160
XIV	2.8 ± 1,304	3.0 ± 0.7071	2.0 ± 0.7071	0.2508

Data presented as mean ± SEM.

Table 3.Kinetics of spermatogenesis in 90-day-old animals.

Stages	Control	C1	C10	p-value
I SAW	43.8 ± 3,114	43.4 ± 1,817	42.8 ± 1,304	0.7764
VII – VIII	39.0 ± 1,732	41.0 ± 1.871	40.6 ± 2,793	0.3560
IX – XIII	16.0 ± 1.0	13.0 ± 1,581	14.8 ± 2,588	0.0697
XIV	2.4 ± 1,140	2.6 ± 0.5477	1.8 ± 0.4472	0.2010

Data presented as mean ± SEM.

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE TESTICLES

Sertoli and Leydig cell count

Pubertal animals from groups C1 and C10 showed a significant reduction in the number of Leydig cells when compared to the control (Figure 3a). No significant change in the number of Sertoli cells was found in either group in animals of the same age (Figure 3b).

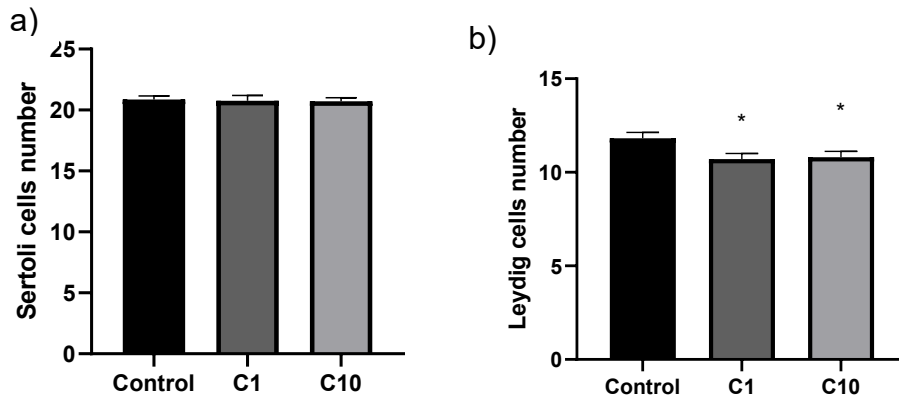


Figure 3: Graphical representation of the number of a) Sertoli and b) Leydig cells in pubescent animals. Data presented as mean $\pm$ SEM. Unpaired t test. $p < 0.05^*$.

In adult animals, changes were found only in the C10 group, which presented a greater number of Sertoli cells and a lower number of Leydig cells (Figure 4).

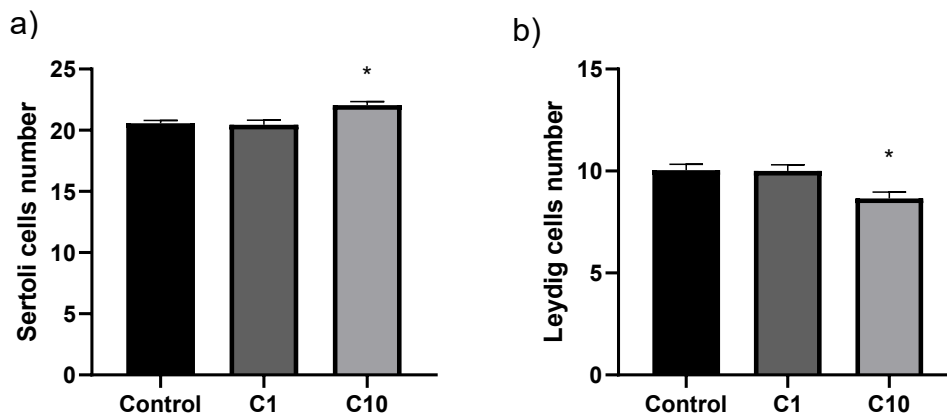


Figure 4:Graphical representation of the number of a) Sertoli and b) Leydig cells in adult animals.Data presented as mean $\pm$ SEM. Unpaired t test. $p < 0.05^*$.

Diameter of the seminiferous tubules and height of the germinal epithelium

At puberty, animals in groups C1 and C10 showed a significant increase in the diameter of the germinal epithelium when compared to the control (Figure 5a), as well as an increase in its thickness (Figure 5b).

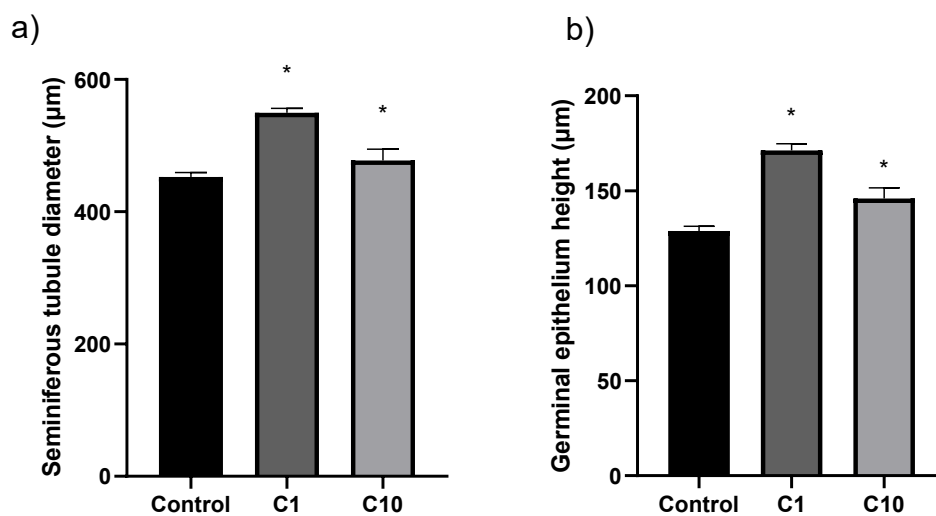


Figure 5:Graphical representation of a) diameter (µm) and b) thickness (µm) of the germinal epithelium in pubescent animals.Data presented as mean $\pm$ SEM. Unpaired t test. $p < 0.05^*$.

Animals in group C1 continued to show an increase in the diameter of the germinal epithelium as adults, while group C10 showed no difference when compared to the control (Figure 6a). As for the thickness of the epithelium, the animals in group C1 showed no significant difference while the animals in group C10 showed an increase in thickness when compared to the control (Figure 6b)

a) b)

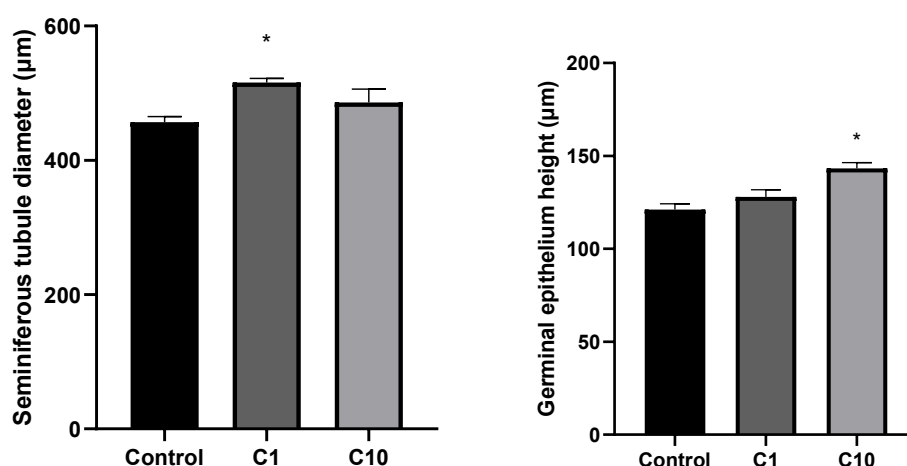


Figure 6: Graphical representation of a) diameter (μm) and b) thickness (μm) of the germinal epithelium in adult animals. Data presented as mean ± SEM. Unpaired t test. $p < 0.05^*$.

Histopathology

Pubescent animals from all groups were subjected to histopathology analysis, but only the C10 group showed changes, with an increase in cells in the lumen and vacuoles found. The adult animals in the C10 group maintained the changes found and the animals in the C1 group also showed changes, with cells being found in the lumen in greater quantities.

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE EPIDIDYMIS

Stereological analysis of the epididymis showed a structural change in the organ, altering the lumen-epithelium-interstitium ratio in pubescent and adult C10 group animals. There was a decrease in the epithelial compartment of the organ and an increase in the interstitium and lumen compartments, both in the head and tail of the organ.

DISCUSSION

The results obtained in this study indicate that exposure to cyantraniliprole during periods of pregnancy and lactation caused histopathological changes in the epididymis and testis of pubescent and adult Wistar rats and in the weight of animals at birth, puberty and adults.

While the weight of the animals at birth was reduced, when they reached puberty and adulthood they suffered the opposite effect. It is already known that birth weight is the result of fetal growth. This process is complex and depends on interactions between the fetal genome, availability of nutrients and oxygen to the fetus, maternal nutrition and various growth factors of fetal, maternal and placental origins (McDONALD et al., 2010). Exposure to cyantraniliprole significantly impaired the animals' intrauterine weight gain, generating animals with low birth weight. The programming of several biological systems, including the endocrine and cardiovascular systems, occurs during fetal development and can be affected by intrauterine growth retardation. This indicates that events triggered in the prenatal period, which presents greater sensitivity and development of the fetus in relation to the environment, can later affect phenotypic variability, including weight (CLARIS; BELTRAND; LEVYMARCHAL, 2010). Therefore, it is possible to say that uterine and lactational exposure to cyantraniliprole was able to program the animals' bodies in such a way that overweight was observed upon reaching puberty, which was maintained until adulthood.

Sperm maturation is the process that encompasses the transit of sperm through the epididymis, the interactions of the cell with the components of the epididymal fluid that promote morphological and biochemical changes that result in the acquisition of their ability to fertilize the egg (COOPER; YEUNG, 2003). This process occurs as immature cells migrate from the head towards the tail of the epididymis, through tissue contractions (GRANEMANN, 2006). While sperm motility was maintained despite the changes found in the epididymal compartments of the C10 group, sperm morphology was altered, indicating that such changes only prevented the correct morphological maturation of the gamete. Data that can be corroborated by the findings in group C1, which did not present any significant structural changes in the epididymis and no indication of changes in the maturation process. As the findings in the structure of the epididymis were the same in pubescent and adult animals, it can be said that exposure to cyantraniliprole caused permanent changes in the organ in the animals in the C10 group.

Exposure to the toxicant also caused less proliferation of Leydig cells. The proliferation of Leydig cells occurs in three stages, corresponding to the fetal, neonatal and pubertal periods (NISTAL et al., 1986). In childhood, there is a major degeneration of Leydig cells normal to development (NISTAL et al., 1996), however, during the pubertal period the spermatogenesis phase begins, which coincides with the increase in LH concentrations, leading to proliferation of Leydig cells, inducing fibroblast-like precursor cells to differentiate into mature Leydig cells (WU et al., 2007). Exposure to cyantraniliprole impaired the Leydig cell proliferation process during the pubertal period, causing a reduced quantity of such cells in pubescent animals in both groups, which became permanent in the C10 group, but was reversed in adult animals in the C1 group.

Sertoli cells in mammals actively proliferate during the fetal period (McCoard et al., 2003). For rodents, it is established that the proliferation of SCs lasts for 2 to 3 weeks, gradually reducing until the beginning of the proliferation of primary spermatocytes. Thus, by postnatal day 21 in rats, these divisions no longer occur (Picut et al., 2015). The maintenance of the number of Sertoli cells in pubescent animals indicates that cyantraniliprole did not alter the proliferation of such cells in the fetal period. The increase observed in animals in the C10 group shows an abnormal stimulus to post-puberty proliferation. This was not the first study to show proliferation of Sertoli cells after puberty. Figueiredo et al., 2019 demonstrated such an increase in the same species after exposure to the drug g 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU), used to treat hyperterthyroidism. This important finding contributes, together with the work already mentioned, to explain that continuous, although slow, tubular growth is possible, without altering the efficiency of Sertoli cells. This increase may also have been responsible for compensating changes in spermatogenesis, thus being responsible for the regularization of parameters, which was not found in group C1 where the same change was not observed.

CONCLUSION

It is possible to conclude that intrauterine and lactational exposure to cyantraniliprole at doses of 1 mg/kg/day and 10 mg/kg/day causes significant histological changes in the reproductive organs of Wistar rats. Furthermore, such

exposure also causes metabolic programming capable of generating overweight from puberty to adulthood.

REFERENCES

BASSANI, D.; SILVA, LR; BIRK, L.; FRANCO DE OLIVEIRA, SCWSE; DALLEGRAVE, E.; OLIVEIRA, TF Pesticides in Brazil: a viewpoint about the poison law. *J. Agric. Food Chem.*, 66 (46), 12153-12154, 2018. doi:10.1021/acs.jafc.8b05669

CLARIS, O.; BELTRAND, J.; LEVY-MARCHAL, C. Consequences of intrauterine growth and early neonatal catch-up growth. *Semin. Perinatol.*, New York, v. 34, n.3, p.207-210, Jun. 2010.

COOPER TG, YEUNG CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech.* 2003 May 1;61(1):28-38. doi: 10.1002/jemt.10314. PMID: 12672120.

FAVARETO, APA, FERNANDEZ, CDB, DA SILVA, DAF, ANSELMOFranco, JA, KEMPINAS, WG, 2011. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peripuberty. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 109, 85-96.

FERNANDES GS, ARENA AC, FERNANDEZ CDB, MERCADANTE A, BARBISAN LF, KEMPINAS WG. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 2007;23(1):106–12.

FIGUEIREDO AFA, WNUK NT, TAVARES AO, MIRANDA JR, HESS RA, DE FRANÇA LR, COSTA GMJ. Prepubertal PTU treatment in rat increases Sertoli cell number and sperm production. *Reproduction.* 2019 Aug;158(2):199-209. doi: 10.1530/REP-19-0127. PMID: 31163400.

FILLER R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: Chapin RE, Heindel JH, editors. *Male reproductive toxicology.* California: Academic Press; 1993. p. 334–43.

GRANEMANN, LC Comparative evaluation of equine semen collected with an artificial vagina and by intraluminal washing of the cauda epididymis after orchiectomy. 2006. 59p. Dissertation (Master's in Veterinary Sciences) – Agricultural Sciences Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, 2006.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MARINHO-PRADO, JS; NECHET, K. de L.; MORANDI, MAB; BETTIOL, W. Natural agricultural pesticides: use and perspectives. Brasília, DF: Embrapa, 2016. Chapter 19.

HESS, SC; NODORI, R. Pesticides in Brazil: overview of products between 2019 and 2022. *Revista Ambientes em Movimento*, [SI], v. 2, no. 2, p. 39-52, Dec. 2022.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying aging or induced by stress. *Int J Androl*, v.10(6), 809–828, 1987.

JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA NATIONAL CANCER INSTITUTE. Environment, work and cancer: epidemiological, toxicological and regulatory aspects, Rio de Janeiro: INCA, 2021. Available at: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/ambiente-trabalho-e-cancer-aspectos-epidemiological-toxicological-and-regulatory>.

MCCOARD SA, WISE TH, FORD JJ. Endocrine and molecular influences on testicular development in Meishan and White Composite boars. *J Endocrinol*. 2003;178:405-16.

McDONALD, SD et al. Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: systematic review and meta-analyses. *BMJ*, London, v.341, p.c348, Jul 2010. Claris O, Beltrand J, Levy-Marchal C. Consequences of intrauterine growth and early neonatal catch-up growth. *Semin Perinatol*. 2010 Jun;34(3):207-10. doi: 10.1053/j.semperi.2010.02.005. PMID: 20494737.

NISTAL, M., PANIAGUA, R., REGADERA, J.A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell Tissue Res*. 246, 229–236 (1986). <https://doi.org/10.1007/BF00215884>

PICUT CA, REMICK AK, DE RIJK EP, SIMONS ML, STUMP DG, PARKER GA(2015). Postnatal development of the testis in the rat: morphological study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol. Pathol*. 43, 326–342. 10.1177/0192623314547279

QI, SUZHEN; LÜMMEN, PETER; NAUEN, RALF; CASIDA, JE Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 18, p. 4077–4082, 2014.

ROBB GW, AMANN RP, KILLIAN GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fert* 1978; 54:103-7.

WEIBEL, ER (1963). *Morphometry of the human lung*. Academic Press, New York.

WUX; WAN S; LEE MM. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol* 2007;213:429–433.

CONCLUSÃO

É possível concluir com os dados obtidos que a exposição ao cyantraniliprole durante os períodos de prenhez e lactação é nociva ao organismo de ratos Wistar de diferentes formas. A substância é capaz de alterar o comportamento materno da geração parental, podendo prejudicar o desenvolvimento do filhote. A exposição em períodos críticos do desenvolvimento, como o fetal, também prejudica a correta formação, e possivelmente o funcionamento, de órgãos reprodutores tanto da prole masculina, quanto da prole feminina. Além disso, foi possível concluir também que altas doses do tóxico, aqui representadas pela concentração de 150 mg/kg/dia, não podem ser utilizadas para estudos gestacionais, sendo incompatíveis com o delineamento proposto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cyantraniliprole somente começou a ser utilizado mais amplamente no Brasil e no mundo a partir de 2014, sendo portanto uma substância nova. Por esse motivo, há uma grande escassez de estudos sobre o seu funcionamento e sobre os seus possíveis malefícios tanto a saúde humana e animal, quanto ao meio ambiente. Dessa forma, não se sabe ainda se exposição a substância pode causar prejuízos mais graves a longo prazo.

O presente estudo foi um dos pioneiros ao investigar os possíveis efeitos tóxicos do ciantraniliprole em mamíferos, e os resultados encontrados ressaltam o perigo da exposição e também a necessidade de mais estudos para explicar os malefícios gerados e saber se realmente é uma substância segura, como é classificada atualmente.

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética - UEL



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 20/2020

Londrina, 05 de março de 2020.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos a aprovação do projeto intitulado "Estudo dos efeitos tóxicos do inseticida ciantraniliprole sobre o sistema reprodutor, hepático e renal da prole masculina e feminina de ratas expostas durante gravidez e lactação" protocolo CEUA nº 21037.2019.93 sob a responsabilidade de **Glaura Scantamburlo Alves Fernandes** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em 05/03/2020.

Este projeto tem por objetivo investigar os possíveis efeitos tóxicos da exposição materna ao ciantraniliprole sobre o desenvolvimento intrauterino e lactacional da prole masculina e feminina de ratos Wistar. **Grau de Invasividade: 2.**

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	06/03/2020 a 05/03/2023
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	378, sendo: 15 machos de 90 dias 33 fêmeas de 80 dias Prole estimada: 165 machos e 165 fêmeas
Peso/ Idade	Machos: 90 dias; Fêmeas: 80 dias; Prole
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério do Central do CCB da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, testículos, epidídimos, ovários, útero, glândula seminal, próstata, ducto deferente, fígado, rins, testículos fetais, ovário fetais, fêmur.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão, conforme vigência expressa neste ofício, encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA/UEL (<http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>).

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Profa. Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Profa. Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3377.5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Responsável pelo projeto
C/C para Depto. de Biologia Geral
C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas
C/C para o Biotério do Central da UEL