

LUCIANA DALAZEN DOS SANTOS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA GLIFOSATO-ROUNDUP
NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA.**

Guarapuava

2011

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

Santos, Luciana Dalazen dos

S237e Efeito da exposição perinatal ao herbicida glifosato-roundup na diferenciação sexual e endocrinologia reprodutiva / Luciana Dalazen dos Santos. -- Guarapuava, 2011.

xix, 83 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2011

Orientador: Marco Aurélio Romano

Banca examinadora: Luciano Farinha Watzlawick, Marcos Roberto Queiroga

Bibliografia

1. Farmácia. 2. Glifosato. 3. Roundup. 4. Desregulação endócrina. 5. Esteroidogênese. 6. Morfometria testicular. 7. Orientação sexual. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 612.6

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANA DALAZEN DOS SANTOS

EFEITO DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA GLIFOSATO-ROUNDUP NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA.

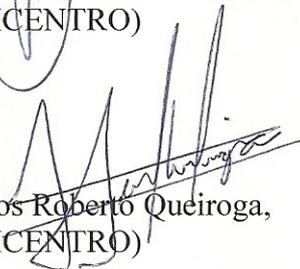
Dissertação aprovada em 30/09/2011 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marco Aurélio Romano,
(Orientador/UNICENTRO)



Prof. Dr. Luciano Parinha Watzlawick,
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Marcos Roberto Queiroga,
(UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR
2011

LUCIANA DALAZEN DOS SANTOS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA GLIFOSATO-ROUNDUP
NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre Em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da UNICENTRO.

Orientador:

Prof. Dr. Marco Aurélio Romano

Guarapuava

2011

DEDICATÓRIA

Ao Alex, “meu lugar seguro”...

Ao meu pai Carlinhos, meu herói...

À minha mãe Salete, minha mestra...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano pela orientação, amizade e confiança durante este importante período.

À Renata Marino Romano pelo auxílio na execução, atenção e amizade.

À Patrícia Wisniewski pela ajuda na execução prática do projeto.

À Fundação Araucária, pela bolsa.

À minha irmã Raquel, pela ajuda no desenho e amor.

E à Daniele Antonelo Campos, Maria Martha Bernardi, Priscila Viau Furtado e Claudio Alvarenga de Oliveira.

RESUMO

O Glifosato-Roundup® é um herbicida amplamente utilizado e considerado um potente desregulador endócrino quando administrado para ratos Wistar na fase pré-púbere. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos causados por este herbicida na prole de fêmeas tratadas durante o período perinatal. Foram utilizados como modelos experimentais 38 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos provenientes de 6 fêmeas. Destes, 25 fizeram parte do grupo tratado, onde as mães receberam a dose de 50mg/kgPV de Glifosato Roundup® Transorb por gavagem e 13 fizeram parte do grupo controle, onde as mães receberam água destilada também por gavagem. O período de administração foi do 18º dia de gestação (D18) até os cinco dias subsequentes ao parto (D25). Este período é caracterizado como o “período crítico” da diferenciação sexual hipotalâmica, onde a conversão da testosterona a estradiol torna o hipotálamo acíclico. Foram avaliados a evolução do peso corporal, peso e idade à puberdade, peso médio dos testículos, epidídimo e vesículas seminais, contagem espermática, produção espermática diária por testículo, reservas espermáticas, tempo de trânsito espermático, morfometria testicular (diâmetro tubular e luminal e espessura epitelial dos túbulos seminíferos), concentrações séricas de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), testosterona e estradiol e por fim, a orientação sexual. As análises estatísticas utilizadas foram o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, de homocedasticidade de Barlett e análise de variância de duas vias (MANOVA). O herbicida Glifosato Roundup® Transorb não interferiu no desenvolvimento corporal dos animais. A idade em que a prole estudada atingiu a puberdade foi alterada, os animais de mães tratadas com o herbicida atingiram a puberdade mais precocemente e por isso, também apresentaram peso menor. O peso dos testículos não sofreu alteração, já as vesículas seminais drenadas e o epidídimo apresentaram-se mais pesados nos animais que receberam o tratamento com o herbicida. O número de espermátides por testículo e por grama de testículo, a produção espermática diária por testículo e as reservas espermáticas no segmento cabeça+corpo do epidídimo foram maiores no grupo tratado. O trânsito espermático foi mais rápido no segmento cauda do epidídimo nos animais tratados. Os animais de ambos os grupos (tratado e controle) não demonstraram alterações no diâmetro tubular total do testículo, porém, a espessura epitelial foi maior no grupo tratado e o diâmetro luminal maior no grupo controle. Não foram encontradas alterações séricas do hormônio FSH, já o LH, a testosterona e o estradiol foram encontrados em maiores concentrações nos animais tratados. A orientação

sexual demonstrou que os animais do grupo tratado apresentaram maior permanência total na área da fêmea e maior escore de preferência sexual pelas fêmeas. Pode-se concluir que este herbicida é um provável desregulador endócrino no “período crítico” de diferenciação sexual hipotalâmica para ratos machos, o que acarreta alterações morfológicas e de orientação sexual dos animais na vida adulta.

Palavras-chave: Glifosato. Roundup. Desregulação Endócrina. Esteroidogênese. Morfometria Testicular. Orientação Sexual.

ABSTRACT

Glyphosate, a herbicide Roundup® is widely used and considered a potent endocrine disrupter when administered to rats in the pre-pubescent. This study aimed to evaluate the effects caused by this herbicide in the offspring of females treated during the perinatal period. Were used as experimental models 38 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from males 6 females. Of these, 25 were part of the treated group, where mothers received the dose of glyphosate in Roundup® 50mg/kgPV Transorb by gavage and 13 took part in the control group, where mothers also received distilled water by gavage. The administration period was the 18th day of gestation (D18) until five days after the delivery (D25). This period is characterized as the "critical period" of sexual differentiation of hypothalamus, where the conversion of testosterone to estradiol makes the hypothalamus acyclic. We evaluated the evolution of body weight, weight and age at puberty, weight of testes, epididymis and seminal vesicles, sperm count, daily sperm production per testis, sperm reserves, sperm transit time, testicular morphology (tubular and luminal diameter and thickness epithelial tubules), serum FSH, LH, testosterone and estradiol and finally sexual orientation. The statistical analysis were used to test Kolomogorov-Smirnov normality, homoscedasticity of the Barlet and analysis of two-way variance (MANOVA). The herbicide Roundup® Transorb Glyphosate did not affect the animals' body development. The age at which studied the offspring reached puberty was changed, the animals treated with the herbicide mothers reached puberty earlier and therefore also had less weight. The testes weight did not change, since the seminal vesicles and epididymis had drained to heavier in the animals receiving treatment with the herbicide. The number of spermatids per testis and per gram of testis, daily sperm production per testis and sperm reserves in the head + body segment of the epididymis were higher in the treated group. The sperm transit was faster in the segment in the tail of the epididymis treated animals. The animals in both groups (treated and control) showed no changes in total testis tubule diameter, however, the epithelial thickness was greater in the treated group and greater luminal diameter in the control group. There were no changes in serum hormone FSH, as LH, testosterone and estradiol were found in higher concentrations in treated animals. Sexual orientation showed that animals treated group showed a longer stay in the area of the total female and higher scores of sexual preference by females. It can be concluded that this herbicide is likely an endocrine disrupter in the "critical period" of hypothalamic sexual

differentiation to male rats, which causes morphological changes and sexual orientation of animals in adulthood.

Key-words: Glyphosate. Roundup. Endocrine disruption. Steroidogenesis. Testicular morphometry. Sexual Orientation.

LISTA DE DESENHOS

- Desenho 1 – Desenho esquemático do aparelho utilizado para a avaliação da orientação sexual. O primeiro desenho representa a planta baixa da arena e o segundo, a visualização lateral da parede metálica da arena. Modificado de Dahlgren et al. (1991).....43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Via de síntese de hormônios esteróides gonadais. A testosterona é o principal produto secretado pelo testículo. As enzimas são (1) 17 β -OH-esteróide desidrogenase; (2) aromatase; e (3) 5 α -redutase. Modificado de Bergadá (2004) e Breigeiron (2005).....	30
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Desenvolvimento corporal dos animais nos grupos tratado e controle dos 21 aos 60 dias de idade.....46
- Gráfico 2 - Pesos médios \pm EPM das vesículas seminais (mg/100g PV) repletas de líquido e após drenagem para os animais dos grupos controle e tratado submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida Glifosato.....49

LISTA DE LÂMINAS

Lâmina 1 – Fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos. Em A observa-se a fotomicrografia dos túbulos do grupo controle. Em B observa-se a fotomicrografia dos túbulos do gupo tratado. Notar a maior espessura epitelial e o menor diâmetro luminal nos túbulos dos animais tratados.....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Evolução do peso corporal de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato.....	46
Tabela 2 - Peso (médias \pm EPM) e idade (mediana \pm Intervalo Quartílico) à puberdade de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato.....	47
Tabela 3 - Peso médio dos testículos (mg/100g de PV) nos grupos estudados (médias \pm EPM).....	47
Tabela 4 - Peso médio total do epidídimo (mg/100g de PV) e por segmentos em cabeça (mg/100g de PV) corpo (mg/100g de PV) e cauda (mg/100g de PV) dos grupos estudados (médias \pm EPM).....	48
Tabela 5 - Número de espermátides por testículo (10^6 /testículo) de ratos Wistar machos submetidos a intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato e grupo controle (médias \pm EPM).....	50
Tabela 6 - Produção espermática por testículo (10^6 /g testículo) de ratos Wistar machos submetidos a intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato e grupo controle (médias \pm EPM).....	50
Tabela 7 - Reservas espermáticas da cabeça + corpo do epidídimo (sptz x 10^6) e da cauda do epidídimo (sptz x 10^6) de ratos Wistar machos submetidos ao herbicida glifosato no período peri-natal e grupo controle (médias \pm EPM).....	51
Tabela 8 - Tempo de trânsito espermático (dias) nos segmentos cabeça+corpo e cauda do epidídimo para os grupos estudados (médias \pm EPM).....	51
Tabela 9 - Diâmetro tubular e luminal e espessura epitelial de túbulos seminíferos de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato (médias \pm EPM).....	52
Tabela 10 - Concentrações séricas de FSH (pg/ml; $\bar{x} \pm$ EPM) para as amostras dos animais nos grupos estudados.....	53
Tabela 11 - Concentração sérica de LH (pg/ml; $\bar{x} \pm$ EPM) para as amostras dos animais nos grupos estudados.....	54

Tabela 12 - Concentração sérica de testosterona (ng/dl; $x \pm EPM$) para as amostras dos animais nos grupos estudados.....	54
Tabela 13 - Concentração sérica de estradiol (pg/ml; $x \pm EPM$) para as amostras dos animais nos grupos estudados.....	55
Tabela 14 - Preferência sexual e tempo de permanência (segundos) dos grupos estudados na área do macho e na área da fêmea e escore de preferência sexual (médias $\pm EPM$).....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	GLIFOSATO.....	22
2.1.1	Características químicas e mecanismo de ação do glifosato.....	23
2.1.2	Comportamento do glifosato no solo.....	23
2.1.3	Farmacodinâmica e farmacocinética do glifosato em animais de laboratório.....	24
2.1.4	Roundup®: ingredientes ativos e inertes.....	25
2.1.5	Estudos toxicológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do glifosato.....	26
2.2	DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO E COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS.....	28
2.2.1	Reprodução – Aspectos Gerais.....	28
2.2.2	Morfologia testicular e espermatogênese.....	29
2.2.3	Testosterona.....	30
2.2.4	Orientação sexual.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL E HIPÓTESE CENTRAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODO.....	35
4.1	ANIMAIS.....	35
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4.3	MANEJO DOS ANIMAIS.....	36
4.4	EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA GLIFOSATO.....	37

4.5	VERIFICAÇÃO DA IDADE À PUBERDADE.....	37
4.6	COLHEITA DE AMOSTRAS PARA EXAMES LABORATORIAIS.....	38
4.6.1	Sangue.....	38
4.6.2	Necropsias: retirada de testículos e glândula vesicular.....	38
4.7	DOSAGENS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIAS.....	39
4.7.1	FSH e LH.....	39
4.7.2	Testosterona total e estradiol.....	40
4.7.2.1	Testosterona total.....	40
4.7.2.2	Estradiol.....	41
4.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS.....	41
4.9	PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA POR TESTÍCULO, CONTAGEM ESPERMÁTICA E TEMPO DE TRÂNSITO NO EPIDÍDIMO.....	41
4.10	AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO SEXUAL.....	42
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	44
4.12	CUIDADOS COM O MANUSEIO, CONSERVAÇÃO E RESÍDUOS DE GLIFOSATO.....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL.....	45
5.2	PESO E IDADE À PUBERDADE.....	46
5.3	TESTÍCULOS.....	47
5.3.1	Peso médio dos testículos e epidídimo.....	47
5.4	VESÍCULAS SEMINAIS.....	48
5.5	CONTAGEM ESPERMÁTICA.....	49
5.5.1	Número de espermátides por testículo e por grama de testículo.....	49

5.6	PRODUÇÃO ESPERMÁTICA ESPERMÁTICA DIÁRIA POR TESTÍCULO.....	50
5.7	RESERVAS ESPERMÁTICAS.....	50
5.8	TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO.....	51
5.9	MORFOMETRIA TESTICULAR.....	51
5.9.1	Diâmetro tubular e luminal e espessura epitelial dos túbulos seminíferos.....	51
5.10	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS.....	53
5.10.1	FSH.....	53
5.10.2	LH.....	54
5.10.3	Testosterona.....	54
5.10.4	Estradiol.....	55
5.11	ORIENTAÇÃO SEXUAL.....	55
6	DISCUSSÃO.....	57
6.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	57
6.2	EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL.....	58
6.3	PESO E IDADE À PUBERDADE.....	58
6.4	PESO MÉDIO DO EPIDÍDIMO E VESÍCULAS SEMINAIS.....	59
6.5	CONTAGEM ESPERMÁTICA (NÚMERO DE ESPERMÁTIDES POR TESTÍCULO, PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA POR TESTÍCULO, RESERVAS ESPERMÁTICAS E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO) E MORFOMETRIA TESTICULAR.....	60
6.6	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LH, TESTOSTERONA E ESTRADIOL.....	62
6.7	ORIENTAÇÃO SEXUAL.....	64
7	CONCLUSÕES.....	66
	Anexo A	67

Anexo B68

REFERÊNCIAS.....69

1 INTRODUÇÃO

As indústrias químicas ligadas à agricultura e pecuária vêm produzindo milhares de novos produtos a cada ano. Durante os últimos cinquenta anos, muitos produtos químicos foram sintetizados e liberados para utilização no meio ambiente. Americanos utilizam aproximadamente dois bilhões de galões de inseticidas a cada ano, e alguns resíduos permanecem na cadeia alimentar por décadas. Em muitos destes produtos são encontradas substâncias que mimetizam hormônios ou possuem atividade de desregulação endócrina, especialmente com propriedades estrogênicas ou de hormônios tiroideanos (COLBORN et al., 1996; SCOTT, 2005).

Os desreguladores endócrinos podem ser definidos como “agentes exógenos” que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação e eliminação de hormônios naturais no corpo humano responsáveis pela manutenção da homeostasia e na regulação de processos de desenvolvimento (KAVLOCK et al., 1996), ou ainda, de acordo com Shettler et al. (1999), como agentes químicos que em doses extremamente pequenas imitam, bloqueiam ou ainda interferem na atividade hormonal normal.

A detecção de resíduos de praguicidas em residências de agricultores e a presença desses resíduos e seus metabólitos em urina das famílias residentes em área agrícola, demonstra que há risco de exposição ambiental, o que torna importante o conhecimento dos efeitos tóxicos em baixas doses por períodos prolongados (CURWIN et al., 2005; CURWIN et al., 2007).

Nas culturas agrícolas, em diversas partes do mundo, o uso de praguicidas é intenso. Animais expostos a longos períodos de pastagem em áreas de integração lavoura e pecuária podem estar ingerindo quantidades de subprodutos, metabólitos e contaminantes utilizados na agricultura. A contaminação do solo e água tanto fluvial como subterrânea, pode levar a distúrbios reprodutivos principalmente no que se refere às alterações do perfil hormonal destes animais. Os efeitos residuais destas substâncias podem estar contidos no sangue, na carne, no leite, na urina e nas fezes dos animais levando a recontaminação do solo e podendo chegar ao consumo humano (CURWIN et al., 2005).

Seus efeitos podem ser agudos ou crônicos, na dependência do tempo de exposição, concentração no ambiente, modo de contato com o produto e tipo de degradação, interferindo

no padrão hormonal dos reprodutores promovendo queda na fertilidade e até infertilidade (AKINGBEMI et al., 2004).

Além dessas observações, resultados obtidos previamente demonstraram que há redução significativa na espermatogênese e na esteroidogênese de ratos tratados com o herbicida Roundup® durante a fase pré-púbere, desde a dose mais baixa utilizada nos experimentos (5 mg/kgPV) (ROMANO et al., 2007a; ROMANO et al., 2008a; ROMANO et al., 2008b; ROMANO et al., 2009; ROMANO et al., 2010; ROMANO et al., 2007b; ROMANO et al., 2007c).

Neste estudo, o objetivo foi investigar o efeito na prole da exposição ao glifosato durante o período peri-natal. O final da gestação e os primeiros dias pós-natal são os períodos nos quais há a diferenciação sexual hipotalâmica, onde ocorre a conversão da testosterona a estradiol, pela maior expressão da enzima aromatase neste período, tornando o hipotálamo acíclico. Essa característica acíclica torna a atividade hipotalâmica do indivíduo masculina, com liberação de gonadotrofinas a partir de um ritmo circadiano. Distúrbios durante esse período podem comprometer a vida reprodutiva futura do animal, principalmente dos indivíduos do sexo masculino, uma vez que o ritmo de liberação das gonadotrofinas será alterado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GLIFOSATO¹

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

Nas culturas tradicionais, sua aplicação é realizada antes do plantio ou após o plantio com uso de equipamentos adequados para evitar o contato com a planta cultivada. O desenvolvimento de sementes de espécies comerciais resistentes ao glifosato (transgênicas) proporcionou segurança na aplicação do produto em qualquer fase do crescimento da planta (CERDEIRA et al., 2007). Seu uso ainda contempla o controle de plantas daninhas aquáticas, onde seu efeito sobre a biodiversidade ainda é discutível (BRAUSCH; SMITH, 2007).

Apesar de o glifosato ser considerado um produto de mediana ou baixa toxicidade segundo a ANVISA (2002), vários estudos recentes têm demonstrado que ele apresenta toxicidade, mesmo quando em quantidade reduzida. Dallegrave et al. (2003) observaram o retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal em ratos Wistar causado pelo Glifosato-Roundup[®] e comprovaram esse efeito tóxico sobre o desenvolvimento fetal em exposições agudas induzidas utilizando-se as doses orais diárias de 0, 500, 750 ou 1.000 mg/kg entre o 6.^a e 15.^o dia de gestação. Verificou-se a ocorrência de mortalidade de 50% das fêmeas que receberam a dose de 1.000 mg/kg.

Observa-se ainda que algumas agricultoras que fazem uso do glifosato na lavoura, têm problemas para engravidar, mas o mecanismo de ação do glifosato em mamíferos ainda é questionado. O glifosato em baixas concentrações não-tóxicas causa efeito de desregulação sobre a enzima aromatase em células de placenta humana *in vitro*. A partir do momento que o glifosato penetra na célula, e isso é facilitado nas formulações de Roundup[®] com adjuvantes, ele reduz a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos (RICHARD et al., 2005).

¹ Nome comum. Nome químico: N-fosfonometilglicina (C₃H₈NO₅P).

A diminuição da atividade da aromatase também foi observada em cultivos de células embrionárias humanas, sendo estas mais sensíveis que as células placentárias. A desregulação da aromatase foi mais intensa na presença de Roundup[®], mas também foi observada na utilização de glifosato sem adjuvantes. Efeitos citotóxicos também foram observados, sendo maiores com o maior período de exposição ao produto, mostrando efeito tempo e dose dependentes (BENACHOUR et al., 2007). Estudos com glifosato em mamíferos, incluindo seres humanos mostraram ainda, diversas alterações fisiológicas e bioquímicas em células (umbilical, embrionária e placentária) (BENACHOUR; SERALINI, 2009)

Além destas observações, resultados obtidos previamente em nosso laboratório demonstraram que há redução significativa na espermatogênese e na esteroidogênese de ratos tratados com o herbicida Roundup[®] durante a fase pré-púbere, desde a dose mais baixa utilizada nos experimentos (5 mg/kgPV) (ROMANO et al., 2007a; ROMANO et al., 2008a; ROMANO et al., 2008b; ROMANO et al., 2009; ROMANO et al., 2010; ROMANO et al., 2007b; ROMANO et al., 2007c).

2.1.1 Características químicas e mecanismo de ação do glifosato

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

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

2.1.2 Comportamento do glifosato no solo

É um produto degradado pelos microorganismos presentes no solo com meia-vida frente à biodegradação de aproximadamente 28 dias, chegando a 90% em 90 dias. A persistência do produto no solo é de 30 a 90 dias (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998).

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

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

Entretanto, a detecção de resíduos de praguicidas em residências de agricultores (CURWIN et al., 2005) e a presença desses resíduos e seus metabólitos em urina das famílias residentes em área agrícola (CURWIN et al., 2007) demonstra que há risco de exposição ambiental, o que torna importante o conhecimento dos efeitos tóxicos em baixas doses por períodos prolongados (CURWIN et al., 2005; CURWIN et al., 2007). Além disso, a presença de alguns tipos de resíduos em alimentos também tem sido identificada (COX; SURGAN, 2006).

2.1.3 Farmacodinâmica e farmacocinética em animais de laboratório do glifosato

A excreção do glifosato ocorre principalmente por via fecal, sendo observada nas fezes a presença de 62 a 69% da dose oral administrada (WILLIAMS et al., 2000). A eliminação do produto também se dá via renal, sendo encontrada cerca de 36% da dose oral na urina. A

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

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

2.1.4 Roundup^{®2}: ingredientes ativos e inertes

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

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

Os mais recentes estudos no desenvolvimento dos ingredientes inertes dos praguicidas estão focados na nanotecnologia. Os ingredientes ativos e inertes são manipulados em nanopartículas, formando uma emulsão, ou então o ingrediente ativo é encapsulado. Atribuindo-se, assim, novas características químicas aos produtos formulados, que podem alterar suas características de ação e toxicidade anteriormente conhecidas (ETCGROUP, 2004).

² Roundup[®] é a formulação comercial mais conhecida do Glifosato e a utilizada neste estudo.

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

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

Da mesma forma, alterações causadas em quatro tipos de sapos norte americanos expostos a cinco formulações a base de glifosato demonstraram incremento no tempo de metamorfose, danos na cauda e anormalidades nas gônadas causadas por disrupção dos hormônios, comprovados pelo aumento na transcrição de RNAm nos animais expostos, com maior efeito nos animais expostos ao surfactante politoxilado tallowamine POEA (HOWE et al., 2004). Ainda, o efeito tóxico maior das formulações de glifosato também foi confirmado em cultivos de células testiculares de camundongos (WALSH et al., 2000), em mitocôndrias de hepatócitos de ratos (PEIXOTO, 2005), em cultivo de células placentárias humanas (RICHARD et al., 2005; BENACHOUR et al., 2007), em cultivo de células embrionárias humanas (BENACHOUR et al., 2007) e em embriões invertebrados (MARC et al., 2002).

2.1.5 Estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* do glifosato

Vários estudos foram conduzidos para demonstrar a segurança e as limitações da utilização do glifosato, e sua marca comercial mais conhecida, o Roundup®. Ensaio avaliando seus efeitos tóxicos sobre animais de laboratório, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães, macaco e galos; e outros *in vitro* em culturas celulares distintas vêm sendo realizados a partir da década de 70 (WILLIAMS et al., 2000).

Dallegrave et al. (2003) observaram o retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal em ratos Wistar causado pelo Glifosato-Roundup® e comprovaram esse efeito tóxico sobre o

desenvolvimento fetal em exposições agudas induzidas utilizando-se as doses orais diárias de 0, 500, 750 ou 1.000 mg/kg entre o 6º e 15º dia de gestação. Verificou-se a ocorrência de mortalidade de 50% das fêmeas que receberam a dose de 1.000 mg/kg.

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

Em mitocôndrias isoladas de hepatócitos de ratos, observou-se redução de 50% no processo de fosforilação oxidativa na presença de Roundup®, que atuou direta e indiretamente na atividade da ATPase (PEIXOTO, 2005). A formulação Roundup® atrasou a ativação da CDK1/ciclina B, inibindo também a síntese global de proteínas, o que alterou a regulação do ciclo celular, durante o desenvolvimento embrionário inicial do *Sphaerechinus granularis*, um invertebrado marinho utilizado como modelo para avaliação da exposição à contaminação ambiental por praguicidas (MARC et al., 2002). Em ampla revisão realizada por Williams et al. (2000), os autores citam que não há evidências que doses orais de 0 a 30mg/kg e de 0 a 30.000 ppm levem à alterações significativas na capacidade de ratos se reproduzirem. Porém, observou-se a redução nas concentrações espermáticas no epidídimo em cerca de 20% dos animais expostos a doses orais de 25.000 ppm e 50.000 ppm. Fêmeas que receberam doses de 50.000 ppm apresentaram elevação no comprimento do ciclo estral de 4,9 para 5,4 dias. Está sendo observado que algumas agricultoras que utilizam glifosato, na lavoura, têm problemas para engravidar, mas o mecanismo de ação do glifosato em mamíferos ainda é questionado.

Richard et al. (2005) demonstraram que o glifosato em baixas concentrações não tóxicas causa efeito de disrupção sobre a enzima aromatase em células de placenta humana *in vitro*. A partir do momento que o glifosato penetra na célula, e isso é facilitado nas formulações de Roundup® com adjuvantes, ele reduz a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos. A diminuição da atividade da aromatase também foi observada em cultivos de células embrionárias humanas, sendo estas mais sensíveis que as células placentárias. A disrupção da aromatase foi mais intensa na presença de Roundup®, mas também foi observada na utilização de glifosato sem adjuvantes. Efeitos citotóxicos também foram observados, sendo maiores com o maior período de exposição ao produto,

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

O mecanismo de desregulação do glifosato estudado por Walsh et al. (2000) em cultivo celular de Leydig da linhagem tumoral MA-10, quantificou a expressão da proteína StAR e da enzima aromatase nos cultivos celulares submetidos a diferentes concentrações de Roundup® (Monsanto). Houve a redução de 90% dos níveis da proteína StAR, implicando que, de cada 100 moléculas de colesterol disponíveis para o transporte ao interior da membrana mitocondrial, apenas 10 atingiram o sistema enzimático P450_{scc}. Em seguida, a conversão de colesterol em pregnenolona foi reduzida em 71% pela inibição da atividade de P450_{scc}. Ao final das transformações bioquímicas observou-se a redução de 94% na esteroidogênese total.

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

2.2 DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO E COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS

2.2.1 Reprodução – aspectos gerais

A reprodução nos mamíferos encontra-se sob o controle dos sistemas nervoso e endócrino que atuam de forma coordenada na promoção, desenvolvimento e maturação das características sexuais e comportamentais. O sistema nervoso é receptor e coordenador dos

estímulos ambientais que influenciam a reprodução. Ele sintetiza e libera hormônios hipotalâmicos que regulam a liberação de hormônios hipofisários, que por sua vez, agem sobre a função gametogênica e endócrina das gônadas (NAFTOLIN, 1981; LIBERTUN, 2004)

O sistema reprodutivo de machos é regulado por uma complexa interação entre o sistema nervoso central, hipotálamo, pituitária (hipófise) e testículos. O hipotálamo é responsável pelo controle central deste complexo, com a síntese e liberação de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotropinas), o qual é liberado de modo pulsátil pelos terminais hipotalâmicos neurais (HEINDEL; TREINEN, 1989). Em ratos, o GnRH é liberado para dentro dos capilares do sistema porta hipofisal até a adenohipófise (HINEY et al., 2002), onde estimula os gonadotrofos a secretarem as gonadotrofinas LH (Hormônio Luteinizante) e FSH (Hormônio Folículo Estimulante) (HEINDEL; TREINEN, 1989). Nos machos o LH e o FSH são secretados de forma estável (LIBERTUN, 2004).

Quando os pulsos de LH atuam nas células testiculares de Leydig ocorre a liberação pulsátil de testosterona (HEINDEL; TREINEN, 1989).

Os hormônios gonadais promovem a diferenciação sexual. Esta “diferenciação sexual do sistema nervoso” pode ser dividida em duas fases: “organizacional” e “ativacional” dos hormônios sexuais. A primeira é caracterizada como período crítico, que ocorre logo após o nascimento, onde circuitos neurais específicos de cada sexo são consolidados. A segunda é quando o indivíduo, na fase adulta, requer os hormônios sexuais para ativar os circuitos e proporcionar o desencadeamento dos aspectos fisiológicos da função reprodutiva (KELLI, 1991; McCORMICK et al., 1998; ver revisão de PILGRIM & REISERT, 1992).

2.2.2 Morfologia testicular e espermatogênese

Os testículos são compostos em seu parênquima por túbulos seminíferos, que são envoltos por uma cápsula composta por três camadas. As paredes dos túbulos seminíferos são formadas por células germinativas e de Sertoli. (NORMAN; LITWICK, 1997; HAFEZ; HAFEZ, 2000). As células germinativas constituem o epitélio germinativo, onde ocorre a espermatogênese. As células de Sertoli formam a barreira hematotesticular que separa os compartimentos espermatogênico intracelular e o espaço extracelular (BERGADÁ, 2004). A

proliferação das células de Sertoli e das células germinativas ocorrem em diferentes períodos do desenvolvimento testicular. O número de células de Sertoli, estabelecido durante o período pré-púbere, determina o tamanho final do testículo e a produção espermática diária em animais sexualmente maduros (ORTH et al., 1988; FRANÇA et al., 2000).

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

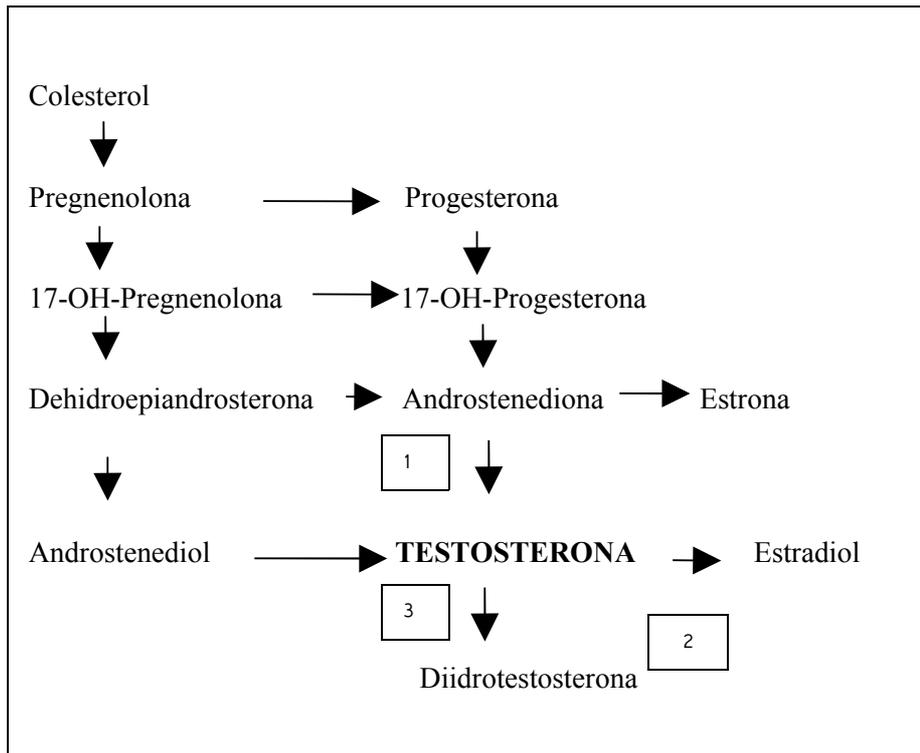
A espermatogênese é o processo de geração do gameta masculino (HEINDEL; TREINEN, 1989), onde as espermatogônias originam as espermatídes maduras em quatro fases: 1) desenvolvimento e mitose de espermatogônias indiferenciadas, originando os espermatócitos primários; 2) desenvolvimento dos espermatócitos via meiose, originando na primeira divisão os espermatócitos secundários e na segunda divisão, as espermatídes que são as últimas células haplóides; 3) espermiogênese, que são transformações estruturais complexas das espermatídes recém-formadas culminando com as espermatídes maduras e 4) espermiacção que é a liberação das espermatídes maduras para a luz dos túbulos seminíferos. A espermiogênese do rato consiste em 19 estágios de transformações sucessivas das espermatídes até espermatozóides (HEINDEL; TREINEN, 1989; ZENICK et al., 1994; KLINEFELTER & HESS, 1998).

Após a liberação das espermatídes para a luz dos túbulos seminíferos, elas são deslocadas para a cabeça do epidídimo. A maturação dos gametas, para espermatozóides, ocorre durante o trânsito das espermatídes maduras ao longo do ducto epididimário (ROBB; AMMAN & KILLIAN, 1978; ZENICK et al., 1994; KLINEFELTER & HESS, 1998). Uma vez iniciado na puberdade, o processo de espermatogênese é contínuo. Nos ratos este processo é reiniciado a cada 13 dias e o tempo para a espermatogônia transformar-se em espermatíde madura é de aproximadamente 50 a 60 dias (HEINDEL; TREINEN, 1989).

A regulação hormonal da espermatogênese é manifestada principalmente pela ação do FSH e da testosterona sobre as células de Sertoli, com subsequente modulação por fatores parácrinos (HEINDEL; TREINEN, 1989).

2.2.3 Testosterona

A testosterona alcança e estimula os órgãos efetores androgênicos por via sanguínea. Nos órgãos efetores é transformada em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -redutase, ou é, em maior parte, convertida em estradiol pela ação da enzima aromatase (ver revisão de LITTLETON-KEARNEY & HURN, 2004). O esquema a seguir (Quadro 1) demonstra as rotas da biossíntese de testosterona:



Quadro 1 - Via de síntese de hormônios esteróides gonadais. A testosterona é o principal produto secretado pelo testículo. As enzimas são: (1) 17β -OH-esteróide-desidrogenase; (2) aromatase; e (3) 5α -redutase. Modificado de Bergadá (2004) e Breigeiron (2005).

No macho, o hormônio esteróide primário, testosterona, é produzido quase que exclusivamente pelas células de Leydig nos testículos. No período pós-natal, o processo de diferenciação das células de Leydig envolve transformações em três estágios designados progenitor, imaturo e células de Leydig adultas aos 21, 35 e 56 dias de idade, respectivamente (AKINGBEMI et al., 1999). Este desenvolvimento é acompanhado por um progressivo aumento na capacidade de produção de testosterona (GEORGE & PETERSON, 1988; MEISEL & SACHS, 1994).

Aparentemente, ocorrem diferenças entre as espécies nos mecanismos hormonais que regulam o comportamento sexual dos machos, mas sabe-se que sempre ocorre controle pela testosterona secretada pelos testículos, ou por seus metabólitos (ARTEAGA-SILVA, 2005).

Ratos machos passam por duas ondas de testosterona, uma entre o 17º e 18º dias de gestação e outra 1-3 horas após o parto (SLOB et al., 1980). Estas ondas são essenciais para o desenvolvimento físico (anatômico) (GRADY et al., 1865) e comportamental (PFAFF & ZIGMOND, 1971) na masculinização destes animais. Portanto, a testosterona tem uma ação fundamental na diferenciação sexual do encéfalo, onde fatores morfológicos e comportamentais específicos são determinados pela presença ou ausência deste hormônio durante períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (BERGADÁ, 2004; BIALEK et al., 2004; BABICHEV; SHISHKINA & PERYSHKOVA, 1990).

Os efeitos centrais da testosterona sobre o comportamento reprodutivo são mediados, em parte, pelos receptores androgênicos (McGINNIS & DREIFUSS, 1989), os quais têm sido localizados em áreas particulares do encéfalo. Existem duas localizações neurais críticas para a regulação do comportamento sexual, a área pré-óptica medial (APOM) e o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), estas áreas contêm altas concentrações de receptores androgênicos (AR) e estrogênicos (ER) (SIMERLY et al., 1990; HARDING & McGINNIS, 2003; LITTLETON-KEARNEY & HURN, 2004).

Existe grande influência das atividades da testosterona pré e pós-natal no desenvolvimento das características masculinas. Ela exerce efeitos organizacionais na combinação das atividades de AR e ER no desenvolvimento neonato (SEALE et al., 2005).

Desreguladores endócrinos podem alterar a expressão de AR e ER no cérebro. Liu et al. (2010) encontraram que a exposição durante a fase de puberdade ao Fenvalerate não somente causou desregulação na síntese dos hormônios testosterona e estradiol, como também inibiu a expressão de AR no córtex cerebral de ratos.

A desregulação do desenvolvimento neurocomportamental por desreguladores endócrinos têm sido investigada porque o desenvolvimento do sistema nervoso central é diretamente regulado por hormônios endógenos, incluindo hormônios gonadais, e por eventos regulados hormonalmente que ocorrem no início do desenvolvimento (JIE et al., 2010). Os mesmos autores relatam que a administração gestacional de Nonylphenol, um conhecido desregulador endócrino, causa alterações no desenvolvimento neurocomportamental e no desenvolvimento reprodutivo da prole de ratos machos, pois a citotoxicidade produzida por

este composto pode passar pelas barreiras placentária e/ou sangue-testículo para produzir alterações nas células reprodutivas.

2.2.4 Orientação Sexual

A organização neural do comportamento sexual é formada por uma complexa rede no sistema nervoso, sensível a estímulos visuais, auditivos e quimiossensoriais que despolarizam circuitos corticais que interagem com unidades de entrada e saída no sistema límbico, para que possa ser expressa uma resposta comportamental (KELLY & JESSEL, 1997). O bulbo olfatório (BO) é a unidade de entrada dos sinais quimiossensoriais transduzidos na mucosa olfatória e órgão vomeronasal. A relativa importância do estímulo quimiossensorial, quando comparado com outros sinais sensoriais, como a visão e audição, é específica para a biologia de determinadas espécies de comportamento noturno (HULL; WOOD & McKENNA, 2006). A APOM representa uma forma de unidade de saída e é designada como o “centro” organizacional mais importante para a expressão do comportamento sexual de machos, incluindo o rato. O núcleo medial da amígdala (AMe) transmite a entrada dos quimiossensores do BO para a APOM, sendo fundamental na investigação do comportamento sexual (WOOD & NEWMAN, 1995; WOOD, 1997).

Além destas, outras áreas cerebrais importantes na efetivação do comportamento sexual são a subdivisão magnocelular do núcleo pré-óptico-medial, associado ao aspecto motor do comportamento sexual (WOOD & NEWMAN, 1995; WOOD, 1997), o núcleo paraventricular, na facilitação da ereção durante a cópula (ver revisão de GIULIANO & HAMPIN, 2004), e núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), na regulação da motivação sexual de ratos machos (HARDING & McGINNIS, 2003).

Nos ratos, a interação sexual é iniciada por fêmeas em estro que aceitam ou não a aproximação de machos sexualmente ativos (ERSKINE, 1989). O sinal olfatório inicia um importante papel nesta decisão das fêmeas. Possivelmente o sistema acessório olfatório está envolvido na transmissão central de muitos feromônios que causam mudanças na neuroendocrinologia reprodutiva e no comportamento, pois atingem a área pré-óptica basal no cérebro (SAKUMA, 2008).

Os estímulos visuais e auditivos parecem ter um papel modesto, quando comparados com os estímulos olfatórios (quimiossensoriais), para a ativação da motivação sexual. O estímulo olfatório é necessário para a ativação da aproximação sexual, tanto em hamsters quanto em ratos machos. Para responder aos estímulos de uma fêmea receptiva, além das características visuais, auditivas e olfatórias, os machos necessitam de concentrações adequadas de hormônios testiculares (HERNÁNDEZ-GONZALES et al., 2008).

A receptividade feminina é induzida por hormônios ovarianos, os quais controlam a produção e a emissão dos estímulos de incentivo sexual. Fêmeas sexualmente receptivas emitem alguns sinais que têm a capacidade de ativar a aproximação e eventualmente culminar no comportamento copulatório nos machos. Elas também produzem alguns estímulos com propriedades de incentivo sexual para a aproximação (incentivo positivo) ou para afastar-se (incentivo negativo). Incentivos sexuais são normalmente positivos (HERNÁNDEZ-GONZALES et al., 2008).

Sob algumas condições, machos não aproximam-se de fêmeas receptivas. Quando estes encontram-se no período pré-púbere, quando castrados (AGAMO, 2003; ELIASSON & MEYERSON, 1981; HETTA & MEYERSON, 1978) e em algumas situações em que encontram-se sexualmente exaustos por ocasião de longos períodos de copulação (AGAMO et al., 2004).

Para que ocorra a aproximação sexual, é necessário no mínimo, um organismo emitindo estímulos de incentivo sexual e outro organismo com estado motivacional central capaz de reagir a este estímulo (HERNÁNDEZ-GONZALES et al., 2008).

A diferenciação sexual cerebral depende da ação de hormônios gonadais em um período de tempo específico, chamado “período crítico”. A ação dos hormônios neste período determinam as características específicas de cada sexo. A orquiectomia, realizada em neonatos, culmina no desenvolvimento de estruturas tipicamente femininas, da mesma forma que o tratamento com testosterona em fêmeas recém-nascidas provoca masculinização (SAKUMA, 2008). Provavelmente a testosterona contribui para o dimorfismo sexual atuando no “Bed Nucleus of the Stria Terminalis” (BNST) onde controla a incidência de apoptose (ORIKASA, KONDO & SAKUMA, 2007). Orquiectomia neonatal, bem como o tratamento de filhotes fêmeas com testosterona, também causam reversão sexual, tanto na endocrinologia reprodutiva, quanto no comportamento (ORIKASA et al., 2002).

3 OBJETIVOS

Hipótese central: A exposição peri-natal ao herbicida glifosato-Roundup® altera a diferenciação sexual hipotalâmica.

Com base nas evidências toxicológicas apontadas na revisão bibliográfica e nas características do desenvolvimento reprodutivo, este trabalho possui os seguintes objetivo geral e específicos:

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da exposição peri-natal ao herbicida glifosato-Roundup® sobre o desenvolvimento reprodutivo, comportamental e endócrino da prole.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a exposição peri-natal ao herbicida glifosato-Roundup® sobre:

- 1 desenvolvimento corporal da prole;
- 2 desenvolvimento das características sexuais secundárias, como a idade à puberdade;
- 3 perfil sérico de FSH, LH, testosterona e estradiol;
- 4 orientação sexual da prole na pós-puberdade;
- 5 produção espermática diária por testículo, contagem espermática e tempo de trânsito espermático no epidídimo.

4 MATERIAL E MÉTODO

A descrição da metodologia empregada e de todos os materiais utilizados nas etapas deste experimento estão descritos nos itens e subitens a seguir.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados como modelos experimentais ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Para obtenção das proles a serem avaliadas, foram adquiridos junto ao Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, seis machos e seis fêmeas utilizados como reprodutores. Para observação do comportamento reprodutivo foi necessário a inversão do fotoperíodo dos reprodutores e adaptação ao mesmo. Os animais foram alocados aos pares, segundo o sexo, em caixas de polipropileno com água e ração comercial *ad libitum* durante 60 dias para adaptação ao novo fotoperíodo e estabilização do padrão de secreção hormonal dos animais. O ciclo invertido foi de fotoperíodo de igual duração de noite e dia para todos os animais com temperatura ambiente controlada durante todo o experimento entre 23 a 25°C.

Após o período de adaptação, os casais foram formados e permaneceram juntos até a confirmação da concepção através da observação de presença de espermatozóides na vagina das fêmeas. Cada observação de lavado vaginal foi realizada através de exames pela manhã, ao meio do dia e início da noite. Dois dias após a constatação de espermatozóides no esfregaço vaginal a fêmea foi separada do macho e designou-se o dia 1 (D01) da gestação ao dia de observação de espermatozóides pela primeira vez no lavado vaginal. Estes dados foram posteriormente confirmados pela data de parto, de forma a avaliar a eficiência da metodologia. Após constatar a gestação, os machos foram descartados e as fêmeas agrupadas em duplas por caixa até o 17º dia de gestação (D17), onde cada fêmea foi alocada em uma caixa individual, sendo acompanhadas diariamente para a determinação do exato dia do nascimento.

Inicialmente, para o experimento foram utilizados 48 ratos Wistar machos, provenientes das seis fêmeas acasaladas anteriormente (oito filhotes por fêmea). Quatro fêmeas foram submetidas ao tratamento com o herbicida do 18º dia de gestação (D18) até os

cinco dias subseqüentes ao parto (PND5), e duas fêmeas receberam água destilada durante o mesmo período. Das proles nascidas, os machos foram selecionados no segundo dia pós-natal e padronizados em oito filhotes por fêmea, sendo mantida esta proporção até o desmame. A padronização envolve a eliminação dos animais excedentes por decapitação. Fêmeas constatadas após este período foram eliminadas do experimento, resultando desta forma 38 animais experimentais, dos quais 25 pertenceram ao grupo tratado e 13 ao grupo controle. Os machos selecionados foram identificados de acordo com a respectiva mãe, anteriormente numeradas de 1 a 6, e divididos em grupos de acordo com os tratamentos pré-natais efetuados. As mães foram descartadas após o período de amamentação que se estendeu até o 21º dia pós-parto (PND21). Os filhotes foram mantidos até os 60 dias alimentados com ração balanceada para ratos e água *ad libitum*, pesados nos dias 21 (Desmame), aos 30, 40 e 60 dias para acompanhamento do desenvolvimento ponderal dos animais. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em fotoperíodo invertido de igual duração, noite e dia e temperatura ambiente controlada entre 23 a 25°C.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi totalmente casualizado. A partir da constatação da gestação, as fêmeas foram transferidas para caixas individuais onde permaneceram isoladas até o parto. Durante este período os grupos foram definidos de forma aleatória, mães de filhotes tratados e mães de filhotes do grupo controle, sendo que o último recebeu somente água destilada como tratamento e o grupo tratado recebeu o glifosato diluído em água destilada. Ao nascimento, cada animal de cada grupo recebeu identificação individual, de acordo com a mãe e o tratamento correspondente e foram distribuídos ao acaso em cada caixa por grupo de tratamento. A dose de glifosato foi de 50 mg/kgPV (LU, 1995) baseada na concentração do equivalente ácido de glifosato na formulação do produto (sal de Isopropilamina de Glifosato 648g/L – 480g/L equivalente ácido).

4.3 MANEJO DOS ANIMAIS

Os Fêmeas gestantes foram submetidas aos tratamentos experimentais do 18º dia de gestação (D18) até os cinco dias subseqüentes ao parto (PND5). O período de lactação estendeu-se até o 21º dia de vida (PND21) e após esse período os animais foram alimentados com ração comercial balanceada para ratos e com água disponível *ad libitum*.

4.4 EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA GLIFOSATO

Durante o período de exposição ao herbicida (18º dia de gestação até os 5 dias subseqüentes ao parto) todas as fêmeas foram pesadas diariamente para determinação das quantidades orais a serem fornecidas, com o objetivo de administração de dose em função do peso. A balança utilizada apresentou as seguintes especificações técnicas: acurácia classe III; 3.000g/0,1g (BS Eletronic Celtec).

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

A gavagem foi realizada com auxílio de sonda rígida em aço inoxidável, de 1mm de diâmetro por 5cm de comprimento e acoplada em uma seringa de 1mL de volume total. As doses utilizadas foram de 0 (zero) mg/kg de peso vivo para as mães do grupo controle e 50 (cinquenta) mg/kg de peso vivo para mães do grupo tratado.

Na diluição do glifosato em suspensão aquosa, utilizaram-se pipetas e vidrarias esterilizadas, e a manipulação do produto foi realizada em capela de exaustão tomando-se toda a segurança necessária. O produto comercial utilizado para o tratamento foi o Glifosato Roundup Transorb® (Monsanto Co., St. Louis, MO).

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

4.5 VERIFICAÇÃO DA IDADE À PUBERDADE

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

O início da monitorização da separação da mucosa prepucial e exposição da glândula ocorreu no 33º dia de idade (PND33) para todos os animais de ambos os grupos estudados, foi realizada uma vez ao dia, às 20:00 horas. Esta monitorização estendeu-se até a constatação da separação da pele e exposição completa da glândula (PARKER, 2006), visto que a puberdade nestes animais possui como principal marco de referência o total deslocamento balanoprepucial. Na constatação da puberdade, os animais foram pesados a fim de determinar o peso à puberdade.

4.6 COLHEITA DE AMOSTRAS PARA EXAMES LABORATORIAIS

Aos 60 dias de idade todos os animais foram anestesiados com anestesia geral (associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina) para realização da colheita de sangue e em seguida, eutanasiados através de decapitação para as colheitas dos testículos e glândula vesicular (vesícula seminal).

4.6.1 Sangue

A colheita de sangue foi realizada em todos os animais entre 07:30 e 08:30h da manhã objetivando as dosagens hormonais. A colheita foi realizada através de punção cardíaca e as amostras depositadas em tubos à vácuo contendo gel separador para soro, em seguida centrifugou-se as amostras a 5.000 rpm por 10 minutos. O soro foi separado, acondicionado em tubo tipo *Eppendorf* e congelado à -18°C para posteriores análises laboratoriais de dosagens de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), Testosterona e Estradiol.

4.6.2 Necropsias: retirada de testículos e glândula vesicular

Após a eutanásia, os testículos foram removidos e pesados em balança de precisão. Os pesos foram transformados em proporções relativas à 100g de peso vivo para subseqüentes análises e comparações.

O testículo esquerdo foi seccionado transversalmente em duas porções iguais e fixado em solução de Boin por 24 horas e processados para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina e eosina para posterior realização da análise morfométrica dos túbulos seminíferos.

O testículo direito foi homogeneizado em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5%, seguido por sonicação durante 30 segundos. Depois de uma diluição de 10 vezes, uma amostra de cada animal foi transferida para câmaras de Neubauer (quatro campos por animal) precedendo a contagem de espermátides maduras.

O epidídimo foi separado do tecido adiposo e dividido em cabeça, corpo e cauda, cada parte foi seccionada em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi, seguidos de homogeneização em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5% e sonicação por 30 segundos. Após uma diluição de 10 vezes, cada amostra foi transferida para câmaras de Neubauer para a contagem de espermátides a fim de determinar o tempo de trânsito testicular.

As glândulas vesiculares foram removidas e pesadas em balança de precisão, após a remoção do conteúdo vesicular todas as vesículas foram pesadas novamente. As duas pesagens deram origem a dois parâmetros: peso da glândula vesicular repleta e peso da glândula vesicular drenada.

4.7 DOSAGENS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS

4.7.1 FSH e LH

O ensaio para a dosagem sérica de FSH e LH foi realizado através do *kit* comercial Lincoplex, Millipore, USA no Laboratório de Dosagens Hormonais da Genese Produtos Diagnósticos Ltda. Esse ensaio utiliza a tecnologia Luminex Corporation's xMAP™ (MAP=Multiple Analyte Profiling, x= analitos) que envolve um processo que cora internamente microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito específico. Estas microesferas são então combinadas em um único poço de reação e podem dosar até 100 analitos simultaneamente. A próxima etapa é a adição do anticorpo de detecção biotinizado.

Cada conjunto de microesferas está acoplado com anticorpo de captura específico. O anticorpo de captura, por sua vez, liga-se ao analito específico e então o anticorpo de detecção biotinizado se liga ao analito específico. O resultado final é amplificado através de incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina (AS-PE *reporter*), que emite sinal fluorescente. As microesferas são lidas no equipamento Luminex 100 através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de *reporter* em cada microesfera. As microesferas passam através do fluxo celular Luminex e cada microesfera é identificada e o sinal SA-PE associado a elas é quantificado.

Os resultados foram expressos em pg/mL para ambos os hormônios, sendo a sensibilidade para o LH de 2,91 pg/mL e para o FSH de 31 pg/mL. O coeficiente de variação intraensaio foi < 2,5% para o LH e < 4,7% para o FSH.

4.7.2 Testosterona total e estradiol

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

Os *kits* utilizados nesse experimento são o de radioimunoensaio em fase sólida marcado com ¹²⁵I designado para a dosagem quantitativa da testosterona ou estradiol em soro sem extração. O hormônio marcado com ¹²⁵I compete por um período fixo de tempo com o

hormônio da amostra para os sítios do anticorpo. O tubo é decantado, para separar a forma ligada da livre, e é contado em um contador gama acoplado a um microcomputador. A quantidade de hormônio presente na amostra é determinada a partir de uma curva de calibração, obtida pela dosagem dos calibradores que fazem parte do *kit*.

As amostras de soro foram armazenadas em freezer à temperatura de -18°C, transferidas para o refrigerador à temperatura de 4°C e ali mantidas até o seu completo descongelamento. Os reagentes, tubos e amostras foram mantidos em temperatura ambiente de 21°C cerca de trinta minutos antes do início do ensaio. Os tubos foram preparados e identificados em duplicata, tanto os calibradores quanto os das amostras. Pipetou-se o volume da amostra na base de cada tubo, adicionou-se o hormônio marcado¹²⁵I em todos os tubos e misturou-se em vórtex. Seguiu-se a incubação. Retirou-se o sobrenadante da amostra decantada, eliminando-se todas as gotas da amostra. Os tubos foram levados ao contador gama, onde o procedimento de contagem durou em média 1 minuto para cada amostra.

4.7.2.1 Testosterona total

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

4.7.2.1 Estradiol

A dosagem sérica de estradiol foi realizada através do *kit* comercial Estradiol Coat-A-Count®, DPC, Los Angeles, USA. Os resultados foram expressos em pg/mL. A sensibilidade do teste foi de 92,2% (1,4238 pg/mL). O coeficiente de variação intraensaio foi < 3,9%.

4.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS

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

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

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

4.9 PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA POR TESTÍCULO, CONTAGEM ESPERMÁTICA E TEMPO DE TRÂNSITO NO EPIDÍDIMO

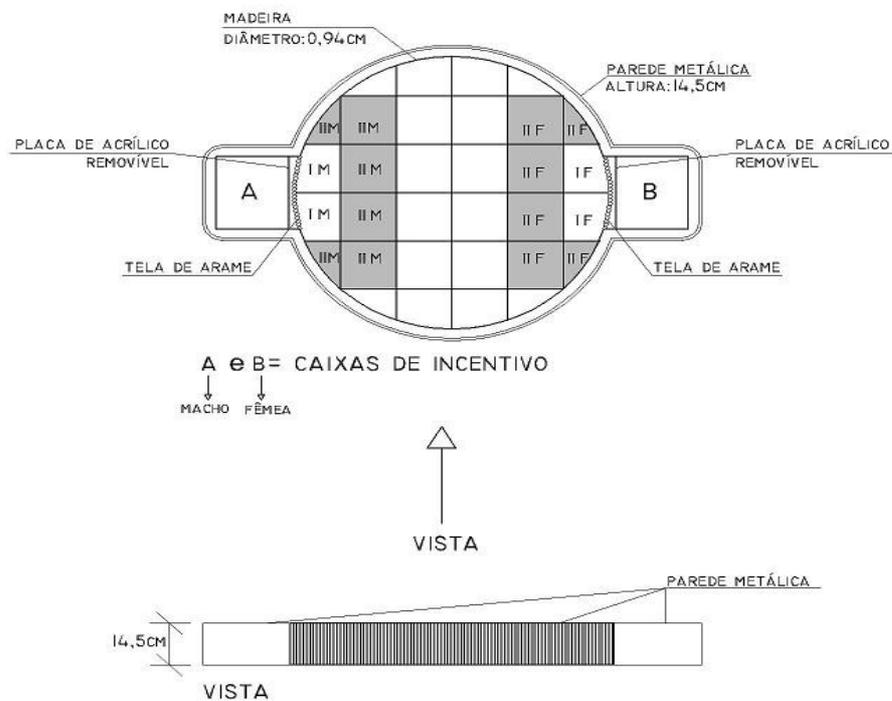
Para calcular a produção de espermatozóides diária por testículo (PED), o número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6,1 dias, que é o número de dias que estas espermátides estão presentes no epitélio seminífero. Em seguida foi calculada a PED por grama a fim de determinar a eficiência do processo. Da mesma forma, o epidídimo foi separado do tecido adiposo e dividido em cabeça, corpo e cauda que foram cortadas em pequenos fragmentos com uma lâmina de bisturi e homogeneizadas, o esperma foi contado como descrito para o testículo. O tempo de trânsito de espermatozóides através do epidídimo foi determinado pela divisão do número de espermatozóides em cada parcela por PED (ROBB, 1978; MOURA, 2006).

4.10 AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO SEXUAL

Os testes foram conduzidos em sala de ciclo invertido, onde os animais eram mantidos desde o período de acasalamento. A orientação sexual foi realizada com um aparelho demonstrado no Desenho 1, constituído de uma arena circular de madeira com diâmetro de 94 cm, circundada por uma parede metálica de 14,5cm de altura. Acoplado a arena, existem 2 compartimentos localizados nas extremidades laterais diametralmente opostas, denominados de caixas incentivo, medindo 25 x 25 x 14,5 cm. Estas caixas alojaram, respectivamente, um macho e uma fêmea (os ratos “iscas”); encontram-se isoladas da arena por uma tela de arame e ficaram fechadas por uma placa de acrílico removível. O chão da arena foi dividido, por segmentos de reta, em 32 partes aproximadamente iguais: as duas partes próximas tanto da caixa de incentivo do macho quanto da fêmea foram denominadas de área I do macho ou da fêmea; as 6 partes subseqüentes são pintadas de cinza e denominadas de área II; e finalmente as 16 partes localizadas na região central da arena foram denominadas de área indiferente. Este aparelho foi inicialmente proposto por HETTA e MEYERSON (1979), sendo posteriormente modificado por DAHLGREN et al. (1991) (Desenho 1).

Os testes foram realizados na fase escura do ciclo claro/escuro, uma vez que ratos Wistar são mais ativos à noite. A única iluminação da sala foi realizada através de lâmpada infra-vermelha. A observação foi feita por dois observadores posicionados cada qual próximo às caixas incentivo, sendo que um pôde medir o tempo de permanência em duas das áreas (áreas I e II do macho) e o outro das outras duas áreas (áreas I e II da fêmea). Para o estudo da orientação sexual dos machos, foram utilizadas fêmeas especialmente preparadas para cada pareamento, denominadas ratas iscas. A rata isca foi previamente ovariectomizada e tratada três semanas após a castração com 50 µg/kg de 17-β-estradiol e 2 mg/kg de progesterona, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do início dos testes, objetivando a indução do cio. Foram colocados nas respectivas caixas incentivo um rato macho isca e a rata fêmea ovariectomizada com cio induzido, sendo que as placas de acrílico foram mantidas, evitando o contato entre os compartimentos. A seguir foi introduzido na arena o rato a ser avaliado, dando-se início a um período de habituação de 5 min. Após este período o rato foi posicionado no centro da arena (área indiferente) e as placas de acrílico das caixas incentivo foram retiradas, porém a tela de arame impediu o contato direto dos animais testados com os ratos “iscas”, pois o incentivo considerado foi o odor que os animais “iscas” exalaram. Iniciou-se então, a observação da motivação sexual do rato, por 20 minutos. Durante este período foi cronometrado o tempo de permanência do rato na área I do macho, na área II do macho, na área I da fêmea e na área II

da fêmea; o tempo que o animal permaneceu na área indiferente não foi cronometrado. O escore de preferência sexual foi calculado subtraindo-se o tempo total que o animal ficou na zona do macho do tempo total que ele permaneceu na área da fêmea. Assim, a pontuação positiva significa preferência por este animal pelo sexo feminino e negativo para os animais com preferência pelo sexo masculino. Decorrido o tempo de observação, o rato teste foi retirado da arena que recebeu higienização com uma solução de álcool a 5% e então um outro rato teste foi colocado na arena. A observação dos animais experimentais e controles foram feitas intercaladamente.



Desenho 1 - Desenho esquemático do aparelho utilizado para a avaliação da orientação sexual. O primeiro desenho representa a planta baixa da arena e o segundo, a visualização lateral da parede metálica da arena. Modificado de Dahlgren et al. (1991).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As variáveis estudadas foram primeiramente submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Quando alguma premissa do teste paramétrico não foi atingida, optou-se por utilizar testes não-paramétricos para as médias

e testes posteriores. Considerou-se diferença estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05. Os valores estão expressos em média (x) e erro-padrão da média (\pm E.P.M.). Todas as análises foram efetuadas com a utilização do software Statistica 7.0, StatSoft Inc.

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

O dia e o peso da completa separação balanoprepucial foi comparado entre os grupos utilizando-se análise não-paramétrica pelo teste U de Mann-Whitney.

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

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

4.12 CUIDADOS COM O MANUSEIO, CONSERVAÇÃO E RESÍDUOS DE GLIFOSATO

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

5 RESULTADOS

As possíveis alterações provocadas à prole de fêmeas tratadas durante o período perigestacional com o herbicida Glifosato Roundup Transorb[®] (Monsanto Co., St. Louis, MO) foram determinadas através da evolução do peso corporal, peso e idade à puberdade, diâmetro tubular e luminal, espessura epitelial dos túbulos seminíferos, concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e estradiol, peso médio dos testículos e epidídimos, peso das glândulas vesiculares, produção espermática diária por testículo, reservas espermáticas, tempo de trânsito no epidídimo e, finalmente, através de parâmetros de orientação sexual. Todos os dados estão apresentados em tabelas com seus respectivos valores médios \pm Erro Padrão da Média (EPM) quando paramétricos e por mediana e intervalo interquartilício (IQ), quando não paramétricos. Para os dados dos parâmetros analisados houve homogeneidade dos dados, que permitiram o uso dos testes estatísticos propostos.

5.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

O desenvolvimento corporal da prole foi avaliado através da evolução do peso individual dos 21 dias de nascimento, também caracterizado como dia do desmame, até os 60 dias. Dessa forma, os animais foram pesados aos 21, 30, 40 e 60 dias de idade.

A avaliação dos pesos dos animais teve como objetivo verificar possíveis comprometimentos no desenvolvimento causados pela utilização do herbicida. Constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na evolução do peso corporal dos animais, ao longo do experimento, entre os animais do grupo tratado com o herbicida e do grupo controle (Tabela 1).

Não foi observada diferença estatística dos pesos corporais, demonstrando similar desenvolvimento nos grupos (tabela 1). Isto denota relativa linearidade no desenvolvimento corporal dos animais de ambos os grupos (gráfico 1).

O herbicida não causou alterações no metabolismo dos animais que pudessem prejudicar o desenvolvimento corporal normal destes.

Tabela 1 - Evolução do peso corporal de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação perinatal pelo herbicida glifosato (Médias±EPM).

Grupos	Peso 21 dias (g) ± E.P.M.	Peso 30 dias (g) ± E.P.M.	Peso 40 dias (g) ± E.P.M.	Peso 60 dias (g) ± E.P.M.
Controle	53,45 ± 1,09	116,26 ± 1,79	204,71 ± 3,32	329,61 ± 3,74
Tratados	50,99 ± 1,10	108,85 ± 1,62	190,77 ± 2,52	320,98 ± 6,54

(teste t de student)

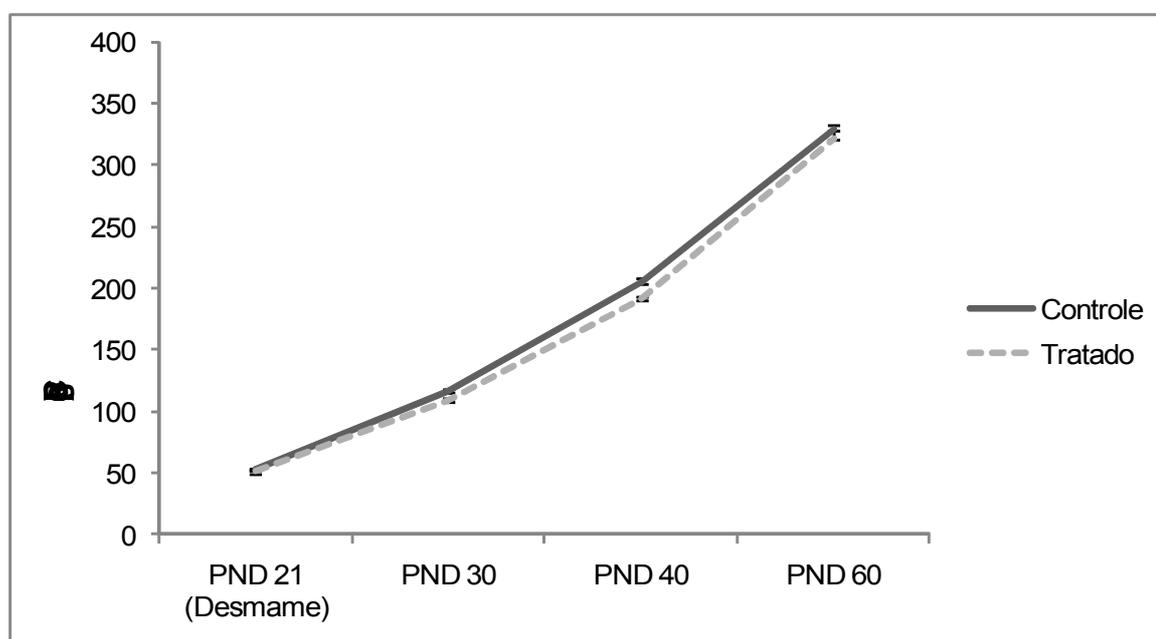


Gráfico 1 – Desenvolvimento corporal dos animais nos grupos tratado e controle dos 21 aos 60 dias de idade.

5.2 PESO E IDADE À PUBERDADE

O parâmetro utilizado para a determinação da idade à puberdade foi a separação balanoprepucial e exposição da glândula peniana para todos os animais a partir do 33º dia de vida. Quando constatada a puberdade, os animais eram pesados e os valores registrados para posterior comparação estatística.

A tabela 2 apresenta os valores de peso médio \pm EPM e idade média à puberdade \pm I.Q., demonstrando que houve diferença significativa ($p < 0,01$) para as duas características entre os grupos tratado e controle. Os animais do grupo tratado atingiram a puberdade mais precocemente e por isso com menor peso corporal quando comparados ao grupo controle.

Tabela 2 - Peso (médias \pm EPM) e idade (mediana \pm Intervalo Quartílico) à puberdade de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato.

Grupos	Peso (g) \pm E.P.M.	Idade (dias) \pm I. Q.
Controle	245,89 \pm 3,25 ^a	47 \pm (46-48) ^a
Tratados	217, 24 \pm 3,19 ^b	45 \pm (44-48) ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,01$, teste t)

5.3 TESTÍCULOS

5.3.1 Peso médio dos testículos e epidídimo

Após a sua retirada, os testículos foram pesados, o epidídimo foi dividido em cabeça, corpo e cauda, sendo que para a maioria das análises foi preconizada a divisão de cabeça + corpo e cauda. As médias dos pesos dos testículos (g), cabeça + corpo (mg) e cauda (g) podem ser visualizadas nas tabelas 3 e 4.

Através da análise estatística não observou-se diferença significativa entre os grupos estudados para a característica peso dos testículos.

Já os epidídimos apresentaram diferenças significativas entre os segmentos estudados. Quando avaliado o peso total dos epidídimos, os animais do grupo tratado apresentaram epidídimos mais pesados ($p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle. Como os segmentos cabeça e corpo não apresentaram diferenças estatísticas, a implicação do maior peso epididimário deveu-se ao maior peso apresentado pelo segmento cauda, que foi mais

pesada nos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,01$). Nos animais do grupo tratado, o segmento cauda apresentou um maior peso $42,45 \pm 1,53$ em relação aos animais do grupo controle $36,91 \pm 0,92$ (Tabela 4).

Tabela 3 - Peso médio dos testículos (mg/100g de PV) nos grupos estudados (Médias \pm EPM).

Grupos	Testículos
Controle	$500,07 \pm 15,60$
Tratados	$493,38 \pm 8,52$

(teste t de student)

Tabela 4 - Peso médio total do epidídimo (mg/100g de PV) e por segmentos em cabeça (mg/100g de PV) corpo (mg/100g de PV) e cauda (mg/100g de PV) dos grupos estudados (Médias \pm EPM).

Grupos	Epidímo Peso	Segmento	Segmento	Segmento
	Total	Cabeça	Corpo	Cauda
Controle	$116,75 \pm 2,17^a$	$69,72 \pm 2,01$	$10,11 \pm 0,85$	$36,91 \pm 0,92^c$
Tratados	$126,23 \pm 3,70^b$	$71,84 \pm 2,49$	$11,94 \pm 1,00$	$42,45 \pm 1,53^d$

Médias com a,b letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)
Médias com c,d letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,01$)
(Teste t de student)

5.4 VESÍCULAS SEMINAIS

Outro segmento andrógeno dependente estudado foram as vesículas seminais ou glândulas vesiculares, que também, a exemplo dos epidídimos, apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. As vesículas seminais quando avaliadas repletas de líquido seminal mostraram-se de igual magnitude, mas após a retirada do fluido, notou-se que houve diferença entre os pesos. Os animais do grupo tratado apresentaram vesículas seminais maiores do que os animais do grupo controle ($p < 0,05$), devido à menor quantidade de fluido. Como o tecido glandular é andrógeno dependente, isto demonstra que nos animais do grupo tratado houve um aumento na atividade tecidual da glândula promovendo seu crescimento (Gráfico 2).

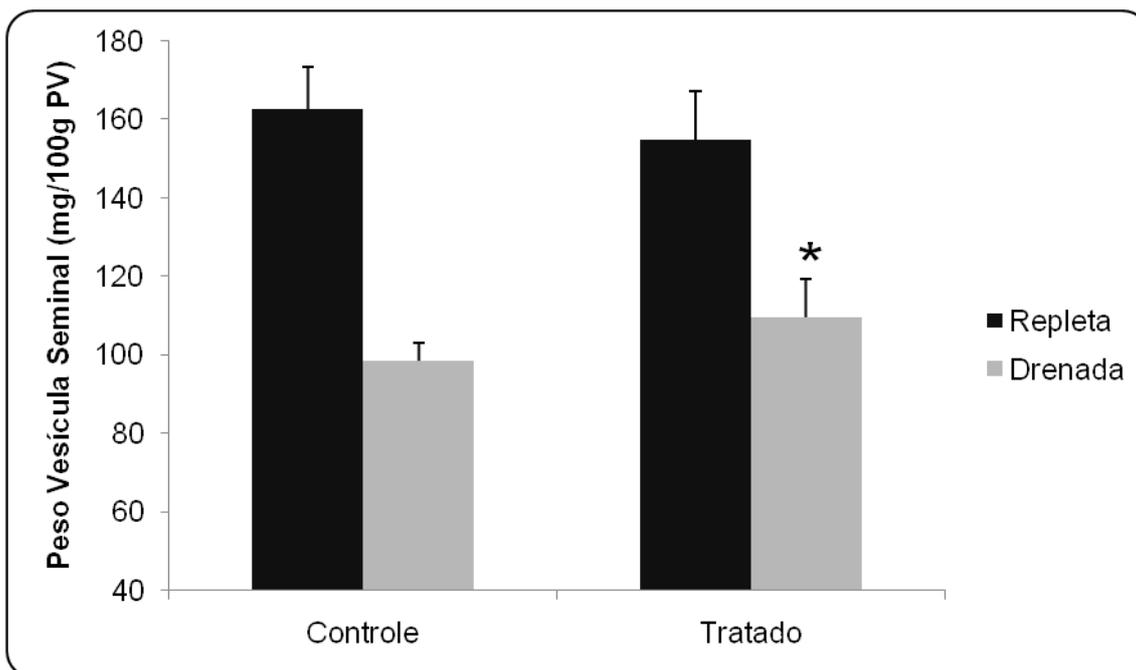


Gráfico 2 – Pesos Médios \pm EPM das vesículas seminais (mg/100g PV) repletas de líquido e após drenagem para os animais dos grupos controle e tratado submetidos a intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato.

5.5 CONTAGEM ESPERMÁTICA

5.5.1 Número de espermátides por testículo e por grama de testículo

Após a retirada dos testículos, o testículo direito foi homogeneizado em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5%, seguido por sonicação durante 30 segundos. Depois de uma diluição de 10 vezes, uma amostra de cada animal foi transferida para câmaras de Neubauer precedendo a contagem de espermátides maduras. A contagem do total das células está representada na tabela 5 em número de espermátides por testículo. Após esta contagem os valores foram transformados em número de espermátides por grama de testículo para a verificação da produção espermática diária testicular. A tabela 5 também demonstra a diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para as duas características nos grupos estudados.

Tabela 5 - Número de espermátides por testículo (10^6 /testículo) de ratos Wistar machos submetidos a intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato e grupo controle (Médias \pm EPM).

Grupos	Número de Espermátides por testículo (10^6 / testículo)	Número de Espermátides por grama de testículo (10^6 /g de testículo)
Controle	52,34 \pm 4,2 ^a	34,89 \pm 0,18 ^a
Tratados	99,22 \pm 19,8 ^b	70,87 \pm 1,43 ^b

Médias com letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (Teste t)

5.6 PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA POR TESTÍCULO

Através da contagem de espermátides maduras foi possível o cálculo da produção espermática diária por testículo. A análise estatística para esta característica demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e tratado, revelando maior produção espermática nos animais do grupo tratado (Tabela 6).

Tabela 6 - Produção espermática diária por testículo (10^6 /g testículo) de ratos Wistar machos submetidos a intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato e grupo controle (Médias \pm EPM).

Grupos	Produção espermática diária por testículo (10^6 /g testículo)
Controle	8,5 \pm 0,7 ^a
Tratados	16,3 \pm 3,2 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (Teste t)

5.7 RESERVAS ESPERMÁTICAS

Houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados para o item reservas espermáticas. Os animais do grupo tratado, submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato apresentaram maior concentração de espermátides nos segmentos cabeça+corpo dos epidídimos ($p < 0,05$). No segmento cauda não houve diferença estatística

entre os grupos estudados denotando uma maior velocidade de passagem dos espermatozoides pela região da cauda nos animais do grupo submetido à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato (Tabela 7).

Tabela 7 – Reservas espermáticas da cabeça+corpo do epidídimo (sptz x 10⁶) e da cauda do epidídimo (sptz x10⁶) de ratos Wistar machos submetidos ao herbicida glifosato no período peri-natal e grupo controle (Médias ± EPM).

Grupos	Cabeça + corpo do epidídimo (10 ⁶)	Cauda do epidídimo (10 ⁶)
Controle	14,1 ± 2,58 ^a	53,9 ± 8,18
Tratados	21,1 ± 2,34 ^b	47,7 ± 4,86

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p < 0,05) (Teste t)

5.8 TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO

O tempo de trânsito espermático também demonstrou diferença estatística significativa, na cauda, entre os grupos controle e tratado (Tabela 8). Nos segmentos cabeça+corpo não houve diferença no tempo de trânsito espermático, mas quando avaliada a cauda, nota-se uma maior velocidade de passagem dos espermatozoides por este segmento, nos animais do grupo tratado, coincidindo com os valores observados na tabela de reserva espermática. Os espermatozoides permaneceram menor tempo neste segmento.

Tabela 8 – Tempo de trânsito espermático (dias) nos segmentos cabeça+corpo e cauda do epidídimo para os grupos estudados (Médias ± EPM).

Grupos	Cabeça+corpo do epidídimo (dias)	Cauda do epidídimo (dias)
Controle	1,6 ± 0,29	6,3 ± 0,83 ^a
Tratados	1,7 ± 0,36	4,0 ± 0,94 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p < 0,05) (Teste t)

5.9 MORFOMETRIA TESTICULAR

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

5.9.1 Diâmetro tubular e luminal e espessura epitelial dos túbulos seminíferos

O estudo das fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos testiculares dos grupos tratado e controle demonstram que ocorreram variações entre eles. A análise estatística demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) na espessura epitelial entre os grupos estudados, sendo que o grupo tratado submetido à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato apresentou maior espessura em relação ao grupo controle (Tabela 9). Como o epitélio germinativo é o responsável pela produção de espermatozóides, nota-se que estes animais tiveram uma maior proporção de células germinativas em relação aos animais do grupo controle, concordando com os valores de maior produção espermática diária.

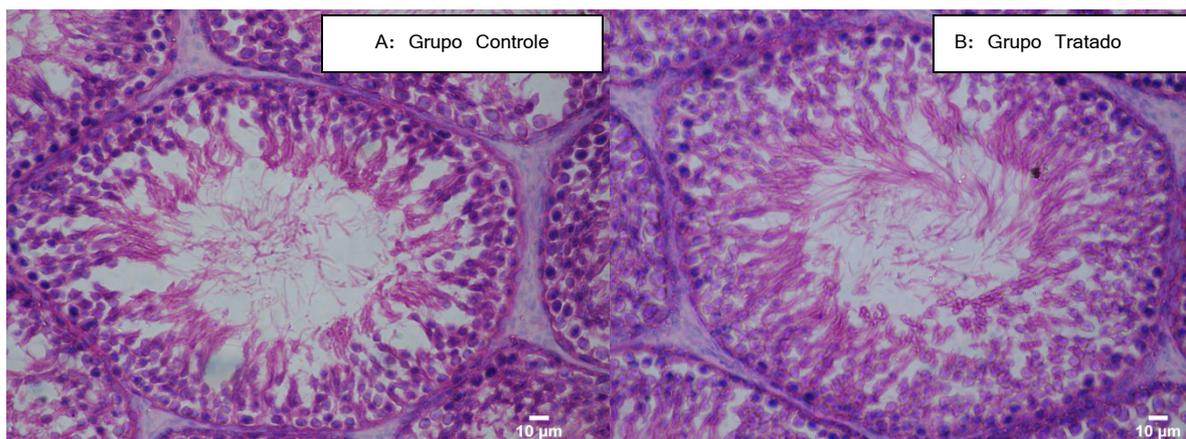
As médias do diâmetro luminal dos grupos tratado e controle também revelaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), sendo que o grupo controle apresentou maior diâmetro luminal em relação ao tratado (Tabela 9). Como a espessura epitelial foi maior nos animais do grupo tratado, conseqüentemente sua porção luminal foi menor.

De acordo com os dados descritos na tabela 9, apesar das diferenças estatísticas apresentadas para espessura epitelial e diâmetro luminal, o diâmetro tubular apresentou-se sem variações estatísticas. Isto demonstra que os testículos tinham tamanhos similares e o que diferiu foram as estruturas do epitélio germinativo.

Tabela 9 - Diâmetro tubular e luminal e espessura epitelial de túbulos seminíferos de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato (Médias \pm EPM).

Grupos	Diâmetro Tubular	Espessura Epitelial	Diâmetro Luminal
	Médio (μm)	Média (μm) Média	Médio
	Média \pm EPM	\pm EPM	(μm)Média \pm EPM
Controle	466,91 \pm 9,28	91,72 \pm 2,25 ^a	256,90 \pm 5,58 ^a
Tratados	451,26 \pm 14,62	97,76 \pm 1,09 ^b	238,75 \pm 5,83 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (Teste t)



Lâmina 1 – Fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos. Em **A** observa-se a fotomicrografia dos túbulos de um animal do grupo controle. Em **B** observa-se a fotomicrografia dos túbulos de um animal do grupo tratado. Notar a maior espessura epitelial e o menor diâmetro luminal nos túbulos dos animais tratados.

5.10 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS

O efeito da exposição peri-natal ao herbicida sobre a endocrinologia da prole foi avaliada através das dosagens das concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e estradiol. A análise desses resultados está descrita a seguir.

5.10.1 FSH

De acordo com os dados apresentados na tabela 10, não houve diferença significativa nas médias de concentrações séricas de FSH entre os grupos tratado e controle. O FSH é o responsável pela produção de proteína transportadora de andrógenos.

Tabela 10 - Concentração sérica de FSH (pg/mL; $\bar{x} \pm \text{EPM}$) para as amostras dos animais nos grupos estudados.

Grupos	FSH (pg/mL)
Controle	12164,0 \pm 1118
Tratado	11544,5 \pm 1006

(Teste t)

5.10.2 LH

A concentração sérica de LH (pg/ml) foi significativamente diferente entre os grupos tratado e controle, $p < 0,05$. O grupo tratado, submetido à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato, apresentou uma maior concentração sérica de Hormônio Luteinizante (LH), responsável pelo estímulo das células de Leydig e, conseqüentemente, da espermatogênese (Tabela 11).

Tabela 11 – Concentração sérica de LH (pg/mL; $x \pm EPM$) para as amostras dos animais nos grupos estudados.

Grupos	LH (pg/mL)
Controle	$70,4 \pm 10,5^a$
Tratados	$122,5 \pm 6,2^b$

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (Teste t)

5.10.3 Testosterona

A concentração sérica de testosterona foi significativamente diferente entre os grupos controle e tratado ($p < 0,05$). O grupo tratado, submetido à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato, apresentou maior concentração sérica deste hormônio quando comparado com o grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12 - Concentração sérica de testosterona (ng/dL; $x \pm EPM$) para as amostras dos animais nos grupos estudados.

Grupos	Testosterona (ng/dL)
Controle	$63,1 \pm 17,8^a$
Tratados	$143,1 \pm 20,8^b$

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

5.10.4 Estradiol

Os valores séricos do hormônio estradiol entre os grupos estudados apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), sendo que a maior concentração para este hormônio apresentou-se para o grupo tratado (Tabela 13).

Tabela 13 - Concentração sérica de Estradiol (pg/mL; $\bar{x} \pm EPM$) para as amostras dos animais nos grupos estudados.

Grupos	Estradiol (pg/mL)
Controle	$<1,42 \pm 0^a$
Tratados	$2,84 \pm 0,72^b$

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) (Teste t)

5.11 ORIENTAÇÃO SEXUAL

Houve diferença estatística significativa no tempo de permanência nas áreas do macho e da fêmea para os grupos estudados (Tabela 14). Os animais do grupo tratado, submetidos à intoxicação peri-natal pelo herbicida glifosato, demonstraram maior permanência total na área da fêmea em relação aos animais do grupo controle e maior escore de preferência sexual pelas fêmeas. Os animais do grupo controle permaneceram por maior tempo na área I do macho e na área I da fêmea ($p < 0,01$).

Tabela 14 – Preferência Sexual e tempo de permanência (segundos) dos grupos estudados na área do macho e na área da fêmea e escore de preferência sexual (Médias \pm EPM).

Parâmetros	Tempo (segundos)	
	Controle	Tratado
Tempo de Permanência na área I do Macho	201.8 \pm 17.6 ^c	88.0 \pm 28.6 ^d
Tempo de Permanência na área II do Macho	228.8 \pm 29.0	224.0 \pm 30.7
Tempo Total na Área do Macho	430.6 \pm 29.3*	312.0 \pm 55.9*
Tempo de Permanência na área I da Fêmea	215.2 \pm 15.9 ^c	115.4 \pm 25.6 ^d
Tempo de Permanência na área II da Fêmea	287.0 \pm 20.2*	509.2 \pm 119.2*
Tempo Total na Área da Fêmea	502.2 \pm 22.7 ^a	624.6 \pm 110.9 ^b
Escore de Preferência Sexual	71.6 \pm 43.0 ^a	312.6 \pm 160.3 ^b

Dados são Média \pm EPM.; a,b diferem nas linhas $P < 0.05$; c,d $P < 0.01$, * $p = 0.09$; Student-t teste, N = 5 por grupo.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento e descritos anteriormente estão correlacionados à literatura na descrição a seguir.

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste estudo, a idade à puberdade, o peso médio do epidídimo e vesículas seminais, a contagem espermática, a morfometria testicular, as concentrações séricas de LH, testosterona e estradiol e os parâmetros de orientação sexual na prole de fêmeas tratadas com o glifosato são dados consistentes da desregulação endócrina causada pela exposição a este herbicida durante o período peri-natal, apesar de ser considerado como um produto de Classe III, ou seja, medianamente tóxico segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2002). Seu uso ainda é indiscriminado, principalmente no Brasil, tanto em áreas agrícolas como não-agrícolas (HAYES; LAWS, 1991; INOUE et al., 2003; CERDEIRA et al., 2007), apesar das demonstrações científicas da toxicidade do Roundup® e potencial genotoxicidade (RAIPULIS et al., 2009), dos efeitos reprodutivos do glifosato em humanos (SANIN et al., 2009), como desreguladores endócrinos em células humanas (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009) e em ratos Wistar (ROMANO et al., 2008b, 2010), além de efeitos de toxicidade oral aguda (DELLEGRAVE et al., 2002), hepatotoxicidade (ÇAGLAR, KOLANKAYA, 2008) e ambientais (EVANS, SHAW, RYPSTRA, 2010).

Estudos também evidenciam que o uso do sal de glifosato não provocou alterações sobre os alvos investigados, mas quando pesquisadores utilizaram formulações comerciais, vários efeitos tóxicos puderam ser identificados (DELLEGRAVE et al., 2003; BELLES et al., 2006; BENEDETTI et al., 2004; MARC et al., 2002), sugerindo que o produto comercial é mais tóxico do que o sal. Muitos pesticidas presentes no ambiente têm sido apontados como substâncias capazes de afetar o sistema endócrino, incluindo efeitos sobre a reprodução (COLBORN et al., 1993) e o glifosato, em estudos de toxicidade reprodutiva, foi apontado como possível causador de efeitos sobre o sistema reprodutivo (WHO, 1994). Por ser o glifosato um contaminante ambiental, este estudo no período peri-natal sugere que humanos nesta fase também entrem em contato com este herbicida.

Avaliamos os efeitos do herbicida na prole masculina de fêmeas tratadas do 18º dia de gestação até o 5º dia subsequente ao parto (D25), pois como demonstrado por Dallegrave et al. (2007), o mesmo herbicida não induziu toxicidade materna quando administrado em doses orais para fêmeas durante a gestação e lactação, mas produziu efeitos reprodutivos adversos em machos descendentes. Sabe-se que a fase utilizada neste estudo para a administração do herbicida é caracterizada, nos ratos, como o período crítico de organização das ações de hormônios gonadais na diferenciação sexual no cérebro e conseqüente definição do sexo gonadal. Neste período, observamos que ocorreu aumento na produção de testosterona na prole de fêmeas tratadas em comparação com o grupo controle. Em estudo anterior, o mesmo herbicida administrado no período pré-puberal revelou seus efeitos anti-androgênicos (ROMANO et al., 2010).

Todos os resultados encontrados neste estudo revelaram efeitos de desregulação endócrina na prole de mães tratadas com o Glifosato Roundup® Transorb, indicando que a administração oral deste herbicida, durante o período peri-gestacional, provoca relevantes alterações hormonais e, conseqüentemente, no comportamento sexual dos machos.

6.2 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

O desenvolvimento ponderal dos animais foi similar entre os grupos estudados, revelando que o herbicida não comprometeu o desenvolvimento corporal normal dos animais, não foi observado nenhum efeito negativo da manipulação diária ou influência da administração do herbicida no metabolismo geral dos animais. Estes resultados também foram observados em estudos anteriores com o mesmo herbicida, mas com diferentes períodos de administração (ROMANO et al., 2008b; 2010).

6.3 PESO E IDADE À PUBERDADE

Os animais estudados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) para o peso e idade à puberdade, sendo que os animais do grupo tratado atingiram a puberdade em menor tempo quando comparados ao grupo controle. Estudos prévios (ROMANO et al., 2008b)

relatam que o glifosato quando administrado a ratos recém-desmamados leva ao atraso do início da puberdade. Já no experimento realizado por Dallegrave et al. (2007) os autores não encontraram diferenças significativas na idade para separação balanoprepucial da prole de fêmeas tratadas com glifosato durante a gestação e lactação.

O parâmetro utilizado para verificar a puberdade foi a separação balanoprepucial com exteriorização da glândula, pois esta variável é um sinal físico (externo) de desenvolvimento sexual em ratos machos (KORENBROT et al., 1977).

Os animais tratados ainda apresentaram menor peso corporal no dia em que foi detectada a puberdade, provavelmente porque atingiram esta fase mais precocemente quando comparados ao grupo controle.

A exposição neonatal ao herbicida acetochlor provocou alteração na idade à puberdade de fêmeas Wistar nas doses de 7,68 e 15,36 mg/kg de peso corporal. A idade para a abertura vaginal foi significativamente ($p=0,0000$) mais acelerada e o peso corporal foi menor na prole de fêmeas tratadas quando comparadas ao grupo controle. Os autores testaram o efeito do peso corporal no PND 4 (mensurado depois do tratamento) no tempo de maturação como uma covariante independente, não encontrando efeito significativo do peso corporal na média de idade da abertura vaginal. Além disso, um significativo efeito do tratamento foi confirmado. A explicação relatada foi de que a redução no peso corporal, estatisticamente diferente do grupo controle, pode indicar que altas doses de acetochlor atingem a dose máxima de tolerância para fêmeas neonatas de ratos, definida como uma dose que induz 10% de redução no peso corporal quando comparada com o grupo controle (ROLLEROVA et al., 2011).

6.4 PESO MÉDIO DO EPIDÍDIMO E VESÍCULAS SEMINAIS

Após a eutanásia, os testículos e epidídimos foram removidos e pesados, o epidídimo ainda foi dividido em cabeça, corpo e cauda e cada segmento foi pesado separadamente para constatação do efeito do herbicida Roundup Transorb[®] sobre os segmentos. Os animais do grupo tratado apresentaram epidídimos mais pesados ($p<0,05$) em relação ao grupo controle, provavelmente em razão do maior peso apresentado pelo segmento cauda nestes animais.

Porém, para Dallegrave et al. (2007) a administração do mesmo herbicida para fêmeas causou diminuição de espermatozoides na cauda do epidídimo da prole. Não foram encontradas diferenças nos pesos dos epidídimos de animais tratados com diferentes doses de ivermectina (MOURA et al., 2006).

As vesículas seminais também foram estudadas, já que seus fluidos contêm muitos compostos importantes para a manutenção de espermatozoides e principalmente por possuírem tecido glandular andrógeno dependente. Verificamos diferenças significativas ($p < 0,05$) nos pesos das glândulas após a drenagem do líquido seminal entre os grupos estudados. Os animais do grupo tratado apresentaram vesículas seminais maiores do que os animais do grupo controle. Um estudo demonstra que o tratamento realizado em fêmeas com o composto anti-androgênio Fenvalerate, no 18º dia de gestação e do PND 1 ao PND 5 provoca a diminuição da vesícula seminal na prole por comprometer o desenvolvimento desse órgão, já que ele é dependente de andrógenos (MONIZ et al., 1999). O efeito demonstrado pelo uso do glifosato neste estudo sugere que a maior concentração de andrógenos presente na prole de fêmeas tratadas, também interfere no desenvolvimento da glândula, entretanto, apresentando maior desenvolvimento, conseqüentemente, peso maior.

6.5 CONTAGEM ESPERMÁTICA (NÚMERO DE ESPERMÁTIDES POR TESTÍCULO, PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA POR TESTÍCULO, RESERVAS ESPERMÁTICAS E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO) E MORFOMETRIA TESTICULAR

Na contagem espermática, todas as características estudadas apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratado e controle. A prole de mães tratadas com o herbicida Glifosato Roundup Transorb® apresentou maior número de espermátides por testículo ($p < 0,05$) e por grama de testículo ($p < 0,05$), maior produção espermática diária ($p < 0,05$), maior concentração de espermátides no segmento cabeça+corpo ($p < 0,05$) e menor tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo ($p < 0,05$). Esses valores refletem a influência causada pela administração do herbicida, levando ao aumento da espermatogênese nestes animais. Esse aumento pôde ser confirmado pela maior espessura epitelial média ($p < 0,05$), e também pelo menor diâmetro luminal médio ($p < 0,05$) dos túbulos seminíferos encontrado nos animais do grupo tratado em comparação com o grupo controle.

A espermatogênese (processo de produção de gametas masculinos) ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos em associação com as células de Sertoli. O processo de geração do gameta masculino pode ser dividido em quatro fases: desenvolvimento e mitose de espermatogônias indiferenciadas, desenvolvimento de espermatócitos via meiose, espermiogênese (diferenciação de espermátides) e espermição (HEINDEL, TREINEN; 1989). As células germinativas (espermatogônias indiferenciadas) estão dispostas em camadas discretas na lâmina basal. As quatro gerações de células desenvolvem-se simultaneamente e em precisa sincronia. A cada geração desenvolvida, elas movem-se acima do epitélio, continuamente suportado pelas células de Sertoli, até que o espermatozóide completamente formado é lançado no lúmen tubular (espermição) (CREASY, 1997).

As funções das células de Sertoli podem ser resumidas nas seguintes categorias: 1) controle da barreira sanguínea dos testículos; 2) produção do fluido tubular; 3) regulação metabólica da espermatogênese; 4) controle parácrino da espermatogênese; 5) controle parácrino das células de Leydig e função celular peritubular; e 6) controle por *feedback* da secreção de FSH (HEINDEL, TREINEN; 1989). Segundo França et. al. (2000) a quantidade estabilizada de células de Sertoli durante o período pré-púbere determina o tamanho testicular e a produção espermática diária em animais sexualmente maduros. O período neonatal é de extrema importância para o desenvolvimento de espermatogênese normal no adulto e a produção do número normal de células germinativas parece depender do tamanho da população de células de Sertoli no final do período peri-natal. Portanto, a produção espermática apresenta relação direta com os eventos decorridos durante o período crítico de desenvolvimento testicular em ratos e mudanças experimentais durante este período podem alterar a produção espermática (ORTH et. al., 1988).

A prole de mães tratadas com Glifosato durante o período peri-gestacional e nos cinco dias subsequentes ao parto, apresentou aceleração do tempo de trânsito espermático, mais espermátides por testículo e por grama de testículo em decorrência da maior produção espermática diária, que segundo França e Russel (1998) e França et al. (2000) é um dado morfométrico que apresenta relação direta com a duração da espermatogênese e a população de células de Sertoli. Isto indica que o herbicida pode provocar aumento do número destas células e conseqüente aumento na produção de espermatozoides. Dallegrave et al. (2007) em estudo realizado com o mesmo herbicida, constatou diminuição da produção espermática diária na prole de fêmeas tratadas durante os últimos três dias de gestação e nos 21 dias de lactação. Outro trabalho realizado com o uso de pentoxifilina no período neonatal em ratos

Wistar, não foi identificada qualquer alteração no rendimento intrínseco da espermatogênese, o qual é determinado pela produção espermática diária por grama de testículo (MORAES et al., 2009).

Silva et al. (2006) avaliaram os efeitos da administração neonatal de naloxone na população de células de Sertoli e na produção espermática em ratos adultos. Em seus resultados, células de Sertoli por testículo, comprimento total do túbulo seminífero, produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foram significativamente maiores no grupo tratado. Os autores explicam que o tratamento com naloxone durante o período crítico de desenvolvimento testicular foi capaz de alterar a dinâmica proliferativa das células de Sertoli.

A espessura do epitélio germinativo reflete o processo de espermiogênese (NORMAN; LITWACK, 1997; HAFEZ, 2000) e alterações hormonais levam a problemas em sua arquitetura (EDDY et al., 1996; SHARPE et al., 1998; ATANASSOVA et al., 1999; ROBERTSON et al., 1999; ATANASSOVA et al., 2000; GOYAL et al., 2001; GOYAL et al., 2003; ATANASSOVA et al., 2005). Os resultados encontrados nos túbulos seminíferos revelam maior espessura epitelial e menor diâmetro luminal nos animais do grupo tratado, comprovando que estes sofreram interferência na produção de espermatozoides, por alterações hormonais causadas pela administração do glifosato, justificando também os aumentos na produção espermática diária.

Apesar das alterações encontradas na espessura e diâmetro luminal, o diâmetro tubular total não revelou qualquer diferença significativa entre os grupos estudados indicando que as alterações ocorreram somente com aumento do epitélio germinativo, mas o diâmetro total e integridade anatômica mantiveram-se inalterados. Estes resultados, como já era esperado, diferem dos efeitos encontrados por Romano et al. (2010) em animais que receberam as doses de 5, 50 e 250mg/kg de Glifosato Roundup Transorb® durante o período pré-púbere. Os autores demonstraram aumento do diâmetro luminal e diminuição do epitélio germinativo devido ao efeito anti-androgênico deste herbicida. A diferença encontrada no tamanho do epitélio germinativo nos dois estudos se deve, provavelmente, aos diferentes períodos de administração do glifosato.

Neste estudo, as alterações encontradas nos machos caracterizadas pelo aumento da produção espermática diária, menor tempo de trânsito espermático e maior espessura do epitélio germinativo nos animais adultos são resultados que comprovam a interferência do herbicida com o balanço hormonal normal e com componentes importantes para a função

reprodutiva como as células de Sertoli e/ou Leydig no desenvolvimento de animais do sexo masculino.

6.6 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LH, TESTOSTERONA E ESTRADIOL

A prole de fêmeas tratadas com o herbicida Glifosato Roundup Transorb® apresentou concentrações séricas mais elevadas do que a prole de mães do grupo controle para os hormônios LH ($p < 0,05$), testosterona ($p < 0,05$) e estradiol ($p < 0,05$).

Segundo Heindel e Treinen (1989) o sistema reprodutivo dos machos é regulado por uma complexa interação entre o Sistema Nervoso Central, Hipotálamo, Pituitária e Testículos. O controle central do complexo é o hipotálamo, com síntese e liberação em pulsos de GnRH (ou LHRH), o qual atua na pituitária estimulando a liberação pulsátil de Hormônio Luteinizante (LH). Quando os pulsos de LH atingem as células de Leydig no testículo, promovem a liberação pulsátil de testosterona.

LH e FSH (Hormônio Folículo Estimulante) atuam nos testículos para a produção de testosterona (produto endócrino) e espermatozóides (produto exócrino) (HEINDEL; TREINEN, 1989).

Em humanos, apenas 10% do estradiol circulante é proveniente dos testículos, enquanto que em ratos, a maioria do estradiol é proveniente da síntese testicular (AKINGBEMI, 2005). Estes hormônios são produzidos a partir da conversão de androstenediona ou de testosterona pela enzima aromatase. Os esteróides de maior ocorrência com atividade estrogênica são o estradiol, o estriol e a estrona (NORMAN; LITWACK, 1997).

Os receptores de estrógenos são encontrados em núcleos hipotalâmicos e gonadotrofos hipofisários, indicando que os estrógenos podem atuar diretamente sobre o eixo hipotalâmico e influenciar na liberação das gonadotrofinas (FSH e LH). Os receptores de estrógenos também foram encontrados em células de Leydig, em células mióides peritubulares e em células germinativas (SHUGHRUE et al., 1998).

Neste estudo encontramos concentrações séricas mais elevadas de testosterona, LH e estradiol na prole de mães tratadas com o herbicida, o que explica a maior produção espermática diária, o aumento no tempo de trânsito epididimário e a morfometria testicular desses animais.

Jie et al. (2010) encontraram diminuição de testosterona plasmática e da produção espermática diária em ratos machos expostos a 80 e 200 mg/kg de Nonylphenol durante a

gestação. Em seus resultados foi observada correlação positiva entre a diminuição da testosterona e da produção espermática diária. Neste trabalho o aumento da produção de testosterona também influencia o aparecimento das características sexuais secundárias, como a separação balanoprepucial, e a produção espermática.

Em estudo *in vitro* realizado por Pogrmic-Majkic et al. (2010), os efeitos provocados pela Atrazina administrada em ratos durante a peri-puberdade, na dose de 1-50 μ M estimularam o acúmulo de cAMP (Adenosina Monofosfato Cíclica) – associada na regulação de proteínas necessárias à esteroidogênese – e a produção de andrógenos, facilitando a androgênese.

A exposição ao herbicida glifosato durante o período pré-puberal a ratos Wistar machos afetou a produção de testosterona em todos os grupos tratados, com reduções de 30, 45 e 50% nos grupos tratados com 5, 50 e 250 mg/kg, respectivamente (ROMANO et al., 2010). Neste estudo, a administração do mesmo herbicida durante o período peri-gestacional revelou aumento dos níveis séricos de testosterona. Resultados descritos por Akingbemi et al, 2001, utilizando Di(2-Ethylhexyl)Phthalate demonstraram que a administração durante a gestação (do 12° ao 21° dias de gestação) de ratos Long-Evans apresentou diminuição dos níveis séricos de testosterona e de LH em machos com 21 e 35 dias de idade. Em um segundo experimento, a administração do mesmo produto químico para animais dos 21 aos 48 dias de idade revelou significativo aumento na capacidade de produção de testosterona pelas células de Leydig e na concentração sérica de LH. Os autores concluem que os efeitos do Di(2-Ethylhexyl)Phthalate nas células de Leydig e esteroidogênese são influenciados pelo estágio de desenvolvimento dos animais.

6.7 ORIENTAÇÃO SEXUAL

Os dados obtidos do estudo da orientação sexual neste experimento estão de acordo com os dados laboratoriais anteriores, pois a presença de níveis séricos mais elevados de testosterona na prole de mães que receberam tratamento com o herbicida glifosato durante o período peri-gestacional, sugerem alterações na orientação sexual destes animais. Os animais do grupo tratado demonstraram maior permanência total na área da fêmea ($p < 0,05$) e maior escore de preferência sexual pelas fêmeas ($p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle.

Muitos estudos relatam que a testosterona pode influenciar o desenvolvimento comportamental em machos através de receptores cerebrais de andrógenos e estrógenos (ZULOAGA et al., 2008; FRYE et al., 2008; RASKIN et al., 2009). O comportamento sexual

de muitas espécies de roedores é, portanto, regulado principalmente pela ação dos hormônios sexuais no sistema nervoso central (BEACH, 1945; WHALEN, LUTTEGE, 1971).

A administração sistêmica de testosterona provoca alteração comportamental em ratos não castrados, com aumento da atividade exploratória em labirinto (BITRAN et al., 1993).

Segundo Liu et al. (2011), a administração de Fenvalerate durante a puberdade de ratos causa desregulação endócrina para a síntese de testosterona, estradiol e nos receptores de andrógenos no córtex cerebral, e essas alterações podem ser deletérias para o desenvolvimento neurocomportamental. A exposição peri-natal de ratos ao Fenvalerate provocou diminuição dos níveis séricos de testosterona e conseqüente aumento do número de montas para ejaculação e diminuição do número de ejaculações durante um período de quarenta minutos (MONIZ et al., 1999).

Em experimento realizado com a administração de ivermectina nas doses de 0,6 e 1,0 mg/kg em ratos machos observou-se alteração na fase motivacional do comportamento sexual com aumento na latência para primeira monta e para primeira intromissão, sugerindo diminuição da motivação sexual nestes animais (BERNARDI et al., 2010).

Este estudo revela desregulação endócrina com elevação dos níveis séricos de testosterona nos animais tratados, os resultados encontrados para a orientação sexual sugerem que os elevados níveis deste hormônio levaram a maior preferência destes animais pelas fêmeas. A aproximação de um macho a uma fêmea depende de estímulos externos (receptividade sexual da fêmea) e estímulos internos (um ambiente interno regulado, com adequadas quantidades hormonais) (HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, 2008). Portanto, o mesmo autor ressalta que o estímulo olfatório é necessário para a ativação da aproximação sexual de ratos machos, os quais necessitam ainda de uma fisiologia hormonal adequada para responder ao estímulo.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, nas condições experimentais descritas, pode-se concluir que o glifosato-Roundup[®] Monsanto:

- Não interfere na evolução do peso corporal dos animais tratados.
- Causa problemas na progressão da puberdade, evidenciada pela antecipação da separação balanoprepucial.
- Não causa alteração no peso dos testículos.
- Altera o peso total do epidídimo e de seu segmento cauda.
- Altera o peso da vesícula seminal drenada.
- Causa aumento do número de espermátides por testículo e por grama de testículo.
- Aumenta a produção espermática diária por testículo.
- Aumenta a velocidade de trânsito espermático e as reservas espermáticas no segmento cabeça+corpo do epidídimo.
- Causa alterações morfológicas testiculares, aumentando a espessura epitelial e reduzindo o diâmetro luminal.
- Não altera o nível sérico de FSH.
- Aumenta as concentrações séricas de LH, testosterona e estradiol.
- Interfere na orientação sexual, levando à maior preferência pelas fêmeas.
- Finalmente, com base no efeito sobre a testosterona, LH e estradiol séricos pode-se considerar que o produto é um desregulador endócrino no “período crítico” da diferenciação sexual hipotalâmica *in vivo*.

Anexo A – Diluição do Roundup®

Solução Mãe:

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

Solução para dosagem de 50mg/kg :

- a. Diluir 5mL da solução mãe na diluição 1 em 45mL de água miliQ
- b. Obter a solução final de $500\text{mg}/50\text{mL}$
- c. Concentração final da solução = 10mg/mL

Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO/G

Ofício nº 035/2011 - CEUA/UNICENTRO/G

Guarapuava, 09 de agosto de 2011

Senhor Professor,

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: "OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL EM MATRIZES WISTAR AO HERBICIDA GLIFOSATO, PERFIL HORMONAL, HISTOMETRIA TESTICULAR E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE RATOS MACHOS PRODUTOS DESTAS FÊMEAS", parecer 001/2011 foi analisado e considerado **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária no dia 03 de junho de 2011.

2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:

– Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados ao CEUA assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa.

– Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.

– **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

Pesquisador: Marco Aurelio Romano

Atenciosamente,


Prof. Rosilene Rebeca
Coordenadora do CEUA/UNICENTRO
Port. 1.983/2011 - GR/UNICENTRO

Ao Senhor
Prof. Marco Aurelio Romano
Departamento de Farmácia- DEFAR
UNICENTRO

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Pres. Zacarias 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR
Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8110 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR
Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR

REFERÊNCIAS

ABREU-JR, C.H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A.F. Relationship between acidity and chemical properties of Brazilian soils. *Science Agricultural*, v. 60, p. 337-343, 2003.

ÂGAMO, A. Copulation-contingent aversive conditioning and sexual incentive motivation in male rats: evidence for a two-stage process of sexual behavior. *Physiology & Behavior*, v.77, p.425-435, 2002.

ÂGAMO, A. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.*, v. 117, p. 3-14, 2003.

ÂGAMO, A.; TURI, A.L.; ELLINGSEN, E.; KASPERSEN, H. Preclinical models of sexual desire: conceptual and behavioral analyses. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 78, p. 379-404, 2004.

AKINGBEMI, B.T.; GE, R.; HARDY, M.P. Leydig cells. In: Knobil, E.; McNEIL J.D. (eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, p. 1021-1033; 1999.

AKINGBEMI, B.T.; GE, R.; KLINEFELTER, G.R.; ZIRKIN, B.R.; HARDY, M.P.; Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, n.3, p.775-780, 2004.

AKINGBEMI, B.T.; YOUKER, R.T.; SOTTAS, C.M.; GE, R.; KATZ, E.; KLINEFELTER, G.R.; ZIRKIN, B.R.; HARDY, M.P. Modulation of rat leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1252-1259, 2001.

ARTEAGA-SILVA, M.; MÁRQUEZ-VILLANUEVA, Y.; MARTÍNEZ-GARCIA, R.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BONILLA-JAIME, H.; RETANA-MÁRQUEZ, S. Effects of hormonal replacement with androgens and estrogens on male sexual behavior and plasma levels of these steroids in gonadectomized golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Physiology & Behavior*, v.85, p. 571-580, 2005.

ATANASSOVA, N.; MCKINNEL, C.; TURNER, K.J.; WALKER, M.; FISHER, J.S.; MORLEY, M.; MILLAR, M.R.; GROOME, N.P.; SHARPE, R.M. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on

spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*, v. 141, n. 10, p. 3898-3907, 2000.

ATANASSOVA, N.; MCKINNEL, C.; WALKER, M.; TURNER, K. J.; FISHER, J. S.; MORLEY, M.; MILLAR, M. R., GROOME, N. P.; SHARPE, R. M. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology*, v. 140, n. 11, p. 5364-5373, 1999.

ATANASSOVA, N. N.; WALKER, M.; MCKINNEL, C.; FISHER, J. S.; SHARPE, R. M. Evidence that androgens and oestrogens, as well follicle stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *Journal of Endocrinology*, v. 184, p. 107-117, 2005.

BABICHEV, V.N.; SHISHKINA, I.V. & PERYSHKOVA, T.A. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomed Science*, v. 2, p. 189-92, 1990.

BEACH, F.A. Bisexual mating behavior in the male rat: effects of castration and hormone administration. *Physiol. Zool.*, v. 18, p.390-402, 1945.

BELLES, D.; SHANER, D.; WESTRA, P.; BRUNK, G. Comparison of efficacy absorption and translocation of three glyphosate formulations on velvetleaf. *Pesticide Management Science*, v. 62, p. 1177-1181, 2006.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.*, v.22, p. 97-105, 2009.

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

BENAMÚ, M.A.; SCHNEIDER, M.I.; SÁNCHEZ, N.E. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. *Chemosphere*, v.78, p.871-876, 2010.

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

BERGADÁ, C. Função Endócrina do Testículo. Em: CINGOLANI, H.E. & HOUSSAY, A.B. eds. *Fisiologia Humana de Houssay*. Artmed: Porto Alegre, 7ªed., v. 54, p. 695-704, 2004.

BERNARDI, M.M.; KIRSTEN, T.B.; SPINOSA, H.S.; MANZANO, H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naive, but not sexually experienced male rats. (in press). *Research in Veterinary Science*, 2010.

BIALEK, M.; ZAREMBA, P.; BOROWICZ, K.K. & CZUCZWAR, S.J. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Polish. Journal of Pharmacology*, v. 56, p. 509-18; 2004.

BITRAN D.; KELLOG C.K.; HILVERS R.J. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABAA receptors in the rat. *Horm. Behavior*, v. 27, p. 568-583, 1993.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. *Crêterios para a classificaçãotoxicolôgica*. Manual de procedimentos para análise toxicolôgica de produtos agrotóxicos, seus componentes e afins. Brasília: ANVISA, 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/manual> >.

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

BREIGEIRON, M.K. Efeitos da hipertensão renovascular sobre a função reprodutiva de ratos machos *Wistar*. 2005. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

ÇAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sib-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 25, p. 57-62, 2008.

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

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

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

COLBERT, N.K.W.; PELLETIER, N.C.; COTE, J.M.; CONCANNON, J.B.; JURDAK, N.A.; MINOTT, S.B.; MARKOWSKI, V.P. Perinatal exposure to low levels of the environmental antiandrogen Vinclozolin alters sex-differentiated social play and sexual behaviors in the rat. *Environmental Health Perspectives*, v.113, n.6, p.700-707, 2005.

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

COLBORN, T.; VOM SAAL, F.S.; SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, v. 101, p. 387-384, 1993.

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

CREASY, D.M. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicologic Pathology*, v.25, n.2, p.119-131, 1997.

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

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

DAHLGREN, I. L.; MATUCSZCZYK, J. V.; HARD, E. Sexual orientation in male pregnant rats prenatally exposed to ethanol. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 13, p. 267-269, 1991.

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

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; DALSENTER, P.R.; LANGELOH, A. Oral acute toxicity of glyphosate in Wistar rats. *Journal of Veterinary Research*, v. 1, p. 29-34, 2002.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; OLIVEIRA, R.T.; ANDRADE, A.J.M.; DALSENTER, P.R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch. Toxicology*, v. 81, p. 665-673, 2007.

DOMÍNGUEZ-SALAZAR, E.; PORTILLO, W.; BAUM, M.J.; BAKKER, J.; PAREDES, R.G. Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiology & Behavior*, v.75, p.337-346, 2002.

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

EDINGER, K.L.; FRYE, C.A. Sexual experience of male rats influences anxiety-like behavior and androgen levels. *Physiology & Behavior*, v.92, p.443-453, 2007.

ELIASSON, M. & MEYERSON, B. Development of sociosexual approach behavior in male laboratory rats. *J. Comp. Psychol.*, v. 95, p. 160-165, 1981.

ERSKINE, M.S. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Horm. Behav.*, v. 23, p. 473–502, 1989.

ETCGROUP. *Down on the farm: The impact of nano-scale technologies on food and agriculture*. Ottawa: ETCGroup, 2004, 68p. Disponível em: <<http://www.etcgroup.org>>. Acesso em: 14 Jan 2011.

EVANS, S.C.; SHAW, E.M.; RYPSTRA, A.L. Exposure to a glyphosate-based herbicide affects agrobiont predatory arthropod behavior and long-term survival. *Ecotoxicology*, v. 19, p. 1246-1257, 2010.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Eds.). *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications, p. 198-219, 1998.

FRANÇA, R.L.; SILVA Jr., V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol. Reprod.*, v. 63, p. 1629-1636, 2000.

FRYE, C.A.; KOONCE, C.J.; EDINGER, K.L.; OSBORNE, D.M.; WALF, A.A. Androgens with activity at estrogen receptor beta have anxiolytic and cognitive-enhancing effects in male rats and mice. *Horm. Behav.*, v. 54, p. 726-734, 2008.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.; SÉRALINI, G. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, v.262, p.184-191, 2009.

GEORGE, F.W.; PETERSON, K.G. 5α -Dihydrotestosterone formation is necessary for embryogenesis of the rat prostate. *Endocrinology*, v. 122, p. 1159-1164; 1988.

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

GIACOMITTI, P. Efeitos do herbicida “Tordon 2,4-D 64/240 Trietanolamina BR” em filhotes de mães contaminadas durante a gestação e lactação. 1995. Dissertação. (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GIULIANO, F. & RAMPIN, O. Neural control of erection. *Physiology & Behavior*, v. 83, p. 189-201; 2004.

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

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

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

GRADY, K.L.; PHOENIX, C.H.; YOUNG, W.C. Role of the developing rats testis in differentiation of the neural tissues mediating mating behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol*, v. 59, p. 176-182; 1965.

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

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

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

HARDING, S.M. & MCGINNIS, M.Y. Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference and vocalizations in male rats. *Hormones and Behavior*, v. 43, p. 327-35, 2003.

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

HEINDEL, J.J.; TREINEN, K.A. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicologic Pathology*, v.17, n.2, p.411-445, 1989.

HERNÁNDEZ-GONZÁLES, M.; GUEVARA, M.A.; ÁGAMO, A. Motivational influences on the degree and direction of sexual attraction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1129, p.61-87, 2008.

HETTA, J. & MEYERSON, B.J. Sexual motivation in the male rat. A methodological study of sex-specific orientation and the effects of gonadal hormones. *Acta Physiologica Scandinavica Suppl.*, v.453, p. 1-68, 1978.

HINEY, J.K.; SOWER, S.A.; YU, W.H.; McCANN, S.M. & DEES, W.L.; Gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III, mammalian luteinizing hormone-releasing hormone, or both peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 4, p. 2386-91; 2002.

HOWE, C.M.; BERRILL, M.; PAULI, B.D.; HELBING, C.C.; WERRY, K.; VELDHOFEN, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 1928-1938, 2004.

HULL, E.M.; WOOD, R.I.; McKENNA, Neurobiology of Male Sexual Behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (eds.) *Physiology of Reproduction*. Elsevier, p. 1759-60, 2006.

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

JACOBSEN, P.R.; CHRISTIANSEN, S.; BOBERG, J.; NELLEMAN, C.; HASS, U. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *International Journal of Andrology*, v.33, p. 434-442, 2010.

JIE, X.; YANG, W.; JIE, Y.; HASHIM, J.H.; LIU, X.; FAN, Q.; YAN, L. Toxic effect of gestacional exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth Defects Research (Part B)*, v.89, p.418-428, 2010.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. Research needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U. S. EPA-sponsored Workshop. *Environmental Health Perspectives*, v. 104, supplement 4, 1996.

KELLY, D. & JESSEL, T. Sexo e o cérebro. Em: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M. (Eds.). *Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*, Pretence-Hall do Brasil Ltda: Rio de Janeiro, p. 463-473, 1997.

KELLY, D.D. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M., eds. *Principles of Neural Science*. New York: Elsevier, p. 959-73, 1991.

KLINENFELTER, G.R. & HESS, R.A. Toxicology of the male excurrent ducts and accessory sex glands. In: KORACH, K.S., ed.; *Reproductive and Developmental Toxicology*, Marcel Dekker: New York, v. 23, p. 553-91, 1998.

KORENBROT C. C.; HUHTANIEMI I. T.; WEINER R. I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the rat. *Biol. Reprod.*, v. 17, p. 298-303, 1977.

LAZARINI, C.A.; LIMA, R.Y.; GUEDES, A.P.; BERNARDI, M.M. Prenatal exposure to dichlorvos: physical and behavioral effects on rat offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, v.26, p.607-614, 2004.

LEE, H.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. Effects of perinatal exposure to phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. *Journal of Reproduction and Development*, v.52, n.3, 2006.

LIBERTUN, C. Caracteres sexuais: regulação neuroendócrina da reprodução. Em: CINGOLANI, H.E. & HOUSSAY, A.B., eds. *Fisiologia Humana de Houssay*. Porto Alegre: ArtMed; p. 677-694; 2004.

LITTLETON-KEARNEY, M. & HURN, P.D. Testosterone as a modulator of vascular behavior. *Biological Research for Nursing*, v. 5, n. 4, p. 276-85, 2004.

LIU, P.; MENG, X.; WANG, H.; JI, Y.; ZHAO, M.; ZHAO, X.; XU, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; XU, D. Effects of pubertal Fenvalerate exposure on testosterone and estradiol synthesis and the expression of androgen and estrogen receptors in the developing brain. *Toxicology Letters*, v. 201, p. 181-189, 2011.

LONSTEIN, J.S.; QUADROS, P.S.; WAGNER, C.K. Effects of neonatal RU486 on adult sexual, parental, and fearful behaviors in rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 115, n.1, p. 58-70, 2001.

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

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

MEISEL, R.; SACHS, B.D. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBIL, E.; McNEILL, J.D. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, p. 3-106, 1994.

McCORMICK, C.M.; FUREY, B.F.; CHILD, M.; SAWYER, M.J. & DONOHUE, S.M. Neonatal sex hormones have “organizational” effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Brain Research-Developmental Brain Research*, v. 105, n. 2, p. 295-305, 1998.

McGINNIS, M.Y. & DREIFUSS, R.M. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology*, v. 24, n. 2, p. 618-26, 1989.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, v. 81, p. 781-787, 2010.

MONIZ, A.C.; CRUZ-CASALLAS, P.E.; OLIVEIRA, C.A.; LUCISANO, A.; FLORIO, J.C.; NICOLAU, A.A.; SPINOSA, H.S.; BERNARDI, M.M. Perinatal Fenvalerate exposure: behavioral and endocrinology changes in male rats. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 21, n. 5, p. 611-618, 1999.

MORAES, T.A.P.; JASSET, P.F.; TORRES, S.M.; MORAES, A.V.; SILVA JUNIOR, V.A.; GERRA, M.M.P. Efeito do uso de pentoxifilina no período neonatal sobre a produção espermiática em ratos Wistar adultos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 1, p. 80-87, 2009.

MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P.; SILVA JÚNIOR, V.A.; SILVA, C.G.C.; CAJU, F.M.; ALVES, L.C. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, p. 799-808, 2006.

NAFTOLIN, F. Understanding the bases of sex differences. *Science*, v. 211, p. 1263-1264, 1981.

NGUON, K.; BAXTER, M.G.; SAJDEL-SULKOWSKA, E.M. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls differentially affects cerebellar development and motor functions in male and female rat neonates. *The Cerebellum*, v. 4, p. 112-122, 2005.

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

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

ORIKASA, C., Y. KONDO, S. HAYASHI, *et al.*. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor β in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 3306–3311, 2002.

ORIKASA, C., Y. KONDO & Y. SAKUMA. Transient transcription of the somatostatin gene at the time of estrogen-dependent organization of the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area. *Endocrinology*, v. 148, p. 1144–1149, 2007.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v. 122, p. 787-794, 1988.

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

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

PFAFF, D.W.; ZIGMOND, R.E. Neonatal androgen effects on sexual and non-sexual behavior of adult rats tested under various hormone regimes. *Neuroendocrinology*, v. 7, p. 129-145, 1971.

PIENIAZEK, D.; BUKOWSKA, B.; DUDA, W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 79, p. 58-63, 2004.

PILGRIM, C. & REISERT, I. Differences between male and female brains – developmental mechanisms and implications. *Hormones and metabolism research.*, v. 24, p. 353-359, 1992.

POGRMIC-MAJKIC, K.; FA, S.; DAKIC, V.; KAISAREVIC, S.; KOVACEVIC, R. Upregulation of peripubertal rat leydig cell steroidogenesis following 24 h *in vitro* and *in vivo* exposure to atrazine. *Toxicological Sciences*, p. 52-60, 2010.

RAIPULIS, J.; TOMA, M.M.; BALODE, M. Toxicity and genotoxicity testing Roundup. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, section B, v. 63, p. 29-32, 2009.

RASKIN, K.; GENDT, K.; DUITTOZ, A.; LIERE, P.; VERHOEVEN, G.; TRONCHE, F.; MHAOUTY-KODJA, S. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J. Neurosci.*, v. 29, p. 4461-4470, 2009.

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

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P. & KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction Fertil.*, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978.

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

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

ROHLF, F.J. *tpsDig*. Versão 2.10. Suny at Stony Brook: Ecology and Evolution, 2006. Disponível em: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2011.

ROLLEROVA, E.; WSOLOVA, L.; URBANCIKOVA, M. Neonatal exposure to herbicide acetochlor alters pubertal development in female wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, p.1-12, 2011.

ROMANO, MA ; ROMANO, R. M. ; OLIVEIRA, C. A. . Alterações morfométricas dos túbulos seminíferos em ratos expostos ao herbicida glifosato-Roundup.. In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007, Búzios. *Revista Brasileira de Toxicologia*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, v. 20, p. 69-69, 2007a.

ROMANO, MA ; ROMANO, R. M. ; KHALIL, N. M. ; OLIVEIRA, C. A. . Efeito da exposição pré-púbere ao herbicida glifosato-Roundup sobre a função renal. In: *Anais*, XIX Seminário de Pesquisa, 2008, Guarapuava - PR. XIX Seminario de Pesquisa / XIV Semana de Iniciação Científica. Guarapuava, PR : Editora Unicentro, v. 1, p. 1-3, 2008a.

ROMANO, R. M.; ROMANO, MA ; MOURA, M. O. ; OLIVEIRA, C. A. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, p. 481-487, 2008b.

ROMANO, R. M. ; ROMANO, M.A. ; OLIVEIRA, C. A. . Glifosato e outros praguicidas como disruptores endócrinos químicos. *Ambiência*, v. 5, n. 2, p. 359-372, 2009.

ROMANO, R. M. ; ROMANO, MA ; BERNARDI, M. M. ; FURTADO, P.V.; OLIVEIRA, C. A. . Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Reproductive Toxicology*, v. 84, p. 309-317, 2010.

ROMANO, R. M. ; ROMANO, MA ; PINTO, S. F. ; OLIVEIRA, C. A. . A exposição pré-púbere em ratos machos ao herbicida glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade. In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007, Buzios. *Revista Brasileira de Toxicologia*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, v. 20, p. 54-54, 2007b.

ROMANO, R. M. ; ROMANO, MA ; OLIVEIRA, C. A. . Alterações macroscópicas em órgãos esteroideogênicos (testículos e adrenais) em ratos expostos cronicamente ao herbicida glifosato-Roundup.. In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007, Búzios. *Revista Brasileira de Toxicologia*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, v. 20, p. 55-55, 2007c.

ROSENBERG, B.G.; CHEN, H.; FOLMER, J.; LIU, J.; PAPADOPOULOS, V.; ZIRKIN, B.R. Gestacional exposure to Atrazine: effects on the postnatal development of male offspring. *Journal of Andrology*, v. 29, n. 3, p. 304-311, 2008.

RYAN, B.C.; HOTCHKISS, A.K.; CROFTON, K.M.; GRAY, L.E. In utero and lactational exposure to Bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic

behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicological Sciences*, v. 114, n. 1, p. 133-148, 2010.

SAKUMA, Y.; Neural substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1129, p. 55-60, 2008.

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

SANIN, L. H.; CARRASQUILLA, G.; SOLOMON, K.R.; COLE, D.C.; MARSHALL, E.J.P. Regional differences in time to pregnancy among fertile women from five Colombian regions with different uses of glyphosate. *J. Toxicology Environmental Health*, v. 72, p. 949-960, 2009.

SCHETTLER, T.; SOLOMON, G.; VALENTI, M. HUDDLE, A. *Generations at Risk. Reproductive Health and the Environment*. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, 1999. 430 p.

SCOTT, F. G. *Developmental Biology*. 6.ed. Editora Sinauer, 2005. Disponível em:< www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2011.

SEALE, J.V.; WOOD, S.A.; ATKINSON, H.C.; LIGHTMAN, S.L.; HARBUZ, M.S. Organizational role for testosterone and estrogen on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the male rat. *Endocrinology*, v. 146, n.4, p.1973-1982, 2005.

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

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

SILVA JUNIOR, V.A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F., DE PAULA, T.A.R.; PALMA, M.B.; AMORIM, M.J.A.A.; AMORIM JUNIOR, A.A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 46, p. 157-166, 2006.

SILVA, M.D.; PERALBA, M.C.R.; MATTOS, M.L.T. Determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais no Arroio Passo do Pilão. *Pesticidas: R Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 19-28, 2003.

SIMERLY, R.B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M. & SWANSON, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor m-RNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.*, v. 294, n. 1, p. 76-95, 1990.

SLOB, A.K.; OOMS M.P.; VREEBERG, J.M.T. Prenatal and early postnatal sex differences in plasma and gonadal testosterone and plasma luteinizing hormone in female and male rats. *J. Endocrinol.*, v. 87, p. 81-87, 1980.

SMITH, S.S.; OJEDA, S.R. Maternal modulation of infantile ovarian development and available ovarian luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) receptors via milk GnRH. *Endocrinology*, v. 115, p. 1973-1983, 1984.

STERN, S.; COX, C.; PRESTON, R.; SHARMA, A.; INGLIS, G.B.; BALYS, M.; WEISS, B. Perinatal methanol exposure in the rat: behavioral effects in neonates and adults. *Fundamental and Applied Toxicology*, v.36, p. 163-176, 1997.

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

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

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

WALLER, D.P.; KILLINGER, J.M.; ZANEVELD, L.J.D. Physiology and toxicology of male reproductive tract. *Endocrine toxicology*. Raven, New York, p. 269-333, 1995.

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

WHALEN R.E.; LUTTEGE W.G. Testosterone, androstenedione and dihydrotestosterone effects on mating behavior of male rats. *Horm. Behavior*, v. 2, p. 117-125, 1971.

WHO – World Health Organization. *Glyphosate Environmental Health Criteria.*, v. 159, p. 1-177, 1994.

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

WOOD, R. I. & NEWMAN, S.W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamster. In: MICEVYCH, P.E. & HAMMER, R.P.J. eds., *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones*, Cambridge. Cambridge Univ. Press, p. 3-39, 1995.

WOOD, R.; Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Hormones and Behavior*, v. 32, p. 40-45, 1997.

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

ZENICK, H.; CLEGG, E.D.; PERREAULT, S.D.; KLINEFELTER, G.R.; GRAY, L.E. Assessment of male reproductive toxicity – A risk assessment approach, In: HAYES, W., ed., *Principles and Methods of Toxicology*, Raven Press: New York, third edition, v. 27, p. 937-88, 1994.

ZULOAGA, D.G.; MORRIS, J.A.; ORDAN, C.L.; BREEDLOVE, S.M. Mice with the testicular feminization mutation demonstrate a role for androgen receptors in the regulation of anxiety-related behaviors and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Horm. Behav.*, v. 54. p. 758-766, 2008.