

MARCIA SARPA DE CAMPOS MELLO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO
PESTICIDA TRIFENIL HIDRÓXIDO DE ESTANHO
(TPTH) EM CAMUNDONGOS

PPGVS / INCQS
FIOCRUZ
2007

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO PESTICIDA TRIFENIL HIDRÓXIDO DE ESTANHO (TPTH) EM CAMUNDONGOS

MARCIA SARPA DE CAMPOS MELLO

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadores: Dr^a Isabella Fernandes Delgado e
Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Rio de Janeiro
2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO PESTICIDA TRIFENIL HIDRÓXIDO DE ESTANHO (TPTH) EM CAMUNDONGOS

MARCIA SARPA DE CAMPOS MELLO

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovada em 30 de Julho de 2007 pela banca examinadora:

Prof. Dr. Luís Felipe Ribeiro Pinto (UERJ)

Prof. Dr. Thomas Manfred Krauss (INCQS)

Prof. Dr^a. Isabella Fernandes Delgado (INCQS)

Orientadores: Dr^a Isabella Fernandes Delgado e Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Rio de Janeiro
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Sarpa, Marcia

Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos/ Marcia Sarpa de Campos Mello - 2007
xxiii, p. 131.

Orientadores: Dr^a. Isabella Fernandes Delgado e Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Julho de 2007

1.TPTH 2.Toxicidade peri e pós-natal 3.Puberdade 4.Fertilidade

**“Aquele que vê as coisas crescerem desde o princípio terá delas a
melhor visão”.**
- Aristóteles, 384-322 a.C.

A meus queridos pais, **Salvatore e Lia**, e ao meu marido, **Luís** que, em troca de todas as minhas ausências, me ofereceram paz, força e amor.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por essa vida maravilhosa.

A **meus pais**, pelo amor e carinho, exemplo de honestidade, humanidade, trabalho e força de vontade. Amo vocês!

Ao **meu querido marido Luis**, pela tranquilidade para lidar com o meu estresse e que nos dias mais cansativos de experimento me dava força e paz para seguir em frente. Obrigada pela compreensão nos momentos em que precisei me isolar para analisar os dados e escrever a tese.

Aos meus amados sobrinhos, **Gabi e Vitor**, e ao meu gatinho **Nit** pelo carinho que me recebia diariamente quando eu voltava para casa.

A **Isabella Fernandes Delgado**, que contribuiu como exemplo para a minha formação científica e acadêmica. Obrigada por todas as oportunidades, pela confiança e pela amizade.

Ao **Prof. Francisco Paumgarten** pela orientação, estímulo, confiança e pelos ensinamentos indispensáveis na minha formação científica.

A querida e grande amiga **Karen Friedrich** que esteve presente em todas as etapas da minha vida acadêmica e pessoal, me dando conselhos e estendendo as mãos todas as vezes que precisei chorar. Obrigado pela amizade, paciência e por ajudar na revisão final da tese.

A **Camila**, meu “braço direito (e esquerdo)” durante os experimentos e nos momentos difíceis que passei. Obrigada pelo companheirismo, por dividir as tarefas e pela grande amizade.

A querida **Rose** que esteve presente durante todo o período da minha vida acadêmica no Laboratório de Toxicologia Ambiental e que se tornou uma grande amiga.

A minha querida amiga **Isabel**, pelo carinho e atenção dispensados mesmo estando do outro lado do oceano.

A **Tânia Fróes**, psicóloga e amiga, por me ajudar a caminhar durante esse período de turbulências e incertezas.

Ao **Paulo Dalsenter** e **Samanta Araújo** do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade Federal do Paraná, pela atenção e pelos grandes ensinamentos recebidos no período que estive em Curitiba.

A **Wilma Kempinas** da UNESP de Botucatu por me receber em seu laboratório, pela atenção e tempo dispensados ao meu aprendizado sobre espermatogênese. Obrigada, também, a todos os alunos da sua equipe que estavam sempre dispostos a ajudar e tirar dúvidas e, principalmente, a **Ana Paula Favareto**, que continuou me ajudando via Internet.

Ao **Marco Antônio, Gina, Aline, Cristina Queiroz, Sonia Dória, Marília** (*in memoriam*), **Ubiracir, Luciane Medeiros, Lú Lobianco, Márcia Pietroluongo**, enfim, a todos da maravilhosa Turma de Mestrado e Doutorado / 2003 do INCQS. Vocês tornaram cada dia de aula mais suave e alegre. Nossos trabalhos em grupo e churrascos serão inesquecíveis.

Ao **Rodrigo Netto Costa** por fazer as análises da testosterona, pelas palavras que sempre me confortam e pela grande amizade.

A **Ana Cecília, Maria Regina, Sérgio Kuriama, Manuel, Hellen, Renan, Igor, Renato, Jéferson, Mara, Antônio Augusto, Tiago, Flávio, Elaine, Kátia, Bárbara, Elza, Vanilda, Flavia**, enfim, a todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Toxicologia Ambiental e que direta ou indiretamente me apoiaram e incentivaram no decorrer dessa tese.

A **Tininha** e **Andréia** pela grande ajuda na preparação da apresentação final da tese.

A **Maria Helena Simões Villas Bôas** coordenadora da pós-graduação e a todos da secretaria acadêmica.

A **Fiocruz e a CAPES** pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	xv
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Gráficos e Quadros	xxi
Resumo	xxii
Abstract	xxiii
I. Introdução	01
I.1 Avaliação da toxicidade reprodutiva de xenobióticos	02
I.2 Estanho	06
I.3 Compostos organoestanhosos	06
I.4 Compostos Trifenílicos de Estanho	11
I.4.1 Identidade e propriedades físico-químicas	11
I.4.2 Transformação, distribuição e transporte no ambiente	12
I.4.3 Métodos Analíticos	12
I.4.4 Fontes de exposição humana e ambiental	13
I.4.5 Toxicidade aguda e sub-crônica	14
I.2.6 Toxicidade crônica e carcinogenicidade	15
I.2.7 Genotoxicidade	16
I.2.8 Imunotoxicidade	16
I.2.9 Neurotoxicidade	17
I.2.10 Toxicidade Reprodutiva	17
I.5 Relevância do Estudo	21
II. Objetivos	23
III. Metodologia	25

III.1 Experimento 1	25
III.1.1 Animais	26
III.1.2 Acasalamento	27
III.1.3 Doses e Tratamento	27
III.1.4 Acompanhamento pré- e peri-natal	28
III.1.5 Acompanhamento pós-natal	28
III.1.6 Teste de Fertilidade	29
III.1.7 Fêmeas na idade adulta	29
III.1.8 Machos na idade adulta	30
III.1.8.1 Número de espermatozóides e espermátides	30
III.1.8.2 Morfologia espermática	31
III.1.9 Análise Estatística	33
III.2 Experimento 2	33
III.2.1 Animais	33
III.2.2 Doses e Tratamento	35
III.2.3 Toxicidade geral	36
III.2.4 Acompanhamento pós-natal	36
III.2.5 Fim do tratamento (45 PN)	36
III.2.5.1 Peso corporal e dos órgãos reprodutivos, fígado, baço e timo das fêmeas	37
III.2.5.2 Peso corporal e dos órgãos reprodutivos, fígado, baço e timo dos machos	37
III.2.5.3 Número de espermátides e espermatozóides	37
III.2.5.4 Morfologia espermática	38
III.2.5.5 Histologia Testicular	42
III.2.5.6 Quantificação da testosterona	46
III.2.6 Teste da Fertilidade	46
III.2.7 Cesariana	47
III.2.8 Machos que participaram do teste de fertilidade	48
III.2.9 Análise estatística	48

IV. Resultados	52
V.1 Experimento 1	50
IV.1.1 Efeitos sobre o organismo materno	50
IV.1.2 Efeitos sobre os órgãos maternos	50
IV.1.3 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre o nascimento e desenvolvimento pós-natal	50
IV.1.4 Efeitos da exposição ao TPTH sobre o ganho de peso médio dos filhotes	51
IV.1.5 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre o aparecimento dos marcos do desenvolvimento pós-natal	58
IV.1.6 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre fertilidade	60
IV.1.7 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre os órgãos dos filhotes na idade adulta	62
IV.1.8 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre os parâmetros reprodutivos masculinos dos filhotes na idade adulta	62
IV.2 Experimento 2	66
IV.2.1 Toxicidade geral e mortalidade	66
IV.2.2 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre o ganho de peso corporal	66
IV.2.3 Efeitos da exposição ao TPTH sobre o aparecimento dos marcos do desenvolvimento pós-natal	67
IV.2.4 Avaliação do ciclo estral	67
IV.2.5 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre fígado, baço e timo de fêmeas e machos mortos após o tratamento	73
IV.2.6 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas mortos após o tratamento	73

IV.2.7 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre os parâmetros reprodutivos de machos mortos após o tratamento	77
IV.2.8 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre a fertilidade de machos e fêmeas	81
IV.2.9 Efeitos da exposição durante ao TPTH a pré-puberdade e a puberdade sobre fígado, baço e timo de machos e fêmeas que participaram do teste de fertilidade	83
IV.2.10 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas que participaram do teste de fertilidade	83
IV.2.11 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre os parâmetros reprodutivos de machos que participaram do teste de fertilidade	87
V. Discussão	90
V.1 Experimento 1	97
V.1.1 Toxicidade materna e efeitos pré e peri-natais	97
V.1.2 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre o aparecimento dos marcos do desenvolvimento pós-natal	98
V.1.3 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre fertilidade	99
V.1.4 Efeitos da exposição <i>in utero</i> e durante a lactação ao TPTH sobre os órgãos e sobre os parâmetros reprodutivos dos filhotes na idade adulta	99
V.2 Experimento 2	101

V.2.1 Toxicidade geral e correlação entre o ganho de peso corporal e os marcos físicos do desenvolvimento	101
V.2.2 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre os órgãos de fêmeas e machos mortos no dia 46 pós-natal	104
V.2.3 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre os parâmetros reprodutivos de machos mortos após o tratamento	106
V.2.4 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre a fertilidade de machos e fêmeas	110
V.2.5 Efeitos da exposição durante ao TPTH a pré-puberdade e a puberdade sobre os órgãos e parâmetros reprodutivos dos animais submetidos ao teste de fertilidade	111
VI. Conclusões	112
VI.1 Experimento 1	112
VI.2 Experimento 2	112
VII. Bibliografia	114

LISTA DE ABREVIATURAS

ad libitum – a vontade

ANOVA – Análise de variância (estatística)

AO – abertura de olhos

AP – aparecimento de pêlos

apud – do latim “junto a”, fonte de uma citação direta

AV – abertura do canal vaginal

b. wt. – *body weight* (peso corporal)

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

DBTCI – di-*n*-butil dicloreto de estanho

DBTs – dibutil de estanho

DO – descolamento de orelhas

DT – descida dos testículos

EI – erupção dos incisivos

e.g. – por exemplo (*exempli gratia*)

EEC – Comunidade Econômica Européia

FDA – Agência de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

i.e. - isto é (“*id est*”)

ICH – Conferência Internacional de Harmonização

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IDT – Ingestão Diária Tolerável

Igs – Imunoglobulinas

IPCS – Programa Internacional de Segurança de Químicos

JMPR – Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues

NOAEL – No Observed Adverse Effect Level

OECD – Organização para Cooperação Econômica e sobre o Desenvolvimento

per se – por si só

PN – pós-natal

TBT – Compostos Tributil de Estanho

TBTA – Tri-*n*-butil Acetato de Estanho

TBTCl – Tri-*n*-butil Cloreto de Estanho

TBTO – Tributil Óxido de Estanho

TPT – Compostos Trifenil de Estanho

TPTA – Trifenil Acetato de Estanho

TPTCl – Trifenil Cloreto de Estanho

TPTH – Trifenil Hidróxido de Estanho

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

WHO – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O ciclo reprodutivo.

Figura 2 – Vias de entrada dos compostos organoestanhos no ambiente.

Figura 3 – Estrutura química geral de compostos trifenil de estanho.

Figura 4 – Desenho esquemático do experimento 1

Figura 5 – Estágios do ciclo espermatogênico de camundongos

Figura 6 – Desenho do experimento 2

Figura 7 – Grupos formados para tratamento

Figura 8 – Morfologia dos espermatozóides

Figura 9 – Aspecto histológico dos estágios dos túbulos seminíferos de camundongos em cortes transversais corados com H&E

Figura 10 – Esquema do teste de fertilidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ganho de peso materno de camundongos tratados oralmente com TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tabela 2 – Peso dos órgãos maternos no dia 21 pós-natal de camundongos tratados oralmente com TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tabela 3 – Dados do nascimento e do desmame de camundongos expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5mg/kg de peso corporal) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tabela 4 – Mortalidade materna e mortalidade pré-, peri- e pós-natal de camundongos expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5mg/kg de peso corporal) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação

Tabela 5 – Peso médio dos filhotes expostos *in utero* e durante a lactação ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia).

Tabela 6 – Ganho de peso dos filhotes (ninhada) expostos *in utero* e durante a lactação ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia).

Tabela 7 – Marcos do desenvolvimento pós-natal de filhotes de camundongos expostos ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5mg/kg de peso corporal) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tabela 8 – Teste de fertilidade de camundongos expostos ao TPTH *in utero* do dia 6 de gestação ao dia 21 pós-natal.

Tabela 9 – Peso dos órgãos absoluto e relativo de filhotes (fêmeas) expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tabela 10 – Peso dos órgãos absoluto e relativo de filhotes (machos) expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tabela 11 – Mortalidade dos camundongos (filhotes) fêmeas e machos tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 12 – Ganho de peso de camundongos (fêmeas) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 13 – Ganho de peso de camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 14 – Marcos físicos do desenvolvimento pós-natal de camundongos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 15 – Ciclo estral de camundongos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 16 – Peso dos órgãos de camundongos (fêmeas) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 17 – Peso dos órgãos dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 18 – Peso dos órgãos sexuais dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 19 – Variáveis reprodutivas de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 20 – Variáveis reprodutivas de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 21 – Análise histológica dos túbulos seminíferos de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tabela 22 – Teste de fertilidade de camundongos (fêmeas) expostos ao TPTH do dia 15 pós-natal ao dia 45 pós-natal.

Tabela 23 – Peso dos órgãos de camundongos (fêmeas grávidas) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal e que participaram do teste de fertilidade.

Tabela 24 – Peso dos órgãos dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal e que participaram do teste de fertilidade.

Tabela 25 – Peso dos órgãos dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal e que participaram do teste de fertilidade.

Tabela 26 – Variáveis reprodutivas de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo de milho; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal que participaram do teste de fertilidade.

Tabela 27 – Variáveis reprodutivas de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo dos Protocolos Regulatorios *in vivo* para avaliação da toxicidade sobre o desenvolvimento.

Quadro2 – Estudos de toxicidade reprodutiva do TPTH

Quadro 3 – Estudos da Toxicidade Materna e Embriofetotoxicidade dos Compostos Triorganoestanhosos.

Quadro 4 – Estudos da Toxicidade Peri e Pós-Natal dos Compostos Triorganoestanhosos

Quadro 5 – Esquema indicando a redução do ganho de peso corporal durante as quatro semanas de tratamento.

Quadro 6 – Relação entre o peso corporal médio e os dias da abertura de vagina e da descida de testículos.

RESUMO

O grupo de compostos organoestanhosos inclui uma variedade de químicos amplamente empregados na agricultura e na indústria em geral. Sob o ponto de vista toxicológico, um dos desfechos que merece atenção diz respeito aos possíveis efeitos sobre o sistema reprodutivo de organismos em desenvolvimento. O presente estudo - dividido em 2 etapas - buscou investigar: *i.* efeitos do TPTH sobre o desempenho reprodutivo geral e a fertilidade após exposição *in utero* e durante a lactação, e *ii.* efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade sobre o desenvolvimento de órgãos reprodutivos e a fertilidade. **Experimento 1:** Camundongos *Swiss Webster* foram acasalados e as fêmeas grávidas tratadas com 0, 1,875; 3,75 e 7,5mg TPTH/kg de peso corpóreo/dia por entubação gástrica do 6º dia de gravidez ao 21º dia pós-natal (PN). Ao nascimento, foi registrado o número de filhotes nascidos vivos e de natimortos. Parâmetros físicos do desenvolvimento PN foram avaliados. No dia 70PN, o teste de fertilidade foi realizado. Logo após o nascimento, três ninhadas do maior grupo de dose foram totalmente canibalizadas pela mãe. O ganho de peso materno ao longo da gestação e lactação não diferiu entre os grupos, nem houve alteração do número de filhotes ao nascimento e ao desmame. No dia 1PN, observou-se redução do peso corporal médio da prole a partir da dose de 1,87mg TPTH/kg. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto ao aparecimento de marcos físicos do desenvolvimento, nem quanto ao teste de fertilidade. As mortes de algumas ninhadas (7,5mg/kg) e a redução do peso médio dos filhotes ao nascimento (a partir de 1,875 mg/kg) indicam que nas condições experimentais deste estudo, o TPTH induziu toxicidade peri-natal em camundongos. **Experimento 2:** Camundongos *Swiss Webster* foram tratados por entubação gástrica (0, 1,875; 3,75, 7,5 e 15 mg TPTH/kg de peso corpóreo/dia) nos dias 15 a 45 PN. Parâmetros físicos do desenvolvimento PN (descida de testículos e abertura de vagina) e peso corporal foram avaliados diariamente. No dia 46PN, a metade dos animais foi sacrificada. Foram determinados: peso do timo, baço e órgãos reprodutivos, número de espermatozoides e produção espermática diária. No dia 65PN, a outra metade foi avaliada quanto à fertilidade. A dose de 15mg TPTH /kg causou mortalidade de 80% dos animais. O TPTH reduziu o ganho ponderal na primeira semana do tratamento, mas houve recuperação nas semanas que se seguiram, de modo que ao final do tratamento a redução foi observada apenas com as duas maiores doses estudadas. A descida de testículos ocorreu no 21PN no grupo controle e 29PN no grupo tratado com 15mg TPTH/kg. A abertura de vagina também foi atrasada nos grupos tratados com as duas maiores doses. O número de espermatozoides na cauda do epidídimo foi 167 ± 39 ($\times 10^6$) no grupo controle, 103 ± 31 ($\times 10^6$) nos animais tratados com 7,5mg/kg e 30 ± 9 ($\times 10^6$) na maior dose estudada. A produção espermática diária foi de 82 ± 16 e 45 ± 14 ($\times 10^6$) nos grupos tratados óleo de milho e com 15mg TPTH/kg, respectivamente. No teste de fertilidade, a razão entre o número de fêmeas que cruzaram e o número de fêmeas que deram à luz não diferiu entre os grupos. Não foram observadas diferenças quanto ao número de espermatozoides e espermátides entre os animais sacrificados após o teste de fertilidade. A maior dose de TPTH induziu acentuada mortalidade. O TPTH também retardou a descida de testículos e a abertura de vagina nos grupos tratados com doses superiores a 3,75mg TPTH/kg e diminuiu o número de espermatozoides e espermátides nas doses de 7,5 e 15mg TPTH/kg nos animais sacrificados logo após o fim do tratamento (46PN). Essa redução não foi observada, entretanto, nos animais que participaram do teste de fertilidade (65PN), indicando que os efeitos tóxicos sobre as gônadas masculinas foram reversíveis com a interrupção do tratamento.

ABSTRACT

Organotin compounds are a broad-group of chemicals used in agriculture as well as in industry. Tri substituted organotins are potent biocidal compounds that are used for a variety purposes. The present study was performed to evaluate the effects of exposure to TPTH during developmental periods of utmost importance for reproductive function. Two independent experiments were performed. **Experiment 1:** *Swiss Webster* mice were mated and the day on which copulation was confirmed by the presence of a vaginal plug was designated as day '0' of pregnancy. Pregnant mice were treated by gavage with 0; 1.875; 3.75; 7.5 mg TPTH/kg body wt /day from day 6 of gestation to day 21 of lactation. A vehicle-control group received corn oil only. The progeny was examined at birth and subsequently until weaning. Mortality, weight gain and the day of appearance of physical signs of postnatal development (ear unfolding, incisor eruption, fur development, eye opening, testis descent and vaginal opening) were evaluated. When the exposed offspring reached maturity (postnatal day 70) their reproductive capacity was assessed. Weights of reproductive organs of the exposed offspring were evaluated in adulthood. Furthermore, sexually mature male mice were assessed for their daily sperm production, sperm counts and sperm morphology. TPTH did not alter maternal weight gain during gestation and lactation. No difference between control and treated groups was observed regarding viability of the offspring at birth and during lactation. There was, however, a dose-related reduction of pup body weight in groups treated with 1.875, 3.75 and 7.5mg TPTH /kg body wt at postnatal day 1 and an increase of perinatal mortality in the group treated with 7.5mg TPTH/kg bw/day. Developmental landmarks were unaffected and no adverse effect was noted in groups treated with the two lowest doses of TPTH. The foregoing results therefore suggested that increased perinatal mortality was the most evident toxic effect noted during prenatal and lactational exposure to TPTH. **Experiment 2:** The effects of 0; 1.875; 3.75; 7.5 and 15 mg TPTH/kg body wt /day on male and female sexual development were investigated in the second experiment. *Swiss Webster* pups were treated by gavage for 30 days beginning on postnatal day 15. Mortality, weight gain and physical signs of postnatal development (testis descent and vaginal opening) were evaluated. One half of each group was killed postnatal day 46. Male and female sexual organs, thymus, spleen and liver weights recorded. Furthermore, sexually mature male mice were assessed for their daily sperm production, sperm counts, sperm transit time, sperm morphology, testosterone levels and testicular histology. When exposed animals reached maturity (postnatal day 65) their reproductive capacity was assessed (fertility test) and all parameters previously described were evaluated. TPTH induced a dose-related increase in the frequency of deaths with a high mortality in the group treated with 15 mg TPTH/kg body wt /day. A dose-related delay in testis descent was observed in groups treated with 3.75, 7.5 and 15 mg TPTH/kg body wt. A dose-related delay of vaginal opening was observed as well, but only at the two highest dose levels evaluated. Treatment with TPTH also reduced the absolute and relative weights of the reproductive organs, when these parameters were evaluated at postnatal day 46. The reduction of sperm counting [control group = 167 ± 39 ($\times 10^6$); 7.5mg/kg = 103 ± 31 ($\times 10^6$) and 15 = 30 ± 9 ($\times 10^6$)] and of daily sperm production [0 = 82 ± 16 ($\times 10^6$) and 15mg/kg = 45 ± 14 ($\times 10^6$)] was also caused by TPTH exposure. Our data indicated that peripubertal and pubertal exposure to TPTH (7.5 and 15 mg TPTH/kg) impaired development and altered gonadal function of male mice. Our data also suggested, however, that these toxic effects were reversed as exposure was discontinued.

I. INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento industrial ocorrido no século XX, principalmente, após a Segunda Guerra Mundial, resultou no marcante crescimento da produção de medicamentos, fibras sintéticas, pesticidas e compostos químicos industriais e também na liberação dessas substâncias no meio ambiente. A produção de compostos orgânicos sintéticos aumentou de menos de 450 mil toneladas em 1920 para mais de nove milhões de toneladas em 1945 (Gallo, 1996; Thomas, 1996). A partir de 1960, a intensificação da exploração agrícola conduziu ao aumento na produção e utilização de pesticidas no combate a pragas da lavoura (Ecobichon, 1996). Apesar da sua importância na agricultura, os resíduos de pesticidas encontrados nos alimentos, água e solo podem oferecer riscos à saúde do homem e de outros organismos não alvo.

Alguns pesticidas e outras substâncias químicas sintéticas têm o potencial de produzir alterações no sistema endócrino através da ligação a receptores específicos de hormônios esteróides, *e.g.* estradiol, testosterona e progesterona, antagonizando ou estimulando o sistema endócrino (Gaido *et al.*, 1998; Kavlock *et al.*, 1996). Essas substâncias químicas são conhecidas como desreguladores endócrinos. Segundo definição do EDSTAC (*Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee*, comitê constituído pela Agência de Proteção Ambiental americana – US EPA), desreguladores endócrinos são substâncias exógenas que alteram funções endócrinas e causam efeitos adversos no indivíduo, sua progênie e/ou (sub) populações de organismos (Goldman *et al.*, 2000).

Independentemente, dos eventuais efeitos dos contaminantes químicos ambientais sobre o sistema endócrino, é de grande importância o estudo dos seus efeitos sobre o desenvolvimento, o comportamento, a reprodução e a fertilidade (Neubert & Chahoud, 1995). Existem evidências de que a exposição a determinadas substâncias químicas contribui para o surgimento de distúrbios do sistema reprodutivo masculino e feminino de animais, incluindo alterações estruturais e funcionais, tais como, micropênia em crocodilos, reversão sexual em peixes e masculinização de caramujos fêmeas (Gray, 1998; Baker, 2001). Também foram observados anormalidades do sistema reprodutivo em seres humanos, entre elas, o aumento do número de casos de

criptorquidismo, hipospádia, abortos, redução da libido, prejuízos na produção espermática, impotência e aumento na incidência de tumores de testículo, próstata e mama (Sonnenschein & Soto, 1998; Baker, 2001; Toppari *et al.*, 1996; Sultan *et al.*, 2001; Garry *et al.*, 2002). Portanto, o estudo dos efeitos dos contaminantes ambientais que interferem com funções reguladas pelo sistema endócrino e com sistema reprodutivo é de grande interesse para a saúde pública.

I.1 Avaliação da toxicidade reprodutiva de xenobióticos

O impacto de xenobióticos sobre o sistema reprodutivo foi evidenciado pela “Tragédia da Talidomida” na década de 60. Esse acontecimento levou a um aumento do conhecimento da toxicidade de compostos químicos e medicamentos sobre o sistema reprodutivo (Thomas, 1996). As agências regulatórias, por sua vez, tornaram mais rigorosas as exigências quanto aos estudos de segurança e eficácia de novos medicamentos, incluídos os estudos de toxicidade reprodutiva, e estenderam tais exigências a outros produtos, tais como pesticidas, aditivos alimentares e substâncias químicas em geral.

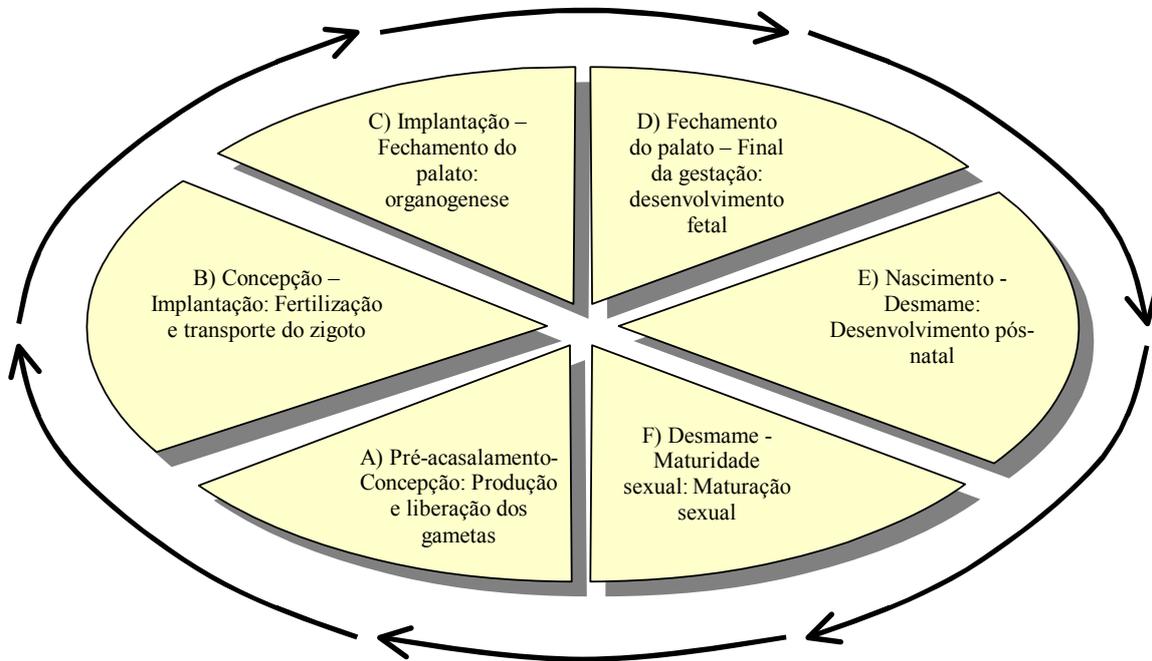
A Toxicologia Reprodutiva é uma das áreas mais complexas da Toxicologia Preditiva, esta complexidade se deve em parte à própria natureza e duração do processo reprodutivo. Entende-se por *reprodução* o processo biológico que assegura a continuidade das espécies, possibilitando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Portanto, o ciclo reprodutivo não consiste apenas na concepção, gravidez e nascimento, mas tem início com a produção de gametas nos pais (ainda no período pré-natal do organismo parenteral), seguindo pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, quando o descendente adulto torna-se capaz de procriar (Figura 1).

Os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer das suas diferentes fases. Um agente químico pode, por exemplo, impedir ou inibir temporariamente a reprodução, pode ainda causar defeitos de desenvolvimento na prole exposta e assim por diante. Desta forma os estudos de Toxicidade Reprodutiva têm que ser igualmente abrangentes para que se possam detectar diferentes tipos de agravos nas

diferentes fases do ciclo reprodutivo. As diretrizes internacionais do FDA (*US Food & Drug Administration*) e da ECC (*European Economic Community*), a princípio, recomendam a realização do estudo de Toxicidade Reprodutiva em três segmentos.

No entanto, vários fatores, tais como o aumento do conhecimento do processo reprodutivo básico e a crescente divergência nos desenhos de estudos empregados em diferentes países, levou a publicação, recentemente, de novos protocolos aceitos internacionalmente, que estão resumidos, no Quadro 1. Essas diretrizes harmonizadas são resultados da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) de técnicas necessárias para o registro de medicamentos de uso humano (Riecke & Stahlmann, 2002).

A reprodução nos mamíferos pode ser dividida em seis partes cada qual com um grau de susceptibilidade aos diferentes efeitos adversos de medicamentos e químicos. Portanto, devem ser estudadas por testes de toxicidade reprodutiva específicos.



Estudos específicos:

A) Pré-acasalamento até a concepção: avaliação das funções reprodutivas de adultos machos e fêmeas, desenvolvimento e maturação dos gametas, comportamento no acasalamento e fertilização.

B) Concepção até a implantação: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, desenvolvimento pré-implantação e implantação.

C) Implantação até o fechamento do palato: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, desenvolvimento embrionário e formação de órgãos principais.

D) Fechamento do palato até o final da gestação: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, crescimento e desenvolvimento fetal, e crescimento e desenvolvimento dos órgãos.

E) Nascimento até o desmame: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, adaptação neonatal a vida extra-uterina, crescimento e desenvolvimento pré-desmame.

F) Desmame até a maturidade sexual: crescimento e desenvolvimento pós-desmame, adaptação a vida independente, e alcance da função sexual completa.

Figura 1: O ciclo reprodutivo. (Riecke & Stahlmann, 2000)

Quadro 1: Resumo dos Protocolos Regulatórios *in vivo* para avaliação da toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento.

Estudo	Exposição	Desfechos registrados	Comentários
Segmento 1 Fertilidade e Desempenho reprodutivo	Machos: 10 semanas antes do acasalamento Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Desenvolvimento do gameta, fertilidade, viabilidade pré- e pós-implantação, nascimento e lactação.	Avalia a capacidade reprodutiva de machos e fêmeas após a exposição por todo o ciclo espermatogênico e oogênico
Segmento 2 Embriofeto-toxicidade	Da implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia (análise externa, visceral e esquelética) do conceito antes do nascimento.	Exposição curta para prevenir adaptação do metabolismo materno e fornece alta exposição ao embrião durante período de vulnerabilidade associado a gastrulação e organogênese
Segmento 3 Desenvolvimento peri- e pós-natal	Do último trimestre da gestação até a lactação	Sobrevivência pós-natal, crescimento e morfologias externas.	Observa os efeitos sobre o desenvolvimento dos principais órgãos funcionais durante o período peri-natal
ICH 4.1.1 Protocolo de fertilidade	Machos: 4 semanas antes do acasalamento Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Machos: peso e histologia dos órgãos reprodutivos, motilidade e contagem dos espermatozóides. Fêmeas: viabilidade do conceito na metade da gravidez ou mais tarde	Avaliação dos desfechos reprodutivos dos machos; duração do tratamento é menor do que no <i>Segmento 1</i>
ICH 4.1.2 Efeitos sobre o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, incluindo funções maternas.	Da Implantação ao final da lactação	Toxicidade relativa de fêmeas grávidas vs não grávidas; viabilidade pós-natal, crescimento, desenvolvimento, e déficits funcionais (incluindo comportamento, maturação e reprodução).	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 1</i>
ICH 4.1.3 Efeitos sobre o desenvolvimento embriofetal	Da Implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia dos fetos (análise externa, visceral e esquelética) antes do nascimento.	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 2</i> , usualmente conduzido em duas espécies (roedor e não-roedor).
OECD 4.1.4 Estudo da toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal	Da Implantação (ou acasalamento) até um dia antes da cesárea	Viabilidade e morfologia dos fetos (análise externa, visceral e esquelética) antes do nascimento.	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 2</i> , usualmente conduzido em duas espécies (roedor e não-roedor).

Fonte: Rogers & Kavlock, 2001.

I.2 Estanho

Estudos arqueológicos realizados no domínio interfluvial dos rios Tigre e Eufrates, antiga Mesopotâmia, atual Iraque, revelaram que o uso do bronze remonta a 3.500 a 3.200 a.C. Reconhece-se, portanto, que o estanho foi um dos primeiros metais a ser trabalhado pelo homem, inicialmente aplicado na forma de liga com o cobre (bronze) para manufatura de armas e ferramentas, caracterizando um marco da evolução tecnológica das civilizações, a denominada Idade do Bronze. A utilização do estanho pelos povos do Oriente Médio em tempos tão remotos, deve-se, provavelmente, às peculiaridades físicas e químicas do metal.

O estanho é um metal branco prateado, maleável, pouco dúctil, de baixo ponto de fusão, altamente cristalino e insolúvel em água, que é usado para revestir latas de alimentos, bebidas e aerossóis. O estanho pode ser combinado com outros químicos formando vários compostos. Quando o estanho é combinado com o cloro, o enxofre, ou o oxigênio, ele é chamado de composto inorgânico de estanho. Compostos inorgânicos de estanho são encontrados em pequenas quantidades na crosta terrestre. Esses compostos estão também presentes em cremes dentais, sabonetes, perfumes, aditivos alimentares e corantes (ATSDR, 2005). O estanho também pode ser combinado com o carbono para formar compostos orgânicos, que são usados na fabricação de plásticos, embalagens de alimentos, tubos plásticos, pesticidas, aditivos de tintas e preservativos de madeira. Em geral, compostos organoestanhosos são produzidos pelo homem e não ocorrem naturalmente no ambiente.

I.3 Compostos organoestanhosos

O grupo dos compostos organoestanhosos inclui uma variedade de químicos amplamente empregados na agricultura e na indústria em geral. A grande maioria destes compostos tem origem antropogênica, com exceção do metil estanho, que pode também ser produzido por biometilação ambiental. O primeiro registro de comercialização de compostos organoestanhosos data de 1936, quando foram usados como estabilizadores de polímeros sintéticos (Fent, 1996). Desde que sua propriedade biocida foi reconhecida em 1950, observou-se um aumento considerável de sua aplicação, consumo e produção,

que cresceu de 5.000 t no ano de 1955 para cerca de 35.000 t no ano de 1985, que naquele momento, representava aproximadamente 7% do consumo mundial total de estanho por ano.

Os compostos diorganoestanhosos e monoorganoestanhosos são usados, principalmente, como estabilizadores de policloreto de vinila (PVC) e catalisadores na produção de poliuretanos, silicone e em outros processos industriais. Os compostos triorganoestanhosos são utilizados como pesticidas de uso agrícola; como agentes preservativos da madeira, algodão, papel, na indústria de vidros; e como aditivos de tintas para uso náutico (efeito antiincrustante). Já os compostos tetraorganoestanhosos são basicamente usados como estabilizadores de óleos e intermediários na produção dos seus derivados (Fait *et al.*, 1994). Dentre os diferentes grupos de compostos a base de estanho, são os compostos triorganoestanhosos os mais estudados sob o ponto de vista toxicológico (Guard *et al.*, 1981).

Compostos tributil estanho (TBT) têm sua principal aplicação como agentes biocidas. O TBT foi inicialmente proposto como bactericida (*e.g.* desinfetante de uso hospitalar), e como moluscicidas no combate da *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* nas áreas endêmicas (Cardarelli, 1977 e Duncan, 1980). No entanto, após a descoberta de sua potente ação antiincrustante, a adição de TBT em tintas para uso próprio em embarcações, redes de pesca, plataformas para exploração de petróleo, bóias para auxílio à navegação e tubulações de usinas nucleares, passou a representar a principal aplicação deste composto. A utilização de tintas contendo acima de 20% de TBT em sua composição previne a adesão e o crescimento de crustáceos, plâncton, bactérias, algas e outros organismos nos cascos de embarcações, o que reduz o custo de manutenção com limpeza e o consumo excessivo de combustível devido às incrustações biológicas (Boyer, 1989). A bioincrustação, além de provocar graves danos nas estruturas submersas, causa prejuízos econômicos óbvios, porque torna irregular e rugosa a superfície dos cascos aumentando o arrasto e reduzindo a velocidade das navegações. Estima-se uma economia anual de dois bilhões de dólares com o uso destes compostos (Champ, 1999).

O emprego de compostos tributil estanho em tintas de uso náutico faz com que essa seja a principal via de entrada do TBT no ambiente aquático (WHO, 1980). Outra

possível via de entrada e distribuição dos compostos organoestanhosos no meio ambiente ocorre através da aplicação agrícola de compostos trifenil estanho (TPT), o que contamina o solo e os corpos de água. Apesar do TPT ser também usado como agente antiincrustante em adição ao TBT, sua principal aplicação é agrícola, onde este é usado como agente fungicida, sobretudo nas plantações de batata, beterraba, café e arroz. Apesar das poucas estimativas alguns relatos demonstram que o consumo de TPT como fungicida agrícola não é raro. Em países europeus, como *e.g.* a Holanda, o consumo anual de trifenil acetato de estanho (TPTA) na safra de batata do ano de 1987 foi de 300 t, o que representa aproximadamente 8% do total de fungicidas utilizados neste país (Fent, 1996).

A Figura 2 ilustra algumas outras vias importantes de entrada de compostos organoestanhosos no meio ambiente. A contaminação com TBT pode decorrer da lixiviação ou do próprio desgaste de produtos a base de PVC e outros inúmeros produtos industriais revestidos e/ou protegidos por este composto, sobretudo os compostos mono-butil de estanho e di-butil de estanho, que contaminam, via de regra, os sistemas de tratamento de esgotos municipais. O descarte de produtos contendo compostos organoestanhosos em aterros sanitários pode levar a contaminação do solo e do lençol freático. Já em incineradores municipais, compostos organoestanhosos são decompostos em óxido de estanho e em outros produtos de combustão, considerados de toxicidade relativamente baixa.

Embora ocorra a emissão de compostos organoestanhosos no ar durante a aplicação de pesticidas, ou a partir de superfícies revestidas com estes compostos, esta forma de contaminação ambiental não é considerada de grande importância. Isto porque TBT e TPT, além de apresentarem baixa pressão de vapor, são rapidamente decompostos por fotodegradação (Fent, 1996).

1. MAR, LAGOS E BAÍAS
2. SISTEMA DE TRATAMENTO DE ESGOTO
3. INCINERAÇÃO
4. ATERRO SANITÁRIO
5. AR
6. SOLO
7. LENÇOL FREÁTICO

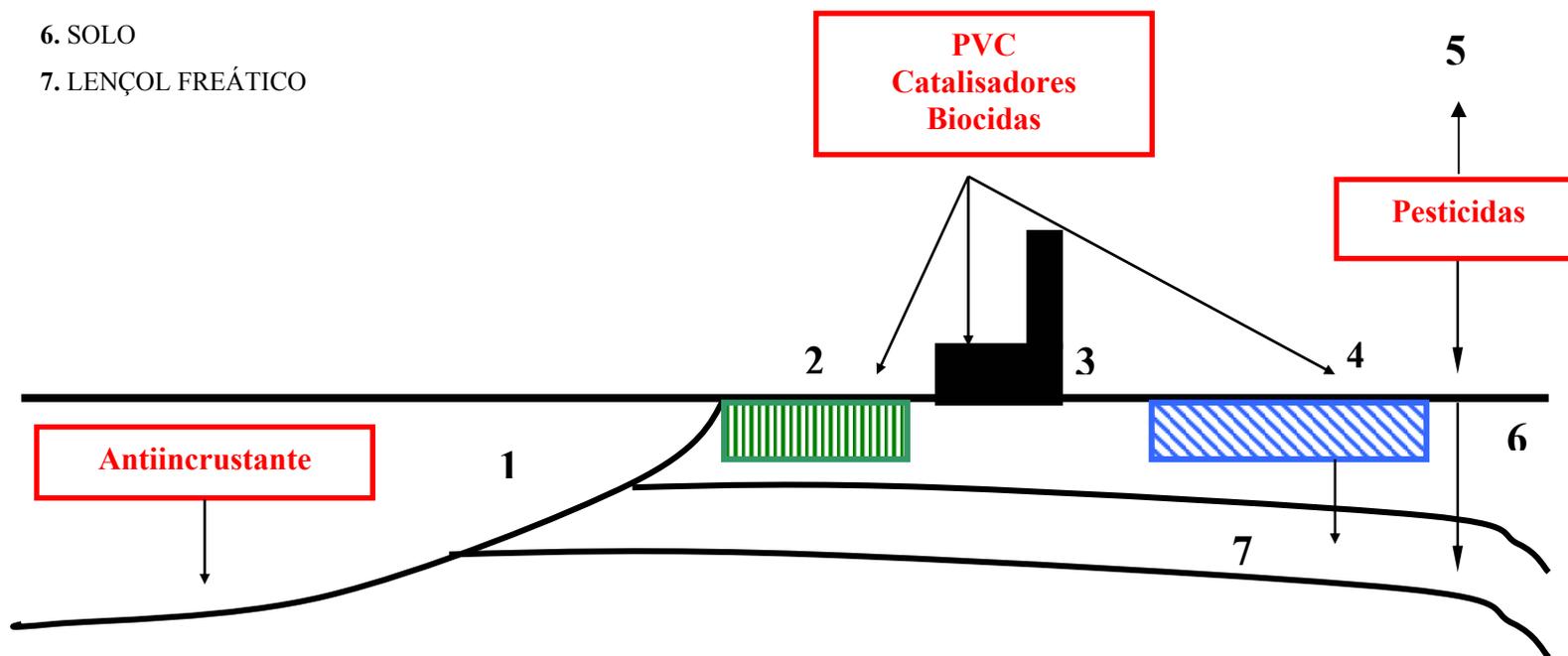


Figura 2: Vias de entrada dos compostos organoestanhosos no ambiente
(Fent, 1996)

A contaminação mundial de peixes e outros organismos de origem marinha por TBT e TPT é apreciável. Apesar de nas últimas décadas a adição de TBT em produtos antiincrustantes ter sido mais abundante do que a adição de TPT, os níveis residuais destes dois compostos em peixes e mariscos são comparáveis, havendo, entretanto diferenças consideráveis quanto aos níveis residuais encontrados nas diferentes espécies de peixes estudadas (WHO, 1999). Os níveis residuais são bem mais elevados em peixes de cativeiro e naqueles encontrados em baías e em áreas costeiras, quando comparados com peixes pelágicos. Apesar dos compostos TPT serem degradados por defenilação seqüencial e serem excretados em forma conjugada, vários estudos têm demonstrado que tais compostos sofrem bioacumulação ao longo da cadeia alimentar e que a exposição humana pode ocorrer através da ingestão de frutos do mar contaminados (WHO, 1999).

Desde que as tintas contendo TBT e TPT começaram a ser utilizadas em larga escala, no início da década de 1970, pensou-se que essa seria a solução para o antigo e oneroso problema da bioincrustação. No entanto, já nessa época surgiram as primeiras evidências de efeitos prejudiciais em muitas outras formas de vida marinha além dos organismos incrustantes. Os primeiros apontamentos de problemas ambientais decorrentes do uso de compostos a base de estanho foram registrados no final dos anos 1970, após a observação de um drástico declínio na produção de espécies economicamente importantes na Baía de Arcachon, na França. A principal alteração biológica atribuída ao amplo uso de compostos organoestanhosos foi à morte de ostras e larvas de moluscos, além do aparecimento de órgão sexual masculino em gastrópodes fêmeas (Fernandez *et al.*, 2002). Esse último efeito, um fenômeno observado após distúrbio hormonal induzido é denominado *imposex*, e altera a proporção sexual desses organismos no meio ambiente. Compostos organoestanhosos são, por isso, considerados desreguladores endócrinos em moluscos.

Diante do acidente ocorrido na Baía de Arcachon, a França foi o primeiro país a regulamentar o uso de compostos organoestanhosos com aplicação antiincrustante, na tentativa de reduzir as concentrações ambientais. Em 1982, a França banuiu o uso de tintas a base de estanho em embarcações com dimensões menores que 25 metros de comprimento. Essa proibição foi, posteriormente, adotada por outros países, tais como

Inglaterra (1987), Estados Unidos (1988), Suécia e Nova Zelândia (1989), Austrália e Japão (1990) e Dinamarca (1991). Alemanha, Áustria e Suíça impuseram também restrições em ambientes de água doce (Champ, 1999). Recentemente, a Comissão de Proteção Ambiental Marinha (CPAM) pertencente à Organização Internacional Marítima (IMO) recomendou que no ano de 2008 ocorra a proibição global do uso de compostos organoestanhos em tintas de navios, além da suspensão de novas aplicações em embarcações já a partir do ano de 2003 (Champ, 1999). Entretanto, é importante que se ressalte, que no Brasil, bem como em outros países em desenvolvimento, não existe legislação impondo restrições ou estabelecendo níveis permissíveis desses compostos no meio ambiente.

I.4 Compostos Trifenílicos de Estanho

I.4.1 Identidade e propriedades físico-químicas

Compostos trifênil estanho (TPT) são derivados trifenílicos do estanho tetravalente. Eles apresentam a fórmula geral $(C_6H_5)_3 Sn-X$, onde X é um ânion ou um grupo aniônico, *i.e.* o cloro, o hidróxido ou o acetato.

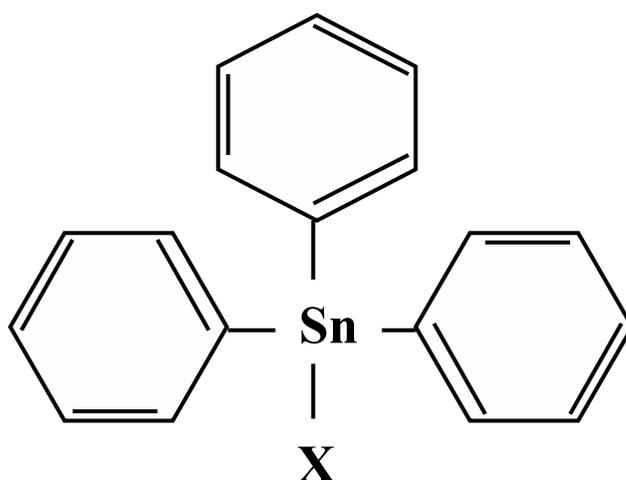


Figura 3: Estrutura química geral de compostos trifênil estanho.

As propriedades físico-químicas do TPT dependem do ânion ligado ao estanho. Em temperatura ambiente, com pH entre 3-8, o TPTA (trifenil acetato de estanho) e TPTCl (trifenil cloreto de estanho) são rapidamente hidrolisados em TPTH. Como consequência, os resultados de muitos estudos com TPTA e TPTCl são aplicados ao TPTH. Esses compostos são lipofílicos e têm baixa solubilidade em água (WHO, 1999).

I.4.2 Transformação, distribuição e transporte no ambiente.

A degradação do TPT ocorre através de uma seqüência de defenilação resultante da clivagem da ligação estanho-carbono através de mecanismos biológicos, químicos ou térmicos e irradiação ultravioleta. A clivagem biológica e por irradiação ultravioleta são consideradas os processos mais importantes. Fatores abióticos, tais como, temperatura elevada, aumento da intensidade da luz solar, e condições aeróbicas parecem aumentar a degradação de TPT no ambiente (WHO, 1999).

O TPTH é fortemente adsorvido pelo solo e sedimentos, portanto, a contaminação de plantas, via raízes, é extremamente baixa. A persistência do TPTH depende do tipo de solo e de seu pH. Em solo arenoso e sedimentado sua meia-vida foi registrada como sendo cerca de 1 a 3 meses, já em solo inundado a meia-vida foi estimada em 126 dias. Em água, a meia-vida estimada do TPT é de 2 a 3 semanas (WHO, 1999).

I.4.3 Métodos analíticos

TPT e seus produtos de degradação podem ser analisados em alimentos e em amostras ambientais ou de origem biológica a partir da utilização de uma variedade de técnicas, dependendo do meio e da sensibilidade necessária para cada análise.

Normalmente, o processo tem início com a extração líquida ou adsorção em matrizes sólidas, seguidas por re-extração e/ou concentração (WHO, 1999). A quantificação pode ser realizada utilizando-se espectrometria de absorção atômica,

cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama, espectrometria de massa, ou ainda cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector ultravioleta ou de fluorescência. Os limites de detecção destas técnicas situam-se na faixa de ng/litro para amostras de água e <1 µg/kg para sedimento e amostras de origem biológica (WHO, 1999).

Estudos em roedores mostraram que o TBT e TPT são absorvidos no trato gastro-intestinal, e que níveis de TPT e de seus metabólitos no fígado e nos rins são maiores que os níveis no sangue e em outros tecidos (Ohhira e Matsui, 1996; Appel, 2004).

I.4.4 Fontes de exposição ambiental e humana

O TPTH apresenta potente ação algicida, fungicida e moluscicida. Como descrito anteriormente, a adição deste composto em tintas próprias para uso em embarcações impede a bioincrustação, o que promoveu seu amplo uso na década de 1970. Anos depois, observou-se que o TPTH apresenta potente ação tóxica para organismos aquáticos não-alvo. Por ser extremamente tóxica à vida marinha, a produção de TPTH foi banida em muitos países desenvolvidos, apesar das vantagens econômicas que representava a aplicação de um agente biocida tão potente. Entretanto, o TPTH, assim como outros compostos a base de estanho, ainda vêm sendo usados como estabilizadores de PVC, em preservativos da madeira e na produção de pesticidas. O TPTH é utilizado no Brasil como pesticida agrícola, com aplicação em lavouras e no tratamento de sementes para plantio em culturas de amendoim, arroz, batata, cacau, cenoura e feijão (ANVISA, 2006).

Além de representar risco ao ecossistema, principalmente, às populações aquáticas não-alvo, estudos realizados em mamíferos demonstram que o TPTH pode induzir uma variedade de alterações fisiológicas. Os efeitos induzidos pelo TPTH incluem: marcante neurotoxicidade e imunotoxicidade, indução de apoptose em timócitos, indução de hiperplasia/adenomas em órgãos endócrinos, e irritação ocular (WHO, 1999). O TPTH apresenta toxicidade aguda moderada em roedores e não é

carcinogênico, entretanto, alguns dados sugerem uma possível ação co-clastogênica (WHO, 1999).

Não existem dados disponíveis sobre exposição ocupacional ao TPTH. Os poucos relatos de envenenamento que foram divulgados até hoje registram efeitos neurotóxicos que, aparentemente, são persistentes (WHO, 1999).

Além da exposição ocupacional, a exposição humana pode se dar através da ingestão de alimentos contaminados, sobretudo produtos agrícolas e frutos do mar. Em países como Inglaterra, Alemanha e Estados Unidos, em que TPT tem freqüente aplicação agrícola, os níveis de resíduos encontrados nos alimentos são periodicamente monitorados pelos órgãos federais de vigilância sanitária (FAO, 1991a) e a ingestão diária tolerável (IDT= 0-0,5µg/kg de peso corpóreo dia) estabelecida pelo JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*) é criteriosamente obedecida. Um estudo realizado no Japão forneceu uma estimativa de ingestão diária de 4,3 e 2,7µg (expresso como TPTCl por 50Kg) em 1990 e 1997, respectivamente (Ueno *et al.*, 1999; WHO, 1999). Um estudo similar finlandês estimou a ingestão diária de sete compostos organoestanhosos, incluindo o TPT, como sendo 2,47 ng/kg de peso corporal (Rantakokko *et al.*, 2006). No Brasil, apesar de serem livremente comercializados, não há dados disponíveis na literatura sobre a exposição humana ou ambiental a compostos organoestanhosos.

I.4.5 Toxicidade aguda e sub-crônica

Após administração oral de TPTH, os sinais tóxicos observados em várias espécies incluem anorexia, vômito, tremor, diarreia e ataxia. A DL₅₀ aproximada, calculada após administração oral de TPTH é 160 mg/kg de peso corpóreo para ratos e 100-245 mg/kg de peso corpóreo para camundongos (WHO, 1999).

A avaliação da toxicidade sub-crônica oral do TPTH evidencia alguns sintomas comuns em diferentes espécies estudadas, *i.e.* diminuição do nível sérico de imunoglobulinas (Igs), redução do ganho de peso corpóreo e aumento do peso do fígado, além da morte de camundongos, ratos e cães tratados com doses relativamente

baixas (WHO, 1999). Os efeitos induzidos em camundongos foram observados a partir de 3,4mg TPTH/kg/dia. Tais efeitos foram igualmente observados em ratos tratados por via oral com doses maiores que 0,30mg TPTH/kg/dia. Em estudos realizados em cães, o *NOAEL* (*No Observed Adverse Effect Level*, ou *nível máximo de dose em que não se observa efeito adverso*) foi estabelecido em 0,21mg TPTH/kg/dia. Desta forma, podemos dizer que camundongos são aparentemente mais resistentes aos efeitos deletérios induzidos pela exposição subcrônica ao TPTH.

I.4.6 Toxicidade crônica e carcinogenicidade

Os estudos de toxicidade crônica evidenciaram que o organismo feminino é mais susceptível aos efeitos deletérios de compostos TPT (*e.g.* redução do peso corpóreo, alteração de componentes do sistema imune e aumento da taxa de mortalidade). A maior susceptibilidade feminina foi observada tanto em ratos como em camundongos (WHO, 1999).

Não existem evidências que o estanho e compostos estanhos causem câncer em humanos. Estudos em animais não demonstraram evidência de carcinogenicidade para o estanho inorgânico (ATSDR, 2005). Observou-se aumento da incidência de adenoma hepatocelular, em ambos os sexos, e da incidência de carcinoma hepatocelular em fêmeas tratadas com TPTH. Um aumento da incidência de adenoma hipofisário foi observado exclusivamente em fêmeas, enquanto este mesmo estudo revelou que em doses maiores que 4,8 mg TPTH/kg/dia, aumentou a incidência de tumores de células intersticiais do testículo (células de Leydig) em ratos machos (WHO, 1999).

Embora alguns tumores tenham surgido nestes estudos, não houve aumento estatisticamente significativo entre os animais expostos. Além disso, estudos recentes sugerem que a hiperplasia de células de Leydig é extremamente rara no homem, e que o desenvolvimento de adenomas e alterações neoplásicas observados em ratos são processos provocados por alterações hormonais específicas da fisiologia de roedores que apresentam pouca, ou nenhuma, relevância sob o ponto de vista da carcinogenicidade humana (WHO, 1999). Portanto, o Departamento de Saúde e Serviço Humano (DHHS), a Agência internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), e a

Agência de Proteção Ambiental Americana (U.S. EPA) não classificaram o estanho metálico ou compostos inorgânicos de estanho como carcinogênico. A EPA determinou que um organoestanhoso específico, tributil óxido de estanho, não é classificado como carcinogênico para humanos (ATSDR, 2005).

I.4.7 Genotoxicidade

Testes *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidade, tal como, testes de mutagenicidade da *Salmonella* (Teste de Ames), ensaios de aberrações cromossômicas, testes de micronúcleos em camundongos, ensaio citogenético em células de ovários de hamster chinês (CHO), teste dominante letal em ratos, entre outros, mostraram resultados negativos, mesmo em altas doses. Porém, dados indicam que o TPT potencializa a genotoxicidade de outras substâncias. Sasaki *et al.* (1993) identificaram que compostos TPT potencializam a indução de aberrações cromossômicas pela mitomicina C em cultura de células CHO quando tratados durante a fase G₂. Da mesma forma, uma ação co-clastogênica foi encontrada por Yamada *et al.* 1993, ao registrarem um aumento na frequência de micronúcleos induzida pela mitomicina C em reticulócitos periféricos de camundongos tratados por via intraperitoneal com TPTCl, embora o TPTCl *per se* não apresente ação clastogênica (WHO, 1999).

I.4.8 Imunotoxicidade

Efeitos sobre o sistema imune foram observados tanto em estudos de toxicidade em longo prazo como em estudos em curto prazo. Como outros compostos organoestanhosos, o TPTH mostrou propriedades imunossupressoras tais como, promoção de linfopenia e diminuição dos pesos de órgãos imuno-relacionados, *i.e.*, baço e timo, resultando em alterações nas respostas humoral e celulares em ratos, camundongos e cobaias (WHO, 1999).

I.4.9 Neurotoxicidade

Após administração oral de TPT em roedores, observou-se aumento dos níveis de estanho no tecido cerebral, e efeitos neurotóxicos, tais como, necrose neuronal e deficiência de aprendizado no teste do labirinto (WHO, 1999). No entanto, o TPT induz efeitos neurotóxicos relativamente brandos quando comparados com aqueles induzidos após exposição a outros compostos a base de estanho, tais como trimetil e trietil de estanho (ATSDR, 2005).

I.4.10 Toxicidade reprodutiva

Com relação à toxicidade reprodutiva e efeitos sobre o desenvolvimento pré-e pós-natal induzidos por compostos organoestanhos, pode-se dizer que, pelo menos até o momento em que concluímos o levantamento bibliográfico desta tese, não existiam na literatura dados disponíveis sobre os efeitos da exposição ao TPTH sobre o desenvolvimento, a lactação, a pré-puberdade e a puberdade de camundongos. No entanto, alguns estudos demonstram que os TPTs causam efeitos sobre a reprodução de ratos, coelhos e hamster a partir de doses relativamente baixas, em geral, tóxicas também para o organismo materno. Diminuição do número de sítios de implantações, do número de fetos vivos, e do peso médio fetal ao nascimento, além de aumento do número de reabsorções são alguns dos efeitos encontrados nestas espécies.

Apesar do estudo conduzido em ratas grávidas (Chernoff *et al.*, 1990 e Rodwell, 1985, *apud* WHO, 1999) não demonstrar nenhuma alteração estrutural que sugerisse efeito teratogênico do TPTH, avaliações conduzidas em hamster (Carlton & Howard, 1982 *apud* WHO, 1999) (Quadro 2) evidenciam um discreto aumento na incidência de hidronefrose e hidrocefalia, em níveis de dose em que sinais de toxicidade materna já eram evidentes. Além disso, estudo realizado com outro composto organoestanhoso, *i.e.* o tributil óxido de estanho (TBTO), em fêmeas grávidas de camundongos, revelou um aumento da incidência de fenda palatina, encurtamento da mandíbula e fusão dos ossos exoccipital/basoccipital, sugerindo que o TBTO induz efeito teratogênico nesta espécie (Faqi *et al.*, 1997). Outro estudo descreveu que ratos expostos ao tributil de

estanho durante a gestação e lactação apresentaram problemas no desenvolvimento de algumas características femininas. Não se sabe se o estanho e os compostos estanhosos passam através do leite para os filhotes de animais. Porém, alguns organoestanhosos podem atravessar a placenta e alcançar os fetos em animais (ATSDR, 2005).

Com relação aos efeitos embriofetotóxicos de compostos trifenilicos de estanho, *i.e.* TPTH, TPTCl e TPTA, poucos são os estudos que tenham realizado uma avaliação sistemática de seus potenciais teratogênicos. Em estudo conduzido por Ema *et al* (1997) nenhuma malformação externa, interna ou de esqueleto foi registrada após exposição a doses entre 3,1 e 25mg TPTCl/kg em ratas expostas durante o período precoce da gestação (período pré-implantação). O TPTCl, no entanto, parece produzir efeito severo antiimplantação, sobretudo quando administrado na fase mais precoce do processo de blastogênese, *i.e.* entre os dias 0 e 3 de gestação. Em outra investigação, na qual ratas foram tratadas oralmente com TPTCl por três dias consecutivos durante o período de organogênese (entre os dias 7-9, ou dias 10-12, ou dias 13-15), Ema *et al* (1999) não encontraram alterações morfológicas em decorrência à exposição ao TPTCl. Assim, não há evidências conclusivas que sustentem a teratogenicidade do TPTCl.

A situação é a mesma para o TPTA. Há somente um artigo científico publicado a respeito da toxicidade materna e do potencial embriofeto-tóxico do TPTA (Noda *et al* 1991a). Este estudo foi realizado em ratos e não evidenciou efeito teratogênico, nem mesmo em níveis de dose tóxicos para mãe. Além dos registros citados acima, somente um trabalho completo sobre a toxicidade reprodutiva do TPTH está disponível até o momento (Chernoff *et al.*, 1990), porém, assim como em Rodwell (1985, *apud* WHO, 1999) não foi observado efeito teratogênico do TPTH em ratos. Duas únicas exceções são os estudos conduzidos recentemente em nosso laboratório (Viana, 2002 e Sarpa, 2007). Sarpa (2007), constatou que a exposição *in utero* ao TPTH durante todo o processo de organogênese (do dia 6 ao dia 17 de gestação) induziu efeito teratogênico em camundongos, causando o aumento de malformações severas, *i.e.* fenda palatina e alterações morfológicas em órgãos sexuais, em níveis de dose não-tóxicos para o organismo materno, apontando para uma certa seletividade dos efeitos adversos sobre o desenvolvimento embrionário (Quadro 3).

Os artigos científicos sobre a toxicidade reprodutiva do TPTH são escassos, apesar do interesse óbvio que tais estudos representam em termos de Saúde Pública. Nos últimos anos, apenas algumas avaliações foram realizadas, a grande maioria delas pela indústria química (Carlton & Howard 1982; Rodwell, 1987; Rodwell, 1985 e Young, 1986; *apud* WHO, 1999). Estes dados estão compilados no Quadro 2. É importante destacar, que nenhum destes estudos foi publicado em revistas científicas, estando disponíveis somente em formato resumido em publicações da Organização Mundial de Saúde (OMS), como no *Concise International Chemical Assessment Document 13* (WHO, 1999), tal qual reproduzidas no Quadro 2. Desta forma, apesar de apresentar indícios de toxicidade reprodutiva, esta forma de apresentação de resultados não nos permite avaliar o verdadeiro grau de severidade das alterações funcionais e morfológicas encontradas, nem tão pouco, descrevem detalhes sobre a metodologia e métodos estatísticos empregados na interpretação final dos resultados.

Quadro 2: Estudos de toxicidade reprodutiva do TPTH

Espécie (cepa;N; sexo; dose)	Desenho Experimental	Efeitos	Referência
Hamster grávidas (<i>Syrian</i> ; 20-25/grupo).	TPTH (0; 2,25; 5,08 e 12 mg/kg/dia, entubação gástrica) do dia 5 ao dia 14 de gestação. Cesárea: dia 15. Desfechos avaliados: toxicidade materna (sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração) e embriofeto-toxicidade (corpo lúteo, reabsorções, peso fetal, alterações de vísceras e esqueleto).	Três casos de hidronefrose na dose de 5,08 mg/kg e um caso de hidrocefalia na dose de 12 mg/kg. NOAEL<2,25 mg/kg.	Carlton & Howard, 1982
Coelhas grávidas (New Zeland albino; 22/grupo).	TPTH (0; 0,1; 0,3 e 0,9 mg/kg/dia via entubação gástrica) do dia 6 ao dia 18 de gestação. Cesárea: dia 29. Desfechos avaliados: toxicidade materna (sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração) e embriofeto-toxicidade (corpo lúteo, reabsorções, implantações, peso fetal, alterações de vísceras e esqueleto).	O NOAEL para toxicidade materna foi de 0,1 mg/kg. NOAEL para embriofeto-toxicidade foi de 0,3 mg/kg	Rodwell, 1987
Ratas grávidas (<i>Sprague-Dawley</i> ; 45/grupo).	TPTH (0; 0,35; 1,0; 2,8 e 8,0 mg/kg/dia, na ração) do dia 6 ao dia 15 de gestação. Cesárea: dia 20. Desfechos avaliados: toxicidade materna (sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração) e embriofeto-toxicidade (corpo lúteo, número de fetos vivos e mortos, reabsorções, implantações, peso fetal, alterações de vísceras e esqueleto).	Não houve evidência de indução de efeitos estruturais irreversíveis (teratogenicidade). O NOAEL para a toxicidade materna foi de 1,0 mg/kg, e para embriofeto-toxicidade foi de 2,8 mg/kg.	Rodwell, 1985.
Ratos (<i>Wistar</i> ; 30/sexo/grupo).	Toxicidade reprodutiva – 2 gerações. TPTH (0; 0,4; 1,5 e 4,0 mg/kg/dia, na ração) durante o crescimento, acasalamento, gestação e lactação. Desfechos avaliados: sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração, fertilidade. Peso e análise morfológica dos órgãos dos pais e filhotes. Número de filhotes vivos e mortos.	Mortalidade e redução, dose-relacionada, do peso do timo e baço nos lactentes das gerações F1 e F2, nas doses de 1,5 e 4,0 mg/kg. NOAEL: 0,4 mg/kg.	Young, 1986

WHO, 1999 (modificado)

Com relação aos efeitos de compostos organoestanhos sobre o desenvolvimento sexual de ratos, machos e fêmeas, expostos durante o período da puberdade foram descritos, recentemente, por Grote *et al.* 2004 e Grote *et al.* 2006, respectivamente. Nesses estudos, os efeitos induzidos por compostos organoestanhos são: diminuição do peso dos órgãos imuno-competentes, dos testículos, dos epidídimos, da próstata e da vesícula seminal, diminuição dos níveis de testosterona e progesterona e aumento nos níveis de estradiol. No entanto, os resultados desses estudos não fornecem dados suficientes sobre marcos do desenvolvimento dos filhotes expostos *in utero* e durante a lactação, fertilidade e sobre o desenvolvimento sexual dos machos e das fêmeas, tais como, produção espermática diária, contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo, morfologia dos espermatozoides e histologia dos testículos, manutenção do ciclo estral e histopatologia do timo, baço e fígado. Outro estudo publicado recentemente encontrou uma redução da espermatogênese de camundongos adultos expostos, através de injeção intraperitoneal, ao hidróxido de fentina (Reddy *et al.*, 2006), porém, foi um estudo de curta duração (3 dias) e a via usada não é a principal via de exposição ao pesticida. Portanto, vários aspectos com relação aos efeitos trifenil hidróxido de estanho sobre os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas, e sobre a fertilidade devem ser esclarecidos.

I.5 Relevância do Estudo

A constatação de que compostos organoestanhos agridem fortemente o meio ambiente ocorreu há mais de duas décadas. No entanto, as tentativas de substituição por novos agentes antiincrustantes não se consumaram e os processos de regulamentação da produção, consumo e utilização destes compostos, além de serem extremamente lentos, diferem fortemente entre as diferentes nações.

Enquanto a maioria dos países europeus e os Estados Unidos baniram o uso de tintas antiincrustantes a base de estanho em embarcações de pequeno porte ainda na década de 1980, no Brasil e na grande maioria de países em desenvolvimento não existe legislação impondo restrições ou estabelecendo níveis permissíveis destes compostos no meio ambiente.

Como resultado da restrição de uso de compostos organoestanhosos como agentes antiincrustante em alguns países, a aplicação do TBT e TPT tornou-se menor na década de 1990. No entanto, é importante ressaltar que os compostos organoestanhosos permanecem no ambiente aquático devido ao seu amplo uso em embarcações de grande porte e em estruturas de auxílio a embarcações e ao acúmulo na cadeia biológica. Além disso, a falta de controle da produção, aplicação e monitoramento dos níveis de contaminação humana e ambiental em países em desenvolvimento contribuem para a permanência destes compostos em nosso meio.

Como se trata de um produto de uso agrícola (ANVISA, 2006), a preocupação com a exposição ocupacional deve prevalecer, sobretudo em países como o nosso, em que o consumo de pesticidas tem crescido rapidamente, mas na maioria dos casos, não existe controle eficaz sobre a venda destes produtos, não há monitoramento da exposição ocupacional, os diagnósticos dos casos de intoxicação são falhos e os equipamentos de proteção individual não são utilizados rotineiramente (Delgado & Paumgartten 2004 e Forget, 1991). Além disso, as decisões regulatórias em países em desenvolvimento baseiam-se em estimativas de risco realizadas para cenários de exposição de países desenvolvidos, que obviamente não levam em consideração tais peculiaridades do nosso meio.

Desta forma, podemos dizer que a resposta à questão levantada neste estudo é importante em termos de uma possível reavaliação de risco do TPTH, sobretudo em países como o nosso, em que compostos organoestanhosos são livremente comercializados, sem que, no entanto, haja dados disponíveis sobre contaminação humana ou ambiental. As informações obtidas neste estudo poderão subsidiar a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com dados que permitam a implementação de medidas de proteção da população exposta e na definição de uma legislação, que imponha restrições ou estabeleça níveis permissíveis desses compostos no meio ambiente.

II. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição pré e pós-natal ao TPTH sobre o desenvolvimento, maturação sexual e fertilidade de camundongos. O estudo foi dividido em duas etapas, a saber:

II.1 Avaliação dos efeitos adversos resultantes da exposição ao TPTH *in utero* (a partir do dia 6 de gestação) e durante a lactação sobre o desenvolvimento pós-natal da prole (Experimento 1), cujos objetivos específicos foram avaliar possíveis efeitos adversos sobre:

- ✓ gestação e ganho de peso materno;
- ✓ ganho de peso corporal dos filhotes;
- ✓ marcos físicos do desenvolvimento [aparecimento de pêlos (AP), descolamento de orelhas (DO), erupção de incisivos (EI), abertura de olhos (AO), descida de testículo (DT) e abertura de vagina (AV)];
- ✓ fertilidade;
- ✓ peso dos órgãos imuno-competentes (timo, baço e fígado) e dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimos, vesícula seminal, útero e ovários);
- ✓ produção espermática diária, número de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático;
- ✓ morfologia dos espermatozóides.

II.2 Avaliação dos efeitos adversos do TPTH sobre a reprodução de camundongos (machos e fêmeas) após exposição durante a pré-puberdade e puberdade, *i.e.* do dia 15 PN ao dia 45PN (Experimento 2), cujos objetivos específicos foram avaliar possíveis efeitos adversos sobre:

- ✓ ganho de peso corporal;
- ✓ marcos físicos do desenvolvimento (descida de testículo e abertura de vagina);
- ✓ ciclo estral;
- ✓ fertilidade;

- ✓ peso dos órgãos imuno-competentes (timo, baço e fígado) e reprodutivos (testículos, epidídimos, vesícula seminal, útero e ovários);
- ✓ produção espermática diária, número de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático;
- ✓ concentração hormonal (testosterona);
- ✓ morfologia dos espermatozóides;
- ✓ histologia testicular.

III. METODOLOGIA

III.1 Experimento 1

III.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, com idade entre 50 e 60 dias, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável (33,5 x 40,5 x 17,0 cm) e cama de maravalha de pinho branco e aclimatados durante os 10 dias que antecederam o início do experimento. Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais da FIOCRUZ (processo nº 0077-01), e todos os procedimentos que envolveram a manipulação animal foram realizados com base nas normas desta comissão. O experimento 1 foi realizado no Setor de Animais de Laboratório do INCQS – Fiocruz.

Os animais receberam água e ração comercial para ratos (Nuvilab® - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos sobre as seguintes condições ambientais: temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar (cerca de 70%) e ciclo claro-escuro constante (período claro de 8 às 20 horas). As trocas das camas de maravalha e água foram feitas três vezes por semana, e a ração foi substituída semanalmente. A seguir o desenho esquemático do experimento 1 (Figura 4).

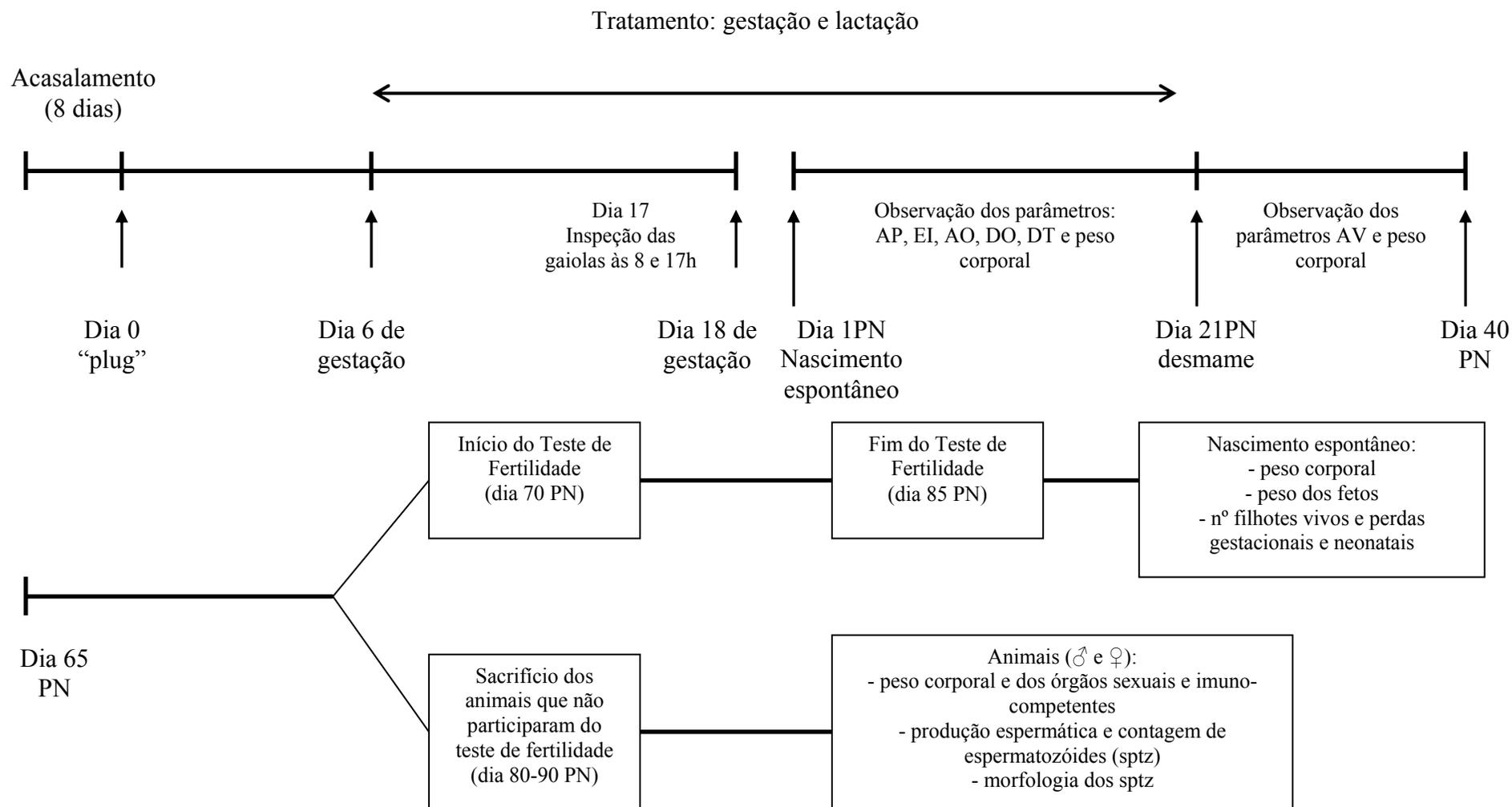


Figura 4: Desenho esquemático do experimento 1 (AP: aparecimento dos pêlos; EI: erupção dos incisivos; AO: abertura dos olhos; DO: descolamento das orelhas; DT: descida dos testículos e AV: abertura da vagina).

III.1.2 Acasalamento

O acasalamento dos animais ocorreu segundo o procedimento proposto por Chahoud & Kwasigroch (1977). Duas fêmeas foram transferidas para a gaiola de um macho durante as duas últimas horas do período escuro (6 às 8 horas da manhã). Em seguida as fêmeas foram retiradas e examinadas para a verificação da ocorrência do cruzamento. O cruzamento foi confirmado pela presença do “*plug*” (massa esbranquiçada de espermatozóides) na abertura vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do cruzamento foram consideradas como dia ‘0’ de gravidez.

III.1.3 Doses e Tratamento

Após a confirmação do cruzamento as fêmeas foram pesadas (dia zero), alojadas em gaiolas individuais e incluídas aleatoriamente a um dos seguintes grupos experimentais:

Grupo Experimental	Nº de fêmeas grávidas
Não tratado	N = 12
Controle (óleo de canola)	N = 18
1,875mg TPTH/kg de peso corporal	N = 17
3,75mg TPTH/kg de peso corporal	N = 18
7,50mg TPTH/kg de peso corporal	N = 18

O trifetil hidróxido de estanho (TPTH; Aldrich - Inc) foi diluído em óleo de canola (Mazola®) e administrado por via oral (entubação gástrica) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação. Dois grupos controle, um tratado apenas com o veículo (óleo de canola) e outro não-tratado, foram constituídos. As doses foram selecionadas baseadas em estudos anteriores (Viana, 2002 e Sarpa, 2003). As diluições foram feitas de modo a obter um volume de solução de 10 ml/kg de peso corporal. O tratamento foi realizado sempre na parte da manhã (8 às 12 horas). Os animais foram pesados diariamente durante todo o período de gestação e lactação.

III.1.4 Acompanhamento pré- e peri- natal

O peso corporal das fêmeas grávidas foi registrado no dia '0' de gestação e diariamente do dia 6 de gestação ao dia 21 pós-natal (desmame). Os animais foram observados quanto a alterações clínicas e comportamentais sugestivas de toxicidade materna, tais como, perda de pêlo, hipoatividade, piloereção e redução do consumo de ração.

A partir do dia 18 de gestação as gaiolas foram inspecionadas duas vezes ao dia, sempre às 8 horas e às 17 horas, para verificação do nascimento dos filhotes. Para obtenção dos dados da gravidez foram registrados os números de filhotes nascidos vivos e de natimortos. As fêmeas que não deram à luz até o dia 22 gestação e aquelas que, após terem dado à luz, canibalizaram toda a ninhada foram pesadas e sacrificadas por inalação de CO₂. As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal e o útero, o fígado, o baço e o timo de cada animal foram examinados. Os pesos do fígado, baço e timo foram registrados. As paredes uterinas foram seccionadas e seu conteúdo foi examinado. Após os conteúdos dos úteros terem sido examinados, os sítios de implantação foram identificados pelo método descrito por Salewisk (1964). O útero foi imerso em solução de sulfeto de amônio a 10% (Merck®), por 10 minutos. Em seguida, o útero foi lavado em água corrente e mergulhado por mais 10 minutos em uma solução formada por partes iguais de ferrocianeto de potássio a 20% e ácido clorídrico a 1% (Merck®). Após a coloração, os sítios de implantação, que aparecem como pontos escuros na parede uterina, foram localizados e contados.

III.1.5 Acompanhamento pós-natal

Após a verificação do nascimento, os filhotes foram identificados individualmente, através de injeção subcutânea de nanquim preto na pata. Os seguintes parâmetros foram registrados: peso individual, número de filhotes nascidos vivos e número de natimortos. Durante a avaliação destes parâmetros, que durou em média 5 minutos para cada ninhada, os filhotes foram mantidos afastados da mãe, sob condições controladas de temperatura.

O dia da verificação do nascimento foi considerado dia 1 pós-natal (Dia 1 PN). Do dia 1 PN até o final do período de lactação (dia 21 PN), cada filhote foi examinado diariamente para avaliação do aparecimento de marcos físicos do desenvolvimento (*i.e.* abertura dos olhos, aparecimento de pêlo, descolamento das orelhas e erupção dos incisivos e descida dos testículos). Todos os filhotes nascidos durante o experimento foram individualmente pesados nos dias 5, 10, 15, 20 e 25 PN e o peso destes animais, assim como as mortes ocorridas durante o período de lactação, foram registrados.

No dia do desmame, dia 21 PN, os filhotes foram separados de suas mães. Cada mãe foi então pesada e morta por inalação de CO₂. As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal para avaliação de alterações macroscópicas. O útero, timo, fígado e baço foram retirados e seus pesos registrados. Os sítios de implantação presentes no útero foram identificados pelo método descrito por Salewisk (1964). Os filhotes foram separados por sexo e alojados em gaiolas contendo um número máximo de 05 animais. A avaliação e o registro do dia da abertura completa do canal vaginal foram realizados após o desmame.

III.1.6 Teste da Fertilidade

Quando os filhotes expostos *in utero* e durante a lactação alcançaram a idade de cerca de 70 dias, teve início o teste da fertilidade. Um macho e três fêmeas provenientes de diferentes ninhadas e do mesmo grupo experimental foram selecionados aleatoriamente e alojados juntos durante 15 dias. Ao final do período de acasalamento as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais, que foram inspecionadas duas vezes ao dia para verificação do nascimento dos filhotes. No dia 1 pós-natal o número de filhotes vivos por ninhada foi registrado, as mães foram sacrificadas por inalação de CO₂ e o número de sítios de implantação foi determinado pelo método descrito por Salewisk (Salewisk, 1964). As fêmeas que não deram à luz até o 22º dia após o início do período de acasalamento foram submetidas a um segundo acasalamento similar ao primeiro, porém foram utilizados machos não tratados. Por outro lado, machos que não acasalaram com pelo menos duas fêmeas, foram submetidos a um segundo período de acasalamento de 15 dias com três fêmeas não tratadas.

III.1.7 Fêmeas na idade adulta

As fêmeas expostas *in utero* e durante a lactação que não participaram do teste de fertilidade foram pesadas e sacrificadas por inalação de CO₂ entre os dias 80 e 90 de vida. As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal e o útero, os ovários, o fígado e o baço de cada animal foram examinados, pesados e fixados para posterior análise histopatológica.

III.1.8 Machos na idade adulta

Ao alcançarem cerca de 90 dias de idade, os machos que não participaram do teste de fertilidade foram pesados e sacrificados por inalação de CO₂. As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal e testículos, epidídimos, vesícula seminal, fígado e baço foram retirados, examinados e pesados. O peso da vesícula seminal foi obtido após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem. Os testículos, epidídimos, fígado, baço e timo foram fixados para posterior análise histopatológica. Os animais foram avaliados quanto à contagem de espermátides e espermatozóides nos testículos e na cauda do epidídimo, respectivamente, e morfologia dos espermatozóides.

III.1.8.1 Número de espermatozóides e espermátides

Depois de pesados, os testículos e os epidídimos foram separados para determinação da produção espermática diária e da quantidade de espermatozóides, respectivamente. Os testículos tiveram a túnica albugínea removida e foram colocados separadamente em 1 ml de uma solução salina (cloreto de sódio 0,9%) contendo 0,5% de Triton X-100 (Sigma®) para homogeneização. O material foi processado em homegeneizador manual de tecidos. Então, 100µl do homogeneizado foram diluídos em 900µl de solução salina (diluição 1:10), do qual uma alíquota (10µl) foi colocada em câmara de Neubauer para contagem do número de espermátides resistentes à homogeneização (adaptado de Dalsenter *et al.*, 1997).

A contagem foi feita por microscopia ótica (Zeiss SV11, Alemanha - aumento 400x) contando-se as células presentes em quatro dos doze retículos maiores da câmara de Neubauer. O valor médio contado foi multiplicado pelo volume de diluição (100) e

dividido pelo volume da câmara de contagem (0,0001). O número de espermátides por animal foi obtido pela soma das contagens do testículo direito e esquerdo. Para estabelecer a produção espermática diária, o número de espermátides por grama de testículo de cada animal foi dividido por 4,84. A determinação deste divisor de tempo está baseada nos tipos celulares resistentes à homogeneização (espermátides 14-16) que estão presentes nos estágios II-VIII do ciclo do epitélio seminífero (Figura 5) (Parker, 2006). A série completa das associações celulares é conhecida como ciclo do epitélio seminífero, sendo que sua duração, isto é, o intervalo necessário para que todos os estágios apareçam em um ponto do túbulo seminífero é uniforme em cada espécie (Amann, 1982). No camundongo, as associações celulares abrangem 12 estágios diferentes. O ciclo espermatogênico do camundongo está ilustrado na Figura 5.

Para contagem do número de espermatozóides, depois de registrado o peso dos epidídimos, a cauda foi separada do corpo-cabeça, cortada em pequenos pedaços e colocada em 1ml de solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5% de Triton X-100 (Sigma®). Os epidídimos direito e esquerdo foram processados em homogeneizador manual de tecidos. Então, 50µl do homogeneizado foram diluídos em 950µl de solução salina (diluição 1:20), e uma alíquota (10µl) foi colocada em câmara de Neubauer (adaptado de Dalsenter *et al.*, 1997). Como descrito para as espermátides, a contagem dos espermatozóides por cauda de epidídimos foi feita por microscopia ótica, contando-se as células presentes em quatro dos doze retículos maiores da câmara de Neubauer. O valor médio contado foi multiplicado pelo volume de diluição (200) e dividido pelo volume da câmara de contagem (0,0001) (Parker, 2006). O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo foi obtido através da divisão do número de espermatozóides pela produção espermática diária (Amann, 1986).

Este processo está baseado no fato de que no final da espermatogênese os núcleos dos espermatozóides e das espermátides alongadas se tornam altamente condensadas e entrelaçadas, conseqüentemente o núcleo dos espermatozóides e das espermátides são resistentes à homogeneização, enquanto os núcleos das outras células germinativas e das células somáticas são destruídos (Amann, 1982).

III.1.8.2 Morfologia espermática

Para avaliar o percentual de espermatozoides morfologicamente anormais (defeitos na cabeça ou pedaço da cauda), uma suspensão de espermatozoides foi obtida através da lavagem da luz do ducto deferente com 0,3 ml de cloreto de sódio 0,9%. A lâmina foi preparada com uma alíquota dessa suspensão, secou a temperatura ambiente durante 24h e foi corada com vermelho congo e violeta de genciana (adaptado de Andrade *et al.*, 2002). A análise das lâminas, para avaliação de defeitos encontrados na cabeça, corpo e cauda dos espermatozoides encontra-se em andamento.

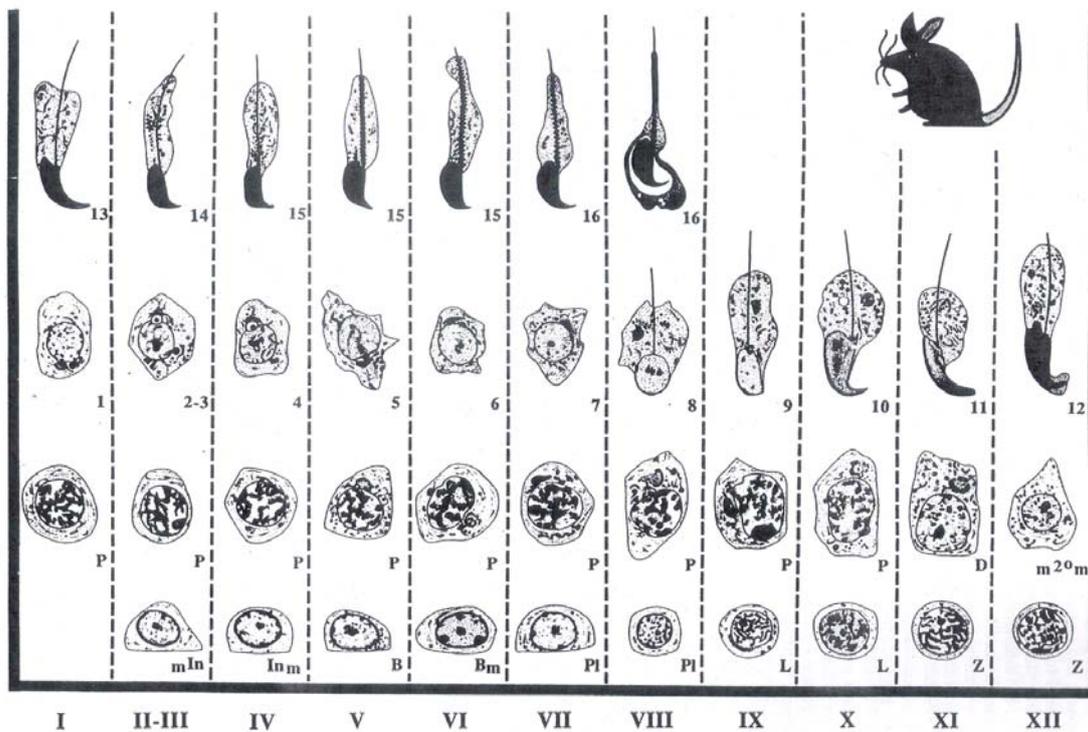


Figura 5: Estágios do ciclo espermático de camundongos (Zenick *et al.*, 1994).

III.1.9 Análise estatística

Para as variáveis que apresentam distribuição normal (paramétricas) os resultados foram comparados empregando a análise de variância de uma via (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Para as variáveis que não obedecem a distribuição normal, os resultados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney para determinar as diferenças entre dois grupos. As proporções foram analisadas pelo teste qui-quadrado.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, exceto na Tabela 7 [mediana (mínimo e máximo)]. O nível de significância estatística foi de 5% ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa SPSS® 12.0.

III.2 Experimento 2

III.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster, fêmeas grávidas, com idade entre 50 e 60 dias, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável (33,5 x 40,5 x 17,0 cm) e cama de maravalha de pinho branco. Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais da FIOCRUZ (processo nº P 0077-01), e todos os procedimentos que envolveram a manipulação animal foram realizados com base nas normas desta comissão. O experimento 2 foi realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental da ENSP – Fiocruz.

Os animais receberam água e ração comercial para ratos (Nuvilab® - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos no biotério, com os seguintes controles ambientais: temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar (cerca de 70%) e ciclo claro-escuro constante (período claro de 8 às 20 horas). As trocas das

camas de maravalha e água foram feitas três vezes por semana e a ração foi substituída semanalmente.

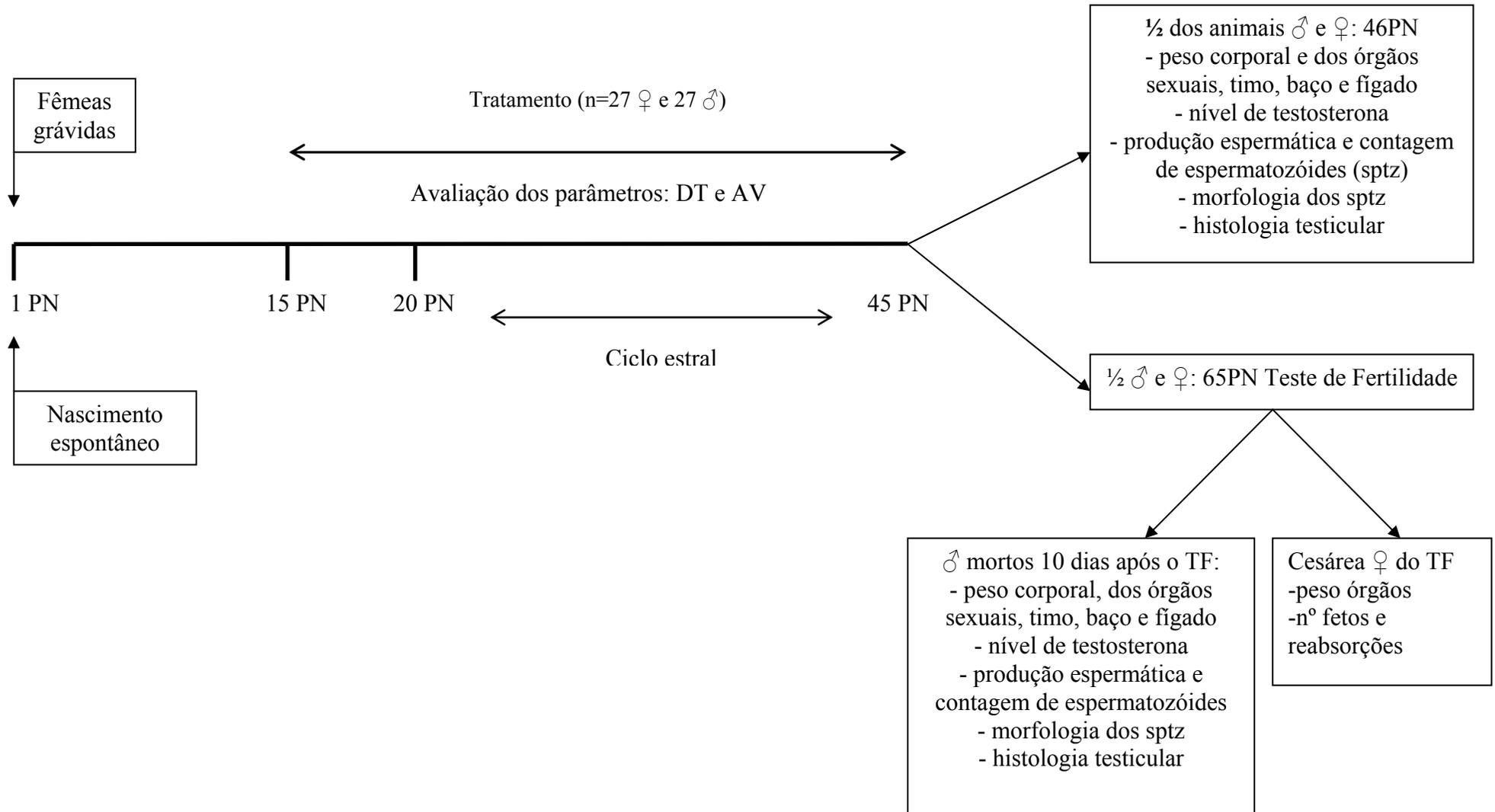


Figura 6: Desenho do experimento 2 (DT: descida dos testículos; AV: abertura da vagina; TF: teste de fertilidade; PN: pós-natal)

III.2.2 Doses e Tratamento

Após a verificação do nascimento, somente cinco filhotes machos e cinco fêmeas, de cada ninhada, permaneceram no estudo para compor os cinco grupos ([Figura 7](#)). No dia 15 pós-natal os filhotes, machos e fêmeas, provenientes da mesma ninhada, foram incluídos aleatoriamente a um dos seguintes grupos experimentais:

Grupo Experimental	Fêmeas	Machos
Controle (óleo de milho)	23	26
1,875 mg TPTH/kg de peso corporal	22	26
3,75 mg TPTH/kg de peso corporal	21	24
7,50 mg TPTH/kg de peso corporal	27	27
15 mg TPTH/kg de peso corporal	21	26

O trifetil hidróxido de estanho (Aldrich, Inc) foi diluído em óleo de milho grau farmacêutico (Sigma®) e administrado por via oral (entubação gástrica) do dia 15 ao dia 45 pós-natal, nas doses de 1,875; 3,75; 7,5 e 15mg TPTH/kg de peso corporal. As doses foram selecionadas baseadas em estudos anteriores (Viana, 2002 e Sarpa, 2003). As diluições foram feitas de modo a obter um volume de solução de 10 ml/kg de peso corporal. Um grupo controle, tratado apenas com o veículo (óleo de milho), foi constituído. O tratamento foi realizado sempre na parte da manhã (8 às 12 horas). Os animais foram pesados diariamente durante todo o período de tratamento. No dia do desmame, *i.e.* dia 21 pós-natal, os filhotes foram separados de sua mãe, divididos por sexo e alojados em gaiolas contendo um número máximo de 05 animais.

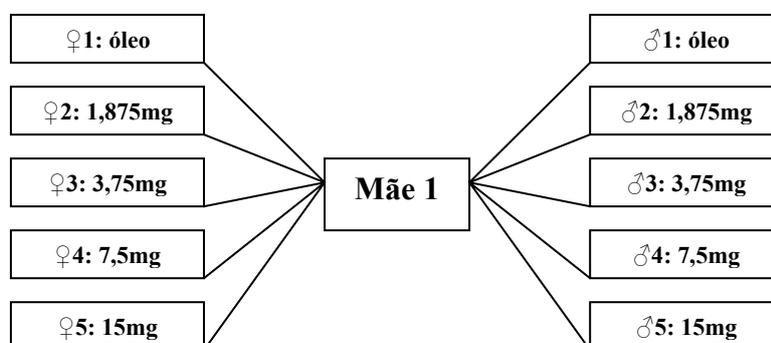


Figura 7: Grupos formados para tratamento

III.2.3 Toxicidade geral

Para avaliar a toxicidade geral induzida pelo TPTH, os animais foram pesados diariamente durante todo o período de tratamento e monitorados quanto à mortalidade e alterações clínicas e comportamentais, tais como, perda de pêlo, hipoatividade e redução do consumo de ração.

III.2.4 Acompanhamento pós-natal

Durante a lactação, *i.e.* a partir do dia 15 pós-natal, os filhotes machos foram avaliados diariamente para determinar o dia da descida dos testículos através da palpação da bolsa escrotal. As fêmeas foram examinadas diariamente, a partir do dia 20 pós-natal, para o registro do dia em que houve completa abertura do canal vaginal. A partir do dia que foi registrado a abertura do canal vaginal, o ciclo estral das fêmeas foi monitorado pela observação das mudanças citológicas do esfregaço vaginal durante, pelo menos, três ciclos completos. O esfregaço foi realizado com auxílio de uma micropipeta, através da lavagem vaginal com 50 µl de água destilada e posterior avaliação, *a fresco*, dos tipos celulares do epitélio vaginal em microscopia óptica (Zeiss SV11, Alemanha - aumento de 200x). A avaliação do esfregaço vaginal foi baseada nos seguintes critérios citológicos que caracterizam o estágio do ciclo estral: predominância de células epiteliais nucleadas (proestro); predominância de células epiteliais cornificadas (estro); presença de células epiteliais cornificadas e/ou leucócitos (metaestro); presença abundante de leucócitos (diestro) (Chahoud & Kwasigroch, 1977; U.S. EPA, 1996). O monitoramento do ciclo estral foi realizado somente na metade das fêmeas, *i.e.* das fêmeas que participaram do teste de fertilidade. O lavado vaginal para o preparo da lâmina foi realizado no dia em que foi observada a completa abertura da vagina até o dia 65 pós-natal.

III.2.5 Fim do tratamento (45 PN)

A metade dos animais (machos e fêmeas) expostos ao TPTH do dia 15 ao 45 pós-natal foi morta no dia seguinte ao fim do tratamento (Figura 6) e avaliada quanto ao peso corporal e dos órgãos, número de espermátides e espermatozóides, morfologia espermática, histologia testicular e níveis de testosterona.

III.2.5.1 Peso corporal e dos órgãos reprodutivos, fígado, baço e timo das fêmeas

Para verificar os possíveis efeitos imediatos da exposição ao TPTH durante a puberdade, após o período de tratamento, metade das fêmeas foi escolhida aleatoriamente e sacrificada por deslocamento cervical. Os pesos do fígado, baço e timo foram registrados, bem como, o peso dos seus órgãos reprodutivos, útero e ovários. Após serem pesados os órgãos foram fixados em Millonig de Carlson (100 ml formol a 40%; 900 ml água destilada; 18,6g fosfato monobásico de sódio; 4,2g hidróxido de sódio) para posterior análise histopatológica. Antes de serem sacrificadas, as fêmeas que estavam no estro foram anestesiadas com éter etílico e tiveram o sangue do plexo orbital coletado para posterior determinação da concentração de estradiol e progesterona.

III.2.5.2 Peso corporal e dos órgãos reprodutivos, fígado, baço e timo dos machos

A partir do dia 46 pós-natal, os filhotes machos foram pesados e anestesiados com éter etílico. Amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital, e os animais foram mortos por deslocamento cervical. Os testículos, epidídimos e a vesícula seminal foram removidos e pesados. A vesícula seminal foi pesada após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem. O fígado, o baço e timo também foram pesados e fixados para posterior análise histopatológica. Os animais foram avaliados quanto à produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo, concentração de testosterona sanguínea, morfologia dos espermatozóides e histologia testicular.

III.2.5.3 Número de espermátides e espermatozóides

Depois de pesados, os testículos e os epidídimos foram separados para determinação da produção espermática diária e da quantidade de espermatozóides, respectivamente. Os testículos (direito) tiveram a túnica albugínea removida e foram colocados em 1 ml de uma solução salina (cloreto de sódio 0,9%) contendo 0,5% de Triton X-100 para homogeneização. O material foi processado em homegeneizador manual de tecidos. Então, 100µl do homogeneizado foram diluídos em 900µl de solução salina (diluição 1:10), do qual uma alíquota (10µl) foi colocada em câmara de Neubauer para contagem do número de espermátides resistentes à homogeneização (adaptado de Dalsenter *et al.*, 1997).

A contagem foi feita por microscopia ótica (Zeiss SV11, Alemanha - aumento 400x) contando-se as células presentes em quatro dos doze retículos maiores da câmara de Neubauer. O valor médio contado foi multiplicado pelo volume de diluição (100) e dividido pelo volume da câmara de contagem (0,0001). Nos animais em que um dos testículos foi utilizado para a histologia testicular, o número de espermátides contadas foi multiplicado por dois para estimar o número de espermátides por animal. Para estabelecer a produção espermática diária, o número de espermátides por grama de testículo de cada animal foi dividido por 4,84.

Para contagem do número de espermatozóides, depois de registrado o peso dos epidídimos, a cauda foi separada do corpo-cabeça, cortada em pequenos pedaços e colocada em 1mL de solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5% de Triton X-100. Os epidídimos direito e esquerdo foram processados em homegeneizador manual de tecidos. Então, 50µl do homogeneizado foram diluídos em 950µl de solução salina (diluição 1:20), e uma alíquota (10µl) foi colocada em câmara de Neubauer (adaptado de Dalsenter *et al.*, 1997). Como descrito para as espermátides, a contagem dos espermatozóides por cauda de epidídimos foi feita por microscopia ótica, contando-se as células presentes em quatro dos doze retículos maiores da câmara de Neubauer. O valor médio contado foi multiplicado pelo volume de diluição (200) e dividido pelo volume da câmara de contagem (0,0001) (Parker, 2006). O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo foi obtido através da divisão do número de espermatozóides pela produção espermática diária (Amann, 1986).

III.2.5.4 Morfologia espermática

Para avaliar o percentual de espermatozoides morfologicamente anormais (defeitos na cabeça ou pedaço da cauda), uma suspensão de espermatozoides foi obtida através da lavagem da luz de cada ducto deferente com 0,3 ml de cloreto de sódio 0,9%. A lâmina foi preparada com uma alíquota dessa suspensão, mantida a temperatura ambiente durante 24h e posteriormente corada com vermelho congo e violeta de genciana (adaptado de Andrade *et al.*, 2002). Duzentos espermatozoides (somente cabeça ou espermatozoide intacto) por animal foram analisados em microscópio (Zeiss SV11 - aumento de 1000x - imersão) quanto à presença de defeitos na cabeça e/ou cauda. As classificações individuais dos espermatozoides estão descritas abaixo.

Anomalias de cabeça	Anomalias de cauda	Outras anomalias
Duas cabeças	Flagelo enrolado	Cauda quebrada
Gancho reduzido	Flagelo torto	Gancho rombudo
Cabeça de banana	Ponta do flagelo torta	
Cabeça de alfinete		
Cabeça em forma de gota		
Cabeça invertida		
Sem gancho		
Cabeça separada		
Gancho excessivo		
Amorfo		
Cabeça curta		

(adaptado de Filler, 1993)



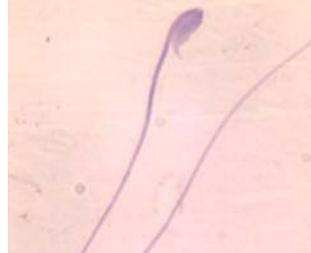
Espermatozóides Normais



Cabeça redonda



Cabeça de alfinete



Cabeça invertida



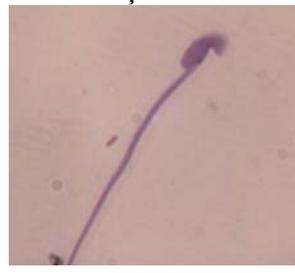
Cabeça gigante



Cabeça estreita



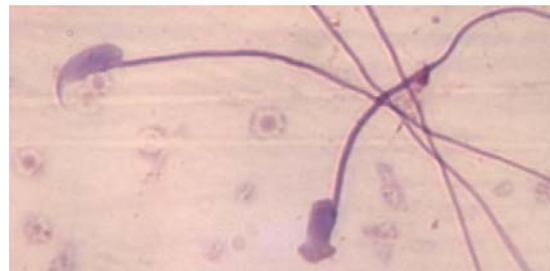
Cabeça anã



Gancho acentuado



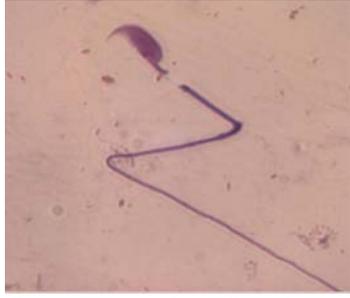
Gancho reduzido



Cabeça amorfa

Figura 8: Morfologia dos espermatozóides

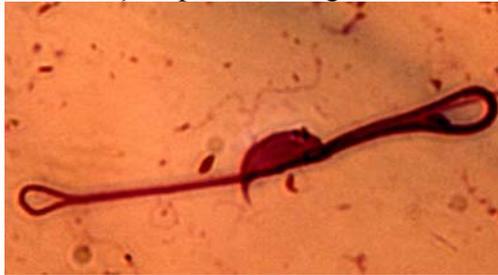
Continuação da Figura 8



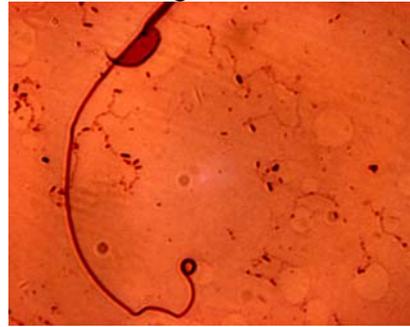
Cabeça separada e flagelo torto



Flagelo torto



Flagelo enrolado



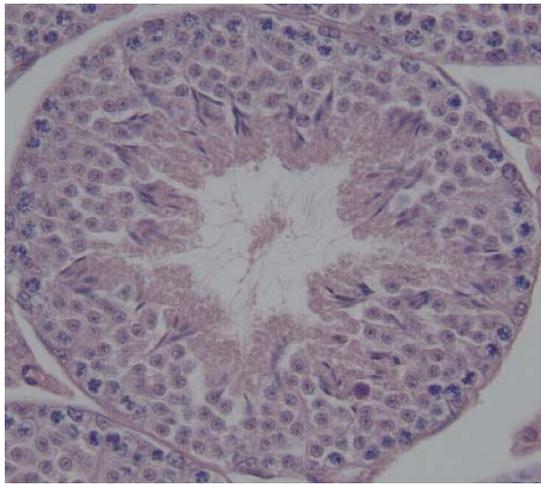
Ponta do flagelo enrolada

III.2.5.5 Histologia Testicular

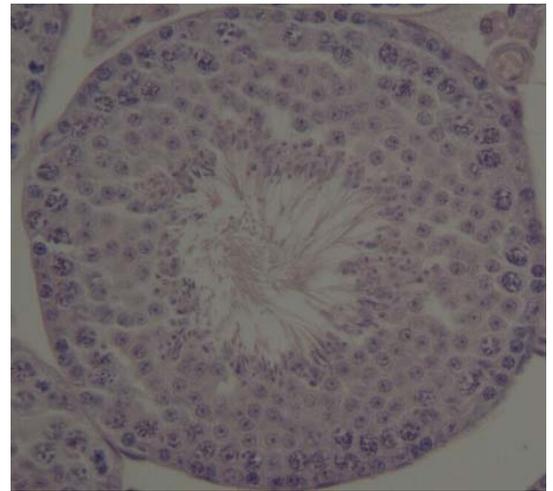
Para análise histológica, o testículo esquerdo de cada animal foi pesado e fixado em solução de Bouin (300 ml de água destilada; ácido pícrico à saturação; 20 ml ácido acético glacial; 100 ml formaldeído) durante 6 horas e posteriormente fixado em Millonig de Carlson (*adaptado de* Garagna, 2005). Após a fixação, os testículos foram clivados e processados (desidratação, clarificação e impregnação). A impregnação foi feita em parafina durante 3h a 56°C, e subsequentemente emblocadas (inclusão). Foram realizados cortes transversais de 5µm de espessura que foram corados com hematoxilina/eosina para posterior análise histológica.

Após o preparo das lâminas, os diâmetros dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio foram medidos. Como os túbulos seminíferos apresentam uma variabilidade natural nos diâmetros, foram selecionados cinco túbulos seminíferos por animal apresentando contornos mais circulares e com associações celulares específicas dos estágios VII-VIII. As medidas foram feitas com o auxílio da ocular micrométrica (Zeiss SV11 – Alemanha).

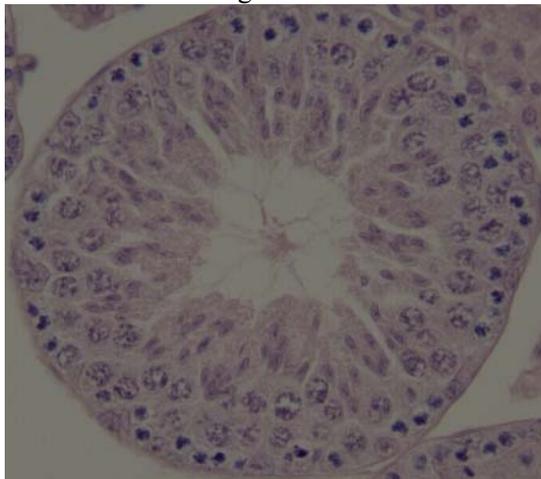
Outro parâmetro avaliado foi à análise histopatológica dos túbulos para detectar anormalidades, tais como, vacuolização, perda de adesão das células (“sweling”), aparência das células de Sertoli, hiperplasia ou hipertrofia das células de Leydig do interstício, presença de células descamadas na luz dos túbulos, organização da arquitetura celular dos túbulos, degeneração de células germinativas, espermátides retidas e espermição tardia. Além disso, 50 secções de túbulos de cada testículo foram analisadas microscopicamente para determinar a frequência dos estágios dos túbulos, que foram divididos da seguinte forma: I-VI, VII-VIII, IX-XI e XII (em andamento) (Figura 9).



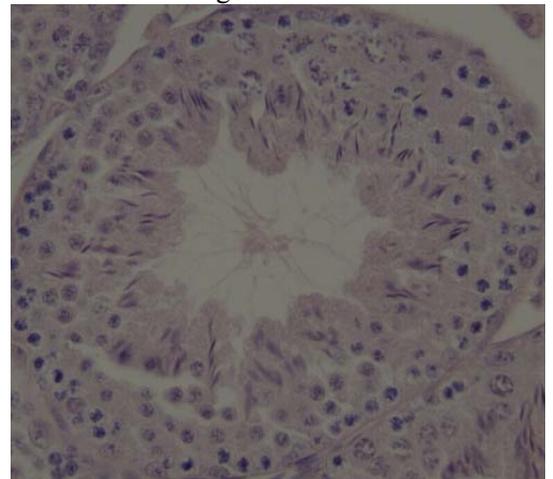
Estágios I – VI



Estágios VII – VIII



Estágios IX – XI



Estágio XII

Figura 9: Aspecto histológico dos estágios dos túbulos seminíferos de camundongos em cortes transversais corados com H&E

III.2.5.6 Quantificação da testosterona

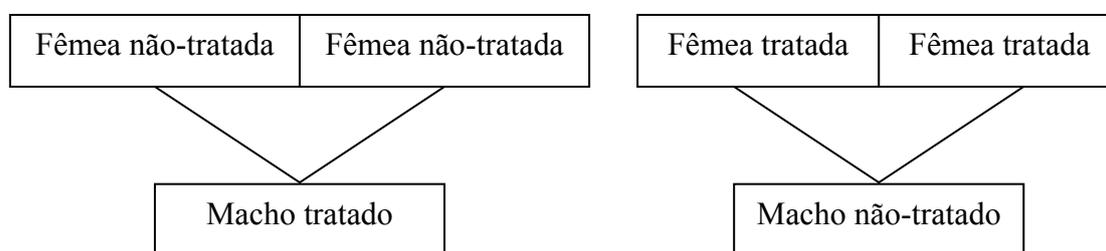
Para a determinação da concentração de testosterona sanguínea, amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital (sempre às 10 horas da manhã). O sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos (MiniSpin - Eppendorf) e o soro foi separado e mantido a -18°C até o momento da análise. A concentração de testosterona foi determinada por imunoenensaio competitivo (Free Testosterone Elisa, ARP, Inc™). O princípio deste ensaio está baseado na competição entre a testosterona da amostra e a testosterona conjugada utilizada como reagente para uma quantidade constante de anticorpo antitestosterona. Foram adicionados 25µl da amostra, do padrão e do controle (em duplicata) nos poços previamente sensibilizados com o anticorpo antitestosterona. Em seguida, foram adicionados 100µl de testosterona conjugada e a placa incubada por 60 minutos a 37 °C. Os poços foram lavados três vezes com 300µl de tampão de lavagem diluído. Após a lavagem, foram adicionados 150µl da solução reagente TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina), a placa foi homogeneizada e incubada por 15 minutos em estufa a 37 °C, ao abrigo da luz. Então, 50µl da solução de parada foi adicionada e a medida a absorvância espectrofotometricamente em 450 nm (Biotek Instruments, INC). A construção da curva padrão foi feita com seis soluções de referência contendo concentrações conhecidas de testosterona, que foram relacionadas com as absorvâncias lidas. Os níveis de testosterona livre das amostras (pg/ml), foram determinados com a plotagem da absorvância na curva padrão. Foi utilizado um controle, que juntamente com os padrões e amostras foram feitos em duplicata, e reportada a média obtida.

III.2.6 Teste da Fertilidade

Quando a outra metade dos filhotes expostos ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade alcançou à idade de 65 dias ([Figura 6](#)), teve início o teste de fertilidade. O acasalamento dos animais ocorreu segundo o procedimento proposto por Chahoud & Kwasiogoch (1977). Duas fêmeas não-tratadas (65 dias de vida) foram transferidas para a gaiola de um macho exposto ao TPTH, e duas fêmeas tratadas foram alojadas com um macho não-tratado (65 dias de vida), durante as duas últimas horas do período escuro (6 às 8 horas da manhã). Em seguida as fêmeas foram retiradas e examinadas para a verificação da ocorrência do cruzamento. O cruzamento foi confirmado pela presença

do “*plug*” (massa esbranquiçada de espermatozóides) na abertura vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do cruzamento foram consideradas como dia ‘0’ de gravidez. O procedimento do acasalamento foi repetido diariamente durante oito dias. Os machos e as fêmeas, que não cruzaram nos primeiros oito dias do teste de fertilidade, foram submetidos a um segundo período de acasalamento com novas fêmeas e novos machos não-tratados e com comprovada fertilidade.

1º cruzamento



2º cruzamento



Figura 10: Esquema do teste de fertilidade

III.2.7 Cesariana

No dia 16 de gestação as fêmeas que participaram do teste de fertilidade foram sacrificadas por deslocamento cervical. As cavidades abdominais foram abertas por uma

ampla incisão longitudinal e o útero gravídico, os ovários, o fígado, o baço e o timo de cada animal foram examinados. Os pesos do fígado, baço, timo e ovários foram registrados. O útero foi pesado com todo o seu conteúdo e posteriormente aberto, mantendo sempre a mesma posição que ocupava no ventre materno. A parede uterina foi seccionada com cuidado para evitar danos aos fetos. O número de sítios de implantação, fetos vivos e mortos e o número de reabsorções (intermediária e tardia) foram registrados. Após os conteúdos dos úteros terem sido examinados, os sítios de implantação foram identificados pelo método descrito por Salewisk (1964).

III.2.8 Machos que participaram do teste de fertilidade

No dia 75 pós-natal, os machos adultos que participaram do teste de fertilidade foram pesados e anestesiados com éter etílico. Amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital, e os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos, epidídimos e a vesícula seminal foram removidos e pesados. A vesícula seminal foi pesada após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem. Os pesos do fígado, baço e timo também foram registrados. Todas as variáveis avaliadas nos filhotes machos sacrificados após o tratamento também foram avaliadas nos machos adultos que participaram do teste de fertilidade. Os animais foram avaliados quanto à produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo, morfologia dos espermatozóides, histologia testicular e nível de testosterona no sangue (conforme itens *III.2.5.3 ao III.2.5.6*).

III.2.9 Análise estatística

Para as variáveis que apresentam distribuição normal (paramétricas) os resultados foram comparados empregando a análise de variância de uma via (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Para as variáveis que não obedecem a distribuição normal, os resultados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney para determinar as diferenças entre dois grupos. As proporções foram analisadas pelo teste qui-quadrado.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, exceto na Tabela 14 [mediana (mínimo e máximo)]. O nível de significância estatística foi de 5% ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa SPSS® 12.0.

IV. RESULTADOS

IV.1 Experimento 1

IV.1.1 Efeitos sobre o organismo materno

A Tabela 1 mostra a evolução ponderal das fêmeas tratadas com TPTH durante a gravidez e lactação. O ganho de peso materno ao longo da gestação, assim como durante o período de lactação, não diferiu entre os grupos tratados com as diferentes doses de TPTH e os dois grupos controle.

IV.1.2 Efeito sobre os órgãos maternos

Na Tabela 2 podem ser encontrados os valores de peso absoluto do timo, fígado, baço, ovários e útero maternos no dia do desmame, assim como o peso relativo [(peso do órgão ÷ peso corporal) x 100] destes órgãos.

Foi observado um aumento do peso relativo do fígado na dose de 7,5mg TPTH/kg ($7,05 \pm 0,42$) em relação aos controles e demais doses estudadas (NT = $6,38 \pm 0,50$; óleo = $6,50 \pm 0,61$; 1,875mg/kg = $6,70 \pm 0,57$; 3,75mg/kg = $6,47 \pm 0,51$). Houve também redução dos pesos relativos do útero na dose de 7,5mg TPTH/kg, em relação ao controle veículo (óleo) (Tabela 2).

IV.1.3 Efeito da exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH sobre o nascimento e desenvolvimento pós-natal

A Tabela 3 mostra o número médio de sítios de implantação evidenciada ao desmame, o número de perdas gestacionais e neonatais, o tamanho médio das ninhadas ao nascimento (dia 1 PN) e o número de filhotes ao desmame (dia 21PN). O número médio de sítios de implantação por útero (avaliado nas mães sacrificadas ao desmame através do método de Salewisk) e o número médio de nascimentos por ninhada, não diferem significativamente entre os grupos experimentais. Não há diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais quanto ao tamanho médio da ninhada ao nascimento. Durante o período de lactação, algumas mortes de filhotes foram

registradas, mas estas ocorreram em todos os grupos experimentais, inclusive no grupo não tratado. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao número médio de filhotes por ninhada ao desmame.

A Tabela 4 mostra os dados referentes à mortalidade materna e à mortalidade pré-, peri-e pós-natal da prole exposta ao TPTH *in utero* e durante lactação. Não observamos mortes maternas durante o período de tratamento. Logo após o nascimento, três ninhadas do grupo que recebeu 7,5 mg TPTH/kg foram totalmente canibalizadas pelas mães (Tabela 2). Não foi observado canibalismo em nenhum outro grupo experimental. Nos filhotes dos grupos em que não houve canibalismo, não observamos anomalias nos filhotes.

IV.1.4 Efeito da exposição ao TPTH sobre o ganho de peso médio dos filhotes

A Tabela 5 mostra o peso médio dos filhotes durante os primeiros 25 dias do desenvolvimento pós-natal. Há uma evidente redução – dose relacionada – do peso médio dos filhotes ao nascimento. Embora essa redução seja observada em todos os níveis de dose houve recuperação ponderal de modo que, a partir do dia 5 pós-natal, os grupos não mais diferem entre si.

O ganho de peso (Δp) dos filhotes expostos *in utero* e durante a lactação ao TPTH, é apresentado na Tabela 6. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais quanto ao ganho de peso nos períodos analisados.

Tabela 1: Ganho de peso materno de camundongos tratados oralmente com TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tratamento	TPTH (mg/kg peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,5
Fêmeas grávidas (N)	12	18	17	18	18
Fêmeas no dia 1PN (N)	12	18	17	18	18
Fêmeas no dia 21 PN (N)	12	18	17	18	15♣
Peso materno (g)					
Dia 0	30,5±2,7	31,2±1,9	30,6±3,2	30,0±1,8	30,1±2,4
Dia 18	62,7±7,8	63,3±5,6	65,5±5,8	61,3±4,5	61,3±5,9
Ganho de peso materno (g)					
Dia 6-0	5,1±1,1	5,5±1,1	5,9±0,9	5,7±1,2	5,8±1,1
Dia 11-6	6,7±1,9	5,2±0,9	5,6±1,0	5,4±1,4	5,4±1,7
Dia 15-6	16,6±3,4	15,5±2,2	17,0±2,1	15,8±2,5	16,3±2,7
Dia 18-0	32,3±6,3	32,1±4,4	34,9±3,4	31,3±3,3	31,3±4,7
Peso materno pós-natal (g)					
Dia 1 pós-natal	40,9±4,2	43,2±2,9	43,1±3,9	41,1±3,2	40,9±3,2
Dia 21 pós-natal	49,2±5,4	49,4±4,4	49,5±4,9	47,2±4,2	48,7±4,86
Ganho de peso materno pós-natal(g)					
Dia 21 PN – 1 PN	8,2±3,2	6,1±3,2	6,46±4,3	6,1±3,1	7,8±2,8

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle não tratado; **b**: diferente do controle óleo; **c**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg. ♣: Todas as mortes ocorreram no período peri-natal (dia 1 PN).

Tabela 2: Peso dos órgãos maternos no dia 21 pós-natal de camundongos tratados oralmente com TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,5
Fêmeas (dia 21PN)	12	18	17	18	15
Timo (g)	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01
Timo %	0,04±0,02	0,04±0,02	0,04±0,03	0,05±0,03	0,04±0,03
Fígado (g)	3,14±0,48	3,20±0,32	3,33±0,51	3,06±0,34	3,43±0,40 ^d
Fígado %	6,38±0,50	6,50±0,61	6,70±0,57	6,47±0,51	7,05±0,42 ^{a, b, c, d}
Baço (g)	0,22±0,13	0,23±0,07	0,23±0,07	0,19±0,06	0,19±0,06
Baço %	0,44±0,24	0,47±0,15	0,46±0,12	0,40±0,11	0,39±0,10
Ovário (g)	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
Ovário %	0,07±0,02	0,07±0,02	0,07±0,03	0,06±0,02	0,06±0,03
Útero (g)	0,12±0,04	0,14±0,06	0,12±0,07	0,10±0,04	0,09±0,05
Útero %	0,24±0,08	0,27±0,11	0,24±0,12	0,22±0,08	0,20±0,11 ^b
Peso do animal no dia 21 PN (g)	49,20±5,4	49,40±4,4	49,50±4,9	47,20±4,2	48,70±4,86

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle não tratado; **b**: diferente do controle óleo; **c**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 3,75 mgTPTH/kg.

Tabela 3: Dados do nascimento e do desmame de camundongos expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5mg/kg de peso corporal) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,50
Sítios de implantação					
Total (ninhada)	141 (12)	228 (18)	221 (17)	220 (18)	195 (15)
N por ninhada (média ±DP)	11,75±2,01	12,67±1,75	13,00±1,90	12,22±1,63	13,00±2,24
Perdas gestacionais e neonatais					
Total (ninhada)	20 (10)	31 (14)	24 (9)	28 (14)	33 (15)
Por sítios de implantações (%)	13,71	12,53	9,58	12,21	16,62
Por ninhada (média ±DP)	1,67±1,30	1,72±2,40	1,41±2,83	1,56±1,46	2,20±1,56
Nº de filhotes ao nascimento					
Total (ninhada)	121 (12)	197 (18)	197 (17)	192 (18)	162 (15)
Por sítios de implantações (%)	86,29	87,47	90,42	87,79	83,38
Por ninhada (média ±DP)	10,08±1,73	10,94±2,01	11,59±2,60	10,67±1,64	10,80±2,24
Nº de filhotes ao desmame					
Total (ninhada)	118 (12)	197 (18)	189 (17)	180 (18)	143 (15)
Por sítios de implantações (%)	84,42	87,47	87,11	82,65	74,11
Por ninhada (média ±DP)	9,83±1,59	10,94±2,01	11,12±2,37	10,00±1,94	9,53±2,61

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney, ou por Qui-quadrado. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle não tratado; **b**: diferente do controle óleo; **c**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 3,75 mgTPTH/kg.

Tabela 4: Mortalidade materna e mortalidade pré-, peri- e pós-natal de camundongos expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5mg/kg de peso corporal) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,50
Fêmeas grávidas (Salewisk positivo)	12	18	17	18	18
Mortalidade Materna	0	0	0	0	0
Nascimento prematuro (antes do dia 18 de gestação)	0	0	0	0	0
Mortalidade pré-natal (grávidas que não deram a luz até o dia 22 gestação)	0	0	0	0	0
Mortalidade peri- e pós-natal (mortalidade de toda a ninhada)	0	0	0	0	3♣
Mortalidade peri- e pós-natal/Grávida (%)	0%	0%	0%	0%	16,6%
Ninhadas viáveis ao nascimento	12	18	17	18	18
Ninhadas viáveis ao desmame	12	18	17	18	15

Os valores percentuais foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. Em todos os casos a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. ♣: Todas as mortes ocorreram no período peri-natal (dia 1PN).

Tabela 5: Peso médio dos filhotes expostos *in utero* e durante a lactação ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia).

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,5
Ninhadas (N)	12	18	17	18	15
Dia 1 pós-natal	1,79±0,15	1,76±0,13	1,67±0,11 ^{a, b}	1,66±0,11 ^{a, b}	1,57±0,12 ^{a, b, c, d}
Dia 5 pós-natal	2,96±0,40	2,94±0,28	2,95±0,39	2,98±0,34	2,87±0,28
Dia 10 pós-natal	5,30±0,94	5,01±0,69	5,03±0,67	5,19±0,64	4,96±0,71
Dia 15 pós-natal	6,98±1,43	6,61±0,92	6,53±1,00	6,63±1,04	6,61±1,15
Dia 20 pós-natal	9,42±2,51	8,48±1,51	8,43±1,65	8,24±1,85	8,56±1,97
Dia 25 pós-natal	15,22±3,86	14,11±2,09	14,00±2,73	14,19±3,21	14,50±3,53

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle não tratado; **b**: diferente do controle óleo de canola; **c**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 3,75 mgTPTH/kg.

Obs: A ninhada usada como unidade de análise e os valores representam a média das médias por ninhada. O desmame foi realizado no dia 21 PN.

Tabela 6: Ganho de peso dos filhotes (ninhada) expostos *in utero* e durante a lactação ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia).

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,5
Ninhadas (N)	12	18	17	18	15
Ganho de peso					
Dia 5-1 PN	1,17±0,33	1,18±0,23	1,28±0,33	1,33±0,29	1,30±0,21
Dia 10-1 PN	3,51±0,86	3,25±0,63	3,36±0,61	3,54±0,62	3,39±0,66
Dia 20-1 PN	7,63±2,43	6,73±1,45	6,76±1,63	6,58±1,82	6,99±1,92
Dia 25-1 PN	13,44±3,81	12,35±2,04	12,33±2,69	12,54±3,18	12,92±3,48
Dia 20-5 PN	6,46±2,16	5,55±1,33	5,48±1,49	5,26±1,69	5,69±1,80
Dia 25-10 PN	9,92±3,06	9,10±1,47	8,97±2,31	9,00±2,75	9,54±2,86

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle não tratado; **b**: diferente do controle óleo de canola; **c**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 3,75 mgTPTH/kg.

IV.1.5 Efeitos da exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH sobre o aparecimento dos marcos do desenvolvimento pós-natal

Os dados relativos ao aparecimento dos marcos físicos do desenvolvimento pós-natal avaliados neste estudo são mostrados na Tabela 7. O TPTH não alterou o aparecimento dos marcos do desenvolvimento estudados, *i.e.* descolamento da orelha, aparecimento de pêlo, erupção de incisivos, abertura de olhos, abertura de vagina e descida de testículo (Tabela 7).

Tabela 7: Marcos do desenvolvimento pós-natal de filhotes de camundongos expostos ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5mg/kg de peso corporal) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,50
Ninhadas (N)	12	18	17	18	15
Dia do descolamento da orelha	5 (5-6)	5 (4-6)	5 (4-6)	5 (4-6)	5 (4-5)
Ninhadas (N)	12	18	17	18	15
Dia do aparecimento de pêlo	5 (4-6)	5 (4-6)	5 (5-6)	5 (4,5-7)	5 (5-6)
Ninhadas (N)	12	18	17	18	15
Dia da erupção dos incisivos	9 (8-10)	9 (8-10)	9 (8-10)	8 (8-10)	8,5 (8-10)
Ninhadas (N)	12	18	17	18	15
Dia da abertura dos olhos	16 (15-17)	16 (14-17)	16 (15-17)	16 (15-17)	16 (15-18)
Ninhadas (N)	11	18	17	18	15
Dia da abertura de vagina	27 (25-33)	27,5 (25-31)	28 (26-32)	27,5 (24-34)	29 (25-33)
Ninhadas (N)	12	18	17	18	15
Dia da descida de testículo	22 (21-26)	22 (22-27)	22,5 (21-26)	23 (21-30)	23 (21-29)

Os dados são apresentados como mediana (mínimo - máximo). Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney (análise por ninhada - mediana das medianas). Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

IV.1.6 Efeito da exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH sobre fertilidade

A Tabela 8 mostra os resultados do Teste de Fertilidade realizado com animais adultos expostos *in utero* e durante a lactação ao TPTH. Como pode ser visto na Tabela 8, a proporção de fêmeas que deram à luz por fêmeas que cruzaram, e a razão do número de machos que acasalaram com pelo menos duas fêmeas pelo total de machos não difere entre os grupos tratados com TPTH e os grupos controles. Portanto, a exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH não alterou a fertilidade de camundongos, machos e fêmeas, avaliados no presente teste.

Tabela 8: Teste de fertilidade de camundongos expostos ao TPTH *in utero* do dia 6 de gestação ao dia 21 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,5
1º cruzamento					
Nº fêmeas que deram à luz/ Nº fêmeas que cruzaram (%)	18/18 (100%)	27/27 (100%)	22/27 (81%)	25/27 (92%)	24/24 (100%)
Nº machos que acasalaram com pelo menos duas fêmeas/ Total de machos (%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/9 (88,8%)	9/9 (100%)	8/8 (100%)
2º cruzamento					
Nº fêmeas que cruzaram / Nº fêmeas que deram à luz (%)	—	—	5/5 (100%)	2/2 (100%)	—
Nº machos que acasalaram com pelo menos duas fêmeas/ Total de machos (%)	—	—	0/1 (0%)	—	—
1º + 2º cruzamento					
Nº fêmeas que deram à luz/ Nº fêmeas que cruzaram (%)	18/18 (100%)	27/27 (100%)	27/27 (100%)	27/27 (100%)	24/24 (100%)
Nº machos que acasalaram com pelo menos duas fêmeas/ Total de machos (%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/9 (88,8%)	9/9 (100%)	8/8 (100%)
Sítios de implantação					
Total	250	370	302	334	330
Por ninhada (média±DP)	13,89±3,29	13,70±2,30	13,73±2,62	13,36±2,51	13,75±1,96
Fetos vivos					
Total	209	335	267	298	299
Por ninhada (média±DP)	11,61±3,18	12,41±2,52	12,14±2,32	11,92±2,53	12,46±2,45
(dia 1 pós-natal)					

Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney, ou por Qui-quadrado. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

IV.1.7 Efeito da exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH sobre os órgãos dos filhotes na idade adulta

Na Tabela 9 podem ser encontrados os valores de peso absoluto e relativo do fígado, baço, ovários e útero das fêmeas sacrificadas entre os dias 80 e 90 pós-natal. Encontramos uma redução estatisticamente significativa do peso absoluto do fígado na dose de 7,5mg TPTH /kg de peso corpóreo.

Os valores de peso absoluto do fígado, baço, testículos, epidídimos e vesícula seminal dos machos mortos entre os dias 90 e 100 pós-natal encontram-se resumidos na Tabela 10. A exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH diminuiu o peso absoluto dos epidídimos e vesícula seminal dos filhotes quando comparado ao peso dos controles.

IV.1.8 Efeito da exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH sobre os parâmetros reprodutivos masculinos dos filhotes na idade adulta

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com TPTH e os grupos controles com relação ao número de espermátides nos testículos (soma do testículo direito e esquerdo), produção espermática diária, número de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático (dados não demonstrados).

Tabela 9: Peso dos órgãos absoluto e relativo de filhotes (fêmeas) expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,5
Ninhadas (N)*	12	18	17	18	15
Fígado (g)	1,94±0,17	1,93±0,33	1,80±0,26	1,75±0,21	1,68±0,14 ^{a, b}
Fígado %	5,09±0,55	4,95±0,62	4,61±0,41	4,73±0,46	4,79±0,49
Baço (g)	0,21±0,03	0,20±0,03	0,20±0,04	0,20±0,04	0,19±0,03
Baço %	0,56±0,08	0,52±0,08	0,51±0,08	0,53±0,09	0,55±0,08
Ovário (g)	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
Ovário %	0,08±0,02	0,08±0,02	0,07±0,02	0,09±0,02	0,08±0,03
Útero (g)	0,12±0,01	0,14±0,04	0,13±0,04	0,11±0,03	0,13±0,03
Útero %	0,30±0,05	0,36±0,10	0,34±0,11	0,30±0,08	0,37±0,09
Peso médio (g)	38,14±2,51	38,82±2,69	38,90±3,70	37,09±2,64	35,18±3,26 ^{b, c}

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão (média das médias). Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle não tratado; **b**: diferente do controle óleo de canola; **c**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg. *: Sacrifício ao final do experimento, ninhadas com idade entre 80 e 90 dias.

Tabela 10: Peso dos órgãos absoluto e relativo de filhotes (machos) expostos *in utero* ao TPTH (não tratado; óleo; 1,875; 3,75 e 7,5 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 de gestação ao dia 21 de lactação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	não tratado	óleo	1,875	3,75	7,5
Ninhadas (N)*	12	18	17	18	15
Fígado (g)	2,3±0,2	2,3±0,20	2,4±0,32	2,5±0,35	2,4±0,35
Fígado %	4,7±0,5	4,6±0,36	4,8±0,43	5,1±0,57 ^{a, b}	5,0±0,50 ^b
Baço (g)	0,18±0,03	0,18±0,02	0,17±0,03	0,18±0,04	0,20±0,06
Baço %	0,38±0,07	0,37±0,04	0,35±0,06	0,38±0,09	0,42±0,13
Testículo Direito (g)	0,13±0,02	0,13±0,02	0,13±0,02	0,12±0,02	0,12±0,01
Testículo Direito %	0,27±0,04	0,26±0,04	0,26±0,04	0,25±0,04	0,26±0,03
Testículo esquerdo (g)	0,13±0,02	0,13±0,02	0,12±0,02	0,12±0,01	0,12±0,02
Testículo esquerdo %	0,26±0,04	0,26±0,04	0,25±0,04	0,24±0,03	0,26±0,04
Epidídimos (g)	0,09±0,01	0,09±0,01	0,10±0,02	0,09±0,01	0,08±0,01 ^c
Epidídimos %	0,19±0,03	0,18±0,02	0,19±0,03	0,18±0,03	0,17±0,02
Vesícula Seminal (g)	0,24±0,05	0,20±0,03 ^a	0,21±0,03 ^a	0,19±0,02 ^a	0,20±0,04 ^a
Vesícula Seminal %	0,51±0,11	0,42±0,06 ^a	0,41±0,05 ^a	0,40±0,05 ^a	0,42±0,07 ^a
Peso médio dos filhotes (g)	48,7±4,00	48,7±3,4	49,0±5,76	48,7±5,2	47,7±5,2

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle não tratado; **b**: diferente do controle óleo de canola; **c**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg. *: Sacrifício ao final do experimento, ninhadas com idade entre 80 e 90 dias.

IV.2 Experimento 2

IV.2.1 Toxicidade geral e mortalidade

Durante o período de tratamento, não observamos mortes ou sinais clínicos de toxicidade nos animais dos grupos tratados com óleo de milho, 1,875 e 3,75 mg TPTH/kg de peso corporal. No entanto, na dose de 7,5 mg TPTH/kg, 7,4% dos machos e 3,7% das fêmeas morreram, e na dose de 15 mg TPTH/kg, observamos um drástico aumento da mortalidade tanto entre os machos (80,8%), quanto entre as fêmeas (80,9%) logo após o desmame, *i.e.* entre os dias 21 e 25 pós-natal (Tabela 11).

IV.2.2 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre o ganho de peso corporal

A Tabela 12 mostra a evolução ponderal e o ganho de peso das fêmeas expostas ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade. No dia 15 pós-natal, *i.e.* antes do início do tratamento, não houve diferenças quanto ao peso médio dos filhotes. A partir do dia 21 pós-natal (desmame), observamos uma redução estatisticamente significativa do peso médio das fêmeas das duas maiores doses (7,5 e 15 mg/kg) com relação aos outros grupos experimentais. Nos primeiros dias de tratamento (dia 21-15) notamos uma drástica redução – dose relacionada – do ganho de peso (média±DP) das fêmeas a partir da dose de 1,875 mg/kg (óleo = 3,41±0,99g; 1,875mg/kg = 2,84±0,77g; 3,75mg/kg = 2,26±0,75g; 7,5mg/kg = 0,85±1,09g; 15mg/kg = -0,49±0,55g). Portanto, o ganho de peso no início do tratamento foi comprometido a partir da menor dose avaliada. A análise do ganho de peso durante todo o período de tratamento (dia 45-15), entretanto, indicou que o TPTH foi tóxico a partir da dose de 7,5 mg/kg (óleo = 21,02±2,55g; 7,5mg/kg = 18,85±2,99g; 15mg/kg = 14,55±1,80).

O peso médio e o ganho de peso dos filhotes machos expostos ao TPTH do dia 15 ao dia 45 pós-natal estão ilustrados na Tabela 13. Até o dia 30 pós-natal, o peso médio dos filhotes machos encontrava-se reduzido a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg, indicando uma maior susceptibilidade dos machos ao TPTH quando comparado com as fêmeas no mesmo período de tratamento. O ganho de peso dos machos do início do tratamento até o desmame (dia 21-15) diminuiu de forma dose-

relacionada a partir da dose de 1,875mg TPTH/kg (óleo = 3,59±0,79g; 1,875mg/kg = 3,05±0,85g; 3,75mg/kg = 1,90±0,91g; 7,5mg/kg = 1,35±0,82g; 15mg/kg = -0,22±0,81g), porém, após o dia 35 pós-natal (10º dia de tratamento) essa diminuição aparece a partir da dose de 7,5mg TPTH/kg (óleo = 28,12±2,03g; 7,5mg/kg = 25,70±4,66g; 15mg/kg = 18,62±2,87 18,62±2,87g), indicando que o período mais crítico ocorre logo após o desmame.

IV.2.3 Efeitos da exposição ao TPTH sobre o aparecimento dos marcos do desenvolvimento pós-natal

Os dados referentes ao aparecimento dos marcos físicos do desenvolvimento pós-natal avaliados neste estudo são mostradas na Tabelas 14. Nas fêmeas observa-se um atraso na abertura de vagina nas ninhadas do grupo de 7,5 e 15 mg de TPTH/kg em relação ao grupo controle veículo (óleo de milho). No entanto, o atraso na descida de testículo, foi estatisticamente significativo a partir da dose de 3,75 mg de TPTH/kg de peso corporal, demonstrando assim, mais uma vez, uma maior susceptibilidade dos machos aos efeitos do TPTH no período pré-puberdade e durante a puberdade. A média do peso corporal no dia da abertura de vagina nas fêmeas e no dia da descida de testículos nos machos não estava alterada.

IV.2.4 Avaliação do ciclo estral

A Tabela 15 apresenta os resultados da avaliação do ciclo estral das fêmeas expostas ao TPTH do dia 15 ao dia 45 PN e que participaram do teste de fertilidade no dia 65PN. Uma fêmea do grupo exposto a 3,75mg TPTH/kg e uma fêmea do grupo exposto a 7,5mg TPTH/kg não entraram no estro até o dia 65 pós-natal. Observamos uma tendência não significativa do atraso da idade para o primeiro estro nas duas maiores doses de TPTH (7,5mg/kg: $p = 0,059$ em relação ao óleo e $p = 0,067$ em relação à dose de 1,875mg TPTH/kg). O peso corporal no dia do primeiro estro e o tempo decorrido desde a abertura do canal vaginal até o primeiro estro não estavam alterados entre os diferentes grupos experimentais.

Tabela 11: Mortalidade dos camundongos (filhotes) fêmeas e machos tratados oralmente com TPTH (óleo; 1.875; 3.75 e 7.5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1.875	3.75	7.50	15
Número de filhotes fêmeas no dia 15 PN	23	22	21	27	21
Número de filhotes fêmeas no dia 45 PN	23	22	21	26	4
Mortalidade durante o tratamento (%)	0%	0%	0%	3,7%♣	80,9% ^a ♣
Número de filhotes machos no dia 15 PN	26	26	24	27	26
Número de filhotes machos no dia 45 PN	26	26	24	25	5
Mortalidade durante o tratamento (%)	0%	0%	0%	7,4%♣	80,8% ^a ♣

Os valores percentuais foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. Em todos os casos a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo; **b**: diferente da dose de 1.875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mgTPTH/kg. ♣: Todas as mortes ocorreram no período do desmame (entre os dias 21 e 25 pós-natal).

Tabela 12: Ganho de peso de camundongos (fêmeas) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg peso corporal)				
	óleo	1,875	3,75	7,5	15
Fêmeas no dia 45 PN (N)	23	22	21	26	4
Peso médio(g)					
Dia 15	7,27±1,03	7,22±0,79	7,31±0,99	7,24±0,96	7,20±1,34
Dia 21 (desmame)	10,68±1,83	10,07±1,38	9,58±1,56	8,09±1,60 ^{a, b, c}	6,71±1,08 ^{a, b, c}
Dia 25	15,14±2,40	14,35±1,76	13,68±2,27	11,28±2,61 ^{a, b, c}	8,82±1,46 ^{a, b, c}
Dia 30	20,61±2,88	20,34±2,03	19,2±3,30	16,12±3,75 ^{a, b, c}	12,48±2,30 ^{a, b, c}
Dia 35	24,72±2,63	24,71±1,76	23,31±4,03	20,59±3,82 ^{a, b, c}	16,02±2,72 ^{a, b, c}
Dia 45	28,29±3,08	28,49±2,20	27,59±4,63	26,09±3,55	21,75±2,67 ^{a, b, c}
Ganho de peso (g)					
Dia 21 – 15	3,41±0,99	2,84±0,77 ^a	2,26±0,75 ^{a, b}	0,85±1,09 ^{a, b, c}	-0,49±0,55 ^{a, b, c, d}
Dia 25 – 15	7,87±1,49	7,13±1,17	6,36±1,38 ^a	4,04±2,03 ^{a, b, c}	1,62±0,96 ^{a, b, c, d}
Dia 35 – 15	17,45±1,96	17,49±1,32	16,00±3,36	13,35±3,23 ^{a, b, c}	8,82±1,68 ^{a, b, c, d}
Dia 45 – 15	21,02±2,55	21,27±2,06	20,27±4,12	18,85±2,99 ^{a, b, c}	14,55±1,80 ^{a, b, c, d}
Dia 45 – 21	17,61±2,27	18,43±2,12	18,01±3,98	18,00±2,72	15,04±1,67 ^{a, b, c, d}

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente do 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

Tabela 13: Ganho de peso de camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg peso corporal)				
	óleo	1,875	3,75	7,5	15
Machos no dia 45 PN (N)	26	26	24	25	5
Peso médio(g)					
Dia 15	7,34±0,86	7,25±0,86	7,09±0,97	7,28±1,01	7,47±0,36
Dia 21 (desmame)	10,93±1,37	10,30±1,43	8,99±1,46 ^{a, b}	8,63±1,52 ^{a, b}	7,24±0,84 ^{a, b}
Dia 25	15,96±2,21	15,11±2,48	13,30±2,44 ^a	12,07±2,42 ^{a, b}	9,18±1,43 ^{a, b, c}
Dia 30	23,66±3,08	22,90±3,64	20,60±3,76 ^a	18,18±4,01 ^{a, b}	13,32±0,99 ^{a, b, c, d}
Dia 35	29,54±2,68	29,15±3,21	26,85±3,74	24,49±4,65 ^{a, b}	18,13±1,03 ^{a, b, c, d}
Dia 45	35,45±2,57	36,20±3,31	34,83±3,98	32,98±5,28 ^b	26,08±2,90 ^{a, b, c, d}
Ganho de peso (g)					
Dia 21 – 15	3,59±0,79	3,05±0,85 ^a	1,90±0,91 ^{a, b}	1,35±0,82 ^{a, b, c}	-0,22±0,81 ^{a, b, c, d}
Dia 25 – 15	8,62±1,53	7,86±1,77	6,21±1,78 ^{a, b}	4,79±1,84 ^{a, b, c}	1,71±1,39 ^{a, b, c, d}
Dia 35 – 15	22,21±2,21	21,90±2,54	19,76±3,03 ^{a, b}	17,21±4,07 ^{a, b, c}	10,67±1,23 ^{a, b, c, d}
Dia 45 – 15	28,12±2,03	28,95±2,66	27,74±3,30	25,70±4,66 ^{a, b}	18,62±2,87 ^{a, b, c, d}
Dia 45 – 21	24,53±2,03	25,90±2,29	25,84±3,00	24,35±4,47	18,84±3,66 ^{a, b, c, d}

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente do 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

Tabela 14: Marcos físicos do desenvolvimento pós-natal de camundongos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	Óleo	1,875	3,75	7,50	15
Fêmeas (N)	23	22	21	26	4
Dia da abertura de vagina	27 (22-30)	27,5 (23-32)	28 (24-38)	31 (24-44) ^a	39,5 (31-42) ^a
Média do peso corporal no dia da abertura de vagina	17,00±2,36	16,97±2,59	16,66±3,00	17,55±2,57	17,88±0,94
Machos (N)	26	26	24	25	5
Dia da descida de testículo	21 (19-25)	21 (20-25)	22,5 (20-28) ^a	23 (21-29) ^a	29 (27-30) ^a
Média do peso corporal no dia da descida de testículos	11,40±1,12	10,95±1,12	10,83±1,11	10,56±1,14	11,63±1,76

Os dados são apresentados como mediana (mínimo-máximo) e média±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mgTPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mgTPTH/kg.

Tabela 15: Ciclo estral de camundongos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	Óleo	1,875	3,75	7,50	15
Fêmeas (N)	12	10	9	11	2
Dia pós-natal do 1º estro	38,70±5,73	38,70±8,23	41,33±6,18	46,33±6,15 ^{w, y}	51,50±0,71
Peso corporal no 1º estro	24,79±3,46	24,35±3,12	25,93±2,00	25,05±2,41	24,82±1,58
Da abertura do canal vaginal ao 1º estro (dias)	12,00±4,20	11,80±6,50	13,00±5,20	11,58±4,40	11,50±2,10

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg; ^w: $p = 0,059$ em relação ao óleo e ^y: $p = 0,067$ em relação ao 1,875mg/kg. Obs: O lavado vaginal para o preparo da lâmina foi realizado, diariamente, do dia da abertura da vagina até o dia 65 pós-natal (início do teste de fertilidade).

IV.2.5 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre o fígado, baço e timo de fêmeas e machos mortos após o tratamento

A avaliação de sinais clínicos de toxicidade normalmente envolve a avaliação do peso dos órgãos. Para evitar fatores de confundimento devidos a variações do peso corporal, o resultado foi expresso, também, em termos de peso relativo [(peso do órgão ÷ peso corporal) x 100]. Na Tabela 16 podem ser encontrados os valores de peso absoluto do timo, fígado e baço das fêmeas no dia 46 pós-natal, assim como o peso relativo destes órgãos. O peso relativo do timo no grupo tratado com 15mg TPTH/kg ($0,48 \pm 0,12$) encontrou-se significativamente aumentado quando comparamos com o grupo controle ($0,29 \pm 0,08$). Foi observado um aumento do peso relativo do fígado das fêmeas a partir da dose de 3,75mg TPTH/kg ($5,70 \pm 0,55$) com relação ao grupo tratado com óleo ($4,97 \pm 0,45$).

A exposição repetida ao TPTH alterou o peso de órgãos como fígado, baço e timo dos machos (Tabela 17). Logo após o fim do tratamento, dia 46 pós-natal, observamos um aumento significativo do peso relativo do fígado nas duas maiores doses (7,5 e 15 mg TPTH/kg). Outra observação digna de nota foi o aumento do peso relativo do baço na maior dose ($0,55 \pm 0,08$) em relação a todos os diferentes grupos experimentais. Esse efeito foi observado somente nos machos.

IV.2.6 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre os órgãos reprodutivos de fêmeas e machos mortos após o tratamento

Não observamos alterações de peso dos órgãos reprodutivos – útero e ovários – das fêmeas expostas ao TPTH do dia 15 ao dia 45 pós-natal (Tabela 16). O efeito do TPTH sobre os órgãos reprodutivos dos machos pode ser observado na Tabela 18. Observamos redução do peso absoluto dos epidídimos na dose de 15mg TPTH/kg ($0,05 \pm 0,01$) e da vesícula seminal a partir da dose de 7,5mg TPTH/kg ($0,13 \pm 0,01$) quando comparado com o controle óleo de milho ($0,07 \pm 0,01$ e $0,16 \pm 0,03$). O efeito na redução do peso dos órgãos reprodutivos também foi evidente em termos de peso relativo.

Tabela 16: Peso dos órgãos de camundongos (fêmeas) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,875	3,75	7,5	15
Fêmeas no dia 46 PN (N)	11	12	11	14	2
Timo (g)	0,09±0,03	0,09±0,02	0,10±0,02	0,10±0,02	0,12±0,01
Timo %	0,29±0,08	0,30±0,08	0,33±0,07	0,34±0,09	0,48±0,12 ^{a, b}
Fígado (g)	1,58±0,19	1,68±0,25	1,81±0,27	1,76±0,24	1,61±0,32
Fígado %	4,97±0,45	5,39±0,55	5,70±0,55 ^a	6,02±0,61 ^{a, b}	6,27±0,43 ^a
Baço (g)	0,17±0,03	0,15±0,03	0,16±0,06	0,14±0,03	0,16±0,05
Baço %	0,53±0,10	0,49±0,10	0,51±0,16	0,47±0,09	0,60±0,12
Ovário (g)	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01
Ovário %	0,07±0,03	0,08±0,04	0,07±0,03	0,07±0,03	0,06±0,02
Útero (g)	0,14±0,06	0,14±0,04	0,11±0,06	0,13±0,05	0,05±0,02
Útero %	0,42±0,16	0,45±0,11	0,36±0,20 ^b	0,42±0,14	0,17±0,06 ^b
Peso corporal (g)	31,82±2,07	31,05±1,68	31,75±2,38	29,26±3,22	25,47±3,32 ^{a, b, c}

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

Tabela 17: Peso dos órgãos dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,785	3,75	7,5	15
Machos no dia 46PN (N)	14	14	12	13	4
Timo (g)	0,06±0,02	0,07±0,01	0,07±0,03	0,08±0,02	0,10±0,01 ^{a, b}
Timo %	0,14±0,04	0,16±0,03	0,16±0,05	0,19±0,05 ^a	0,27±0,03 ^{a, b, c, d}
Fígado (g)	2,27±0,18	2,37±0,09	2,43±0,21	2,60±0,48 ^a	2,35±0,22
Fígado %	5,58±0,38	5,66±0,30	5,82±0,44	6,23±0,68 ^{a, b}	6,61±0,27 ^{a, b, c}
Baço (g)	0,15±0,03	0,15±0,02	0,16±0,04	0,16±0,03	0,20±0,01
Baço %	0,37±0,07	0,35±0,06	0,39±0,08	0,38±0,07	0,55±0,08 ^{a, b, c, d}
Peso corporal	40,82±3,10	41,92±2,29	41,90±3,55	41,59±4,21	35,48±3,20 ^{a, b, c, d}

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

Tabela 18: Peso dos órgãos sexuais dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,785	3,75	7,5	15
Machos no dia 46PN (N)	14	14	12	13	4
Testículo Direito (g)	0,12±0,02	0,12±0,01	0,11±0,01	0,12±0,02	0,10±0,01 ^b
Testículo Direito %	0,29±0,04	0,30±0,03	0,27±0,03	0,28±0,03	0,27±0,03
Testículo Esquerdo (g)	0,11±0,01	0,12±0,01	0,11±0,01	0,11±0,02	0,10±0,01
Testículo Esquerdo %	0,27±0,03	0,28±0,04	0,26±0,03	0,26±0,03	0,28±0,04
Epidídimos (g)	0,07±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01 ^{a, b}
Epidídimos %	0,18±0,03	0,17±0,02	0,16±0,03	0,16±0,03	0,13±0,02 ^{a, b}
Vesícula Seminal (g)	0,16±0,03	0,16±0,03	0,15±0,02	0,13±0,01 ^{a, b}	0,08±0,03 ^{a, b, c, d}
Vesícula Seminal %	0,40±0,05	0,38±0,07	0,36±0,06	0,32±0,04 ^{a, b}	0,21±0,08 ^{a, b, c, d}
Peso corporal	40,82±3,10	41,92±2,29	41,90±3,55	41,59±4,21	35,48±3,20 ^{a, b, c, d}

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

IV.2.7 Efeitos da exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH sobre os parâmetros reprodutivos masculinos dos animais mortos após o tratamento

Nas Tabelas 19, 20 e 21 observam-se os efeitos da exposição ao TPTH sobre a produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo, tempo de trânsito espermático, concentração de testosterona sanguínea, morfologia dos espermatozóides e histologia testicular.

Uma redução, estatisticamente significativa, na produção espermática diária e no número de espermatozóides, foi observada nos animais expostos ao TPTH. O número de espermatozóides na cauda do epidídimo por animal foi 30 ± 9 ($\times 10^6$) na maior dose, 103 ± 31 ($\times 10^6$) nos animais tratados com 7,5mg/kg e 167 ± 39 ($\times 10^6$) no grupo controle. A produção espermática diária foi de 45 ± 14 ($\times 10^6$) e 60 ± 23 ($\times 10^6$) nos animais tratados com 15 e 7,5mg TPTH/kg, respectivamente, e 82 ± 16 ($\times 10^6$) nos grupos tratados com óleo de milho. No tempo de trânsito espermático, essa redução foi observada apenas na maior dose (controle = $2,05 \pm 0,44$ dias e 15mg/kg = $0,81 \pm 0,61$ dias). A exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH não alterou significativamente os níveis de testosterona livre medidos pelo teste de ELISA no soro dos animais, quando comparado ao grupo controle (Tabela 19). Observamos um discreto aumento do número de espermatozóides anormais (defeitos de cabeça e cauda) nos animais expostos ao TPTH, no entanto, esse aumento não diferiu significativamente do percentual observado nos animais do grupo exposto apenas ao controle veículo (óleo) (Tabela 20).

Histologia testicular

Os resultados referentes à análise morfométrica dos túbulos seminíferos encontram-se na Tabela 21. Foi observada uma redução do diâmetro e da altura do epitélio dos túbulos seminíferos dos animais do grupo de 3,75 mg TPTH/kg em relação ao grupo controle veículo (óleo).

Tabela 19: Variáveis reprodutivas de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo de milho	1,875	3,75	7,50	15
Machos no dia 46 PN (N)	14	14	12	13	4
Nº de espermátides por testículo (x10⁶)	89±17	88±21	69±17	61±21 ^{a, b}	41±10 ^{a, b}
Nº de espermátides por grama testículo (x10⁶)	400±79	385±113	319±77	291±111 ^a	218±67 ^{a, b}
Produção espermática diária	82±16	79±23	66±16	60±23 ^a	45±14 ^{a, b}
Nº de espermatozóides por animal (x10⁶)	167±39	150±33	124±20 ^a	103±31 ^{a, b}	30±9 ^{a, b, c, d}
Tempo de trânsito espermático (dias)	2,05±0,44	1,99±0,56	1,97±0,52	1,86±0,67	0,81±0,61 ^{a, b, c, d}
Testosterona livre (pg/ml)	16,7±21,8	34,2±32,8	14,4±22,9	18,2±20,7	0,12±0,09

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo de milho; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

Tabela 20: Morfologia dos espermatozóides de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,875	3,75	7,5	15
Machos no dia 46 PN	14	14	12	13	4
Normal (%)	87,30	86,68	89,50	85,50	85,00
Anormal (%)	12,70	13,32	10,50	14,50	15,00
Gancho reduzido	0,43	0,14	0,46	0,46	1,38
Cabeça de banana	0,14	0,11	0,21	0,23	0,38
Cabeça de alfinete	0,11	0,14	0,21	0,31	0,38
Gancho acentuado	0	0,04	0	0,12	0
Cabeça separada	0	0	0	0,15	0
Cabeça redonda ou invertida	1,14	0,86	1,50	2,00	1,88
Cabeça amorfa	0,14	0,29	0,38	1,31	0,75
Cabeça anã	0,14	0,11	0,04	0,04	0,13
Cabeça gigante	0,04	0	0	0	0,13
Flagelo enrolado	6,75	7,54	4,79	6,58	4,75
Flagelo ou ponta do flagelo torta	1,89	2,11	2,04	1,73	2,75
Ponta do flagelo enrolada	1,96	2,00	0,88	1,35	2,50
Cauda quebrada	0	0	0	0	0

As percentagens foram comparadas pelo Teste de Qui-quadrado ou, alternativamente pelo teste de Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

Tabela 21: Morfometria dos túbulos seminíferos de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo de milho	1,875	3,75	7,50	15
Machos no dia 46 PN (N)	14	13	12	12	4♠
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)					
Média	231,1±11,70	227,0±8,0	219,4±7,80 ^a	218,6±11,31 ^a	215,0±12,8
Mínimo	212,1±10,6	206,0±9,7	202,1±8,7	201,7±8,3	194,6±11,1 ^a
Máximo	251,1±14,4	248,0±11,2	236,7±8,4 ^a	240,9±14,5	239,3±18,5
Altura do epitélio dos túbulos seminíferos (µm)					
Média	68,8±5,9	68,8±6,6	62,2±3,9 ^{a, b}	64,2±3,9	63,7±1,5
Mínimo	60,8±5,3	59,0±5,1	55,0±3,3 ^a	56,7±3,2	57,0±3,5
Máximo	77,5±7,9	78,0±9,1	69,3±4,7 ^{a, b}	71,1±4,6	70,6±2,9

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo de milho; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg. ♠somente 3 animais foram analisados, pois não foi encontrado estágios VII-VIII em uma das lâminas.

IV.2.8 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre a fertilidade de machos e fêmeas

A exposição ao TPTH não interferiu com o resultado do teste de fertilidade dos machos e das fêmeas. Como pode ser visto na Tabela 22, a proporção de fêmeas que deram à luz por fêmeas que cruzaram, e a razão do número de machos que acasalaram com pelo menos duas fêmeas pelo número total de machos não difere entre os grupos tratados com TPTH e os grupos controles. Portanto, não encontramos neste estudo evidência de que a administração oral de TPTH altere a fertilidade de camundongos machos e fêmeas. O reduzido número de animais na maior dose (15mg/kg) se deve a acentuada mortalidade durante o tratamento.

Tabela 22: Teste de fertilidade de camundongos (fêmeas) expostos ao TPTH do dia 15 pós-natal ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,875	3,75	7,5	15
1º cruzamento					
Nº de machos que cruzaram/ Nº de machos total (%)	12 / 12 (100%)	12 / 12 (100%)	12 / 12 (100%)	11 / 12 (91,6%)	2 / 2 (100%)
Nº de fêmeas que deram à luz/ Nº de fêmeas que cruzaram (%)	11 / 12 ♠ (100%)	10 / 10 (100%)	9 / 10 (90%)	11 / 12 (91,6%)	2 / 2 (100%)
2º cruzamento					
Nº de machos que cruzaram/ Nº de machos total (%)	—	—	—	0 / 1 (0%)	—
Nº de fêmeas que deram à luz/ Nº de fêmeas que cruzaram (%)	—	—	0 / 1 (0%)	0 / 1 (0%)	—
1º + 2º cruzamento					
Nº de machos que cruzaram/ Nº de machos total (%)	12 / 12 (100%)	12 / 12 (100%)	12 / 12 (100%)	11 / 12 (91,6%)	2 / 2 (100%)
Nº de fêmeas que deram à luz/ Nº de fêmeas que cruzaram (%)	12 / 12 ♠ (100%)	10 / 10 (100%)	9 / 10 (90%)	11 / 12 (91,6%)	2 / 2 (100%)
Sítios de implantação					
Total (ninhada)	149	140	123	150	27
Por ninhada (média±DP)	13,55±1,86	14,00±2,26	13,67±3,24	13,64±1,63	13,50±3,54
Fetos vivos					
Total (ninhada)	143	135	110	145	23
Por ninhada (média±DP)	13,0±2,0	13,50±2,01	12,22±3,38	13,18±1,47	11,50±0,71

Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney, ou por Qui-quadrado. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo de milho; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg. ♠ Uma fêmea grávida morreu durante a gestação.

IV.2.9 Efeitos da exposição durante ao TPTH a pré-puberdade e a puberdade sobre fígado, baço e timo de fêmeas e machos que participaram do teste de fertilidade

Na Tabela 23 podem ser encontrados os valores de peso absoluto do timo, fígado e baço das fêmeas grávidas que participaram do teste de fertilidade, assim como o peso relativo $[(\text{peso do órgão} \div \text{peso corporal}) \times 100]$ destes órgãos. Não observamos diferenças significativas nos pesos – absoluto e relativo – do timo, baço e fígado das fêmeas e dos machos que participaram do teste de fertilidade (Tabela 24).

IV.2.10 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre os órgãos reprodutivos de fêmeas e machos que participaram do teste de fertilidade

Não foram observadas alterações de peso dos órgãos reprodutivos (ovários e útero) das fêmeas grávidas expostas ao TPTH no período da pré-puberdade e puberdade (Tabela 23), bem como dos testículos, epidídimos e vesícula seminal dos machos (Tabela 25), o que indica recuperação dos animais.

Tabela 23: Peso dos órgãos de camundongos (fêmeas grávidas) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal e que participaram do teste de fertilidade.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,875	3,75	7,5	15
Fêmeas no dia 80 PN (N)	11 ♠	10	9♣	11♣	2
Timo (g)	0,04±0,02	0,04±0,01	0,05±0,02	0,04±0,01	0,04±0,01
Timo %	0,07±0,03	0,07±0,02	0,08±0,03	0,07±0,02	0,06±0,03
Fígado (g)	3,64±0,42	3,72±0,55	3,62±0,50	3,84±0,36	4,10±0,06
Fígado %	6,34±0,52	6,47±0,69	6,39±0,80	6,51±0,44	6,47±0,76
Baço (g)	0,23±0,06	0,27±0,07	0,25±0,08	0,25±0,08	0,26±0,04
Baço %	0,41±0,11	0,48±0,16	0,45±0,15	0,42±0,13	0,41±0,11
Ovário (g)	0,04±0,02	0,04±0,01	0,05±0,02	0,04±0,02	0,04±0,00
Ovário %	0,07±0,02	0,07±0,02	0,08±0,03	0,06±0,03	0,06±0,01
Útero gravídico (g)	14,11±2,71	13,00±5,44	13,46±6,23	14,18±3,48	17,56±6,72
Útero gravídico %	24,36±2,74	21,67±7,90	22,70±7,08	23,85±4,84	27,03±6,99
Peso corporal gestacional (g)	57,52±5,63	57,81±8,21	57,35±9,57	59,08±5,42	63,87±8,36
Peso corporal <i>menos</i> peso do útero	43,41±3,45	44,81±4,23	43,89±5,21	44,91±3,95	46,32±1,63

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg. ♠: uma fêmea morreu durante a gestação; ♣: uma fêmea não ficou grávida.

Tabela 24: Peso dos órgãos dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal e que participaram do teste de fertilidade.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,785	3,75	7,5	15
Machos no dia 75PN	12	12	12	12	1
Timo (g)	0,05±0,01	0,05±0,02	0,05±0,02	0,05±0,01	0,07
Timo %	0,11±0,03	0,11±0,03	0,11±0,04	0,11±0,03	0,15
Fígado (g)	2,73±0,31	2,75±0,43	2,78±0,27	2,76±0,48	3,09
Fígado %	6,01±0,36	6,19±0,33	6,23±0,54	6,29±0,59	6,81
Baço (g)	0,20±0,03	0,20±0,03	0,17±0,02	0,19±0,03	0,19
Baço %	0,43±0,05	0,45±0,06	0,39±0,05	0,44±0,09	0,42
Peso corporal	45,39±3,64	44,31±5,44	44,74±3,85	43,74±5,41	45,39

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

Tabela 25: Peso dos órgãos dos camundongos (machos) tratados oralmente com TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 15 ao dia 45 pós-natal e que participaram do teste de fertilidade.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,785	3,75	7,5	15
Machos no dia 75PN	12	12	12	12	1
Testículo Direito (g)	0,13±0,02	0,12±0,02	0,13±0,02	0,13±0,02	0,15
Testículo Direito %	0,28±0,04	0,27±0,05	0,29±0,04	0,30±0,05	0,33
Testículo Esquerdo (g)	0,12±0,01	0,12±0,01	0,13±0,02	0,12±0,02	0,13
Testículo Esquerdo %	0,26±0,03	0,26±0,04	0,28±0,03	0,28±0,05	0,29
Epidídimos (g)	0,09±0,01	0,09±0,02	0,09±0,01	0,09±0,02	0,10
Epidídimos %	0,19±0,02	0,19±0,04	0,20±0,02	0,20±0,04	0,22
Vesícula Seminal (g)	0,19±0,03	0,19±0,04	0,20±0,03	0,20±0,03	0,25
Vesícula Seminal %	0,43±0,08	0,44±0,08	0,44±0,07	0,45±0,06	0,55
Peso corporal	45,39±3,64	44,31±5,44	44,74±3,85	43,74±5,41	45,39

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

IV.2.11 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre os parâmetros reprodutivos masculinos dos animais que participaram do teste de fertilidade

Os efeitos da exposição ao TPTH sobre a produção espermática diária, contagem de espermatozoides, morfologia dos espermatozoides e concentração de testosterona sanguínea são mostrados nas Tabelas 26 e 27.

Não encontramos diferenças significativas na produção espermática diária, no número de espermatozoides e no tempo de trânsito diário entre os grupos expostos ao TPTH e o controle, demonstrando mais uma vez a recuperação dos animais. A exposição durante a pré-puberdade e a puberdade ao TPTH não alterou os níveis de testosterona livre medidos pelo teste de ELISA no soro dos animais, quando comparado ao grupo controle (Tabela 26). O percentual total de espermatozoides anormais (defeitos de cabeça e cauda) nos animais expostos ao TPTH não diferiu significativamente do percentual observado nos animais do grupo controle (Tabela 27).

Tabela 26: Variáveis reprodutivas de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo de milho; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal que participaram do teste de fertilidade.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo de milho	1,875	3,75	7,50	15
Machos no dia 75 PN (N)	12	12	12	12	1
Nº espermátides por testículo (x10⁶)	100±38	83±37	82±30	64±28	100
Nº de espermátides por grama testículo (x10⁶)	422±151	370±169	334±126	276±140	384
Produção espermática diária	87±31	76±35	69±26	57±29	79
Nº espermatozóides por animal (x10⁶)	302±66	306±81	299±60	269±65	200
Tempo de trânsito espermático (dias)	3,81±1,40	4,92±2,76	5,02±2,28	6,22±3,87	2,17
Testosterona plasmática	27,7±30,2	40,0±34,9	38,6±24,6	38,5±34,7	0,29

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey e de Bonferroni. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle óleo de milho; **b**: diferente da dose de 1,875 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg.

Tabela 27: Morfologia dos espermatozoides de camundongos machos expostos ao TPTH (óleo; 1,875; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal) do dia 15 ao dia 45 pós-natal.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	óleo	1,875	3,75	7,5	15
Machos no dia 75 PN	12	12	12	12	1
Normal (%)	82,20	80,63	81,42	80,58	81,00
Anormal (%)	17,80	19,38	18,58	19,42	19,00
Gancho reduzido	0,25	0,58	0,29	0,54	0
Cabeça de banana	0,08	0	0,08	0	0
Cabeça de alfinete	0	0,17	0,04	0,04	0
Sem Gancho	0	0	0	0,04	0
Cabeça separada	0	0	0,04	0,13	0
Cabeça redonda ou invertida	0,54	1,25	1,79	1,17	2,0
Cabeça amorfa	0,17	0,04	0,17	0	0
Cabeça anã	0	0	0	0,04	0
Cabeça gigante	0	0	0	0	0
Flagelo enrolado	10,0	10,71	10,21	10,25	13,0
Flagelo ou ponta do flagelo torta	4,17	4,13	3,50	4,79	1,0
Ponta do flagelo enrolada	2,67	2,46	2,38	2,13	3,0
Cauda quebrada	0	0,04	0,08	0,21	0

As percentagens foram comparadas pelo Teste de Qui-quadrado ou, alternativamente pelo teste de Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

V. DISCUSSÃO

O uso de pesticidas na agricultura, e a conseqüente contaminação dos alimentos, é motivo de preocupação quanto aos impactos em termos de saúde pública. Nesse contexto, a avaliação toxicológica de pesticidas é importante para a ação da vigilância sanitária porque permite estabelecer parâmetros de segurança relativos à utilização desses produtos, viabilizando programas e ações de controle cientificamente embasados e tecnicamente aplicáveis. A exposição humana aos pesticidas resulta tanto do consumo de alimentos, quanto ao contato direto, no caso da exposição ocupacional dos aplicadores rurais e manipuladores (Anvisa, 2007).

Os resíduos de pesticidas presentes nos alimentos podem representar risco para a saúde da população. Como apresentado no relatório do Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que visa avaliar a qualidade dos alimentos em relação à contaminação por pesticidas, a grande maioria das culturas investigadas no Brasil foi positiva para a presença de resíduos de pesticidas acima dos níveis toleráveis. Alguns estudos sugerem também que há alta incidência de intoxicações com pesticidas, como por exemplo, carbamatos, piretróides e organofosforados (Faria *et al.*, 1999; Levigard & Rozemberg, 2004). Além da intoxicação aguda, estudos realizados com trabalhadores e/ou animais sugerem que a exposição crônica a pesticidas também afeta a saúde, causando alterações neurológicas, reprodutivas, imunológicas ou metabólicas (Dalsenter *et al.*, 1997; Sonnenschein & Soto, 1998; Koifman *et al.*, 2002). Assim sendo, estudos sobre os efeitos à longo prazo da exposição contínua a pesticidas são de grande importância para avaliar o risco dessas substâncias para a saúde humana.

Tem sido relatado que nos últimos anos houve um aumento da incidência de distúrbios reprodutivos acometendo seres humanos e animais, e suspeita-se que este fenômeno possa estar relacionado com a crescente exposição a diversas substâncias químicas (*e.g.* pesticidas) capazes de afetar processos regulados por hormônios. Recentemente grande atenção tem sido dada aos possíveis efeitos adversos decorrentes da exposição durante o desenvolvimento pré, peri- e pós-natal do indivíduo. Vários estudos sugerem que a exposição a pesticidas e a outras substâncias químicas durante essas fases do desenvolvimento pode causar distúrbios reprodutivos. Exemplo nesse

sentido são o adiantamento da abertura do canal vaginal em ratas expostas ao inseticida metoxiclor (Gray *et al.*, 1989), os efeitos adversos sobre a espermatogênese causados após exposição *in utero* e durante a lactação ao ftalato de di-(2-etil-hexila) (Andrade *et al.*, 2006) e danos ao tecido testicular causado pelo inseticida lindano (Dalsenter *et al.*, 1996). A exposição a pesticidas durante o desenvolvimento tem produzido também alterações reprodutivas funcionais, sem comprometer o crescimento e a viabilidade dos descendentes, que só se tornam aparentes na idade adulta, como a redução da fertilidade (Neubert & Chahoud, 1995; Gray & Otsby, 1998; Faqi *et al.*, 1998).

Para a maior parte dos compostos químicos, entretanto, não existem informações suficientes para estabelecer uma relação entre os níveis de exposição e os efeitos adversos sobre a saúde reprodutiva humana. Dados obtidos a partir de estudos de exposições ocupacionais são normalmente imprecisos, e os níveis de exposição na população em geral são ainda mais difíceis de serem documentados (Thomas, 1996). Portanto, estudos experimentais com animais são necessários para determinação do potencial de causar distúrbios reprodutivos. A extrapolação de resultados de estudos em animais para o homem deve, no entanto, respeitar as possíveis diferenças entre espécies. O sistema reprodutivo masculino humano, por exemplo, é via de regra mais suscetível à interferência química adversa do que o de roedores. Assim sendo, o planejamento experimental, e a interpretação dos resultados de estudos toxicológicos preditivos em animais devem ser feitos de forma crítica (Zenick *et al.*, 1994; Dourson *et al.*, 2002; Lu, 1991).

Os compostos organoestanhosos foram classificados como desreguladores endócrinos a partir, principalmente, de estudos com organismos aquáticos. Alguns desses estudos relataram o aparecimento de órgão sexual masculino em gastrópodes fêmeas, uma alteração biológica denominada *imposex* (Golub & Doherty, 2004). Em relação aos efeitos de compostos organoestanhosos sobre a reprodução de mamíferos, diversos estudos sugerem que os triorganoestanhosos causam toxicidade materna e efeitos embriofetotóxicos (Quadro 3), alterações morfológicas e funcionais do sistema reprodutivo de ratos (machos e fêmeas), bem como diminuição do peso corporal e dos órgãos reprodutivos quando a exposição ocorre no período peri e pós-natal e durante a puberdade (Quadro 4). O TPTH é pesticida agrícola amplamente utilizado no Brasil. Entretanto, até a presente data, foram realizados poucos estudos voltados para a

avaliação do risco do TPTH, durante períodos críticos do desenvolvimento, para a função reprodutiva de roedores machos e fêmeas. Neste trabalho estudamos os efeitos do TPTH sobre a função reprodutiva de camundongos expostos *in utero* e durante a lactação (experimento 1), e durante a pré-puberdade e a puberdade, período em que os animais imaturos são mais vulneráveis, uma vez que, a maturação dos órgãos reprodutivos e sexuais ainda está em curso (experimento 2). Os estudos aqui apresentados complementam e estendem os estudos anteriores realizados em nosso laboratório com este pesticida triorganoestanhoso (Viana, 2002 e Sarpa, 2003).

Quadro 3: Estudos da Toxicidade Materna e Embriofetotoxicidade dos Compostos Triorganoestanhosos.

		Espécie/ Exposição	Doses	Toxicidade Materna	Teratogenicidade	Cesárea	Tipo de avaliação
TBTO	Baroncelli <i>et al</i> 1990	Camundongos/ dia 6 a 15	0;5; 20 e 40 mg/kg	≥40mg/kg	≥40mg/kg	Sim	alterações visíveis externamente
	Baroncelli <i>et al</i> 1995	Camundongos/ dia 6 a 15	0;5;10;20 e 30 mg/kg	< 5mg/kg	dados não conclusivos	Não	filhotes após nascimento espontâneo
	Davis <i>et al</i> 1987	Camundongos/ dia 6 a 15	0;1,2; 3,5;5,8; 11,7; 23,4 e 35mg/kg	≥11,7mg/kg	≥11,7mg/kg	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
	Crofton <i>et al</i> 1989	Ratos/ dia 6 a 20	0;2,5;5;10;12 e 16 mg/kg	≥10mg/kg	dados não conclusivos	Não	filhotes após nascimento espontâneo
	Faqi <i>et al</i> 1997	Camundongos/ dia 6 a 17	0;0,5; 1,5; 4,5, 13,5 e 27 mg/kg	≥27mg/kg	≥27mg/kg	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
TBTA	Noda <i>et al</i> 1991b	Ratos/ dia 7 a 17	0;1;2;4;8 e 16mg/kg	≥16mg/kg	≥16mg/kg	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
TBTCI	Itami <i>et al</i> 1990	Ratos/ dia 7 a 15	0;5;9;15 e 25 mg/kg	≥ 9mg/kg	Nenhum Efeito*	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
	Ema <i>et al</i> 1995	Ratos/ dia 7 a 9	0;25;50 e 100 mg/kg	Nenhum efeito	Nenhum Efeito*	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
		dia 10 a 12	idem	≥100 mg/kg	≥100 mg/kg	idem	idem
		dia 13 a 15	idem	≥100 mg/kg	≥25 mg/kg**	idem	idem

* Após avaliação sistemática de esqueleto e vísceras não foram encontrados efeitos teratogênicos.

** Registro de efeito teratogênico em níveis de dose não-tóxico para o organismo materno.

(continuação do Quadro 3)

		Espécie/ Exposição	Doses	Toxicidade Materna	Teratogenicidade	Cesárea	Tipo de avaliação
TPTCI	Ema <i>et al</i> 1997	Ratos/ dia 0 a 3	0;3,1;4,7 e 6,3mg/kg	$\geq 6,3\text{mg/kg}$	Nenhum Efeito *	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
		dia 4 a 6	0; 6,3; 12,5 e 25mg/kg	$\geq 12,5\text{mg/kg}$	Nenhum Efeito *	idem	idem
	Ema <i>et al</i> 1999	Ratos/ dia 7 a 9	0;3,1;6,3;9,4 e 12,5mg/kg	$\geq 6,3\text{mg/kg}$	Nenhum Efeito *	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
		dia 10 a 12	0; 6,3; 9,4 e 12,5 mg/kg	$\leq 6,3\text{mg/kg}$	Nenhum Efeito *	idem	idem
		dia 13 a 15	0; 6,3; 9,4 e 12,5 mg/kg	$\leq 6,3\text{mg/kg}$	Nenhum Efeito *	idem	idem
TPTA	Noda <i>et al</i> 1991a	Ratos/ dia 7 a 17	0;1,5;3;6;9 e 12mg/kg	$\geq 9\text{mg/kg}$	Nenhum Efeito*	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
TPTH	Chernoff <i>et al</i> 1990	Ratos/ dia 6 a 15	0 e 13 mg/kg	13mg/kg	Nenhum Efeito*	Sim	alterações de esqueleto e vísceras
	Viana, 2002#	Camundongos/ dia 6 a 17	0; 7,5;15 e 30mg/kg	$\geq 15\text{mg/kg}$	dados não conclusivos	Não	filhotes após nascimento espontâneo
	Sarpa, 2003#	Camundongos/ dia 6 a 17	0;3,75;7,5;15 e 30mg/kg	$\geq 7,5\text{mg/kg}$	$\geq 3,75\text{mg/kg}^{**}$	Sim	alterações de esqueleto e vísceras

* Após avaliação sistemática de esqueleto e vísceras, não foram encontrados efeitos teratogênicos.

** Registro de efeito teratogênico em níveis de dose não-tóxico para o organismo materno.

Estudo realizado em nosso laboratório.

Quadro 4: Estudos da Toxicidade Peri e Pós-Natal dos Compostos Triorganoestanhos

	Autores/ Ano	Espécie	Exposição/morte	Doses/via	Efeitos
TBTCI	Cooke <i>et al.</i> , 2004	Ratos Sprague-Dawley	Mães: do dia 8 gestação até o desmame e filhotes continuaram sendo tratados e foram sacrificados nos dias 30, 60 e 90 PN	0; 0,025; 0,25 e 2,5mg/kg / via oral	Nenhum efeito sobre a mãe, o tamanho da ninhada, razão de sexos e sobrevivência até o desmame; ↓ do peso do timo, baço e fígado dos filhotes, mas as lesões histopatológicas não foram significativas.
	Omura <i>et al.</i> , 2001	Ratos Wistar (avaliação dos machos)	Gestação e lactação – estudo de duas gerações / F1 morta no dia 119 PN e F2 morta no dia 91 PN	0; 5; 25 e 125µg/g na dieta	Atraso no dia da abertura dos olhos, ↓ do peso corporal e dos testículos, epidídimos e vesícula seminal nas gerações F1 e F2; ↓ do nº de espermátides na geração F1 e F2 e de espermatozoides na F2; ↑ na [] de testosterona em F1 e F2; alterações histopatológicas, não significativas, nos túbulos seminíferos em F1 e F2.
	Ogata <i>et al.</i> , 2001	Ratos Wistar (avaliação das fêmeas)	Gestação e lactação – estudo de duas gerações / F1 morta no dia 148 PN e F2 morta no dia 92 PN	0; 5; 25 e 125µg/g na dieta	Índice de fertilidade normal; ↓ do nº de fetos vivos e do peso corporal dos filhotes no DPN 1; ↓ ganho de peso corporal gestacional; Atraso no dia da abertura dos olhos e da vagina; ↑ na distância anogenital no DPN 1; alterações no ciclo estral; ↓ do peso dos ovários e ↑ no peso do útero; nenhuma alteração histopatológica nos ovários.
	Makita <i>et al.</i> , 2003	Ratos Wistar (avaliação das fêmeas)	Do dia 1 de gestação ao dia 21 pós-natal (desmame); fêmeas sacrificadas com 6 semanas de idade.	25µg/g na dieta	↓ do peso materno e do peso dos filhotes no DPN 28; Atraso no dia da abertura dos olhos; ↓ na [] de LH; não houve diferenças na abertura de vagina, nem alterações patológicas.
	Makita <i>et al.</i> , 2004	Ratos Wistar (avaliação dos machos)	Do dia 1 de gestação ao dia 21 pós-natal (desmame); machos sacrificados com 6 semanas de idade	25µg/g na dieta	↓ do peso materno e do ganho de peso dos filhotes; atraso na abertura dos olhos; ↓ do peso da próstata e do LH; não foram observadas alterações na testosterona, no dia da separação prepucial e nem histopatológicas.

	Autores/ Ano	Espécie	Exposição/morte	Doses/via	Efeitos
TBTCI	Makita <i>et al.</i> , 2006	Ratos Wistar (avaliação dos machos)	Do dia 1 de gestação ao dia 21 pós-natal (desmame); machos sacrificados com 12 semanas de idade.	25µg/g na dieta	não foram observadas alterações nos níveis de testosterona, LH e FSH, no dia da separação prepucial, no peso dos órgãos reprodutivos, na contagem e morfologia de espermatozóides e nem alterações histopatológicas.
	Makita <i>et al.</i> , 2005	Ratos Wistar	Da 6ª semana a 12ª semana pós-natal; sacrificados logo após o tratamento.	25µg/g na dieta	↑ do peso corporal e tendência de aumento no peso do fígado e do baço; ↓ do peso do timo; não foram observadas alterações nos níveis de testosterona, LH e FSH, no peso dos órgãos reprodutivos, na contagem de espermatozóides e nem alterações histopatológicas.
	YU <i>et al.</i> , 2003.	Ratos Sprague-Dawley	Do dia 35 ao 44 de idade; sacrificados 5 semanas após o fim do tratamento.	5; 10 e 20mg/kg / via oral	não foram observadas alterações no peso corporal e dos órgãos reprodutivos, e nem alterações histopatológicas nos testículos; ↓ do nº de espermatozóides, espermátides e da produção espermática diária
TBT e TPT	Grote <i>et al.</i> , 2004.	Ratos Wistar (avaliação dos machos)	Do dia 23 ao dia 52 PN; sacrificados no dia 53 PN.	0,5 e 15mg TBT/kg; 2 e 12mgTPT/kg / via oral	TBT : atraso na separação prepucial; ↓ do peso corporal; ↓ nos níveis de testosterona (15mg/kg); ↑ do peso do epididimo e próstata (0,5mg/kg) e ↓ desses órgãos na dose de 15mg/kg. TPT : alta mortalidade (12mg/kg); acentuada perda de peso corporal; ↓ no peso do timo e baço; ↓ nos níveis de testosterona (2 e 6mg/kg) e do LH (2mg/kg), e ↑ do LH (6mg/kg); ↓ do peso dos testículos e epidídimos.
TPTCI	Grote <i>et al.</i> , 2006.	Ratos Wistar (avaliação das fêmeas)	Do dia 23 ao dia 52 PN; sacrificados nos dias 33PN e após o dia 53PN (1º estro).	2 e 6mgTPT/kg / via oral	Dia 33PN : ↓ no peso do timo; ↑ do peso do útero (2mg/kg) e ↓ na dose de 6mg/kg; Dia 53PN : ↑ do peso do fígado e dos ovários; ↑ do peso do útero (2mg/kg) e ↓ na dose de 6mg/kg; ↑ da [] estradiol; atraso na abertura de vagina (6mg/kg).
TBTO/ TPTH	Reddy <i>et al.</i> , 2006.	Camundongos Suíço Albino (55 dias de vida)	Durante 3 dias alternados (1º, 3º e 5º de experimentação) / no 25º dia de experimentação.	10 e 25µg /kg (TBTO e TPTH)/via i.p.	↓ no peso dos órgãos reprodutivos e do nº de espermatozóides; ↓ nos níveis de testosterona e ↑ do LH e FSH.

V.1 Experimento 1

V.1.1 Toxicidade materna e efeitos pré e peri-natais

As investigações sobre a origem de malformações congênitas em mamíferos, assim como os ensaios preditivos relacionados à Toxicologia do Desenvolvimento, são relativamente recentes. Vários fatores contribuíram para o atraso desta área da Toxicologia, entre eles está a idéia - preconcebida - de que o desenvolvimento embrionário de mamíferos, por ocorrer no interior do útero materno, estaria protegido dos efeitos adversos de agentes ambientais. Acreditava-se que as conseqüências da exposição materna aos agentes ambientais poderiam ser unicamente do tipo “*tudo-ou-nada*”, ou seja, ou o agravo seria severo o suficiente para causar a morte do embrião e a interrupção da gravidez, ou então não causaria mal algum ao concepto (Manson, 1986). Somente a partir da década de 1930 começaram a surgir as primeiras constatações experimentais de que a proteção materna não era tão eficiente a ponto de impedir que fatores externos (ambientais) causassem anomalias em embriões de mamíferos (Persuad, 1979).

Hoje é conhecido que determinados agentes químicos podem alterar o desenvolvimento pré-natal e causar alterações visíveis ao nascimento ou seqüelas que só serão detectadas na vida adulta. Enquanto muitas anomalias congênitas são diagnosticadas já ao nascimento, ou até antes deste (*e.g.* por ultra-sonografia ou por amniocentese e exame do cariótipo), outras só são detectadas bem mais tarde ou até mesmo décadas depois, como é o caso da carcinogênese transplacentária (*e.g.* adenocarcinoma de vagina que resulta da exposição *in utero* ao dietilestilbestrol e se manifesta em mulheres adultas jovens). Para avaliar o efeito tóxico de um determinado agente químico durante a gestação é preciso levar em consideração que a toxicocinética pode ser modificada por essa condição fisiológica que envolve não somente o organismo materno, mas sim, uma nova unidade denominada unidade “*materno-placentária-fetal*” (Lemonica, 2003). Vários estudos mostram que a manutenção da homeostasia, *i.e.* da constância do meio interno, é essencial ao desenvolvimento embriofetal normal. Assim sendo, o aparecimento do efeito embriofetotóxico induzido por determinada substância química pode resultar da interação desta substância com outros fatores que incidem sobre o organismo materno, como *e.g.* o estado nutricional,

idade materna, estresse e outros fatores ambientais (Chahoud *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2001; Chernoff *et al.*, 1988; Chernoff *et al.*, 1989).

Há diversos indícios de que a manutenção da homeostasia materna é essencial para o desenvolvimento embriofetal normal. Por exemplo, o estresse experimentado pela mãe durante a gestação pode alterar o desenvolvimento pré- e/ou pós-natal, além de ser capaz também de potencializar o efeito teratogênico de outros agentes (Chernoff *et al.* 1988). Doenças maternas, tais como diabetes mellitus e hipertemia, podem igualmente comprometer os processos normais de embriogênese, resultando em efeitos embriotóxicos. A ação tóxica de xenobióticos sobre o organismo materno pode, de forma inespecífica, alterar o desenvolvimento normal da prole. Por outro lado, a toxicidade materna nem sempre está associada à indução de anormalidades do desenvolvimento embriofetal. Por exemplo, o estireno, mesmo em níveis de dose altamente tóxicos para a mãe, não causa alterações embriofetais (Murray *et al.* 1978). O TPTH, por outro lado, causou efeitos embriofetotóxicos em camundongos expostos *in utero* em níveis de doses não tóxicos para o organismo materno, apontando uma certa seletividade dos efeitos adversos sobre o desenvolvimento embriofetal (Sarpa *et al.*, 2007).

A interpretação de efeitos adversos sobre o desenvolvimento da prole, em níveis de dose tóxicos para o organismo materno é difícil, uma vez que é praticamente impossível distinguir os efeitos decorrentes da exposição direta do embrião, daqueles induzidos indiretamente, pela alteração da fisiologia materna. A toxicidade materna, nos estudos de toxicidade pré-natal é, via de regra, confirmada por avaliações que podem incluir: 1. redução do ganho de peso corpóreo, 2. ocorrência de óbitos durante o período de tratamento, 3. redução do consumo de água e/ou ração, 4. aparecimento de sinais clínicos e 5. alterações no peso e/ou morfologia dos órgãos. Nas diretrizes das agências regulatórias internacionais recomenda-se que os estudos de toxicidade reprodutiva, além de conduzidos de forma a viabilizar a avaliação da relação dose-efeito, incluam pelo menos um nível de dose que produza toxicidade materna. Acredita-se que, ao incluirmos um nível de dose tóxico para o organismo materno, estaríamos aumentando as chances de trabalhar em faixas de dose capazes de produzir algum tipo de efeito sobre o desenvolvimento embriofetal.

Como um agente químico pode interferir no desenvolvimento dos descendentes por afetar diretamente os filhotes, ou indiretamente, ao comprometer a capacidade da mãe em sustentar a prole, tais informações são importantes e devem ser levadas em consideração na interpretação dos efeitos tóxicos de uma substância.

Nas condições experimentais do presente estudo, a exposição ao TPTH não provocou mortes, alterações no ganho de peso corporal das fêmeas grávidas, nem qualquer outro sinal de toxicidade aparente, tais como, diarreia, perda do apetite, piloereção, tremores ou convulsões, nas mães. A única alteração observada no organismo materno diz respeito ao peso dos órgãos avaliados.

Como dito anteriormente, a toxicidade de uma substância pode ser evidenciada, também, pelo aspecto macroscópico e peso de órgãos durante a necrópsia. Por ser o fígado o principal órgão do metabolismo de xenobióticos, em casos de intoxicação, o seu volume e/ou peso pode estar aumentado. As mães expostas à maior dose de TPTH apresentaram um drástico aumento do peso relativo do fígado, indicando toxicidade materna nesse nível de dose. Órgãos do sistema imunológico, como o timo e o baço, também foram examinados na necrópsia.

Apesar dos compostos trifenil estanho serem considerados como agentes imunotóxicos menos severos que compostos tributil estanho, ainda assim o TPTH exhibe claros efeitos imunotóxicos. (WHO, 1999). Os efeitos desses compostos sobre o sistema imunológico de mamíferos são bem documentados e foram observados tanto em estudos de curta duração, como em estudos de exposição mais prolongada, conduzidos em ratos, camundongos e cobaias (WHO, 1992, CICAD National Committee, 1997). Dentre os diferentes órgãos e parâmetros relacionados ao sistema imunológico; o baço, o timo, a produção de imunoglobulinas e o número absoluto e relativo de linfócitos estão entre aqueles que foram mais intensamente afetados pela exposição a compostos trifenil estanho. No nosso estudo, notamos uma tendência (não estatisticamente significativa) à redução do peso do absoluto e relativo do baço. Este resultado é consistente com os resultados obtidos nos estudos realizados por Viana (2002) e Sarpa (2003), e podem ser atribuídos ao efeito imunotóxico do TPTH.

Dados relativos à duração da gestação, ao número de sítios de implantação no útero, ao número de filhotes ao nascimento e a viabilidade dos filhotes, sugeriram a ausência de toxicidade materna e embriofetal. Todavia, o canibalismo de 3 ninhadas completas ao nascimento na dose de 7,5mg/kg indica que houve um efeito que pode ter sido devido a alterações nas mães ou, provavelmente, na prole exposta *in utero*, já que o canibalismo de filhotes malformados ou inviáveis é comportamento exibido por roedores e outros mamíferos. Nos filhotes dos grupos em que não ocorreu canibalismo, não observamos anomalias externas. Observamos uma redução – dose relacionada – do peso médio dos filhotes no dia 1 de vida pós-natal, indicando que ocorreu toxicidade peri-natal em níveis de doses não tóxicos para as mães. Esse efeito, embora significativo no primeiro dia de vida pós-natal, foi reversível, de modo que, a partir do dia 5 de vida pós-natal, a diferença entre os grupos não foi mais detectada pela análise estatística. Esses resultados indicam que, nas condições experimentais deste estudo, o TPTH apresentou toxicidade peri-natal em camundongos.

V.1.2 Efeitos da exposição ao TPTH *in utero* e durante a lactação sobre o aparecimento dos marcos do desenvolvimento pós-natal

O desenvolvimento no período de amamentação, caracterizado pelo ganho de peso, descolamento das orelhas, aparecimento de pêlos, abertura de olhos e erupção de incisivos, não foi alterado pela exposição ao TPTH. Viana (2002) encontrou diferenças nos marcos somáticos do desenvolvimento (erupção de incisivos e abertura de olhos) em camundongos expostos apenas durante a gestação ao TPTH. Essas alterações foram notadas, porém, em níveis de doses mais altos do que 7,5 mg/kg de peso / dia. Estes resultados sugerem, portanto, que o TPTH nas doses empregadas não afetou adversamente o desenvolvimento pós-natal dos filhotes das mães expostas ao TPTH.

Para avaliação da possível interferência do TPTH com o desenvolvimento sexual da prole exposta via organismo materno, determinamos o dia da descida dos testículos para a bolsa escrotal, e o dia da abertura do canal vaginal. Tem sido relatado que agentes que perturbam o equilíbrio hormonal (“desreguladores endócrinos”) podem acelerar ou retardar estes processos (U.S. EPA, 1996). Nesse contexto, Makita *et al.* (2003 e 2006) não observaram atraso na abertura de vagina e na separação prepucial, respectivamente, de ratos (fêmeas e machos) expostos *in utero* e durante a lactação a 25

$\mu\text{g/g}$ TBTCI incorporado na dieta. Neste estudo, a exposição ao TPTH *in utero* e durante a lactação não alterou os períodos médios para a descida dos testículos ou abertura do canal vaginal, não interferindo, portanto, com o início da puberdade nos camundongos, tanto machos quanto fêmeas.

V.1.3 Efeitos da exposição *in utero* e durante a lactação ao TPTH sobre fertilidade

A exposição ao TPTH *in utero* e durante a lactação não afetou adversamente a fertilidade de camundongos - machos e fêmeas - como demonstrado pelos índices de cruzamentos e fertilização, o que é consistente com os resultados encontrados por Ogata & Omura (2001). Em estudo de exposição contínua por duas gerações consecutivas, esses autores não observaram diferenças no índice de fertilidade em animais expostos ao TBTCI (5, 25 e 125 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal/dia) via dieta. A ausência de efeitos sobre a fertilidade dos animais expostos *in utero* e durante a lactação ao TPTH se deve, provavelmente, a uma característica dos roedores que, em geral, produzem e armazenam espermatozoides em quantidade muito superior à quantidade necessária para garantir a fertilidade. Em roedores, a produção espermática pode ser reduzida em 90% sem comprometer a fertilidade.

V.1.4 Efeitos da exposição ao TPTH *in utero* e durante a lactação sobre os órgãos e sobre os parâmetros reprodutivos dos filhotes na idade adulta

Os animais foram avaliados na idade adulta quanto ao peso do fígado e do baço. Não foram observadas alterações dignas de nota no peso desses órgãos entre os diferentes grupos experimentais. Cooke *et al.* (2004) registraram redução no peso do timo, baço e fígado nos filhotes de ratos Sprague-Dawley expostos a 0,025; 0,25 e 2,5 mg TBTCI/kg *in utero* e durante a lactação. Nesse estudo, no entanto, os animais continuaram sendo expostos do desmame até a idade adulta. Os resultados do nosso estudo, entretanto, indicam que as doses que testamos não produziram toxicidade na prole exposta quando esta foi avaliada na idade adulta.

Além do fígado e do baço, examinamos também o peso dos órgãos reprodutivos femininos e masculinos. Alterações do peso de órgãos reprodutivos podem indicar

toxicidade reprodutiva. Modificações do peso absoluto e relativo de órgãos reprodutivos indicam que um agente pode ser potencialmente prejudicial ao sistema reprodutivo (Zenick *et al.*, 1994). Não observamos alterações dos pesos dos ovários e do útero das fêmeas mortas na idade adulta. Nos machos, o peso dos testículos apresenta variação pequena entre animais da mesma espécie, sendo um marcador sensível de dano à gônada. No presente estudo, não observamos diferenças entre controles e expostos ao TPTH quanto ao peso dos testículos. Outros autores também não observaram diferenças do peso dos testículos em ratos expostos ao TBT (25 µg/g de peso corporal/dia) no período perinatal, através da dieta, e mortos com 6 e 12 semanas de idade. (Makita *et al.*, 2004; Makita & Omura, 2006). Os dados referentes aos pesos dos órgãos reprodutivos indicam que, nas condições experimentais do presente estudo, o TPTH não causou toxicidade reprodutiva nas fêmeas e nos machos expostos *in utero* e durante a lactação e mortos na idade adulta.

O número de células espermáticas representa a integridade da espermatogênese nos testículos, enquanto o número de espermatozoides na cauda do epidídimo é uma das avaliações mais significativas da função do epidídimo (Amann, 1982; Zenick *et al.*, 1994). O tamanho dos testículos e a produção espermática na idade adulta dependem do número de células de Sertoli formadas no período perinatal (Sharpe, 1994; Jensen *et al.*, 1995; Toppari *et al.*, 1996). A exposição aos contaminantes químicos ambientais com atividade estrogênica durante esse período, pode reduzir a multiplicação dessas células em decorrência da supressão da síntese e secreção do hormônio folículo estimulante (Toppari *et al.*, 1996; Sweeney, 2000). Esse efeito pode ser irreversível, uma vez que as células de Sertoli não se dividem em roedores adultos, e constituem uma população fixa de células que dão suporte físico e bioquímico às células germinativas durante o processo de espermatogênese (Orth, 1982). Para verificar se a exposição ao TPTH, *in utero* e durante a lactação, foi capaz de afetar tardiamente os parâmetros reprodutivos masculinos, neste estudo os filhotes foram avaliados quanto a número de espermatozoides, produção espermática diária e tempo de trânsito espermático quando alcançaram a idade adulta (cerca de 90 dias). Não foram observadas diferenças entre os grupos expostos ao TPTH e os controles não expostos, indicando ausência de efeitos tóxicos sobre a espermatogênese dos machos expostos *in utero* e durante a lactação e mortos na idade adulta. Todavia, para verificar se houve ausência de dano, ou uma

reversão do dano, um grupo de filhotes deveria ter sido morto logo após o fim do tratamento.

V.2 Experimento II

V.2.1 Toxicidade geral e correlação entre o ganho de peso corporal e os marcos físicos do desenvolvimento

Alterações do sistema reprodutivo podem ser secundárias à ocorrência de toxicidade geral. A toxicidade do TPTH para os animais (machos e fêmeas) foi avaliada através do ganho de peso corporal, do peso do fígado, timo e baço e do monitoramento diário dos animais para detectar sinais clínicos de toxicidade, tais como, perda de pêlo, convulsões, salivação, tremores e piloereção. A avaliação do peso corporal durante o tratamento indica o estado de saúde geral do animal e a redução do ganho de peso corporal pode ser um reflexo de toxicidade sistêmica (Zenick *et al.*, 1994; U.S. EPA, 1996).

No presente estudo, observamos acentuada mortalidade (80%) das fêmeas e dos machos a partir do 6º dia de tratamento com a maior dose de TPTH (15mg/kg de peso corporal/dia). A exposição ao TPTH também reduziu o ganho ponderal (média±DP) das fêmeas e dos machos na primeira semana do tratamento em todas as doses estudadas, mas houve recuperação nas semanas que se seguiram de modo que, ao final do tratamento, a redução foi observada apenas com as duas maiores doses (Quadro 5). Esses resultados indicam que os animais podem ter se tornado tolerantes ao tratamento com TPTH.

Quadro 5: Esquema indicando a redução do ganho de peso corporal durante as quatro semanas de tratamento.

TPTH		1º semana	2º semana	3º semana	4º semana
1,875mg/kg	Macho	↓	--	--	--
	Fêmea	↓	--	--	--
3,75mg/kg	Macho	↓	↓	↓	--
	Fêmea	↓	↓	--	--
7,5mg/kg	Macho	↓	↓	↓	↓
	Fêmea	↓	↓	↓	↓
15mg/kg	Macho	↓	↓	↓	↓
	Fêmea	↓	↓	↓	↓

↓: redução do ganho de peso corporal diferente estatisticamente do grupo controle (óleo).

É importante ressaltar que, nas fêmeas, a média de peso corporal pode variar com o estado fisiológico do animal, uma vez que estrógeno e progesterona influenciam a ingestão alimentar e o gasto de energia. Um composto com atividade estrogênica pode reduzir a ingestão de alimentos e, portanto, interferir com a massa corporal de ratas. Interferências endócrinas extragonadais sobre o hormônio do crescimento, ou hormônios tireoideanos, por exemplo, podem levar ao retardo de desenvolvimento, com atraso do início da puberdade ou interferir com o ciclo sexual e fertilidade (U.S. EPA, 1996). No nosso estudo, além da drástica diminuição no ganho de peso corporal das fêmeas expostas ao TPTH, observamos também atraso do desenvolvimento sexual (dia da abertura da vagina) nas duas maiores doses, quando comparadas ao grupo controle (0 = 27 pós-natal, 7,5 mg/kg = 31 pós-natal e 15mg/kg = 39 pós-natal). É sabido que tratamentos com hormônios sexuais afetam a abertura de vagina. Tratamento pré-natal e neonatal com estrógenos acelera a abertura de vagina (Rodriguez *et al.*, 1993; Biegel *et al.*, 1998), enquanto o tratamento com andrógenos retarda a abertura de vagina (Hoepfner & Ward, 1988; Rhees *et al.*, 1997). Desreguladores endócrinos também afetam a abertura de vagina. A exposição pré-natal e/ou neonatal ao desregulador endócrino estrogênico, metoxiclor, acelera a abertura da vagina, enquanto que a exposição pré-natal a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 3,3',4,4',5-pentaclorobifenila atrasa a abertura de vagina (Gray *et al.*, 1989; Gray e Otsby, 1995; Faqi *et al.*, 1998). O adiantamento do dia da abertura da vagina causado por estrógenos e metoxiclor foi acompanhado pela diminuição do peso corporal no dia da abertura da vagina (Rodriguez *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1989). Nesse estudo, observamos um atraso do dia da abertura da vagina nos animais expostos as duas maiores doses. Se o atraso do dia da abertura de vagina foi causado pelo retardo no desenvolvimento sexual e não devido a uma carência do crescimento, então o peso corporal no dia da abertura da vagina deveria estar aumentado. No entanto, o peso corporal no dia da abertura da vagina, em nosso estudo, não estava aumentado nas duas maiores doses, sugerindo que o efeito induzido pelo TPTH não está hormonalmente relacionado (Quadro 6). Portanto, o atraso da abertura do canal vaginal pode estar associado à toxicidade geral, uma vez que ele ocorreu em níveis de doses que claramente reduziram o peso corporal dos animais.

Além da abertura do canal vaginal e do peso do útero, outros parâmetros são usados para avaliar a atividade estrogênica de compostos químicos, entre eles, a receptividade sexual das fêmeas e a presença de células cornificadas na vagina (determinação do estro). O prolongamento do estro pode ser uma resposta à exposição a um agente com propriedades estrogênicas ou a um agente capaz de bloquear a ovulação. Dodds *et al.* (1938) (*apud* EDSTAC, 1998) observaram indução de estro persistente em ratas ovariectomizadas após exposição ao dietilestilbestrol (DES). Já o diestro prolongado pode ser resultado da exposição a agentes que afetam o desenvolvimento dos folículos ovarianos, que reduzem o número de folículos primordiais, ou que interferem com a ação das gonadotrofinas no ovário (U.S. EPA, 1996). Com relação a possível interferência dos compostos triorganoestanhosos sobre a função reprodutiva (ciclo estral) de fêmeas, Ogata *et al.* (2001), após um estudo de duas gerações com ratas expostas ao TBTCI (125 µg/g de peso corporal/dia) através da dieta, observaram prejuízo da ciclicidade do estro, associado ao atraso da abertura da vagina. Até a presente data, não foram relatados estudos relativos aos efeitos do TPTH sobre o ciclo estral de camundongos. No nosso estudo, a exposição ao TPTH causou irregularidade do ciclo estral e atrasou o primeiro estro das fêmeas nas doses de 7,5 e 15 mg TPTH/kg de peso corpóreo, sem alterar o peso corporal no 1º estro e o tempo, em dias, entre a abertura do canal vaginal e o 1º estro. Esse atraso no dia do primeiro estro nas duas maiores doses coincide com o atraso no dia da abertura do canal vaginal (Quadro 6) e com a redução do peso corporal até a 4ª semana de tratamento (Quadro 5) indicando, mais uma vez, que esse efeito pode estar associado a uma toxicidade sistêmica, e atraso geral do desenvolvimento somático, e não ao efeito de desregulação endócrina associado aos compostos triorganoestanhosos. Os mecanismos com relação aos efeitos do TPTH sobre o ciclo estral não são conhecidos.

Nos machos, a época (em dias) em que ocorre a descida dos testículos para a bolsa escrotal e a separação prepucial são parâmetros andrógeno-dependentes, constituindo sinal externo do estado de desenvolvimento sexual dos machos (Dalsenter *et al.*, 1999). Em um estudo com ratos expostos ao TBT (15mg/kg de peso corporal/dia) durante a puberdade, Grote *et al.* (2004) verificaram um atraso significativo na completa separação prepucial, que começou no dia 46 pós-natal. Esse atraso, entretanto, não foi observado nos animais expostos a 6mg TPT/kg de peso corporal/dia. Makita *et al.* (2004) e Makita & Omura (2006), por outro lado, não observaram diferenças do dia da

separação prepucial em ratos Wistar expostos no período perinatal, através da dieta, ao TBT (25 µg/g de peso corporal/dia) e mortos com 6 e 12 semanas de idade, respectivamente. Os mesmos autores (Makita *et al.*, 2001) não encontraram atraso na descida dos testículos em animais expostos a doses de 5, 25 e 125 µg/g de peso corporal/dia de TBTCI na dieta, em estudo de toxicidade reprodutiva de duas gerações com Ratos Wistar. Neste estudo, a diminuição do ganho de peso corporal dos machos (Quadro 5) foi acompanhada de um atraso na descida de testículos, a partir da dose de 3,75mg TPTH/kg, indicando que esse atraso pode estar relacionado a uma toxicidade sistêmica. Os dados apresentados no Quadro 6 confirmam essa hipótese, uma vez que, o peso corporal no dia da descida de testículo não diferiu entre os grupos. Devido ao reduzido tamanho do animal com que trabalhamos (camundongos), não foi possível determinar com precisão o dia da separação prepucial.

Quadro 6: Relação entre o peso corporal médio e os dias da abertura de vagina e da descida de testículos.

	Óleo	1,875mg TPTH/kg	3,75mg TPTH/kg	7,50mg TPTH/kg	15mg TPTH/kg
Mediana do dia da abertura de vagina (dias) x peso médio corporal no dia da abertura de vagina (g)	27 17,00	27,5 16,97	28 16,66	31* 17,65	39,5* 17,88
Mediana do dia da descida de testículos (dias) x peso médio corporal no dia da descida de testículos (g)	21 11,40	21 10,95	22,5* 10,83	23* 10,56	29* 11,63

*diferente estatisticamente significativo do controle (óleo).

V.2.2 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre os órgãos de fêmeas e machos mortos no dia 46 pós-natal

Além das alterações do peso corporal, as modificações do peso dos órgãos também são indicadores de toxicidade sistêmica (Zenick *et al.*, 1994; U.S. EPA, 1996). Neste estudo determinamos o peso do fígado, do timo e do baço dos animais (machos e fêmeas) expostos ao TPTH do dia 15 ao 45 pós-natal.

Observamos um aumento do peso relativo do fígado, a partir da dose de 3,75mg TPTH/kg, nas fêmeas e na dose de 7,5 e 15mg TPTH/kg, nos machos. Grote *et al.* (2006) também encontraram um aumento do peso absoluto e relativo do fígado nas ratas expostas durante a puberdade a 6mg TPT/kg de peso corporal/dia e sugeriram que este aumento dever-se-ia a uma indução das enzimas hepáticas, que resultaria, possivelmente, da acumulação e subsequente aumento do metabolismo da substância. No nosso estudo, também observamos um aumento do peso relativo do timo das fêmeas expostas à maior dose de TPTH e, nos machos, aumento relativo do peso do timo nas duas maiores doses (7,5 e 15mg /kg peso corporal/dia). No período da pré-puberdade e da puberdade, a testosterona aparece como um mediador no processo normal de involução tímica, portanto, o aumento do peso do timo poderia estar relacionado a uma diminuição no nível de testosterona (Pearce *et al.*, 1981; Greenstein *et al.*, 1986). Porém, no nosso estudo, não notamos alterações no nível de testosterona, o que sugere que o aumento do peso do timo ocorreu devido a um efeito tóxico direto do TPTH sobre o órgão. Nós também constatamos aumento do peso relativo do baço na dose de 15 mg/kg de peso corporal/dia. Esses resultados contrastam com os dados de Grote *et al.* (2004) em ratos. Esses autores encontraram uma diminuição dos pesos, absoluto e relativo, do timo e do baço nos ratos expostos a 6,0 e 12mg TPT/kg de peso corporal/dia e 15mg TBT/kg de peso corporal/dia durante o período da puberdade.

Os pesos do útero e dos ovários são desfechos importantes para caracterizar a saúde e o funcionamento do sistema reprodutivo feminino. As variações hormonais do ciclo sexual feminino têm reflexos no peso do útero que, em resposta à secreção de estrógeno, aumenta de tamanho e se enche de fluido (U.S. EPA, 1996). Sendo assim, o peso do útero pode ser utilizado em testes para avaliar o potencial estrogênico de diferentes agentes (Teste uterotrófico). No entanto, a variabilidade natural do peso desse órgão dificulta a interpretação de resultados, principalmente se as fêmeas não forem mortas na mesma fase do ciclo. Para os ovários, alterações de peso podem estar associadas à depleção de folículos, presença de cistos, inibição da formação do corpo lúteo ou alteração na função do hipotálamo ou hipófise (U.S. EPA, 1996). No nosso estudo, para verificar se a redução do peso dos órgãos apenas acompanha a diminuição do peso corporal, ou se esse órgão é particularmente vulnerável ao TPTH, analisamos também as modificações de peso relativo. A exposição ao TPTH não alterou o peso dos ovários e diminuiu o peso relativo do útero na dose de 3,75 e 15mg TPTH/kg, quando

comparado ao grupo que recebeu a menor dose (1,875 mg/kg). Estes dados e o aparecimento de efeitos sobre outras variáveis avaliadas, *i.e.*, atraso no dia da abertura de vagina e do dia do 1º estro, somente em níveis de doses que causaram acentuada toxicidade sistêmica, indicam que a exposição ao TPTH, nas condições experimentais desse estudo, não foi prejudicial ao sistema reprodutivo feminino.

Estudos que examinaram a interferência de TPT e TBT sobre os órgãos e o desenvolvimento sexual masculino são mais frequentes do que relatos sobre alterações em órgãos reprodutivos femininos. Grote *et al.* (2004) verificaram que, após a exposição de ratos por 30 dias, durante o período da puberdade, houve diminuição do peso, absoluto e relativo, dos testículos nos animais tratados com 2mg TPT/kg de peso corporal/dia e somente do peso absoluto dos testículos nos machos tratados com 6 e 12mg TPT/kg de peso corporal/dia, e diminuição do peso, absoluto e relativo, dos epidídimos e da vesícula seminal nas doses de 6 e 12mg TPT/kg de peso corporal/dia. Nos animais tratados com TBT, os mesmos autores observaram aumento do peso, absoluto e relativo, dos epidídimos e da próstata na dose de 0,5mg TBT/kg de peso corporal / dia e redução do peso, absoluto e relativo, dos epidídimos, da próstata e da vesícula seminal na dose de 15mg TBT/kg de peso corporal/dia. Omura *et al* (2001) estudaram em ratos expostos por 2 gerações, a toxicidade reprodutiva do TBTCI focalizando os efeitos deste composto sobre o desenvolvimento sexual masculino. Estes autores observaram diminuição do peso dos testículos e do epidídimo, apesar das concentrações do hormônio luteinizante e da testosterona no soro não estarem diminuídas. Os autores sugerem que as mudanças observadas se devem à inibição da aromatase e que o TBTCI deve ser um fraco inibidor da dessa enzima em ratos machos. No que diz respeito à masculinização de gastrópodes expostos ao TBT, o relatório do Programa Internacional de Segurança de Químicos (IPCS) sobre desreguladores endócrinos indica que a inibição da aromatase e o consequente aumento de andrógenos pode ser um dos mecanismos envolvidos no imposex (Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors).

No presente estudo, o TPTH causou uma drástica redução do peso, absoluto e relativo, dos epidídimos na dose de 15 mg/kg de peso corporal/dia e uma pequena redução do peso absoluto do testículo direito também foi observada neste mesmo nível de dose, nos machos mortos no dia 46 de vida pós-natal. No entanto, nessa dose o

número de animais avaliados era pequeno (n=4) e a redução desses órgãos foi acompanhada de toxicidade sistêmica e acentuada redução do peso corpóreo dos animais, indicando que o efeito do TPTH sobre os órgãos reprodutivos está possivelmente associado à toxicidade geral do composto. Nos machos mortos após o tratamento, *i.e.*, no dia 46 pós-natal, observamos redução do peso da vesícula seminal a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg de peso corporal/dia. Esse efeito foi dose-relacionado e observado tanto em termos de pesos absolutos, como relativos. Como o peso da vesícula seminal é considerado um parâmetro andrógeno-dependente esse achado parece refletir alguma interferência endócrina decorrente da exposição ao TPTH. Dados sobre o peso da próstata poderiam consubstanciar os achados em relação ao peso da vesícula seminal sobre uma possível interferência endócrina, mas devidos a dificuldades de cunho técnico para a dissecação desta glândula, não foi possível realizar esta avaliação.

Com relação à avaliação histológica dos testículos é sabido que o dano histopatológico de órgãos reprodutivos pode ser considerado como indicativo de efeito adverso sobre a reprodução (U.S. EPA, 1996). No entanto, freqüentemente, a avaliação histológica revela lesões apenas se o prejuízo ao epitélio germinativo for severo. Lesões mais sutis, como retenção de espermátides ou perda de células germinativas, que podem afetar significativamente a liberação normal de espermatozóides na luz do túbulo, podem não ser detectadas histologicamente (Zenick *et al.*, 1994; U.S. EPA, 1996). Além disso, na espermatogênese a população de espermatogônias é continuamente renovada, e, a menos que ocorra a destruição completa da reserva de espermatogônias, a espermatogênese pode ser restaurada depois que a exposição ao agente cessa. Snow & Hays (1983) mostraram que a exposição de machos adultos ao TPTCl induz distúrbios nos túbulos seminíferos em 72% dos animais tratados. Saxena *et al* (1985) registraram que a administração intratesticular de di-*n*-butil de estanho induz uma marcante mudança degenerativa nos testículos, com possível atrofia dos túbulos seminíferos e completa suspensão da espermatogênese. A análise histopatológica, do presente estudo, encontra-se em andamento, porém, após análise morfométrica dos túbulos seminíferos, observamos uma diminuição na média do diâmetro dos testículos dos animais expostos a 3,75 e 7,5 mg TPTH/kg. Esse resultado indica que pode ter ocorrido atrofia dos túbulos seminíferos nos animais expostos ao TPTH na pré-puberdade e na puberdade.

V.2.3 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre os parâmetros reprodutivos de machos mortos logo após o término do tratamento

O número de células espermáticas reflete a integridade da espermatogênese no interior dos testículos e a função testicular, enquanto que o número de espermatozóides na cauda do epidídimo é uma das avaliações mais significativas da função do epidídimo (Amann, 1982; Zenick *et al.*, 1994). Efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo masculino foram relatados em animais expostos a outros compostos organoestanhosos. YU *et al.* (2003) observaram uma redução na produção espermática diária e no número de espermátides por testículos em ratos (Sprague-Dawley) tratados por 10 dias durante a puberdade com 20mg TBTCI/kg, e uma acentuada diminuição no número de espermatozóides na cauda do epidídimo nas doses de 10 e 20mg TBTCI/kg, apesar de não encontrar diferenças no peso dos órgãos reprodutivos. Em outro estudo com TBTCI, Omura *et al.* (2001), relataram uma redução no número de espermátides por testículo em machos da geração F1 expostos a 125µg/g de TBTCI na dieta. Já ratos Wistar imaturos expostos a 25µg/g de TBT na dieta da 6^o a 12^o semana de vida não apresentaram diferenças no número de espermatozóides no epidídimo (Makita *et al.*, 2005). Também não foram observadas diferenças na contagem de espermatozóides do epidídimo de animais expostos *in utero* e durante a lactação a 25 µg/g TBT na dieta e mortos com 12 semanas de vida (Makita & Omura, 2006). Reddy *et al.* (2006) encontraram uma drástica redução no número de espermatozóides no epidídimo de camundongos Suíço Albino, após três dias de exposição ao TPTH (10 e 25µg/kg de peso corporal / dia) ou ao TBTO (10 e 25µg/kg de peso corporal/dia). A via de administração utilizada nesse estudo (i.p.), entretanto, não é aquela pela qual ocorre à exposição humana a essa substância. Além disso, o TPTH e o TBTO foram dissolvidos em etanol, solvente que pode ter influenciado nos resultados do estudo.

Neste estudo, a exposição de camundongos (Suíço Albino) durante 30 dias ao TPTH reduziu em 26% e 45% a produção espermática diária e em 38% e 82% o número de espermatozóides da cauda do epidídimo nas doses 7,5 e 15 mg TPTH/kg, respectivamente, nos animais mortos logo após o fim do tratamento. O TPTH reduziu também o tempo de trânsito espermático (dias) nos animais expostos a 15mg /kg de peso corporal/dia. Estes resultados demonstram que a exposição a substâncias químicas

na pré-puberdade e puberdade pode afetar adversamente o sistema reprodutivo masculino. Alguns desfechos não avaliados poderiam enriquecer a discussão sobre os achados anteriormente apresentados. A produção espermática diária e a maturação dos espermatozoides podem ser criticamente dependentes do número e da funcionalidade das células de Sertoli presentes nos testículos. Cabe lembrar, inclusive, que os espermatozoides imaturos do testículo se movem para o epidídimo, ajudados por secreções das células de Sertoli (Neubert, 1997). A produção espermática é uma variável diretamente relacionada com o número de células de Sertoli. Portanto, as avaliações histopatológicas dos testículos (em andamento), complementarão os achados deste estudo e não podem ser negligenciadas (Toppari *et al.*, 1996). Avaliações histopatológicas dos epidídimos seriam igualmente importantes porque as células da parede do epidídimo são responsáveis pela secreção de proteínas fundamentais ao processo de maturação dos espermatozoides. Seguindo nesta mesma vertente de raciocínio, a avaliação da motilidade espermática (desfecho também não avaliado) poderia trazer indícios adicionais sobre a função do epidídimo, visto que a habilidade dos espermatozoides em movimentar-se seria adquirida durante o processo de maturação neste órgão. Porém, devido a dificuldades de cunho técnico, esta avaliação também não pode ser realizada no presente estudo.

A avaliação espermática pode ser feita no homem, sendo, portanto, uma medida que permite a comparação entre os efeitos observados em animais e o efeito em seres humanos. Alguns estudos relatam oligospermia relacionada à exposição ocupacional a diferentes pesticidas como DDT, kepone e 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP) (Cannon *et al.*, 1978; Slutsky *et al.*, 1999). Até a presente data não foram realizados estudos epidemiológicos com avaliação espermática em seres humanos expostos ao TPTH. Todavia, o efeito nocivo de pesticidas em geral sobre a reprodução de animais de laboratório sugere que estes podem também afetar a fertilidade do homem. Os processos reprodutivos em seres humanos, pelo menos nos machos, parecem ser mais vulneráveis a efeitos deletérios do que os roedores usualmente empregados como modelo experimental (Amann, 1982). Os roedores apresentam as espermatogônias A0 (de reserva) que são recrutadas em caso de dano testicular. A existência destas células de reserva nos humanos é incerta, sendo que a ausência desta população de células compensatórias pode contribuir para o aumento da vulnerabilidade do homem a agentes espermatotóxicos (Zenick *et al.*, 1994). Além disso, em roedores, o número de

espermatozoides produzidos é amplamente superior à quantidade necessária para garantir a fertilidade plena. Em algumas linhagens de ratos e camundongos, a produção espermática pode ser reduzida em até 90% sem comprometer a fertilidade. No entanto, reduções bem menos severas podem comprometer a capacidade reprodutiva na espécie humana (e em primatas não humanos). No homem a produção de espermatozoides é muito próxima ao limite necessário para assegurar um desempenho reprodutivo adequado (Amann, 1982; Zenick *et al.*, 1994).

Morfologia dos espermatozoides

A morfologia espermática refere-se a aspectos estruturais dos espermatozoides e pode ser avaliada na cauda do epidídimo, no ducto deferente e em amostras do ejaculado. A avaliação da morfologia é capaz de identificar anomalias na cabeça e no flagelo dos espermatozoides. Como há uma correlação entre potencial mutagênico e capacidade de induzir anormalidades espermáticas, a análise morfológica da cabeça dos espermatozoides tem sido freqüentemente reportada em estudos de potencial genotóxico. Com isso, estudos relatam que o aumento da incidência de malformações na cabeça dos espermatozoides, reflete a mutação em células germinativas. No entanto, nem todos os mutágenos induzem anormalidades na cabeça dos espermatozoides, e substâncias não mutagenicas também podem alterar a morfologia dos espermatozoides. Portanto, a relação entre morfologia espermática e mutagenicidade não é necessariamente sensível ou específica (U.S. EPA, 1996). No nosso estudo, esse parâmetro foi usado para ampliar a avaliação de efeitos tóxicos sobre os espermatozoides e indicar se uma determinada substância tóxica é capaz de agir nas células germinativas (U.S. EPA, 1986).

A análise da morfologia espermática revelou um discreto aumento do número de espermatozoides anormais nos animais expostos ao TPTH. Não observamos, no entanto diferenças entre os grupos expostos ao TPTH e o grupo controle, sugerindo que o TPTH não causa danos morfológicos persistentes nas células germinativas de camundongos.

Níveis de Testosterona

Alterações dos níveis hormonais podem indicar dano à gônada. Apesar de não ser usada rotineiramente em testes de toxicidade, a medida dos hormônios sexuais oferece informação complementar para a avaliação da toxicidade reprodutiva de um agente químico (U.S. EPA, 1996). Grote *et al.* (2004) verificaram uma diminuição nos níveis de testosterona total em animais expostos por 30 dias a 12mg TPT/kg de peso corporal/dia e naqueles expostos a 15mg TBT/kg de peso corporal/dia. Reddy *et al.* (2006) também observaram uma redução nos níveis de testosterona total em animais expostos por via ip a doses baixas de TPTH. Omura *et al.* (2001), por outro lado, encontraram um aumento na concentração de testosterona no soro de machos da geração F1 expostos a 125µg/g de TBTCl na dieta. Makita *et al.* (2006) não notaram diferenças na concentração de testosterona no soro de animais expostos no período perinatal a 25ppm de TBT através da dieta. Neste estudo, não observamos diferenças entre os diferentes grupos experimentais quanto aos níveis de testosterona livre.

Uma explicação para a inconsistência desses achados na literatura é a variação cíclica dos níveis hormonais que acontece no período de 24 horas como consequência da liberação pulsátil do hormônio luteinizante (LH). Isto dificulta a detecção de diferenças entre os grupos. O controle no horário de coleta da amostra ajuda a minimizar esta variabilidade, reduzindo a interferência dos ritmos pulsáteis e circadiano (U.S. EPA, 1996). No entanto, um grande número de animais seria necessário para diminuir de forma expressiva o efeito dessa variabilidade na investigação de diferenças entre tratados e controles. No nosso estudo observamos redução na contagem espermática sem termos detectado alterações dos níveis de testosterona circulante. Um agente químico que demonstre toxicidade testicular pode afetar as células germinativas, ou as células de Sertoli, sem interferir na estrutura e função das células de Leydig, portanto, a produção de andrógenos pode não ser afetada, mesmo havendo dano aos órgãos reprodutivos. Os resultados obtidos para a dosagem de testosterona contrastam, até certo ponto, com os efeitos observados anteriormente sobre variáveis andrógeno-dependentes: diminuição do peso da vesícula seminal e atraso no dia da descida dos testículos para a bolsa escrotal.

V.2.4 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre a fertilidade de machos e fêmeas

Apesar dos efeitos sobre a reprodução masculina, *i.e.*, diminuição do número de espermatozoides e espermátides, nas duas maiores doses de TPTH (7,5 e 15mg /kg peso corporal/dia), a exposição durante a pré-puberdade e a puberdade a este pesticida não afetou o desempenho reprodutivo de camundongos, machos e fêmeas. A ausência de efeitos sobre a fertilidade dos animais expostos ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade se deve, provavelmente, a uma característica dos roedores que, em geral produzem e armazenam espermatozoides em quantidade muito superior à quantidade necessária para determinar a fertilidade. Portanto, a ausência de efeitos sobre a fertilidade dos animais expostos ao TPTH não é inconsistente com a redução observada na produção espermática e na concentração de espermatozoides. Em função de diferenças inter-específicas, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA, 1996) passou a sugerir a investigação de outras variáveis, além dos acasalamentos, como o peso de órgãos sexuais, a histologia testicular, a produção espermática e os níveis hormonais, para detectar possíveis efeitos adversos de xenobióticos sobre a função reprodutiva. Parte dessas avaliações adicionais foi realizada no presente estudo.

V.2.5 Efeitos da exposição ao TPTH durante a pré-puberdade e a puberdade sobre os órgãos e parâmetros reprodutivos dos animais submetidos ao teste de fertilidade

O TPTH não alterou o peso do fígado, baço e timo, e dos órgãos reprodutivos, (ovário, útero, testículos, epidídimos e vesícula seminal) das fêmeas e dos machos que foram mortos após o teste de fertilidade (75 dias de vida pós-natal). Também não observamos alterações na produção espermática diária e no número de espermatozoides da cauda do epidídimo nos animais expostos do dia 15 ao dia 45 pós-natal e mortos no dia 75 de vida pós-natal. A exposição ao TPTH também não alterou a morfologia dos espermatozoides nem a concentração de testosterona livre nos animais que participaram do teste de fertilidade, *i.e.*, naqueles que foram mortos 30 dias após a interrupção do tratamento, indicando que os efeitos do TPTH notados logo após o término do tratamento foram revertidos com a suspensão da exposição.

VI. CONCLUSÕES

VI.1 Experimento 1

A exposição materna ao TPTH durante a gravidez e lactação resultou em:

- Toxicidade materna na dose de 7,5mg/kg de peso corporal/dia, o que foi evidenciado pelo aumento do peso relativo do fígado;
- Toxicidade perinatal evidenciada pela morte de todos os filhotes de algumas ninhadas logo após o nascimento na dose de 7,5 mg /kg de peso corporal/dia e pela redução do peso médio dos filhotes ao nascimento (dia 1PN), a partir da dose de 1,875 mg/kg de peso corporal/dia.

VI.2 Experimento 2

A exposição direta dos filhotes ao TPTH durante a pré-puberdade, puberdade e início da idade adulta resultou em:

- Acentuada mortalidade na maior dose (15mg /kg de peso corporal/dia);
- Redução do ganho ponderal de todos os grupos (média±DP) na primeira semana do tratamento, havendo recuperação nas semanas que se seguiram de modo que ao final do tratamento a diminuição de peso foi constatada apenas com as duas maiores doses;
- Atraso da abertura de vagina e descida de testículos nos grupos tratados com 3,75, 7,5 e 15mg kg de peso corporal/dia em relação ao grupo controle;
- Atraso do dia do primeiro estro nas fêmeas expostas a 7,5mg/kg de peso corporal/dia;

Nos animais mortos no dia 46 pós-natal:

- Aumento do peso relativo do timo das fêmeas expostas a 15mg/kg de peso corporal/dia e aumento do peso relativo do fígado a partir da dose de 3,75mg/kg de peso corporal/dia;
- Aumento do peso relativo do timo e do fígado dos machos expostos a 7,5 e 15mg/kg de peso corporal/dia e aumento do peso relativo do baço, somente na maior dose testada;
- Redução do peso relativo do testículo e do peso absoluto e relativo dos epidídimos na dose de 15mg /kg de peso corporal/dia;
- Acentuada redução no peso absoluto e relativo das vesículas seminais nas doses de 7,5 e 15mg/kg de peso corporal/dia;
- Diminuição do número de espermátides por testículo, do número de espermátides por grama de testículo, da produção espermática diária, do número de espermatozóides por animal e do tempo de trânsito espermático dos animais tratados com 7,5 e 15mg /kg de peso corporal/dia;
- Discreto aumento do número de espermatozóides anormais (defeitos de cabeça e cauda) nos animais expostos ao TPTH;
- Diminuição da média do diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais tratados com 3,75 e 7,5mg /kg de peso corporal/dia;

Nos animais mortos no dia 75 pós-natal:

- A exposição ao TPTH não alterou o desempenho reprodutivo (fertilidade) dos machos e das fêmeas expostos na pré-puberdade e na puberdade;
- Não foram observadas alterações de órgãos e parâmetros reprodutivos masculinos dos animais mortos a partir do dia 75 de vida pós-natal.

Os resultados encontrados nesse estudo não apóiam a hipótese do TPTH ser um desregulador endócrino em camundongos. Entretanto, é importante ressaltar, que os triorganoestanhosos causam efeitos reprodutivos em roedores e que o mecanismo de ação ainda não foi esclarecido. Por se tratar de um produto, amplamente, utilizado na agricultura, novos estudos devem ser realizados para melhor subsidiar a avaliação de risco para seres humanos.

VII. REFERÊNCIAS

AMANN, R. P., 1982. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundam Appl Pharmacol*, **2**, n. 82, p. 13-25.

AMANN, R.P., 1986. Detection of alteration in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environmental Health Perspectives*, **70**, p.149-158.

ANDRADE, A. J. M., ARAÚJO, S., SANTANA, G. M., OHI, M. AND DALSENTER, P. R., 2002. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **36**: 310-317.

ANDRADE, A. J. M, Grande, S.W., Talsness, C.E., Grote, K., Golombiewski, A., Kock, A.S. and Chahoud, I., 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. *Toxicology*, **225**: 64-74.

ANVISA, 1985. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/h13.htm>

ANVISA, 2007. http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2004.pdf

APPEL, K.E., 2004. Organotin compounds: toxicokinetic aspects. *Drug Metab. Rev.* **36**, 763-86.

ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry), 2005. Toxicological profile for tin and tin compounds. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service

BAKER, V. A., 2001 Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. *Toxicol in vitro*, v. 15, p. 413-419.

BARONCELLI S. KARRER D., TURILLAZZI P.G., 1995. Oral bis (tri-n-butyltin) oxide in pregnant mice. I. Potential influence of maternal behavior on postnatal mortality. *J. Toxicol. Environ. Health* **46**(3): 355-367.

BARONCELLI S. KARRER D., TURILLAZZI P.G., 1990. Embryotoxic evaluation of bis (tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in mice. *Toxicology Letters*, **50**:257-262.

BIEGEL, L. B., FLAWS, J.A., HIERSHFIELD, A.N., O'CONNOR, J.C., ELLIOT, G.S., LADICS, G.S., SILBERGELD, E.K., AND FRAME, S.R., 1998. 90-Day feeding and one generation reproductive study in CrI:Cd BR rats with 17 β -estradiol. *Toxicol. Sci.* **44**: 116-142.

BOYER, I. J., 1988. Toxicity of dibutyltin, tributyltin, and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, **55**: 253-298.

CARDARELLI, N. F., 1977. Controlled Release Molluscicides, University of Akron, Akron, Ohio. *Monograph*.

CANNON, S. B., VEAZEY, J.M., JACKSON, R.S., BURSE, V.W., STRAUB, W.E., LANDRIGAN, P.A. AND LIDDLE, J.S., 1978. Epidemic kepone poisoning in chemical workers. *Am J Epidemiol*, v. **107**, n. 6, p. 529-37.

CARLTON, B. J. AND HOWARD, M., 1982. The evaluation of the teratogenicity of triphenyltin hydroxide (TPTH) in the Syrian hamster. Unpublished report 723-0100 (A22884) of Batelle Columbus Laboratories, Columbus, OH. Submitted to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].

CASTRO V. L., CHIORATO S. H. and PINTO N. F., 2000. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. *Toxicology Letters*, v. **118**, p. 93-102.

CHAHOUD, I, KURIYAMA, S; PAUMGARTTEN, F. J. R., 2002. Maternal protein- and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats. *Toxicology*, v. **179** n. 1-2, p.137-49.

CHAHOUD, I. AND KWASIGROCH, T. E., 1977. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, H. J. AND KWASIGROCH, T. E. (Editors), *Methods in Prenatal Toxicology*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 78-91.

CHAMP, M. A., 1999. The need for the formation of an independent, international marine coatings board. *Marine Pollution Bulletin*, **38**: 239-246.

CHERNOFF N., MILLER, D. B., ROSEN, M. B., MATTSHECK, C. L., 1988. Developmental effects of maternal stress in the CD1 mouse by restraint on single days during the period of major organogenesis. *Toxicology*, v. **51**, p. 57-65.

CHERNOFF, N., ROGERS, J. M., KAVLOCK, R. J., 1989. An overview of maternal and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. *Toxicology*, **59**, p.111-125.

CHERNOFF, N., SETZER, R. W., MILLER, D.B., ROSEN, M.B. AND ROGERS, J.M., 1990. Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. *Teratology*, **42**: 651-658.

COOKE G.M., TRYPHONAS, H., PULIDO, O., CALDWELL, D., BONDY, G.S. AND FORSYTH, D., 2004. Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part I: Toxicology, histopathology and clinical chemistry. *Food and Chemical Toxicology*, **42**, 211-220.

CROFTON, K. M., DEAN, K. F., BONCEK, V.M., ROSEN, M.B., SHEETS, L.P., CHERNOFF, N. AND REITER, L.W., 1989. Prenatal or Postnatal Exposure to Bis (tri-*n*-butyl tin) oxide in the Rat: Postnatal Evaluation of Teratology and Behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **97**: 113-123.

DALSENTER P.R., FAQI, A.S., WEBB, J., MERKER, H.J. and CHAHOUD, I., 1996. Reproductive toxicity and tissue concentrations of lindane in adult male rats. *Human & Experimental Toxicology*, **15**: 406-410.

DALSENTER P.R., FAQI, A.S., WEBB, J., MERKER, H.J. and CHAHOUD, I., 1997. Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. *Human & Experimental Toxicology*, **16**: 146-153.

DALSENTER, P.R., MERKER, H.J., CHAHOUD, I., FAQI A.S., 1999. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Human and Experimental Toxicology*, **18 (9)**, 583-589.

DAVIS, A., BARALE, R., BRUN, G., FORSTER, R., GUNTHER, T., HAUTEFEUILLE, H., HEIJDEN, C.A., KNAAP, A.G.A.C., KROWKE, R., KUROKI, T., LOPRIENO, N., MALAVEILLE, C., MERKER, H.J., MONACO, M., MOSESSO, P., NEUBERT, D., NORPPA, H., SORSA, M., VOGEL, E., VOOGD, C.E., UMEDA, M. AND BARTSCH, H., 1987. Evaluation of the genetic and embryotoxic effects of bis(tri-*n*-butyltin) oxide (TBTO), a broad-spectrum pesticide, in multiple in vivo and in vitro short-term tests. *Mutation Research*, **188**: 65-95.

DELGADO, I.F., AND PAUMGARTTEN F. J.R., 2004. Pesticide use and poisoning among farmers from the county of Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. Jan-Feb; **20(1)**:180-6.

DOURSON, M., CHARNLEY, G. and SCHEUPLEIN, R., 2002. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II Risk and regulation. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. **35**, n. 3, p. 448-467.

DUNCAN, J., 1980. The toxicology of molluscicides: The organotins. *Pharmacol. Ther.*, **10**: 407.

ECOBICHON, D.J., 1996. Toxic effects of pesticides. In: KLASSEN, C.D. *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill, p. 643-689.

EDSTAC, 1998. Screening and testing. Final Report, p. 489-591.

EMA, M., KUROSAKA, R., AMANO, H. AND OGAWA, Y., 1995. Further evaluation of the development toxicity of tributyltin chloride in rats. *Toxicology*, **96**: 195-201.

EMA, M., MIYAWAKI, E. AND KAWASHIMA, K., 1999. Development Toxicity of Triphenyltin Chloride after administration on three consecutive days during organogenesis in rats. *Bull. Environmental Contam. Toxicology*, **62**: 363-370.

EMA, M., MIYAWAKI, E., HARAZONO, A. AND OGAWA, Y. 1997. Effects of triphenyltin chloride on implantation and pregnancy in rats. *Reproductive Toxicology*, **11**: 201-206.

FAIT, A., FERIOLI, A., BARBIERI, F., 1994. Organotin compounds. *Toxicology*, **91**: 77-82.

FAO (1991) Pesticide residues in food, 1991. Evaluations, Part I - Residues. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 337-371 (FAO Plant Production and Protection and Protection Paper 113/1).

FAQI, A. S., DALSENTER, P.R., MERKER, H.J AND CHAHOUD, I., 1998. Effects on developmental landmarks and reproductive capability of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in offspring rats during pregnancy. *Hum. Exp. Toxicol.* **17**, p. 365-372

FAQI, A. S., DALSENTER, P.R., MERKER, H.J AND CHAHOUD, I., 1998. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin in male offspring rats exposed through pregnancy and lactation. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. **150**, p. 383-392.

FAQI, A. S., SCHWEINFURTH, H., AND CHAHOUD, I., 1997. Determination of the no-effect dose of bis(tri-n-butyl tin) oxide (TBTO) for maternal toxicity and teratogenicity in mice. *Cong. Anom.*, **37**: 251-258.

FARIA, N.M.X., FACCHINI, L.A., FASSA, A.G. & TOMASI, E., 1999. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da Serra Gaúcha (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, v.**33**, n.4, p.33-34.

FENT, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicology*, **26**: 1-117.

FERNANDEZ, M. A., LIMAVERDE, A. M., CASTRO, I. B., ALMEIDA, A. C. M., WAGENER, A. L. R., 2002. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, **18(2)**: 463-476.

FILLER, R., 1993. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: *Methods in Toxicology*, vol 3A, 334-343.

FORGET, G. 1989. Pesticides: necessary but dangerous poisons. *Internationals Development Research Center Report*, **18**: 4-5.

GAIDO, K.; DOHME, L.; WANG, F.; CHEN, I.; BLANKVOORT, B.; RAMAMOORTHY, K. & SAFE, S., 1998. Comparative estrogen activity of wine extracts and organochlorine pesticide residues in food. *Environmental Health Perspectives*, 106 (Sup. 6):1347-1351.

GALLO, M.A., 1996. History and scope of toxicology. In: KLASSEN, C.D. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, p. 3-11.

GARAGNA, S., VASCO, C., MERICO, V., ESPOSITO, A., ZUCCOTTI, M., REDI, C.A., 2005. Effects of a low dose of bentazon on spermatogenesis of mice exposed during foetal, postnatal and adult life. *Toxicology*, **212**: 165-174.

GARRY, V. F. HARKINS M, LYUBIMOV A, ERICKSON L AND LONG L., 2002. Reproductive outcomes in women of the Red River Valley of the north. I. The spouses of pesticide applicators: pregnancy loss, age at menarche, and exposures to pesticides. *J Toxicol Environ Health A*, **65**, n. 11, p. 769-786.

GOLDMAN, J. M.; LAWS, S. C.; BALCHAK, S. K.; COOPER, R. L. & KAVLOK, R. J., 2000. Endocrine-Disrupting Chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual

maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical Reviews in Toxicology* **30(2)**: 135-196.

GOLUB, M.S. AND DOHERTY, J.D., 2004. Triphenyltin as a potent human endocrine disruptor. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, **7**: 281-295.

GRAY Jr., L. E., OTSBY, J., KELCE, W.R., 1989. A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive developmental and function in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12 (1)**, 92-108.

GRAY Jr., L. E. & OTSBY, J., 1998. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicol Ind Health*, v. **14**, n. 1-2, p. 159-184.

GRAY Jr., L. E. & OTSBY, J., 1995. In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol.* **133**, p. 285-294.

GREENSTEIN, B.D., FITZPATRICK, F.T.A., ADCOCK, I.M., KENDALL, M.D., WHEELER, M.J., 1986. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *J. Endocrinol.*, **110**, 417-422.

GROTE, K., ANDRADE, A.J.M., GRANDE, S.W., KURIYAMA, S.N., TALNESS, C., APPEL, K. AND CHAHOUD, I., 2006. Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. *Toxicology*, May 1;**222(1-2)**:17-24.

GROTE, K., STAHLSCHMIDT, B., TALNESS, C., GERICKE, C., APPEL, K. AND CHAHOUD, I., 2004. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology*, **202**: 145-158.

GUARD, H. E., COBET, A. B. AND COLEMAN, W. M., 1981. Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. *Science*, **213**: 770-771.

HOEPFNER, B.A. AND WARD, I.L., 1988. Prenatal and neonatal androgen exposure interact to affect sexual differentiation in female rats. *Behav. Neurosci.* 102: 61-65.

ITAMI, T., EMA, M., AMANO, H., MURAI, T. AND KAWASAKI, H., 1990. Teratogenic evaluation of tributyltin chloride in rats following oral exposure. *Drug Chem. Toxicol.*, **13**: 283-295.

JENSEN, T.K., JENSEN T.K., TOPPARI J, KEIDING N. AND SKAKKEBAEK N.E.,1995. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clinical Chemistry*, **41**, n 12: 1896-1901.

JOHNSON, MAY, M. R., BUSBEE, D. L., WILLIAMS, J. D., 1992. Effect of age and dietary restriction on daily sperm production and number and transit time of epididymal spermatozoa in the mouse. *AGE*, v. **15**, n.3, p. 65-100.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DE ROSA, C.; FLUNER-CRISP, P.; KAATARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, M.; SINK, T. & TILSON, H. A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104(Sup. 4):715-740.

KOIFMAN, S., KOIFMAN, R. J. and MEYER, A., 2002. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad Saúde Pública*, v. **18**, p. 435-445.

LEMONICA, I. P., 2003. Embriofetotoxicidade. *In: Fundamentos de Toxicologia* (OGA, Z.), p. 91-99, 2º Ed., São Paulo: Atheneu Editora.

LEVIGARD Y.E. & ROZEMBERG B., 2004. A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas de “nervos” no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos. *Cad. Saúde Pública*, v.**20**, n.6, p.1515-1524.

LOEFFLER, I. K. & PETERSON, R. E., 1999. Interactive effects of TCDD and p,p'-DDE on male reproductive tract development in *in utero* and lactationally exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. **154**, n. 1, p. 28-39.

LU, F. C., 1991. Toxicology evaluation: assessment of safety/risk. In: *Basic Toxicology: fundamentals, target, organs, and risk assessment*. 2. ed. Miami: Taylor & Francis, p. 327-344.

MABLY, T. A., MOORE, R. W. and PETERSON, R. E., 1992. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. **114**, n. 1, p. 97-107.

MAKITA, Y., TANAKA, A., OMURA, M., and OGATA, R., 2003. Effects of Simultaneous Administration of Tributyltin and 1,1-Dichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethylene (p,p'-DDE) on Female Offspring of Wistar Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **66**, 2337-2347.

MAKITA, Y., OMURA, M., and OGATA, R., 2004. Effects of Perinatal Simultaneous Exposure to Tributyltin and 1,1-Dichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethylene (p,p'-DDE) on Male Offspring of Wistar Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **67**, 385-395.

MAKITA, Y., OMURA, M., TANAKA, A. and KIYOHARA, C., 2005. Effects of Concurrent Exposure to Tributyltin and 1,1-Dichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethylene (p,p'-DDE) on Immature Male Wistar Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **97**, 364-368.

MAKITA, Y. and OMURA, M., 2006. Effects of Perinatal Combined Exposure to 1,1-Dichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethylene (p,p'-DDE) and Tributyltin on Male Reproductive System. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **99**, 128-132.

MANSON, J. M., 1986. Teratogens. In: *Casarett and Doull's. Toxicology. The Basic Science of Poison*. (Klassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J.), New York, Toronto, London: Macmillan Publishing Company, p. 195-220.

MURRAY, F. J., JOHN, J. A., BALMER, M. F., SCHWETZ, B. A., 1978. Evaluation of styrene given to rats and rabbits by inhalation or by gavage. *Toxicology*, v. **11**, n 4, p. 335-343.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I., 1995. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. *Endocrin Chemica Environ*, v. **3**, p. 24-52.

NEUBERT, D., 1997. Vulnerability of the Endocrine System to Xenobiotic Influence. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. **26**, p. 9-29.

NODA T., MORITA S., YAMANO T. AND SHIMIZU M., 1991a. Effects of triphenyltin acetate on pregnancy in rats by oral administration. *Toxicology Letters* 56:207-212.

NODA, T., MORITA, S., YAMANO, T., SHIMIZU, M., KAKAMURA, T., SAITOH, M. AND YAMADA, A. 1991b. Teratogenic study of tri-*n*-butyltin acetate in rats by oral administration. *Toxicology Letters*, **55**: 109-115.

NODA, T., YAMANO, T., SHIMIZU, M., 2001. Effects of maternal age on teratogenicity of di-*n*-butyltin diacetate in rats. *Toxicology*, n. **167**, p. 181-189.

OGATA, R., OMURA, M., SHIMASAKI, Y., KUBO, K., OSHIMA, Y., AOU, S. AND INOUE, N., 2001. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. *J. Toxicology and Environmental Health, Part A*, **63**: 127-144.

OHHIRA, S., MATSUI, H., 1996. Comparative study of the metabolism of triphenyltin in hamsters and rats after a single oral treatment with triphenyltin chloride. *Toxicology Letters*, **85**, 3-8.

OMURA, M., OGATA, R., SHIMASAKI, Y., KUBO, K., OSHIMA, Y., AOU, S., TANAKA, A., HIRATA, M. AND INOUE, N., 2001. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. *Toxicological Sciences*, **64**: 224-232.

ORTH, J.M., 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *The Anatomical Record*, v **203**, 485-492.

OTSBY, J. KELCE W.R., LAMBRIGHT C., WOLF C.J., MANN P. and GRAY L.E., 1999. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Ind Health*, v. **15**, p. 80-93.

PARKER, R.M., 2006. Testing for Reproductive Toxicity. In: Ronald D. Hood (editor). *Developmental and Reproductive Toxicology. A Practical Approach*. 2º edição

PEARCE, P., KHALID, B.A., FUNDER, J.W., 1981. Androgens and thymus. *Endocrinology* **109** (4), 1073-1077.

PERSAUD, T. V. N., 1979. Teratogenesis – Experimental Aspects and Clinical Implications. In: *Expermentelle Pathologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena. Suplemento 4.

RANTAKOKKO P, KUNINGAS T, SAASTAMOINEN K, VARTIAINEN T., 2006 Dietary intake of organotin compounds in Finland: A market basket study. *Food Addit. Contam.* **23**, 749-756.

REDDY, P. S., PUSHPALATHA, T. AND REDDY, P.S., 2006. Reduction of spermatogenesis and steroidogenesis in mice after fentin and fenbutantin administration. *Toxicology Letters*, **166**: 53-59.

RHEES, R.W., KIRK, B.A., SEPHTON, S., AND LEPHART, E.D., 1997. Effects of prenatal testosterone on sexual behavior, reproductive morphology and LH secretion in the female rat. *Dev. Neurosci.* **19**: 430-437.

RIECKE, K. AND STAHLMANN, R., 2000. Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia*, **32**: 209-218.

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

RODRIGUEZ, P., FERNANDEZ-GALAZ, C., AND TEJERO, A., 1993. Controlled neonatal exposure to estrogens: A suitable tool for reproductive aging studies in the female rat. *Biol. Reprod.* **49**: 387-392.

RODWELL, D. E., 1985. A teratology study in rats with triphenyltin hydroxide (Code 029664 OF ZD97 0001 technical substance). Unpublished report WIL- 39011 (A31079) of WIL Research Laboratories Inc., Ashland. Submitten to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].

RODWELL, D. E., 1987. An embryotoxicity study in rabbits with triphenyltin hidroxide (Code: HOE 209664 OF ZD97 0004). Unpublished report WIL- 39012 (A35220) of WIL Research Laboratories Inc., Ashland. Submitted to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].

ROGERS, J.M. AND KAVLOCK, R.J., 2001. Developmental Toxicology. *In*: CASARETT and DOULL'S. *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York, St. Louis, San Francisco, McGraw-Hill, Inc., 6º ed, Editado por Klaassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J., p.351-381.

SALEWSKI, E., 1964. Faerbemethoden zum Makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* p. 247, 367.

SARPA, M., 2003. Avaliação da toxicidade pré-natal do trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública - FIOCRUZ*.

SARPA, M., DE CARVALHO, R.R., DELGADO, I.F. AND PAUMGARTTEN, F.J.R., 2007. Developmental toxicity of triphenyltin hydroxide in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, doi: 10.1016/j.yrtph.2007.05.005.

SASAKI, Y. F., YAMADA, H., SUGIYAMA, C. AND KINAE, N., 1993. Increasing effect of tri-*n*-butyl tins and triphenyltins on the frequency of chemically induced chromosome aberrations in the cultured Chinese hamster cells. *Mutation research*, **300**: 5-14.

SHARPE, R.M., 1994. Could environmental, oestrogenic chemicals be responsible for some disorders of the human male reproductive developmental? *Current Opinion in Urology*, **v 4**, 295-301.

SLUTSKY, LEVIN J.L., LEVY B.S., 1999. Azoospermia and oligospermia among a large cohort of DBCP applicators in 12 countries. *Int J Occup Environ Health*, **v. 5**, n. 2, p. 116-22.

SONNENSCHNEIN, C. & SOTO, A. M., 1998. An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonist. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **v. 65**, n. 1-6, p. 143- 150.

SULTAN, C. BALAGUER, P., TEROVANNE, B., GEORGET, V., PARIS, F., JEANDEL, C., LUBROSO, S., NICOLAS, J., 2001. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol*, **v. 178**, p. 99-105.

SWEENEY, T., NICOL L., ROCHE J.F. AND BROOKS, A.N., 2000. Maternal exposure to octylphenol suppresses ovine fetal follicle-stimulating hormone secretion, testis size and Sertoli cell number. *Endocrinology*, **v 141**, 2667-2673.

SNOW, R.L. AND HAYS, R.L., 1983. Phasic Distribution of Seminiferous Tubules in rats treated with Triphenyltin Compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**, 658-665.

THOMAS, J.A., 1996. Toxic responses of the reproductive system. In: KLASSEN, C.D. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, p. 547-581.

TOPPARI, J. LARSEN, J. C., CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A., GRANDJEAN, P., GUILLETTE, L. J., JÉGOU, B., JENSEN, T. K., JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J. A., MEYER, O., MÜLLER, J., RAJPERT-DE MEYTS, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R., SUMPTER, J., SKAKKEBAEK, N. E., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect*, v. **104**, n. 4, p. 741-803.

UENO S, SUSAN, N, FURUKAWA Y, KOMATSU, Y., KOYAMA S, SUZUKI, T. 1999 Butyltin and phenyltin compounds in some marine fishery products on the Japanese market. *Arch. Environ. Health*, **54**, 20-25.

U.S. Environmental Protection Agency (1986). Guidelines for mutagenicity risk assessment. *Fed. Reg.* **51**, 34006-34012.

U.S. Environmental Protection Agency (1991). EPA/600/FR-91/001: Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment, Washington.

U.S. Environmental Protection Agency (1996). EPA/630/R-96/009: Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Washington.

VIANA, V.G., 2002. Investigação de possíveis danos funcionais causados pela exposição pré-natal ao trifenil hidróxido de estanho (TPTH). *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública - FIOCRUZ*.

WHO (1980) Tin and organotin compounds: A preliminary review. *Environmental Health Criteria 15*, Geneva pp. 79-83.

WHO (1992). Pesticide Residues in food, 1991. Evaluations 1991 Part II - Toxicology. Geneva, World Health Organization, pp. 173-208.

WHO (1999). Concise International Chemical Assessment Document 13, 1999. Triphenyltin Compounds. World Health Organization. Geneva.

YAMADA, H. AND SASAKI, Y. F., 1993. Organotin are co-clastogens in a whole mammalian system. *Mutation Research*, **301**: 195-200.

YOUNG, D. L., 1986. A dietary two-generation reproduction study in rats with triphenyltin hydroxide (Code: HOE 0.29664 OF ZD97 0004 technical substance). Final report project WII-39022 (A35378) of WIL Research Laboratories, Inc., Ashland. Submitted to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].

YU, W.J., LEE, B.J., NAM, S.Y., KIM, Y.C., LEE, Y.S. AND YUN, Y.W., 2003. Spermatogenic disorders in adult rats exposed to tributyltin chloride during puberty. *J. Vet. Med. Sci.*, **65** (12):1331-1335.

ZENICK, H., CLEGG, E.D., PERREAULT, S.D., KLINEFELTER, G.R. and GRAY, L.E, 1994. Assessment of Male Reproductive Toxicity. A Risk Assessment Approach. In A. Wallace Hayes (editor), *Principles and Methods of Toxicology*, 937-987.