

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TOXICIDADE REPRODUTIVA DO HERBICIDA GLIFOSATO-
ROUNDUP® EM RATOS WISTAR**

**ELIANE DALLEGRAVE
ORIENTAÇÃO: DR. AUGUSTO LANGELOH**

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**TOXICIDADE REPRODUTIVA DO HERBICIDA GLIFOSATO-
ROUNDUP® EM RATOS WISTAR**

ELIANE DALLEGRAVE

**Tese apresentada como um dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutora em Ciências Veterinárias
na área de Farmacologia e
Toxicologia.**

Orientador: Dr. Augusto Langeloh

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2003.

* Bióloga - PUCRS - 1988/2
Especialista em Toxicologia - PUCRS - 1989/2
Médica Veterinária - UFRGS - 1997/1
Mestre em Ciências Veterinárias – UFRGS – 1999/1

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que desejaram estudar
e não tiveram a mesma oportunidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Augusto Langeloh, pela dedicação incansável em transmitir seus conhecimentos e os princípios referentes à pesquisa científica, como também pela sua amizade e compreensão.

Ao Dr. Paulo Roberto Dalsenter, pela confiança, incentivo, dedicação, apoio técnico e principalmente pela amizade.

À Dra. Maria Beatriz Ferreira, pelo apoio técnico, incentivo, amizade e pelo exemplo de profissionalismo, comprometimento e dedicação ao ensino e a pesquisa.

À Veterinária Fabiana Mantese, incansável no auxílio à execução da etapa experimental, pelo apoio e amizade.

Aos bolsistas Gabriela Langeloh, Adriana Mattei e Jane Mattei e, em especial, à Janaína Drawanz Pereira e ao Ricardo Soares Coelho, pelo auxílio na execução dos experimentos e também pela amizade.

Ao Ms. Anderson J. M. Andrade da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelo auxílio na realização das dosagens hormonais.

À Prof^a. Rosemari T. Oliveira, pela realização das análises histopatológicas.

À bibliotecária Ana Vera F. Rodrigues, pelo auxílio técnico.

Ao funcionário Diego Santana D. Fraga, pelo cuidado e manutenção dos animais.

À Dra. Elaine Elizabetski, pela disponibilização de equipamentos necessários à execução do projeto, revisão dos artigos e pela amizade.

Ao Prof. Roberto Thaddeu, pela disponibilização do seu laboratório, como também pela amizade.

À Dra. Rosana Nogueira de Moraes da UFPR, pela disponibilização do seu laboratório e apoio técnico na realização das dosagens hormonais.

Aos membros da banca examinadora da prova de qualificação, Dra. Helena C. da Silva de Assis (UFPR), Dr. Alberto A. Rasia Filho (UFRGS) e Dr.

João R. Braga de Mello (UFRGS), pela excelente contribuição na minha formação e também pelas sugestões referentes ao projeto de tese.

Aos professores, funcionários, mestrandos, doutorandos, bolsistas e estagiários do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, pela calorosa acolhida e intensa colaboração.

A Coordenação, professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela troca de experiências e convivência.

Ao Conselho de Apoio à Pesquisa, pela bolsa de doutorado, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pesquisa da UFRGS, pelas bolsas de iniciação científica concedidas.

Aos colegas do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, pelo apoio e incentivo constantes.

Ao meu marido Edson (eternamente companheiro), meus familiares, especialmente, Charles Henri, Gustavo e Iara, e amigos incondicionais Elisângela e Vanessa, pelo apoio e compreensão.

Aos animais, modelos experimentais, sem os quais nenhum conhecimento poderia ter sido gerado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	16
RESUMO	18
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 Desreguladores endócrinos	29
2.2 Herbicida glifosato	41
2.3 Ensaios em toxicologia reprodutiva	47
3 OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo geral	59
3.2 Objetivos específicos	59
4 ENSAIO DE TERATOGENICIDADE	60
4.1 Materiais e métodos	60
4.1.1 Produto	60
4.1.2 Animais	60
4.1.3 Acasalamento	61
4.1.4 Tratamento das progenitoras	61
4.1.5 Gestação	62
4.1.6 Sacrifício das progenitoras	62
4.1.7 Fetos	64
4.1.8 Variáveis avaliadas	65
4.1.9 Análise estatística	66
4.2 Resultados	67
4.2.1 Variáveis das progenitoras	67
4.2.2 Variáveis fetais	72
4.3 Discussão	77
4.3.1 Toxicidade materna	77
4.3.2 Toxicidade fetal	78
5 ENSAIO DE FERTILIDADE E PERFORMANCE REPRODUTIVA	81
5.1 Materiais e métodos	81
5.1.1 Produto	81
5.1.2 Animais	81
5.1.3 Tratamento dos machos	81
5.1.4 Tratamento das fêmeas	82
5.1.5 Acasalamento	83
5.1.6 Sacrifício dos machos	83
5.1.7 Gestação	86

5.1.8	Sacrifício das progenitoras ao final da gestação	87
5.1.9	Lactação	88
5.1.10	Sacrifício das progenitoras ao final da lactação	88
5.1.11	Variáveis avaliadas	89
5.1.12	Análise estatística	91
5.2	Resultados	92
5.2.1	Variáveis dos machos	92
5.2.2	Variáveis das fêmeas	102
5.2.3	Variáveis das progenitoras ao final da gestação	106
5.2.4	Variáveis fetais	112
5.2.5	Variáveis das progenitoras ao final da lactação	112
5.3	Discussão	116
5.3.1	Toxicidade masculina	116
5.3.2	Toxicidade materna	118
5.3.3	Toxicidade fetal	119
6	ENSAIO DE EXPOSIÇÃO PRÉ E PERINATAL	122
6.1	Materiais e métodos	122
6.1.1	Tratamento dos progenitores	122
6.1.2	Desenvolvimento ponderal até a puberdade	122
6.1.3	Desenvolvimento geral e sexual até a puberdade	123
6.1.4	Sacrifício dos machos à puberdade	124
6.1.5	Sacrifício das fêmeas à puberdade	125
6.1.6	Comportamento sexual	125
6.1.7	Sacrifício dos machos à idade adulta	126
6.1.8	Desenvolvimento da progênie até a puberdade	126
6.1.9	Sacrifício das fêmeas à idade adulta	127
6.1.10	Variáveis avaliadas	128
6.1.11	Análise estatística	130
6.2	Resultados	131
6.2.1	Variáveis de desenvolvimento ponderal até a puberdade	131
6.2.2	Variáveis de desenvolvimento geral e sexual até a puberdade	132
6.2.3	Variáveis dos machos à puberdade	136
6.2.4	Variáveis das fêmeas à puberdade	139
6.2.5	Variáveis dos machos à idade adulta	140
6.2.6	Variáveis das fêmeas à idade adulta	146
6.2.7	Variáveis das progênies	151
6.3	Discussão	155
6.3.1	Toxicidade masculina	155
6.3.2	Toxicidade feminina	158
7	DISCUSSÃO GERAL	160
8	CONCLUSÕES	173

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
ANEXOS	183
ANEXO 1 Artigo sobre o Ensaio de Teratogenicidade	184
ANEXO 2 Artigo sobre Toxicidade Oral Aguda	194

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup [®] do 6º ao 15º dia de gestação.	71
TABELA 2 -	Índices reprodutivos das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup [®] do 6º ao 15º dia de gestação.	71
TABELA 3 -	Índices dos fetos das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup [®] do 6º ao 15º dia de gestação.	72
TABELA 4 -	Alterações esqueléticas dos fetos das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup [®] do 6º ao 15º dia de gestação.	74
TABELA 5 -	Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup [®] durante o pré-acasalamento e o acasalamento.	96
TABELA 6 -	Índices de fertilidade dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup [®] durante o pré-acasalamento e o acasalamento.	101
TABELA 7 -	Taxas reprodutivas dos machos e fêmeas tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup [®] durante o pré-acasalamento e o acasalamento.	106
TABELA 8 -	Índices reprodutivos das progenitoras tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup [®] durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação.	110
TABELA 9 -	Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup [®] durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação.	111

TABELA 10 - Índices dos fetos das progenitoras tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação.	112
TABELA 11 - Índices das progenitoras tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação.	114
TABELA 12 - Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação.	115
TABELA 13 - Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®.	136
TABELA 14 - Índices de fertilidade dos machos púberes expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®.	138
TABELA 15 - Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. ...	139
TABELA 16 - Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos adultos expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. ...	140
TABELA 17 - Índices de fertilidade dos machos adultos expostos via útero e lactação a zero, 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®.	142
TABELA 18 - Características de comportamento sexual dos machos adultos expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®.	145
TABELA 19 - Taxas reprodutivas dos machos e fêmeas expostos a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação.	145
TABELA 20 - Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. ...	149

TABELA 21 - Índices das progenitoras expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação.	150
--	-----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Representação da fórmula estrutural do sal isopropilamínico da N-(fosfonometil)glicina utilizado no produto comercial.	41
FIGURA 2 -	Massa corporal relativa das progenitoras (1º dia = 100%) tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação.	67
FIGURA 3 -	Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação.	69
FIGURA 4 -	Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação.	70
FIGURA 5 -	Principais alterações esqueléticas de fetos diafanizados de progenitoras tratadas com 500 (A,C), 750 (D) ou 1000mg/kg (B) de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação.	75
FIGURA 6 -	Massa corporal relativa dos machos (1º dia = 100%) tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 70 dias prévios ao acasalamento.	92
FIGURA 7 -	Massa corporal relativa dos machos (1º dia = 100%) tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias de acasalamento.	93
FIGURA 8 -	Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 70 dias de pré-acasalamento.	94
FIGURA 9 -	Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 70 dias de pré-acasalamento.	95
FIGURA 10 -	Alterações histopatológicas de fígado de machos tratados com zero (controle) (A), 150 (B) ou 450mg/kg (C) de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento e o acasalamento.	98

FIGURA 11 - Alteração histopatológica de rins de machos tratados com zero (controle) (A) ou 450mg/kg (B) de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento e o acasalamento.	99
FIGURA 12 - Alterações histopatológicas de testículos de machos tratados com 50 (A), 150 (B) ou 450mg/kg (C) de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento e o acasalamento.	100
FIGURA 13 - Massa corporal relativa das fêmeas (1º dia = 100%) tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias prévios ao acasalamento.	103
FIGURA 14 - Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias prévios ao acasalamento.	104
FIGURA 15 - Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias prévios ao acasalamento.	105
FIGURA 16 - Massa corporal relativa (1º dia = 100%) durante a gestação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação.	107
FIGURA 17 - Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] durante a gestação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação.	108
FIGURA 18 - Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] durante a gestação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação.	109
FIGURA 19 - Massa corporal relativa (1º dia = 100%) durante a lactação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação.	113

FIGURA 20 - Massa corporal relativa dos filhotes (1º dia = 100%) das progênes expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante a gestação e a lactação.	131
FIGURA 21 - Características de desenvolvimento geral dos filhotes das progênes expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante a gestação e a lactação.	133
FIGURA 22 - Características de desenvolvimento sexual dos filhotes das progênes expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante a gestação e a lactação.	134
FIGURA 23 - Características de desenvolvimento comportamental dos filhotes das progênes expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante a gestação e a lactação.	135
FIGURA 24 - Alteração histopatológica de testículo de macho púbere exposto a 150mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação.	137
FIGURA 25 - Alteração histopatológica de testículo de macho adulto exposto a 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação.	141
FIGURA 26 - Características de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®.	143
FIGURA 27 - Característica de comportamento sexual das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®.	146
FIGURA 28 - Massa corporal relativa durante a gestação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação.	147
FIGURA 29 - Massa corporal relativa durante a lactação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação.	148
FIGURA 30 - Massa corporal relativa das ninhadas do nascimento (1º dia = 100%) ao desmame (A) e dos filhotes do desmame (1º dia = 100%) à puberdade (B) de progenitores expostos a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação.	151

- FIGURA 31 - Características de desenvolvimento geral dos filhotes de progenitores expostos a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. 153
- FIGURA 32 - Características de desenvolvimento sexual dos filhotes de progenitores expostos a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. 154

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - Ácido aminometilfosfônico

ANOVA - análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

°C - graus Celsius

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

DDT - diclorodifeniltricloroetano

DL₅₀ - dose letal média

EPA - *Environmental Protection Agency* - Agência de Proteção Ambiental

EDSP - *Endocrine Disruptor Screening Program* - Programa de Rastreamento de Desreguladores Endócrinos

EDSTAC - *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee* - Comitê Consultivo de Teste e Rastreamento de Desreguladores Endócrinos

epm - erro padrão da média

F₁ - filhos da primeira geração

F₂ - filhos da segunda geração

FAO - *Food and Agriculture Organization* – Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação

FDA - *Food and Drugs Administration* - Administração de drogas e alimentos

FSH -	<i>follicle stimulating hormone</i> - hormônio foliculo estimulante
g -	grama (s)
°GL -	graus <i>Gay Lussac</i>
GnRH -	<i>gonadotrophic releasing hormone</i> - hormônio liberador de gonadotrofinas
h -	hora (s)
ICBS -	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IDA -	ingestão diária aceitável
kg -	quilograma (s)
l -	litro (s)
LH -	<i>luteinizing hormone</i> : hormônio luteinizante
LOEL -	<i>lowest observed effect level</i> - menor dose com efeito observado
MAs -	membros anteriores
mg -	miligrama (s)
ml -	mililitro (s)
MPs -	membros posteriores
MR -	medidas repetidas
n° -	número
N -	número de indivíduos presentes na amostra
NOEL -	<i>no observed effect level</i> - dose sem efeito observado
P -	nível de significância alcançado
PCBs -	bifenilas policloradas
POEA -	polioxietilenamina
ppm -	partes por milhão
PUCRS -	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SINDAG -	Sindicato da Indústria de Defensivos Agrícolas
T -	tolerância
TCDD -	tetraclorodibenzeno-p-dioxina
UFPR -	Universidade Federal do Paraná
UFRGS -	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WHO -	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde

RESUMO

Nos últimos 50 anos houve uma redução significativa na fertilidade de animais selvagens. Estudos revelam que as alterações morfológicas e fisiológicas sobre os órgãos reprodutivos de animais e também de seres humanos podem ser consequência da exposição a contaminantes ambientais. Vários pesticidas presentes no ambiente têm sido apontados como substâncias capazes de afetar o sistema endócrino, incluindo efeitos sobre a reprodução (COLBORN *et al.*, 1993). Inúmeros fatores contribuem para que o Brasil seja um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo. E, neste país, os herbicidas são os pesticidas líderes em vendas. O Roundup[®] é o herbicida mais utilizado, sendo comercializado em preparação contendo 36% de glifosato e 18% de polioxietilenamida (POEA) (ANVISA, 2002a e 2002b). Estudos de toxicidade reprodutiva realizados com o glifosato técnico referem a possibilidade de efeito sobre o sistema reprodutivo (WHO, 1994). Entretanto a literatura carece de estudos sobre os efeitos do POEA e dos produtos comerciais que o contém associado ao glifosato (DALLEGRAVE, 2002). Sendo assim, o presente trabalho objetivou verificar a influência do herbicida glifosato-Roundup[®] sobre a fertilidade e o desenvolvimento de ratos Wistar e a possibilidade deste desregular o sistema endócrino. Foram avaliados os efeitos do herbicida glifosato Roundup[®] (lote BS 1096/98) sobre a reprodução de ratos Wistar, incluindo os efeitos teratogênicos (segmento II), sobre fertilidade e

performance reprodutiva de machos e fêmeas (segmento I) e sobre animais expostos pré e perinatalmente (segmento III). As concentrações desejadas foram elaboradas mediante adição de água destilada. As progenitoras do ensaio de teratogenicidade foram tratadas, por via oral, com 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato (Roundup®) ou água destilada (10ml/kg), do 6° ao 15° dia de gestação. Os animais da geração paterna (segmento I) foram tratados diariamente, por via oral, com 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato (Roundup®) ou água destilada (10ml/kg). Os machos foram tratados por 70 dias no pré-acasalamento e por 15 dias consecutivos na fase de acasalamento. As fêmeas foram tratadas por 15 dias no pré-acasalamento, de 1 a 15 dias na fase de acasalamento, por 21 a 23 dias durante a gestação, e aquelas que foram deixadas parir, por mais 21 dias referente ao período de lactação. A segunda geração (segmento III) foi exposta apenas durante a gestação e a lactação (fêmeas do segmento I). Os resultados do ensaio de teratogênese mostraram sinais de toxicidade materna com 50% de letalidade para as fêmeas tratadas com 1000mg/kg e sinais de retardo de desenvolvimento do esqueleto dos fetos. Os machos da geração paterna mostraram sinais de toxicidade sistêmica, com aumento na massa relativa de fígado e rins, acompanhado de alterações histopatológicas, e de toxicidade reprodutiva, caracterizada por alterações histopatológicas nos testículos, redução na concentração de espermatozóides, na produção diária de espermatozóides, na concentração de testosterona e aumento no percentual de espermatozóides anormais. As fêmeas da geração paterna não apresentaram sinais de toxicidade sistêmica e/ou reprodutiva nas variáveis avaliadas. Os machos expostos durante as fases pré e perinatal manifestaram sinais de toxicidade reprodutiva, caracterizados por alterações

histopatológicas nos testículos, como degeneração das espermatídes em ambas as fases, aumento no percentual de espermatozóides anormais na puberdade e redução na concentração de espermatozóides na fase adulta. As fêmeas expostas durante as fases pré e perinatal não apresentaram sinais de toxicidade sistêmica e/ou reprodutiva nas variáveis avaliadas, como também a prole das mesmas não manifestou alterações de desenvolvimento ponderal ou geral. Este estudo revelou que o herbicida glifosato-Roundup[®] provocou um retardo no desenvolvimento esquelético dos fetos expostos durante a fase de organogênese. Afetou ainda o sistema reprodutivo masculino de indivíduos tratados na fase adulta e expostos durante as fases pré e perinatal, interferindo nas variáveis de fertilidade masculina em puberdade e fase adulta. Também houve sinais de toxicidade sistêmica nas fêmeas do ensaio de teratogênese (segmento II) e nos machos do ensaio de fertilidade e performance reprodutiva (segmento I), em doses muito inferiores aquelas referidas na literatura (WHO, 1994) para o glifosato grau técnico. Conclui-se que o glifosato-Roundup[®] manifestou maior grau de toxicidade sistêmica, reprodutiva masculina e de desenvolvimento esquelético fetal, do que o referido na literatura para o glifosato grau técnico. E, frente à toxicidade reprodutiva masculina evidenciada neste estudo, pode-se sugerir que o glifosato-Roundup[®] manifestou efeitos de modulação endócrina e conseqüentemente, potencial desregulador endócrino.

ABSTRACT

In the last 50 years the fertility in wild animals had been decreased significantly. Studies postulated that the morphological and physiological changes in the reproductive organs of humans and animals could be consequence of chemicals substances into the environment. A large number of pesticides into the environment are known to interfere in the endocrine system, including reproductive effects (COLBORN *et al.*, 1993). Several factories contribute for Brazil to be one of the main countries, which consume pesticides in the world. In this country, the herbicides are the pesticides more marketed. The Roundup[®] is the herbicide more used and in this country, it is marketed in solution containing 36% of the glyphosate and 18% of the polyoxyethyleneamine (POEA) (ANVISA, 2002a e 2002b). Reproductive toxicity studies with technical glyphosate referred the possibility of the reproductive effects (WHO, 1994). However, the literature lacks of studies about POEA effects and of the commercial products that contain glyphosate and POEA associated (DALLEGRAVE, 2002). And then, the present work objected to verified the influence of the glyphosate-Roundup[®] herbicide on the fertility and development of the Wistar rats, and also the possibility of this herbicide disrupt the endocrine system. The reproductive effects of the herbicide glyphosate Roundup[®] (lot: BS 1096/98) in Wistar rats were evaluated, including

the teratogenic effects (segment II), fertility and reproductive performance of males and females (segment I) and pre- and perinatal exposure (segment III). The solutions of the Roundup[®] formulation were prepared by addition of distilled water. The dams of the teratogenic assay were treated, orally, with 500, 750 or 1000mg/kg of glyphosate (Roundup[®]) or distilled water (10ml/kg), from day 6 up to day 15 of pregnancy. The animals of the paternal generation (segment I) were treated daily, orally, with 50, 150 or 450mg/kg of glyphosate (Roundup[®]) or distilled water (10ml/kg). The males were treated for 70 days prior and during the 15 days of the mating. The females were treated for 15 days prior and during the mating (1 up to 15 days), and for 21 up to 23 days during the pregnancy. The females were let to give birth and were treated with Roundup[®] for more 21 days during the lactation period. The second generation (segment III) was exposed during the pregnancy and lactation periods (females of the segment I). The results of the teratogenic assay showed signs of maternal toxicity, expressed as 50% of lethality in the females treated with 1000mg/kg, and signs of developmental retardations on the fetuses skeleton. The males of the paternal generation showed signs of systemic toxicity, characterized as increase in the liver and kidneys relative weight and histopathological alterations, and reproductive toxicity, characterized by histopathological alterations in the testis, decrease in the number of sperm in the epididymis tail, in the daily sperm production, in the testosterone level and increase in the percentage of abnormal sperms. The females of the paternal generation did not show signs of systemic and/or reproductive toxicity. The pre- and perinatal exposed males showed signs of reproductive toxicity;

characterized by histopathologic alterations in the testis - degeneration of the spermatids in both phases, increase in the percentage of abnormal sperms at puberty and decrease in the sperm number at adult age. The pre- and perinatal exposed females did not show signs of systemic and/or reproductive toxicity. The offspring's of those females did not manifest ponderal and/or general development alterations. This study showed that the herbicide glyphosate-Roundup® induced a retard in the skeletal development of the exposed fetuses during the organogenesis. It affected too, the male reproductive system of the rats treated in the adult age and exposed during pre-and perinatal phases, interfering on the male fertility variables in puberty and adult age. Also, it showed signs of systemic toxicity on the females of the teratogenic assay (segment II) and on the males of the fertility and reproductive performance assay (segment I), at very low doses than the ones referred on the literature for the technical glyphosate (WHO, 1994). It was concluded that the glyphosate-Roundup® showed more systemic, male reproductive and fetal skeletal development toxicities than referred on the literature for technical glyphosate. In the presence of male reproductive toxicity showed in this study, it can be suggest that the glyphosate-Roundup® manifested endocrine modulation effects and consequently, it is a potential endocrine disruptor.

1 INTRODUÇÃO

A interferência de substâncias químicas, como fármacos, pesticidas, resíduos orgânicos, entre outros, sobre o sistema reprodutivo e suas funções pode levar a distúrbios graves, tanto em seres humanos, quanto em animais (LEMONICA *et al.*, 1996; DALSENTER *et al.*, 1997; PAUMGARTTEN *et al.*, 1997; LANGELOH & MELLO, 1998). Grande parte dessas alterações afeta direta ou indiretamente o setor de produção primária, causando prejuízos substanciais na economia rural. A redução de fertilidade na exploração pecuária de corte, leite, ovinocultura, entre outras, pode ocorrer devido a inúmeros fatores que devem ser investigados, minimizados e evitados. Dentre estes, pode-se citar desnutrição, doenças infecciosas e exposição a substâncias químicas capazes de afetar o sistema reprodutivo.

O sistema reprodutivo, tanto masculino como feminino, depende da interação de vários hormônios, que são suscetíveis de interferência por diversos xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo). A exposição a esses agentes químicos pode ocorrer em distintas fases do desenvolvimento e, segundo estas, pode provocar seus efeitos de forma mais intensa e/ou irreversível. A exposição aguda ou crônica de animais adultos leva normalmente a falhas na reprodução.

Entretanto, quando a ação desses agentes é direta sobre o aparelho reprodutor maduro, pode permitir a reversibilidade do distúrbio de fertilidade ao eliminar-se a fonte de exposição. Os efeitos gerados pela exposição pré e perinatal levam freqüentemente a distúrbios irreversíveis, pois as alterações são produzidas durante a formação e/ou a diferenciação dos órgãos sexuais. Também é importante ressaltar que o período transcorrido entre a exposição nessa fase de vida e a manifestação dos sintomas geralmente é longo, e somente nas fases peripubertal e adulta surgirão os efeitos diretos sobre o sistema reprodutivo. Estudos na área de toxicologia reprodutiva priorizam a avaliação dos efeitos das substâncias químicas sobre o sistema hormonal de animais e do homem, utilizando ratos como modelo experimental, devido à facilidade na condução dos ensaios *in vivo* (NEUBERT *et al.*, 1977).

Estudos epidemiológicos postulam que, nos últimos 50 anos, o número de espermatozóides e a qualidade destes vêm sendo reduzidos no homem (BENDVOLD *et al.*, 1991; AUGER *et al.*, 1995). A hipótese que vêm sendo investigada é a de que substâncias contaminantes ambientais possam ter influência sobre o sistema endócrino (SHARPE *et al.*, 1993).

A possibilidade de manifestação de distúrbios de fertilidade decorrentes da exposição a xenobióticos tem recebido especial atenção devido não somente a perdas econômicas na produção, como também devido às repercussões sobre o ser humano, exposto via alimentação e/ou ocupacionalmente [EPA (*Environmental Protection Agency* – Agência de Proteção Ambiental), 1996a]. Atualmente, parte significativa dos xenobióticos presentes no ambiente são resíduos de pesticidas

utilizados nas lavouras. Estas substâncias, persistentes no ambiente e/ou bioacumuladas nos organismos, têm sido apontadas como capazes de alterar o sistema endócrino, e, portanto, denominadas de desreguladores endócrinos (STEVENS *et al.*, 1997).

A extensa área do Brasil, sua grande população e conseqüente necessidade de produção de alimentos, como também as condições climáticas e hábitos de cultivo, fazem com que o país seja um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo. Conforme documento divulgado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil é um dos países que mais exagera na aplicação de pesticidas nas lavouras. A utilização incorreta de pesticidas na agricultura brasileira, seja por uso excessivo, erros na diluição ou aplicação dos produtos (falta de equipamentos de proteção), foi constatada por uma pesquisa realizada pela Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, em convênio com a Fundacentro (VENDA DE AGROTÓXICOS, 1999). Estes fatores favorecem a ocorrência de intoxicações agudas, subcrônicas ou crônicas, em caráter acidental e/ou ocupacional. A utilização incorreta favorece ainda a exposição dos consumidores dos produtos agrícolas *in natura* e/ou industrializados pela presença de concentrações elevadas de resíduos.

Pesticidas são extensivamente utilizados no combate de pragas de diversas culturas, como milho, arroz, feijão, café e, especialmente, soja, que, segundo o Sindicato da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG, 2002), é a cultura que mais consome agrotóxicos, requerendo, portanto, especial atenção da comunidade científica. Dentre os agrotóxicos mais usados na cultura de soja destaca-se o

glifosato (Roundup[®]), herbicida sistêmico pós-emergente, de fundamental importância após a criação e a introdução do cultivo da soja transgênica Roundup[®]-Ready [Roundup[®]-resistente (HOEF *et al.*, 1998)].

O herbicida glifosato foi amplamente estudado quanto ao seu potencial de toxicidades aguda, subaguda e crônica, carcinogenicidade, mutagenicidade e também de toxicidade reprodutiva, incluindo ensaios de embriofetotoxicidade, teratogenicidade e multi-gerações (WHO, 1994). Entretanto a literatura carece de estudos sobre o outro componente da formulação comercial, o polioxietilenamina, bem como da associação destes, presente em diferentes formulações (DALLEGRAVE, 2002).

Estudos em toxicidade reprodutiva de várias gerações expostas ao herbicida glifosato, realizados com ratos, revelaram perda de massa corporal nos animais da geração paterna (expostos via alimentação), como também de massa corporal dos filhotes e tamanho das ninhadas (WHO, 1994).

Segundo Yousef *et al.* (1995), o tratamento crônico de coelhos com doses sub-letais de glifosato resultou em toxicidades sistêmica e reprodutiva, caracterizadas por perda de massa corporal, redução de libido, redução da concentração espermática e aumento do percentual de espermatozoides mortos ou anormais.

Os efeitos resultantes da ação do herbicida sobre a espermatogênese ou, indiretamente, sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal revelam a necessidade de realização de mais estudos sobre a toxicidade reprodutiva desta substância e o risco potencial sobre a saúde animal e humana. Igualmente importante é a

avaliação dos efeitos dos produtos comerciais que contém glifosato, como forma de verificar as possíveis alterações previamente citadas pela exposição experimental à substância ativa na população exposta via alimentação e/ou ocupacionalmente.

Tendo em vista as perdas econômicas decorrentes dos distúrbios de fertilidade em animais induzidos pela exposição a pesticidas e os riscos potenciais destes provocarem alterações no sistema reprodutivo humano, justifica-se a execução de ensaios biológicos e análises toxicológicas capazes de determinar os efeitos destes agentes e suas prováveis conseqüências sobre as populações animal e humana.

Esse estudo se propôs a avaliar os efeitos da exposição ao herbicida glifosato-Roundup® em ratos Wistar expostos durante as fases de organogênese (segmento II), reprodutiva de machos e fêmeas da geração paterna (segmento I) e da segunda geração exposta pré e perinatalmente (segmento III), com o objetivo de verificar a influência do herbicida sobre o sistema reprodutivo de ratos e a possibilidade deste desregular o sistema endócrino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desreguladores endócrinos

Definem-se desreguladores endócrinos como substâncias exógenas que alteram funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causam efeitos adversos nos organismos ou suas progênies. Estes abrangem uma variedade de agentes químicos, incluindo hormônios naturais ou sintéticos, constituintes naturais de plantas, pesticidas, aditivos utilizados na indústria de plásticos, detergentes e poluentes persistentes no ambiente (ENDOCRINE DISRUPTORS, 2000).

A possibilidade de manifestação de distúrbios de fertilidade, decorrentes da exposição a xenobióticos, tem recebido especial atenção devido à dependência da integridade do sistema reprodutivo para a sobrevivência de algumas espécies, às perdas econômicas na produção animal e às repercussões sobre o ser humano, exposto via alimentação e/ou ocupacionalmente (EPA, 1996a; THOMAS, 1995).

O potencial de impacto ecológico vinculado a esses agentes inclui alterações sobre a diferenciação sexual e a conseqüente indução de malformações nos órgãos reprodutivos. Seus efeitos podem ser observados em invertebrados,

peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Anormalidades tireoidianas e redução de fertilidade foram observadas em peixes, aves e mamíferos, como também desmasculinização ou desfeminização em peixes e aves, após exposição a agentes desreguladores endócrinos (THOMAS, 1995). Os efeitos potenciais para a saúde humana ligados à exposição aos desreguladores endócrinos incluem câncer testicular ou prostático, redução na quantidade e na qualidade do sêmen e prejuízo no desenvolvimento mental, comportamental e tireoidiano de crianças expostas (ENDOCRINE DISRUPTORS, 2000).

Vários estudos demonstrando alterações morfológicas e fisiológicas em animais selvagens expostos a altas concentrações de contaminantes ambientais fundamentam a hipótese de que estes compostos são capazes de provocar respostas semelhantes àquelas produzidas pelos hormônios esteroidais. Muitos dos desreguladores endócrinos, apesar da ampla diversidade estrutural, são exoestrógenos, substâncias capazes de mimetizar o estrógeno natural. Os mecanismos de ação variam desde ligação direta e conseqüente ativação dos receptores estrogênicos até ligação a outros receptores nucleares que interagem com elementos responsivos a estrógenos ou ação por meio de sinais de transdução (GILLESBY & ZACHAREWSKI, 1998).

Com relação à exposição humana e animal, pode-se dizer que ambas carecem de informações mais específicas sobre os mecanismos de ação e as relações exposição/efeito (ENDOCRINE DISRUPTORS, 2000).

Estudos dos últimos 50 anos revelaram que nesse período de tempo, houve uma redução de 50% na concentração espermática dos animais selvagens.

Diversos autores sugerem que isto se deve à exposição a compostos estrogênicos ou anti-androgênicos, contaminantes ambientais (SAFE & GAIDO, 1998). O aumento crescente na incidência de infertilidade, de anormalidades estruturais no aparelho reprodutor masculino, como hipospádia e criptorquidismo, de neoplasias testiculares e de alterações no sistema reprodutivo feminino, como neoplasias uterinas e de mamas, poderia estar relacionado a elevações nas concentrações de substâncias químicas capazes de afetar o sistema endócrino como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), o lindano, as bifenilas policloradas (PCBs) e as dioxinas, presentes no ambiente e nos alimentos (SHARPE & SKAKKEBAEK, 1993). Vários pesticidas sintéticos e químicos industriais persistentes no ambiente e/ou bioacumulados têm sido implicados como substâncias capazes de alterar a atividade hormonal, indiretamente afetando a capacidade reprodutiva. Os testes padrões exigidos para obtenção do registro pelos órgãos oficiais, como o U.S. *Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), podem ser inadequados para detectar efeitos de modulação endócrina (STEVENS *et al.*, 1997). A exemplo disso, cita-se o trágico incidente da talidomida (medicamento utilizado na década de 60), que, após a realização de testes em ratos (em que não apresentou teratogênias), manifestou seu potencial teratogênico na espécie humana (THOMAS, 1995). Sendo assim, autoridades nacionais e internacionais têm manifestado seu interesse em pesquisar possíveis desreguladores endócrinos e estabelecer protocolos de testes por meio de ensaios *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* ou de estudos a campo e epidemiológicos em várias espécies animais, de forma a rastrear profundamente os efeitos e os prováveis

mecanismos de ação, reforçando a segurança dos testes padrões com relação ao sistema reprodutivo (ENDOCRINE DISRUPTORS, 2000; THOMAS, 1995).

Os agentes toxicantes podem interferir na performance reprodutiva afetando várias funções, tanto do sistema reprodutor masculino, quanto feminino. Os processos fisiológicos que integram o sistema reprodutor de ambos sexos seguem comandos do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise anterior. No macho o LH é referido como hormônio estimulador das células intersticiais (Leydig), secretoras de testosterona, e o FSH, como estimulante da espermatogênese, mediado pela sua ação nas células de Sertoli, no tecido alvo (testículos). Nas fêmeas, o FSH tem função de estimular o desenvolvimento e a maturação dos folículos ovarianos, secretores de estradiol. Já o LH estimula o folículo a ovular e maturar o corpo lúteo, que secreta tanto estrógeno quanto progesterona. A secreção de LH e FSH pela hipófise é modulada pelos hormônios gonadais (tanto dos testículos quanto dos ovários). Sendo assim, a retro-alimentação negativa da secreção de gonadotrofinas pela hipófise ocorre nos dois sexos. Também existe a influência do hormônio inibina. Produzido nos machos pelas células de Sertoli, propicia uma retro-alimentação negativa da secreção de FSH. Nas fêmeas, inibina é produzida pelo corpo lúteo, onde, juntamente com o estrogênio e a testosterona, inibe a produção de FSH e LH pela hipófise. Durante a puberdade nas fêmeas, o estrogênio secretado pelos folículos ovarianos em crescimento ativa as células pré-ópticas do hipotálamo (sensíveis ao

estrogênio) a provocar um pulso na produção de GnRH. Em cérebros androgenizados, as células pré-ópticas não respondem à ativação hormonal, sendo incapazes de alterar a liberação de LH pela hipófise, caracterizando, assim, a liberação constante nos machos e cíclica nas fêmeas (THOMAS, 1995).

O sistema reprodutor masculino pode ser alvo de lesão provocada por um toxicante durante sua passagem pela barreira hemato-testicular (menos desenvolvida em animais imaturos) ou pela ação direta sobre as células de Leydig (não protegidas pela barreira hemato-testicular). Podem ocorrer inibição da divisão ou diferenciação celular, inibição do metabolismo intermediário ou ainda interferência na produção de andrógenos, podendo afetar:

- espermatogênese, incluindo a espermatocitogênese (de espermatogônia a espermatíde) e a espermiogênese (de espermatíde a espermatozóide);
- fertilização;
- síntese de hormônios (testosterona), proteínas ligadoras de andrógenos e substâncias tróficas.

Com relação aos principais agentes toxicantes que atuam sobre a fertilidade masculina, podem-se citar:

- agentes que interferem na espermatogênese, como antineoplásicos (agentes alquilantes como ciclofosfamida), defensivos (naftalenos e clorados) e outros (gossipol, substância presente na semente de algodão);
- cádmio, que provoca degeneração testicular;
- estrógenos (estradiol e zealarenona), que interferem nas características sexuais secundárias.

O sistema reprodutor feminino pode ser alvo de lesão provocada por um toxicante durante a oogênese (inibição de gonadotrofina ou lesão no oócito, prejudicando o desenvolvimento folicular), a implantação (alteração nas secreções uterinas), a placentação (passagem pela barreira placentária e/ou biotransformação nesta), a gestação (morte embrionária, teratogenia ou aborto) e a lactação (agalactia).

Com relação aos principais agentes toxicantes que atuam sobre a fertilidade feminina, podem-se citar:

- agentes que promovem supressão da oogênese ou do ciclo estral, como andrógenos (testosterona), estrógenos (estradiol, coumestrol, zealarenona, para-diclorodifeniltricloroetano (p-DDT), hexacloroeto de benzeno) e progesterona;
- agentes que impedem a implantação e/ou provocam embriofetalidade, como chumbo, estrógenos, nitrogênio da amônia e *Veratrum californicum* (falso heléboro da Califórnia);
- agentes que afetam o desenvolvimento e/ou provocam teratogênias, como dioxinas halogenadas, mercúrio, selênio, *Veratrum californicum* e *Conium maculatum* (samambaia da Califórnia);
- chumbo, selênio, monóxido de carbono, nitratos e nitritos, que provocam aborto;
- *Veratrum californicum*, que provoca gestação prolongada;
- *Claviceps* (alcalóides do ergot), que provoca agalactia (OSWEILER, 1998).

Alguns autores têm concentrado seus estudos na ação de xenobióticos sobre a fertilidade de animais expostos durante gestação e/ou lactação (BJERKE *et al.*, 1994; COLBORN *et al.*, 1993; FAQI *et al.*, 1998 e MABLY *et al.*, 1992),

pois os efeitos provocados nessas fases de formação e/ou diferenciação dos órgãos sexuais podem permanecer e manifestar-se no indivíduo adulto, prejudicando de forma irreversível a performance reprodutiva (BERNARDI, 1996).

O desenvolvimento das gônadas é muito sensível a agentes químicos devido à maior vulnerabilidade da sua população celular. Sendo assim, fatores ambientais (capazes de influenciar o sistema endócrino) podem alterar a determinação genética do sexo gonadal, que, por sua vez, é responsável pela produção hormonal capaz de se traduzir fenotipicamente em um dos sexos (THOMAS, 1995).

A diferenciação sexual inicia com a determinação cromossômica da gônada a ser desenvolvida. O gene denominado de fator determinante do testículo, presente no cromossoma Y, é o responsável pelo desenvolvimento da gônada masculina embrionária, que, por sua vez, secretará a testosterona e o fator inibidor dos ductos de Müller (responsável pelo desenvolvimento do útero, ovidutos e vagina). A diferenciação sexual masculina ocorrerá na presença da testosterona secretada pelos testículos e ligada aos receptores androgênicos cerebrais. Dois cromossomos X são necessários para o desenvolvimento completo dos ovários. Entretanto, ovários embrionários não são necessários para o desenvolvimento das características fenotípicas femininas. Estas ocorrem na ausência de secreção androgênica.

Três períodos de produção de testosterona são importantes para a diferenciação sexual. O primeiro ocorre entre o 14º e o 17º dia de gestação na rata, correspondente na espécie humana ao período entre a 4ª e a 6ª semana de

gestação. O segundo ocorre entre o 17º dia de gestação até a segunda semana pós-natal, correspondendo do 4º mês de gestação até o 3º mês de vida em humanos. E o terceiro período acontece após um longo período de inatividade testicular em ambas espécies, de modo que a produção de testosterona é reiniciada entre 40 e 60 dias de vida no rato e entre 12 e 14 anos na espécie humana (THOMAS, 1995).

Fatores que reduzem a habilidade da testosterona de ser sintetizada, ativada, de entrar nas células e/ou de afetar a capacidade do núcleo de regular a síntese de proteínas andrógeno-dependentes têm o potencial de alterar a diferenciação sexual, tanto quanto a falta de receptores androgênicos. Pequenas deficiências afetam somente estágios de diferenciação dos órgãos da genitália externa, resultando em microfalus, hipospadia, aparência vulviforme do saco escrotal, com morfologia geral masculina. Entretanto, deficiência androgênica severa ou resistência à ação hormonal permitem a persistência dos ductos de Müller, resultando no desenvolvimento de órgãos do sistema genital feminino (útero, ovidutos e vagina), que coexistem com testículos ectópicos e ductos deferentes. O comportamento sexual também aparece marcado no sistema nervoso central por andrógenos oriundos dos testículos, podendo ser afetado por químicos endógenos ou exógenos (THOMAS, 1995).

Estrógenos exercem importantes efeitos sobre organismos em desenvolvimento. Como exemplo, pode-se citar o adenocarcinoma vaginal verificado em fêmeas expostas ao dietilestilbestrol durante a formação embrionária. Várias substâncias denominadas de xenoestrógenos, incluindo herbicidas, fungicidas e inseticidas, têm sido identificadas. Porém, suas ações não

estão restritas às fêmeas. Desreguladores endócrinos como os metabólitos do vinclozolin e do dicarboxime podem atuar como antagonistas androgênicos (THOMAS, 1995).

Estudos em toxicologia pré e perinatal têm se confrontado com diferenças de farmacocinética e farmacodinâmica interespecíficas, envolvendo vários fatores que contribuem para as respostas observadas frente a drogas e químicos ambientais. A suscetibilidade embrionária e/ou fetal é droga-específica, levando em consideração diferenças de farmacocinética materna, transferência placentária e farmacocinética embrionária/fetal, como também de farmacodinâmica, envolvendo o desenvolvimento embrionário/fetal e o metabolismo intermediário (requerendo determinadas isoenzimas, fatores e cofatores) (NEUBERT & CHAHOUD, 1985).

O fígado e os rins contêm determinados sistemas enzimáticos que afetam biologicamente a meia vida dos hormônios esteroidais e de outros hormônios. Sendo assim, xenobióticos capazes de interferir com biotransformação e eliminação são capazes de alterar o sistema endócrino. Por exemplo, hidroxilases esteróides hepáticas podem ser induzidas por pesticidas organoclorados ou organofosforados. Conseqüentemente, as reações de hidroxilação podem tornar os esteróides mais polares, facilitando a excreção destes pelos rins (THOMAS, 1995).

Há muitos sítios de interferência dos agentes químicos sobre sistema reprodutivo dos mamíferos. Podem afetar diretamente o sistema nervoso central, particularmente o hipotálamo e a adeno-hipófise. Hipnóticos e sedativos podem

modificar a atividade do sistema nervoso central, alterando a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas e/ou diretamente a secreção destas (THOMAS, 1995).

Pesticidas geralmente têm mais dados referidos na literatura do que outras classes de substâncias e, atualmente, a EPA pretende priorizar a toxicidade reprodutiva dos componentes ativos das substâncias separadamente dos outros ingredientes (EPA-EDSP, 2000).

Estudos sobre a modulação endócrina da reprodução avaliaram os efeitos de substâncias contaminantes ambientais, como o fungicida vinclozolin e o metabólito do DDT (DDE), sobre o desenvolvimento de roedores machos, expostos durante a fase perinatal. Estes xenobióticos possuem atividade anti-androgênica. Vinclozolin é um inibidor da 5α redutase (enzima conversora da testosterona em diidrotestosterona), reduzindo, portanto, a produção de diidrotestosterona e a atividade androgênica. Como resultado da ação anti-androgênica desses compostos, os machos das progênes expostas manifestaram desenvolvimento de mamas, redução da distância ano-genital, fenda palatina, testículos ectópicos, granulomas epididimários e testiculares, hipospadia e atrofia prostática e das vesículas seminais. Como os eventos básicos são fisiologicamente similares em todas as espécies mamíferas, hipóteses sugerem que estes efeitos possam explicar o aumento da incidência destas anomalias no homem (KELCE *et al.*, 1996).

Trabalhos sobre a incidência de tumores mamários realizados com o herbicida atrazina, revelaram um aumento na incidência destes tumores em ratas

Sprague Dawley, provavelmente por um efeito acelerador da senilidade precoce, característico desta linhagem de ratos. O mecanismo de ação proposto para o metabólito da atrazina (DACT), sugere a interferência sobre a liberação de LH, alterando a liberação do folículo, que, por sua vez, fica liberando estrógenos por mais tempo. Há assim episódios anovulatórios e um ciclo vicioso de redução da liberação de gonadotrofina. De forma semelhante, outros pesticidas também interferem no ciclo estral, como, por exemplo:

- o lindano, que bloqueia os receptores GABA, alterando o metabolismo esteróide e provocando um bloqueio na liberação de LH;
- o ditiocarbamato, que desequilibra a síntese de catecolaminas hipotalâmicas, inibindo a ovulação;
- o clordimeforma, que interfere no tempo de surgimento do pico de LH, inibindo a ovulação (ELDRIDGE *et al.*, 1996).

A toxicidade reprodutiva e a toxicocinética do lindano foram avaliadas em ratos expostos durante a lactação. Os dados revelaram que, na idade adulta, a massa testicular, o número de células espermáticas e de espermatozóides e os níveis de testosterona foram significativamente reduzidos. Quanto à toxicocinética, as concentrações de lindano nos testículos foram similares às aquelas encontradas no cérebro e a metade daquelas encontradas no fígado (DALSENTER *et al.*, 1999).

Os efeitos do endossulfano foram avaliados em ratos expostos durante gestação e lactação, revelando decréscimo na produção de espermatozóides, tanto na puberdade quanto na idade adulta, assim como redução no percentual de

túbulos seminíferos com a espermatogênese completa (DALSENTER *et al.*, 1997).

Toxicidades sistêmica e reprodutiva foram observadas em coelhos machos tratados com doses sub-letais de glifosato. Houve perda de massa corporal, redução de libido, redução da concentração espermática e aumento do percentual de espermatozoides mortos ou anormais. Observaram-se alterações hormonais, como redução dos níveis de testosterona, atribuída à queda dos níveis séricos de LH, que se mantiveram por longos períodos pós-tratamento, sugerindo que este herbicida tem um efeito de longa duração sobre a formação dos espermatozoides e de órgãos reprodutivos dos animais tratados (YOUSEF *et al.*, 1995).

O sistema reprodutivo de machos adultos de espécies de laboratório (ratos e coelhos) parece ser relativamente insensível ao tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (TCDD). Entretanto, seus efeitos podem ser observados quando estes animais são expostos na fase perinatal. Uma simples dose dada no 15º dia de gestação reduz a concentração de testosterona nos fetos e neonatos machos, reduz a distância anogenital e retarda a descida dos testículos. Nos machos adultos, a massa dos órgãos sexuais é reduzida, a espermatogênese é prejudicada, assim como a regulação do LH. Estes resultados revelam que o TCDD inibe a diferenciação sexual cerebral (MABLY *et al.*, 1991).

A necessidade de se associar testes para detectar condições específicas dos desreguladores endócrinos nas diferentes espécies torna-se evidente, assim como a constante análise sobre os melhores pontos a serem pesquisados, levando em

consideração os mecanismos potenciais de atividade, bem como as características fisiológicas das espécies envolvidas (ANKELEY *et al.*, 1998).

Vários dados publicados na literatura revelam a necessidade de se preparar uma sólida e confiável base de dados a respeito dos processos que relacionam estrutura-efeito no campo dos desreguladores endócrinos, como forma de facilitar o rastreamento de efeitos específicos de toxicidade reprodutiva em diferentes espécies, que possam corroborar com os testes exigidos pela EPA, FDA e outros órgãos responsáveis pelo registro de pesticidas e substâncias químicas industriais, entre outras (ANKLEY *et al.*, 1998; BERNSTEIN, 1984).

2.2 Herbicida glifosato

O glifosato é a substância ativa de alguns dos herbicidas mais populares do mercado atual. Foi desenvolvido em 1950 pelo Dr. Henri Martin, químico suíço, como um potente agente complexo. Em 1970, Dr. JE Franz da Companhia Monsanto descobriu a ampla atividade herbicida do glifosato e, no ano seguinte, a mesma companhia lançou no mercado o produto comercial Roundup[®] (SMITH & OEHME, 1992).

Segundo Camargo (1986), o glifosato é o único herbicida representante dos aminoácidos fosfonados, sintetizado a partir de um hidrogênio amínico do aminoácido glicina, por um radical de éster fosfônico. O N-(fosfometil)glicina é um sólido incolor, com ponto de fusão de 200°C, pressão de vapor insignificante (a 25°C), alta solubilidade em água (12g/l a 25°C) e insolubilidade em solventes

orgânicos. Também o sal isopropilamínico da N-(fosfonometil)glicina (Figura 1), usado no produto comercial, possui alta solubilidade em água.

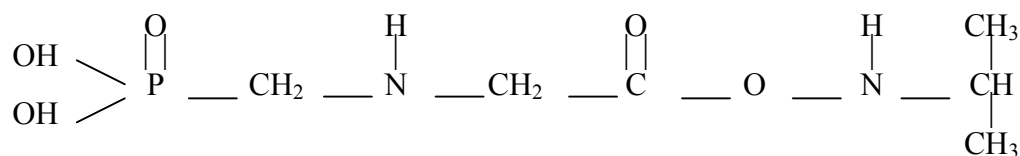


FIGURA 1. Representação da fórmula estrutural do sal isopropilamínico da N-(fosfonometil)glicina utilizado no produto comercial.

O sal isopropilamínico do glifosato é um herbicida sistêmico de amplo espectro para o controle pós-emergente, não residual e não seletivo de gramíneas e ervas de folhas largas (MIDIO & MARTINS, 1997). Conforme Smith & Oehme (1992), o produto comercial Roundup® possui, além do sal isopropilamínico (substância ativa), ingredientes inertes, água e polioxietilenaamina como surfactante (agente de superfície capaz de aumentar a absorção do herbicida pela planta). Quanto ao mecanismo de ação, o mesmo autor refere que, após absorção, o glifosato é rapidamente distribuído a várias partes da planta, afetando a fotossíntese, a respiração celular e a síntese de ácidos nucleicos. O primeiro modo de ação se dá pelo bloqueio da síntese do aminoácido aromático e do metabolismo de compostos fenólicos, influenciando diretamente a síntese protéica e a formação dos tecidos da planta, resultando em parada do crescimento, disfunção celular e conseqüente morte da planta. A resposta da planta à aplicação do glifosato é relativamente lenta. Dependendo da espécie tratada, o efeito herbicida pode ser visto apenas após 2-4 dias para as espécies anuais e até 7 ou mais dias para as perenes.

Com relação às sementes, como as de milho e soja, entre outras, o glifosato pode reduzir a massa, a emergência e o vigor das sementes da cultura, bem como provocar descoloração, reduzir a massa e vigor das sementes da progênie, dependendo da concentração e do tempo de aplicação. Estes efeitos indesejáveis sobre as culturas alvo da proteção do herbicida conduziram à realização de estudos de melhoramento genético, como os da soja, capacitando-a a resistir à aplicação do herbicida sem sofrer os danos referidos anteriormente. A Companhia Monsanto desenvolveu assim uma variedade de sementes de soja transgênicas (geneticamente modificadas): *Roundup[®]-Ready*, resistentes à aplicação do herbicida glifosato-Roundup[®] (HOEF *et al.*,1998).

Com relação à toxicidade, Midio & Martins (1997) referem os índices de toxicidade do herbicida glifosato em valores de tolerância (T ou quantidade máxima de resíduo tolerada no alimento, expresso em ppm – mg/kg de alimento) e/ou ingestão diária aceitável (IDA ou quantidade máxima de herbicida, em mg, a ser ingerida por dia por kg de massa corpórea, que não causa toxicidade), para as culturas a seguir:

- soja: T= 0,2 e IDA= 0,3;
- café: T= 1,0;
- arroz: T= 0,2;
- cítricos: T= 0,1.

Segundo a classificação relativa de toxicidade (OSWEILER, 1998), o glifosato é considerado um herbicida levemente tóxico, manifestando sinais de toxicidade entre 0,5 e 5g/kg. Apresenta DL₅₀ oral aguda para ratos de 4,7g/kg e de

1,6g/kg para camundongos (BABABUNMI, *et al.*, 1978). Conforme a WHO (1994), a DL₅₀ oral aguda para ratos e camundongos encontra-se acima de 5g/kg.

Gfeller & Messonnier (1998) citam que o glifosato possui baixa toxicidade aguda. Entretanto, causa sinais transitórios de irritação dermal e ocular após a exposição de cães em gramados recém tratados.

Segundo OSWEILER (1998) o herbicida a base de glifosato aplicado a gramados na concentração recomendada (150ppm) e administrado na dieta de cães, em concentração de 2000ppm, não apresentou efeitos tóxicos para a espécie em questão.

Adam *et al.* (1997), avaliaram a toxicidade oral e intratraqueal do Roundup[®] e de seus componentes em ratos. Administraram, por via oral, 1g/kg de polioxietilenamina (surfactante), associação de 2g/kg de glifosato com 1g/kg de polioxietilenamina ou Roundup[®] (produto comercial contendo 2g/kg de glifosato e 1g/kg de polioxietilenamina). Todas as formulações produziram diarreia. Hemorragia nasal foi observada nas formulações contendo polioxietilenamina, e mortes (até 24h) ocorreram somente para formulação exclusiva de polioxietilenamina. Ambas substâncias (glifosato e polioxietilenamina) causaram hemorragias pulmonares e danos ao epitélio pulmonar, tanto com o tratamento intratraqueal quanto oral. Estes resultados sugerem que o surfactante polioxietilenamina e as preparações que o contém são mais tóxicas que o glifosato isoladamente.

Blakley (1997) avaliou os efeitos do herbicida Roundup[®] sobre a produção de anticorpos (linfócitos-T e macrófagos) em camundongas CD-1 expostas, via

água de beber, a concentrações de zero a 1,05% do produto, 21 dias após a inoculação com hemácias de ovelha. Este estudo demonstrou que o Roundup® não causa disfunção do sistema imunitário sob “as condições normais de aplicação”.

Com relação à carcinogenicidade, o aminoácido fosfonado glifosato é classificado pela EPA como sendo de classe D, ou seja, apresenta inadequada evidência de carcinogenicidade para animais. Já a Organização Mundial da Saúde concluiu que não há evidências de carcinogenicidade (HOOGHEEM, 1989). Porém, o glifosato grau técnico apresenta como contaminante uma nitrosamina (composto reconhecidamente cancerígeno), a N-nitrosoglifosato (MOSES, 1989). Estudos de carcinogenicidade em ratos expostos cronicamente (via dieta) ao glifosato grau técnico evidenciaram resultados diferenciados. O teste realizado entre 1979 e 1981, com doses equivalentes a 3, 10 e 32mg/kg de massa corpórea por dia, demonstrou aumento estatisticamente significativo na incidência de tumores de células intersticiais nos testículos. Embora estes resultados sugiram evidência de carcinogenicidade, o teste realizado posteriormente, entre 1988 e 1990, com doses equivalentes a 100, 410 e 1060mg/kg de massa corpórea por dia (doses mais elevadas), não confirmaram os achados anteriores (WHO, 1994).

Segundo a WHO (1994), estudos realizados com o glifosato grau técnico em ratos e coelhos, usando como via de administração a oral (por meio da dieta), indicam que este herbicida não é teratogênico. Entretanto, a administração de doses correspondentes a 300, 1000 e 3500mg/kg de massa corpórea por dia para ratas do 6º ao 19º dia de gestação, produziu retardo de crescimento, redução do número de implantes uterinos e do número de filhotes viáveis, para a maior dose.

Fujii *et al.* (1998) administraram glifosato (50mg/kg), por via subcutânea, a ratos Wistar (machos e fêmeas de 27-35 dias de idade). Estes animais foram acasalados (na 10^a semana de vida) e examinados quanto à função reprodutiva. Os resultados sugeriram não haver alterações significativas na atividade das gônadas, embora a exposição ao glifosato durante a gestação tenha afetado a massa e a atividade da enzima carbonil redutase nos testículos da segunda geração (F₁).

Yousef *et al.* (1995) trataram coelhos machos cronicamente (6 semanas), por via oral, com doses sub-letais de glifosato [1/100 DL₅₀ (50mg/kg) e 1/10 DL₅₀ (500mg/kg)]. Os animais manifestaram toxicidades sistêmica e reprodutiva, caracterizadas por perda de massa corporal, redução de libido, redução da concentração espermática e aumento do percentual de espermatozóides mortos ou anormais. Alterações hormonais, como redução dos níveis de testosterona atribuída à queda dos níveis séricos de LH, se mantiveram por longos períodos pós-tratamento, sugerindo que este herbicida tem um efeito de longa duração sobre a formação dos espermatozóides e de órgãos reprodutivos dos animais tratados.

Segundo a WHO (1994), a avaliação dos riscos potenciais do herbicida glifosato para a saúde humana e ambiental foi centrada na presença de resíduos nos vegetais e animais destinados ao consumo humano. Conforme revisão de estudos com animais de laboratório e testes *in vitro*, utilizando as vias oral e dermal, não houve manifestações significativas de sensibilização, mutagenicidade, carcinogenicidade ou teratogenicidade. Estudos de efeitos adversos em laboratório e a campo demonstraram que o glifosato tem baixa toxicidade para abelhas,

minhocas e aves, e que o risco é pequeno ou mesmo negligenciável para organismos aquáticos. Alterações sutis em populações de aves e de pequenos mamíferos têm sido documentadas após aplicação do glifosato, sendo atribuídas a alterações em habitat, cobertura vegetal e provisões alimentares, resultando nos efeitos descritos para o herbicida. Este foi considerado de baixa toxicidade, baixa volatilidade e de reduzida absorção cutânea, tornando sua aplicação segura para trabalhadores que utilizam todos os equipamentos de proteção. Os casos de intoxicações agudas com a formulação Roundup[®], em humanos, resultam de ingestão acidental ou intencional do produto concentrado.

2.3 Ensaios em toxicologia reprodutiva

Toxicidade reprodutiva se refere a algum tipo de interferência na capacidade reprodutiva de machos e/ou fêmeas (incluindo o desenvolvimento pré-natal) provocada por um agente toxicante. Os efeitos provocados por agentes tóxicos geralmente são dose-dependentes, ou seja, o aumento das doses aumenta o risco de manifestação das alterações reprodutivas. Alterações específicas, como anomalias congênitas, podem ocorrer espontaneamente (mutações causadas por fatores endógenos) ou pela influência de substâncias tóxicas (efeitos teratogênicos). Entretanto, a incidência de anomalias espontâneas é prevista dentro das espécies de animais modelo, como também para a espécie humana (EPA, 1996b).

Diversos fatores, como tempo, espaço, custo e, principalmente, fatores éticos, limitam estudos toxicológicos sobre a reprodução humana e animal, tornando

imprescindível o uso de modelos animais para avaliação de possíveis efeitos da exposição a determinados agentes químicos sobre a função reprodutiva (AMANN, 1982; HAYES, 1994).

A avaliação toxicológica dos prováveis efeitos dos desreguladores endócrinos sobre os sistemas hormonais humano e animal segue protocolos padrões para testes de toxicidade reprodutiva conforme guias estabelecidos por *Food and Drug Administration* (Administração de Drogas e Alimentos - FDA). Inclui fertilidade e performance reprodutiva de machos e fêmeas (segmento I), toxicologia do desenvolvimento e teratologia (segmento II) e toxicidade peri e pós-natal (segmento III). Também testes multi-gerações são preconizados pela *Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental – EPA) (THOMAS, 1995; EPA, 1996a).

Para realização desses testes, utilizam-se, dentre outros, ratos e coelhos como modelos experimentais, devido a porte, prolificidade, informações disponíveis sobre a fisiologia das espécies e também custo de manutenção dos ensaios *in vivo* (AMANN, 1982; NEUBERT *et al.*, 1977). Ensaio *in vitro*, utilizando tecidos de órgãos dos sistemas reprodutivos masculino e feminino, são usados para estabelecer a ação de agonistas ou antagonistas dos hormônios, como hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), FSH, LH, testosterona, estradiol e progesterona. Também são avaliados os efeitos de toxicantes sobre os gametas (AMANN, 1982).

Vários xenobióticos, como pesticidas e químicos industriais, têm sido implicados como substâncias capazes de alterar a atividade hormonal

(desreguladores endócrinos), indiretamente afetando a capacidade reprodutiva. Entretanto, testes padrões exigidos para obtenção do registro pelos órgãos oficiais, como U.S. *Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – US EPA), podem ser inadequados para detectar efeitos de modulação endócrina (STEVENS *et al.*, 1997).

Atualmente, EPA constituiu um comitê responsável por definir as estratégias para determinação do risco de substâncias produzirem efeitos moduladores endócrinos - *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee* (Comitê Consultivo de Teste e Rastreamento de Desreguladores Endócrinos - EDSTAC). Este comitê é responsável pelo *Endocrine Disruptor Screening Program* (Programa de Rastreamento de Desreguladores Endócrinos - EDSP), que estabelece as prioridades na pesquisa dos prováveis agentes desreguladores endócrinos. Testes incluem, primeiramente, o potencial de interação e, secundariamente, a relação dose-resposta e os prováveis mecanismos. Os protocolos preconizados para o rastreamento inicial em mamíferos (especialmente, roedores) incluem avaliação uterotrófica (estrogenicidade e anti-estrogenicidade), Hershberger (androgenicidade e anti-androgenicidade), ensaios puberais e ainda avaliação sobre a reprodução de duas gerações (EPA-EDSP, 2000).

Quanto aos modelos biológicos recomendados internacionalmente para avaliação dos efeitos de xenobióticos sobre reprodução e fertilidade animal e humana, pode-se dizer que os ratos são indiscutivelmente os modelos

preferenciais. Entretanto, são exigidas duas espécies, sendo uma não roedora, como os coelhos (NEUBERT *et al.*, 1977).

Com relação aos ratos, convencionalmente utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus* e freqüentemente a linhagem Wistar. Os machos atingem a maturidade sexual entre 60 e 75 dias de vida. Sua fertilidade máxima encontra-se entre 100 e 300 dias, e a senescência reprodutiva se dá ao redor dos 360 dias de idade. Nas fêmeas, a maturidade sexual é atingida entre 60 e 75 dias de vida, sua fertilidade máxima encontra-se entre 90 e 120 dias e a senescência reprodutiva se dá ao redor dos 360 dias de idade. O ciclo estral é regular, de natureza poliéstrica anual, com ciclos de 4 a 5 dias. Estro de 10 a 20 horas, com ovulação espontânea. O período de gestação têm duração de 20 a 22 dias, e o tamanho da prole varia entre 5 e 15 filhotes (COBEA, 1996; CHAHOUD & KWASIGROCH, 1977).

Para avaliação da toxicidade paterna, deve-se considerar que a espermatogênese é um processo longo e que o agente toxicante necessita alterar células típicas testiculares vários dias antes de a toxicidade ser detectada. Sendo assim, torna-se necessário observar o tempo de tratamento mínimo requerido para cada espécie modelo (seis vezes o tempo de um ciclo dos túbulos seminíferos). As características comumente observadas são reservas espermáticas, número de espermatozóides, presença de patologia espermática, entre outras. Os ratos possuem uma desvantagem fundamental em relação aos coelhos. Os primeiros são avaliados com relação às características citadas anteriormente após a morte, enquanto nos coelhos, a avaliação é realizada mediante coleta de sêmen, o que permite inclusão dos mesmos em estudos longitudinais. Outra característica

importante a ser considerada é a alta fertilidade dos ratos em relação aos humanos. Perdas de até 60% na concentração espermática não se refletem na capacidade reprodutiva da espécie. Portanto, as taxas reprodutivas não constituem variáveis seguras para avaliação da fertilidade. Nesta espécie, são usadas as variações em massa testicular, histologia testicular, concentração e patologia espermáticas como variáveis de fertilidade (AMANN, 1986).

Em experimentos de teratogenicidade (Segmento II), a rata tem como vantagens a duração da gestação, a alta taxa de fertilidade, ninhadas numerosas, o desenvolvimento rápido dos filhotes e a relativa resistência a efeitos tóxicos de determinados compostos. Sua maior desvantagem é a baixa suscetibilidade a efeitos teratogênicos em relação a algumas substâncias (cortisona, talidomida), recomendando-se, portanto, utilização de outra espécie para concluir os estudos.

Um dos fatores fundamentais que conduziu inúmeros pesquisadores à conclusão de que se deveria utilizar mais de uma espécie para finalizar ensaios de toxicidade reprodutiva gira em torno das diferenças quanto à suscetibilidade de cada espécie em relação à infinidade de substâncias a serem testadas. Um exemplo inverso ao da talidomida, em que a substância foi teratogênica para ratos, mas não foi para humanos, é o do metotrexato, antagonista do folato, que possui alta teratogenicidade em ratos (0,3mg/kg), mas não manifestou qualquer efeito teratogênico em macacos *Rhesus*, mesmo em dosagens elevadas (3mg/kg) (NEUBERT & CHAHOUD, 1985; NEUBERT *et al.*, 1977). Entretanto, em seres humanos, mostrou-se abortiva no 1º trimestre da gestação (CHABNER *et al.*, 1996).

Como não há modelo ideal que contemple todas as características envolvidas no processo reprodutivo, vários autores indicam, como rotina, um rastreamento inicial da avaliação de esteróides sexuais (ou substâncias com potencial semelhante) em roedores e lagomorfos e, para avaliações mais consistentes, os ensaios biológicos devem estender-se aos primatas (NEUBERT *et al.*, 1977).

Segundo Froberg (1977), para determinar em laboratório a possível toxicidade de substâncias químicas, devem-se utilizar testes específicos à finalidade para a qual os mesmos são propostos. Estes, conforme a EPA (1996a), são classificados em:

- a) estudos de curtos períodos, para avaliação de toxicidade aguda ou tolerância local;
- b) estudos de longos períodos, realizados por duas a seis semanas ou acima de um ano, para avaliação de toxicidade crônica;
- c) estudos especiais, para avaliação de toxicidade reprodutiva, mutagenicidade ou carcinogenicidade.

Nos estudos de toxicologia reprodutiva, são avaliados possíveis efeitos sobre fertilidade, transporte e implantação do zigoto, desenvolvimento embrionário, potencial teratogênico, parto, lactação, desmame e desenvolvimento de anomalias pós-natal. Com relação às dosagens, três esquemas devem ser testados: a maior dosagem que causa o menor efeito tóxico (como a redução do ganho de massa corporal em relação ao grupo controle), a menor dosagem que, abaixo da dosagem tóxica, manifesta atividade farmacológica para a espécie em estudo [*lowest observed*

effect level (LOEL-dose) menor dosagem com efeito observado: EPA, 1996b] e outra dosagem intermediária (FROHBERG, 1977).

Os estudos de toxicologia reprodutiva são divididos em três tipos:

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

b) segmento II – de teratogenicidade, avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese;

c) segmento III – de toxicidade peri e pós-natal, avalia os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

Quaisquer destes segmentos permitem estabelecer a dosagem sem efeito observado nos machos ou fêmeas da geração paterna ou mesmo na progênie [*no observed effect level* (NOEL-dose): EPA, 1996b].

O estudo da fisiologia reprodutiva da espécie de referência nos estudos de toxicologia - "*Rattus norvegicus* (rato) (COBEA, 1996), auxilia na determinação dos protocolos a serem utilizados nos experimentos, levando em consideração os padrões de desenvolvimento geral e sexual durante as diferentes fases de vida.

Segundo Ojeda & Urbanski (1988), as diferentes fases de desenvolvimento pós-natal dos ratos são:

a) neonatal - primeira semana de vida;

b) infantil - a partir do 8º até o 21º dia (quando se efetua o desmame);

c) juvenil - do 30º ao 32º dia nas fêmeas e 35º dia nos machos;

d) peripuberal - período de duração variável que, nas fêmeas está em torno do 38º dia e, nos machos, entre o 55º e o 60º dia.

Conforme Bennetti & Vickery (1970), a puberdade na rata corresponde ao período de crescimento e maturação dos oócitos nos ovários (que estavam em latência desde o 3º ou o 4º dia de vida), culminando com o primeiro ciclo estral, caracterizado pelo cio. Este ocorre um a dois dias após a abertura do canal vaginal, que, por sua vez, se dá entre o 28º e o 49º dia de idade. A rata encontra-se sexualmente madura entre o 90º e o 100º dia (CHAHOUUD & KWASIGROCH, 1977). A maturidade sexual do rato macho se dá em torno dos 40 dias de idade, quando se estabelece o primeiro ciclo espermatogênico completo (precoce em relação às respectivas fêmeas), tendo máxima fertilidade entre o 100º e o 300º dia (BENNETTI & VICKERY, 1970).

Durante a fase neonatal são comumente avaliados a massa corporal ao nascimento, a vitalidade, a presença de anormalidades macroscópicas externas e os indicadores de desenvolvimento (descolamento dos pavilhões auriculares e surgimento da penugem). Na fase infantil, além da massa corporal e do número de filhotes desmamados, são avaliados o desenvolvimento do pêlo, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos e a descida dos testículos. Nas fases juvenil e peripuberal são avaliadas principalmente as características de desenvolvimento sexual que determinam a puberdade, ou seja, a separação prepucial e a abertura do canal vaginal, com a manifestação do primeiro ciclo estral, assim como o ganho de massa corporal durante o período (EPA, 1996b).

As ratas são animais poliéstricos anuais, ou seja, manifestam vários ciclos estrais - de quatro a cinco dias, ao longo do ano (COBEA, 1996).

Conforme Chahoud & Kwasigroch (1977), os ciclos são divididos em quatro fases, comumente avaliadas mediante exame de citologia vaginal:

a) proestro (12h) – caracterizado pelo grande número de células nucleadas e algumas células proliferativas do epitélio vaginal;

b) estro (14h) – caracterizado pela presença de células queratinizadas e anucleadas; a ovulação ocorre espontaneamente na metade do ciclo escuro durante esta fase;

c) metaestro (21h) – com inúmeros leucócitos e filamentos de muco;

d) diestro (57h) – período de repouso, em que a mucosa vaginal é fina, com poucas células nucleadas, poucos leucócitos e muco.

Em vários laboratórios, os ratos são acasalados na proporção de três fêmeas para cada macho, durante todo o período de escuridão, exceto em experimentos em que o momento exato da cópula deve ser determinado para avaliar a idade gestacional precisa (experimentos de teratologia e embrio-farmacologia). Ao confirmar a gestação, mediante a presença de espermatozóides na citologia vaginal, as fêmeas são colocadas em gaiolas individuais, e este é considerado o dia zero de gestação (CHAHOUUD & KWASIGROCH, 1977).

Bernardi (1996) cita que os efeitos nocivos de medicamentos e/ou outros agentes sobre a reprodução no período perinatal são devidos à exposição durante as fases específicas de desenvolvimento embriológico e fetal.

No rato, o período pré-natal inclui as fases de:

- a) pré-implantação: da concepção (dia zero) até o quinto dia;
- b) implantação: quinto e sexto dias;
- c) organogênese: do sexto ao 15º dias;
- d) desenvolvimento fetal: do 16º ao 21º dias.

No final do período de organogênese (13º dia), inicia-se o período de maturação e de diferenciação cerebral, que só irá terminar no período neonatal (durante a lactação).

Segundo Bernardi (1996), essas fases são extremamente importantes e específicas para tratamento e avaliação de possíveis efeitos sobre a fertilidade das progenitoras, bem como sobre o desenvolvimento sexual da progênie, que se encontra em fase de diferenciação sexual cerebral e, posteriormente, de desenvolvimento das características sexuais secundárias.

Igualmente importantes nesse período são as características histológicas, maturação funcional e ganho de massa corporal, fatores extremamente suscetíveis a agentes tóxicos. O feto é mais resistente aos efeitos letais do que o embrião, porém é mais sensível à carcinogênese, devido à alta taxa mitótica, característica dessa fase (BERNARDI, 1996).

Vários são os fatores que interferem nos efeitos da exposição a medicamentos ou outros agentes no período perinatal. Com relação à interação materno - fetal, o tipo de placentação determina o grau de exposição do conceito aos agentes em questão. No caso dos roedores, a placenta hemocorial permite um contato íntimo entre a mãe e o feto, possibilitando a passagem de grande parte dos agentes toxicantes para o feto. São também importantes os fatores ligados à

polaridade das substâncias. Agentes apolares e lipossolúveis encontram maior facilidade em transpor a “barreira placentária” (BERNARDI, 1996).

Com referência à função metabólica da placenta, é consideravelmente menor que a hepática, porém parece ter importância fundamental na transformação de precursores esteróides em estrógenos (BERNARDI, 1996).

Perturbações maternas, toxicidade comumente observada mediante redução no ganho de massa corporal, contribuem fundamentalmente para manifestação dos efeitos nocivos de toxicantes no período perinatal e, segundo Black & Marks (1992), podem ser as responsáveis pelos efeitos sobre a gestação e o concepto.

Bernardi (1996) cita que a lactação contribui de forma específica para exposição dos conceptos a substâncias exógenas, devido à facilidade de dissolução, não só de substâncias lipossolúveis, que potencialmente podem ser excretadas no leite, como também das hidrossolúveis, por meio da emulsão dos lipídios em solução aquosa de proteínas, característica da secreção láctea.

As transformações ocorridas num organismo em desenvolvimento e exposto a agentes tóxicos podem ser funcionais (bioquímicas) ou estruturais (morfológicas). Estas, levam à produção de lesões reversíveis, como a redução da massa corporal ao nascimento (embriotóxicas), ou irreversíveis, como reabsorções embrionárias, abortos, natimortos (embriofetalidade) e a alterações estruturais ou funcionais (teratogenicidade). Alterações que ocorrem em períodos mais tardios do desenvolvimento são denominadas de alterações toxicológicas e são caracterizadas por degenerações, retardos no crescimento ou no desenvolvimento de determinados

órgãos (alterações: anatômicas, patológicas ou bioquímicas em organismos parcial ou completamente formados) (BERNARDI, 1996).

A exposição a agentes toxicantes em estágios precoces do desenvolvimento, via útero e/ou lactação, pode provocar alterações na performance reprodutiva, reduzindo a fertilidade dos animais na fase adulta. Efeitos sobre comportamento sexual, ciclo estral e função gonadal são observados após exposição a compostos esteroidogênicos ou anti-esteroidogênicos. Substâncias com efeito esteroidogênico, como alguns pesticidas, podem provocar alterações testiculares tanto em roedores quanto em humanos (EPA, 1996a). Bernardi (1996) cita a feminização de fetos machos expostos a estrógenos (sintéticos ou naturais), alteração por vezes capaz de levar à redução de fertilidade ou mesmo à infertilidade no animal adulto.

Por fim, a função sexual e a fertilidade refletem uma ampla variedade de funções que são necessárias para a reprodução e que podem ser afetadas pela exposição a fatores ambientais. Vários modelos de infertilidade são reportados em todo mundo, mas somente em 10% dos casos são devidos a alterações durante a vida reprodutiva. Estudos sobre alterações da função sexual e fertilidade em humanos refletem o risco potencial de substâncias químicas contaminantes ambientais serem os principais responsáveis pelos distúrbios reprodutivos. Porém, informações fundamentadas em ensaios com modelos animais são essenciais para sustentar tais suposições (WHO, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do herbicida glifosato-Roundup[®] sobre o sistema reprodutivo de ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do herbicida glifosato-Roundup[®] sobre variáveis de toxicidade sistêmica e reprodutiva em fêmeas gestantes e sobre o desenvolvimento embrio-fetal de ratos expostos durante a organogênese (segmento II).

- Avaliar os efeitos do herbicida glifosato-Roundup[®] sobre variáveis de toxicidade sistêmica e reprodutiva, incluindo fertilidade e performance reprodutiva em machos e fêmeas (geração paterna) (segmento I).

- Avaliar a exposição pré e perinatal das progênes ao herbicida glifosato-Roundup[®] sobre o desenvolvimento geral, sexual e comportamental (F₁) (segmento III), envolvendo:

- avaliação de fertilidade de machos e fêmeas na puberdade;
- avaliação de fertilidade e performance reprodutiva de machos e fêmeas na idade adulta, incluindo o comportamento sexual;
- avaliação do desenvolvimento geral e sexual das progênes (F₂).

4 ENSAIO DE TERATOGENICIDADE

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Produto

Foi utilizado o produto comercial Roundup[®], lote: BS 1096/98, produzido em dezembro de 1998 pela companhia Monsanto do Brasil (São José dos Campos/SP), com validade até dezembro de 2002. Registrado no Ministério da Agricultura e do Abastecimento sob nº 00898793, este herbicida (derivado da glicina) é comercializado na forma de concentrado solúvel, composto de 480g/l de sal de isopropilamina de n-fosfometil-glicina, equivalente a 360g/l de glifosato (ácido de n-fosfometil-glicina), e 180g/l de polioxietilenamina como agente surfactante.

4.1.2 Animais

Foram utilizados 100 ratos Wistar adultos (90 dias), 75 fêmeas (com massa corporal de $218,3 \pm 4,3$ g) e 25 machos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), previamente adaptados, por trinta dias, às condições do biotério de

experimentação do Departamento de Farmacologia. Os ratos foram mantidos em sala com temperatura de 20 a 24°C (sem controle específico da umidade relativa do ar), obedecendo a um ciclo de luz com 12 horas de claridade (das 9h às 21h) e 12 horas de escuridão, recebendo água e ração comercial (Nuvilab CR1–Nuvital) *ad libitum*, durante todo o período experimental.

4.1.3 Acasalamento

As fêmeas foram acasaladas durante o ciclo escuro (das 21h às 9h), na proporção de três fêmeas para cada macho, sendo estas colocadas nas caixas (45 x 30 x 12cm) dos machos. Foi considerado como dia zero de gestação aquele em que se detectou a presença de espermatozóides e de células queratinizadas (estro) na citologia vaginal. As fêmeas gestantes foram alocadas em caixas individuais (30 x 15 x 12cm). Aquelas consideradas não gestantes retornaram diariamente às caixas dos machos durante cada ciclo escuro, até o final do período de acasalamento (período suficiente para constituir os grupos experimentais).

4.1.4 Tratamento das progenitoras

Foram constituídos três grupos experimentais ($n = 15 \pm 1$) cada qual recebendo, respectivamente, 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato (Roundup[®]), diariamente, por via oral (com o auxílio de sonda flexível). O grupo controle foi tratado com água destilada (veículo), em igual volume (10ml/kg). As dosagens foram definidas a partir da NOEL dose (1000mg/kg) estabelecida para o glifosato

em ensaio de teratogênese em ratos (WHO, 1994). As fêmeas foram tratadas do 6º ao 15º dia de gestação, conforme segmento II recomendado pelo EPA (1996a).

4.1.5 Gestação

A massa corporal das fêmeas gestantes foi mensurada diariamente e relacionada à massa corporal do dia zero de gestação, que foi considerada 100% (massa corporal relativa). Os consumos de água e ração durante a gestação foram medidos a cada três dias e relacionados à massa corporal média do referido período (consumo relativo à massa corporal individual).

Sendo assim:

$$\text{massa corporal relativa} = \frac{\text{massa corporal diária}}{\text{massa corporal do dia zero}} \times 100$$

$$\text{consumo relativo de ração} = \frac{\text{consumo de ração (g)} / 3}{\text{massa corporal média dos 3 dias (g)}} \times 100$$

$$\text{consumo relativo de água} = \frac{\text{consumo de água (ml)} / 3}{\text{massa corporal média dos 3 dias (g)}} \times 100$$

As fêmeas foram inspecionadas quanto a sinais de hemorragia, aborto ou possíveis alterações sistêmicas durante todo o período gestacional.

4.1.6 Sacrifício das progenitoras

As fêmeas gestantes de cada grupo experimental, assim como as do grupo controle, foram sacrificadas no 21º dia de gestação para avaliação reprodutiva, teratogênica e de variáveis sistêmicas. Mensurada a massa corporal, cada fêmea foi anestesiada com cloridrato de cetamina (90mg/kg), por via intramuscular, precedido (5min) de cloridrato de xilazina (5mg/kg), por via intramuscular, como

medicação pré-anestésica. A pele e a parede abdominal foram incisadas, e o útero exposto. O útero foi removido, e o ligamento largo divulsionado para verificação da massa uterina. Foi mensurada a massa corporal da fêmea sem o útero. Na continuação, o útero foi incisado na sua face lateral e os fetos foram removidos individualmente. Foram feitas secção do cordão umbilical (0,5cm do abdômen fetal), secagem em papel toalha, observação de sinais vitais, sexagem, identificação individual (com caneta / tinta *permanent marker*), mensuração da massa corporal e avaliação macroscópica externa quanto à presença de malformações. Das progenitoras foram retirados os ovários e contado o número de corpos lúteos (usando-se um microscópio estereoscópico, com aumento de 10x). Foi avaliado também o número de sítios de implantação uterina, após remoção dos botões embrionários. Foram retirados fígado, rins, pulmões, coração e baço. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada fêmea sem o útero.

Sendo assim:

$$\text{massa relativa do órgão} = \frac{\text{massa do órgão}}{\text{massa corporal sem útero}} \times 100$$

Todos os órgãos foram inspecionados quanto a possíveis alterações macroscópicas. Posteriormente, os fetos foram fixados em formol tamponado a 10%.

4.1.7 Fetos

Para a análise de alterações esqueléticas, os fetos sofreram o processo de diafanização, conforme a técnica modificada de Taylor e VanDyke (1985). Esta técnica constou de uma etapa de desidratação, com imersão dos fetos em álcool etílico 70°GL por 24h, seguida da imersão em álcool etílico 96°GL por mais 24h. Na seqüência, os fetos permaneceram por 48h em uma solução de hidróxido de potássio a 1,5%, para posterior remoção das vísceras mediante abertura de um pequeno orifício no abdômen. Após evisceração e remoção da gordura da região cervical dorsal, os fetos foram imersos em uma solução tampão de borato de sódio a 30% por 24h. Para digestão da musculatura, os fetos foram imersos em uma solução de borato de sódio a 30%, com 1g/l de tripsina, e permaneceram nesta solução, em temperatura ambiente, até a completa dissolução da musculatura, tornando assim o feto translúcido. Durante esta fase, a solução foi trocada todas as vezes que se apresentou turva. Na continuação, os fetos foram corados, mediante imersão em uma solução de hidróxido de potássio a 1,5%, com a adição do corante vermelho de alizarina (quantidade suficiente para tornar a solução lilás). Para finalizar, os fetos passaram por uma seqüência de imersões de 48h em cada uma das soluções de glicerina a 40 e 70% em hidróxido de potássio a 1,5% e, finalmente, foram conservados na glicerina 100%.

Os fetos diafanizados foram observados quanto à presença de alterações no esqueleto por meio de microscópio estereoscópico. As alterações esqueléticas foram avaliadas de acordo com o *Atlas of external and skeletal anomalies in rats*

(CHAHOU, 1997) e denominadas conforme a terminologia estabelecida pela *International Federation of Teratology Societies* (WISE *et al.*, 1997).

4.1.7 Variáveis avaliadas

As variáveis avaliadas nas progenitoras foram a massa corporal relativa, os consumos relativos de água e ração, a massa relativa dos órgãos e os índices reprodutivos, incluindo o número de fetos por progenitora e as perdas pré e pós-implantação, calculadas conforme as fórmulas a seguir (LEMONICA *et al.*, 1996).

$$\text{Perdas pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Perdas pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação} - \text{n}^\circ \text{ de fetos}}{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}} \times 100$$

As variáveis avaliadas nos fetos foram a massa corporal e os índices fetais, que incluíram taxas de natalidade, proporção de sexo, malformações macroscópicas externas e alterações esqueléticas, calculadas conforme as fórmulas a seguir (EPA, 1996b).

$$\text{Taxa de vitalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos removidos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos removidos}} \times 100$$

$$\text{Proporção de sexo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de machos}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas}}$$

$$\text{Taxa de malformações externas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de fetos com malformações externas}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de alterações esqueléticas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de fetos com alterações esqueléticas}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

4.1.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como frequência absoluta ou relativa (porcentagem), média e erro padrão da média, conforme a variável proposta.

A análise estatística foi feita por meio dos testes de análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de MR), análise de variância de uma via (ANOVA) e qui-quadrado (ZAR, 1999).

As variáveis quantitativas (que apresentaram distribuição normal) referentes à influência do glifosato no desenvolvimento ponderal e consumos de água e ração foram comparadas por meio da análise de variância de medidas repetidas. Os índices reprodutivos, a massa relativa dos órgãos das progenitoras, o número de fetos e a massa corporal dos fetos foram comparados por meio da análise de variância, seguida do teste de Bonferroni quando indicado. As variáveis qualitativas referentes aos índices fetais, como taxa de natalidade, proporção de sexo e taxas de malformações externas e alterações esqueléticas, foram comparadas por meio do teste qui-quadrado.

Todas as análises foram efetuadas prevendo um nível α de significância de 0,05. No texto, foram citados os níveis de significância (P) alcançados em cada teste estatístico realizado.

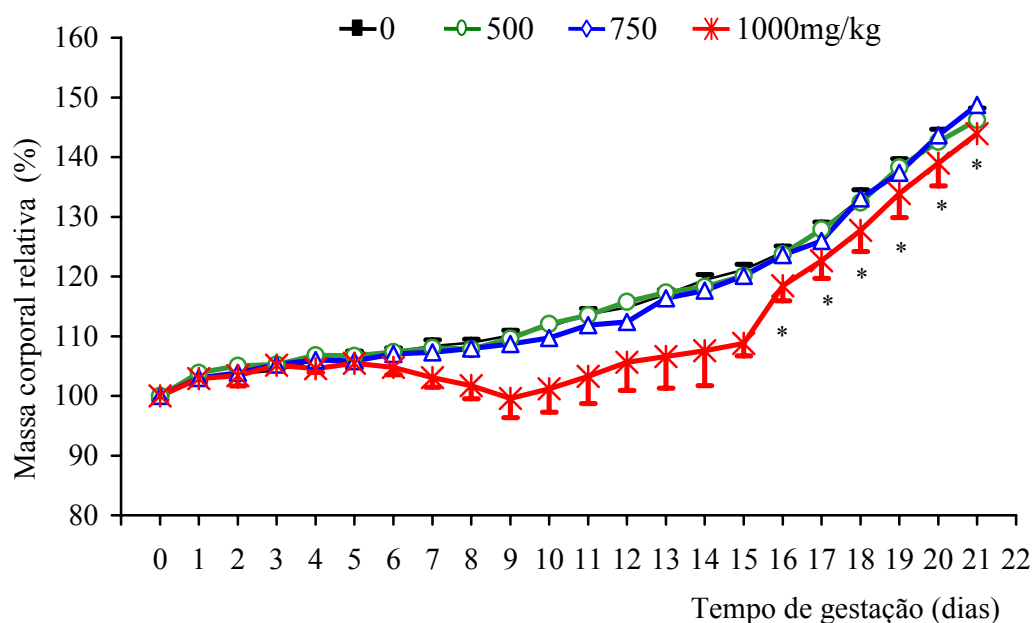
Os programas utilizados para efetuar a análise estatística foram o SPSS *for Windows* 8.0 e o EXCEL 4.0 (LAPPONI, 1995).

4.2 Resultados

4.2.1 Variáveis das progenitoras

O grupo exposto à dosagem de 1000mg/kg de glifosato apresentou um índice de 50% de letalidade das progenitoras durante o período de tratamento (as mortes ocorreram do 7º ao 14º dia de gestação), caracterizando toxicidade materna.

A Figura 2 mostra o desenvolvimento ponderal relativo durante a gestação, com o 1º dia correspondendo a 100%. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,690$, ANOVA de MR) nem interação entre as variáveis grupos de tratamento e dias avaliados ($P = 0,999$, ANOVA de MR).



* Diferença significativa entre os dias 16, 17, 18, 19, 20, 21 e os demais

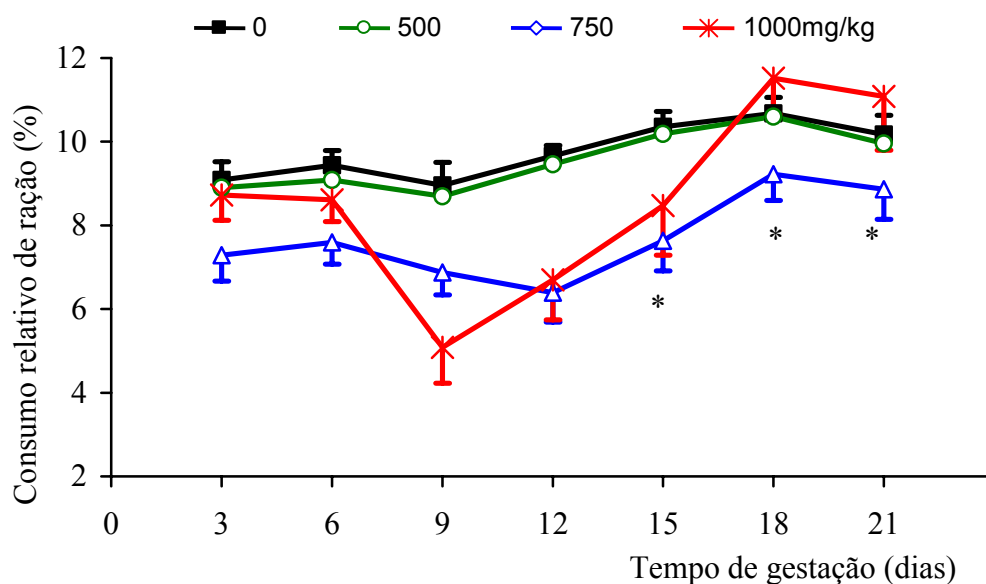
$P < 0,001$ (ANOVA de MR, seguida pelo teste de Bonferroni)

FIGURA 2. Massa corporal relativa das progenitoras (1º dia = 100%) tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n= 15, 15, 16 e 14, respectivamente).

Conforme esperado durante este período, houve aumento significativo na massa corporal relativa ao longo dos dias de tratamento para todos os grupos ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni). As progenitoras expostas a 1000mg/kg de glifosato manifestaram redução na massa corporal relativa exatamente durante o período de administração do tratamento (6° ao 15° dia). Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa, e houve uma retomada do ganho ponderal a seguir.

O ganho total de massa corporal durante a gestação, expresso em gramas (média \pm epm), foi de $106,4 \pm 9,0$; $84,9 \pm 7,0$; $107,4 \pm 9,5$ e $102,2 \pm 8,3$; respectivamente para os grupos controle, 500, 750 e 1000mg/kg de glifosato, não manifestando diferença significativa entre os grupos ($P = 0,693$, ANOVA).

A Figura 3 mostra o consumo relativo de ração durante a gestação. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,905$, ANOVA de MR). Houve interação entre as variáveis grupos de tratamento e períodos de três dias de avaliação ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida pelo teste de Bonferroni). Conforme esperado, durante este período ocorreram diferenças significativas no consumo relativo de ração para todos os grupos ao longo dos períodos de três dias de avaliação ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni). As progenitoras expostas às dosagens de 750 e, principalmente, de 1000mg/kg de glifosato manifestaram redução no consumo de ração durante o período de administração do tratamento, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Houve retomada do consumo a seguir, igualando-se ao grupo controle no período final da gestação.

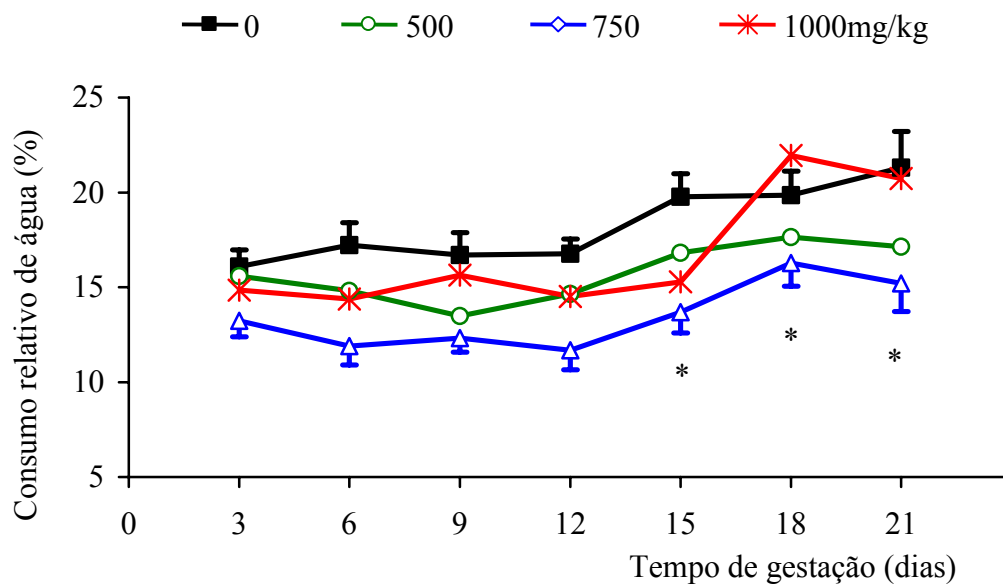


* Diferença significativa entre os dias 15, 18, 21 e os demais

$P < 0,001$ (ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni)

FIGURA 3. Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média de massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n= 15, 15, 16 e 14, respectivamente).

A Figura 4 mostra o consumo relativo de água durante a gestação. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,170$, ANOVA de MR). Houve interação entre as variáveis grupos de tratamentos e períodos de três dias de avaliação ($P = 0,042$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni). Conforme esperado, durante este período ocorreram diferenças significativas no consumo relativo de água para todos os grupos ao longo dos períodos de três dias de tratamento ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), mostrando um aumento no terço final da gestação.



* Diferença significativa entre os dias 15, 18, 21 e os demais
 $P < 0,001$ (ANOVA de MR, seguida pelo teste de Bonferroni)

FIGURA 4. Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n= 15, 15, 16 e 14, respectivamente).

Conforme os dados apresentados na Tabela 1, não houve diferença significativa na massa relativa de órgãos como baço, coração, fígado, pulmões e rins direito e esquerdo, entre os grupos experimentais ($P = 0,428, 0,114, 0,102, 0,098, 0,298, 0,677$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 1. Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

Variáveis	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	500	750	1000
Nº de progenitoras	15	15	16	07
Baço (%)	0,23 ± 0,009	0,24 ± 0,012	0,22 ± 0,009	0,22 ± 0,010
Coração (%)	0,30 ± 0,012	0,35 ± 0,008	0,33 ± 0,008	0,34 ± 0,021
Fígado (%)	4,57 ± 0,130	4,73 ± 0,130	4,89 ± 0,100	5,11 ± 0,190
Pulmões (%)	0,49 ± 0,024	0,55 ± 0,044	0,53 ± 0,019	0,47 ± 0,031
Rim direito (%)	0,30 ± 0,009	0,33 ± 0,009	0,31 ± 0,005	0,33 ± 0,008
Rim esquerdo (%)	0,30 ± 0,008	0,31 ± 0,020	0,31 ± 0,006	0,32 ± 0,010

Não houve diferenças significativas entre os grupos $P > 0,05$ (ANOVA).

Com relação aos índices reprodutivos apresentados na Tabela 2, o número de fetos e as perdas pré e pós-implantação não mostraram diferenças significativas entre os grupos ($P = 0,889$, ANOVA e $P = 0,312$ e $0,703$ qui-quadrado, respectivamente).

TABELA 2. Índices reprodutivos das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação. Dados expressos em média ± erro padrão da média ou percentual.

Índices reprodutivos	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	500	750	1000
Nº de progenitoras	15	15	16	07
Nº de fetos	154	148	162	75
Fetos/progenitora	10,3 ± 0,8	9,7 ± 0,9	10,1 ± 0,9	10,7 ± 1,1
Perdas pré-implantação (%)	7,6	15,5	12,9	11,1
Perdas pós-implantação (%)	2,4	3,3	2,6	3,8

Não houve diferenças significativas entre os grupos $P > 0,05$ (ANOVA ou qui-quadrado).

4.2.2 Variáveis fetais

Conforme a Tabela 3, a massa corporal e os índices fetais, incluindo natalidade, proporção de sexo e malformações macroscópicas externas, não manifestaram diferenças significativas entre os grupos ($P = 0,623$, ANOVA e $P = 0,982$, $0,724$ e $0,170$, qui-quadrado, respectivamente).

TABELA 3. Índices dos fetos das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup[®] do 6º ao 15º dia de gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.

Índices fetais	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	500	750	1000
Nº de fetos	154	148	162	75
Massa corporal (g)	5,1 \pm 0,03	5,0 \pm 0,03	5,1 \pm 0,03	5,1 \pm 0,05
Taxa de vitalidade (%)	100	98,6	99,4	100
Proporção de sexo (macho:fêmea)	0,94:1	1,06:1	1,01:1	1,50:1
Taxa de malformações (%)	0,0	2,0	0,6	0,0

Não houve diferenças significativas entre os grupos $P > 0,05$ (ANOVA ou qui-quadrado).

Apesar do grupo exposto à dosagem de 1000mg/kg apresentar uma proporção entre os sexos mais elevada, esta não foi significativa (teste qui-quadrado, $P = 0,724$) e pode ser atribuída ao menor número de fetos presentes neste grupo. Também, a taxa de malformações externas não foi significativa (teste qui-quadrado, $P = 0,170$), e somente os grupos expostos às dosagens de 500 e 750mg/kg apresentaram fetos com malformações. A principal malformação observada foi anasarca, que ocorreu em três fetos, e um feto, exposto à dosagem de 750mg/kg, teve seu desenvolvimento cessado precocemente, mas não chegou a ser reabsorvido.

A Tabela 4 apresenta as alterações esqueléticas que ocorreram em pelo menos dois grupos experimentais. As demais alterações são descritas no texto a

seguir. Conforme os dados apresentados na Tabela 4, a taxa de alterações esqueléticas apresentou um aumento significativo, de forma dose-relacionada ($P = 0,001$, teste qui-quadrado).

As alterações esqueléticas mais freqüentes foram ossificação incompleta dos ossos do crânio e fontanela aumentada (Tabela 4 e Figura 5). Tais alterações ocorreram com maior freqüência nos grupos experimentais, em comparação com o grupo controle, e mostraram relação dependente de dose. Outras alterações esqueléticas ocorreram com maior freqüência nos grupos expostos ao glifosato, entretanto não manifestaram relação de dose-dependência (Tabela 4 e Figura 5). Estas alterações esqueléticas incluíram a bipartição dos ossos interparietais, supraoccipitais e das esternebras, a ossificação incompleta do osso supraoccipital, processo escamoso, esternebras, membros (geral), fêmures, tíbias, fíbulas e púbis, a ausência de vértebras caudais, a ondulação das costelas e a não-ossificação dos metatarsos e das falanges dos membros posteriores.

TABELA 4. Alterações esqueléticas dos fetos das progenitoras tratadas com zero (controle), 500, 750 ou 1000mg/kg de glifosato-Roundup[®] do 6º ao 15º dia de gestação. Dados expressos em percentual de fetos acometidos.

Região ou estrutura	Anormalidades (%)	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
		0	500	750	1000
Esqueleto (geral)	Qualquer tipo	15,4	33,1*	42,0*	57,3*
Cabeça (geral)	Ossificação incompleta	10,4	29,1*	38,9*	56,0*
	Fontanela aumentada	1,9	25,7*	37,0*	53,3*
Interparietais	Bipartidos	0,6	18,9*	4,9*	0,0
Supraoccipital	Bipartido	9,7	19,6*	1,2	0,0
	Ossificação incompleta	3,2	0,0	1,2	13,3*
Maxila	Disforme	0,0	0,7	1,2	0,0
Mandíbula	Curta	0,6	0,7	0,0	1,3
Processo escamoso	Ossificação incompleta	0,0	0,0	3,1*	2,7*
Vértebras torácicas	Ossificação incompleta	0,6	0,0	0,6	0,0
	Ossificação incompleta	2,6	4,1	3,1	0,0
Vértebras lombares	Disformes	0,0	0,7	1,9	0,0
Vértebras sacrais	Disformes	1,3	0,0	0,6	0,0
	Não ossificados	0,6	0,0	0,6	0,0
Vértebras caudais	Ausentes	1,9	0,0	7,4*	14,7*
	Não ossificados	0,0	2,0	1,9	0,0
Costelas	Ausentes	1,3	2,7	3,1	4,0
	Ossificação incompleta	1,9	2,0	5,6	4,0
	Bifurcadas	0,0	0,7	0,6	0,0
	Onduladas	0,6	2,0	4,9*	0,0
	Ossificação incompleta	1,9	14,9*	0,0	2,7
Esternebras	Bipartidas	3,9	14,2*	0,6	9,3
Membros (geral)	Ossificação incompleta	0,0	0,0	17,9*	1,3
Escápulas	Ossificação incompleta	0,6	3,4	1,2	4,0
Metacarpos	Ossificação incompleta	1,3	1,4	0,6	2,7
Falanges dos MAs	Não ossificadas	5,2	2,7	4,3	1,3
Fêmures	Ossificação incompleta	3,2	3,4	13,0*	0,0
	Arqueadas	0,0	1,4	2,5	0,0
Tibias /Fíbulas	Ossificação incompleta	2,6	2,7	11,7*	8,0
Metatarsos	Não ossificados	4,5	1,4	13,6*	10,7
Falanges dos MPs	Não ossificados	7,1	20,9*	22,2*	2,7
Ílios	Ossificação incompleta	11,7	4,7	1,2	0,0
Ísquios	Ossificação incompleta	4,5	2,7	9,3	0,0
Púbis	Ossificação incompleta	3,9	2,7	11,1*	0,0
N = progenitoras (fetos)		15 (154)	15 (148)	16 (162)	07 (75)
MAs = membros anteriores e MPs = membros posteriores					

* Diferença significativa em relação ao grupo controle ($P < 0,05$, teste qui-quadrado)

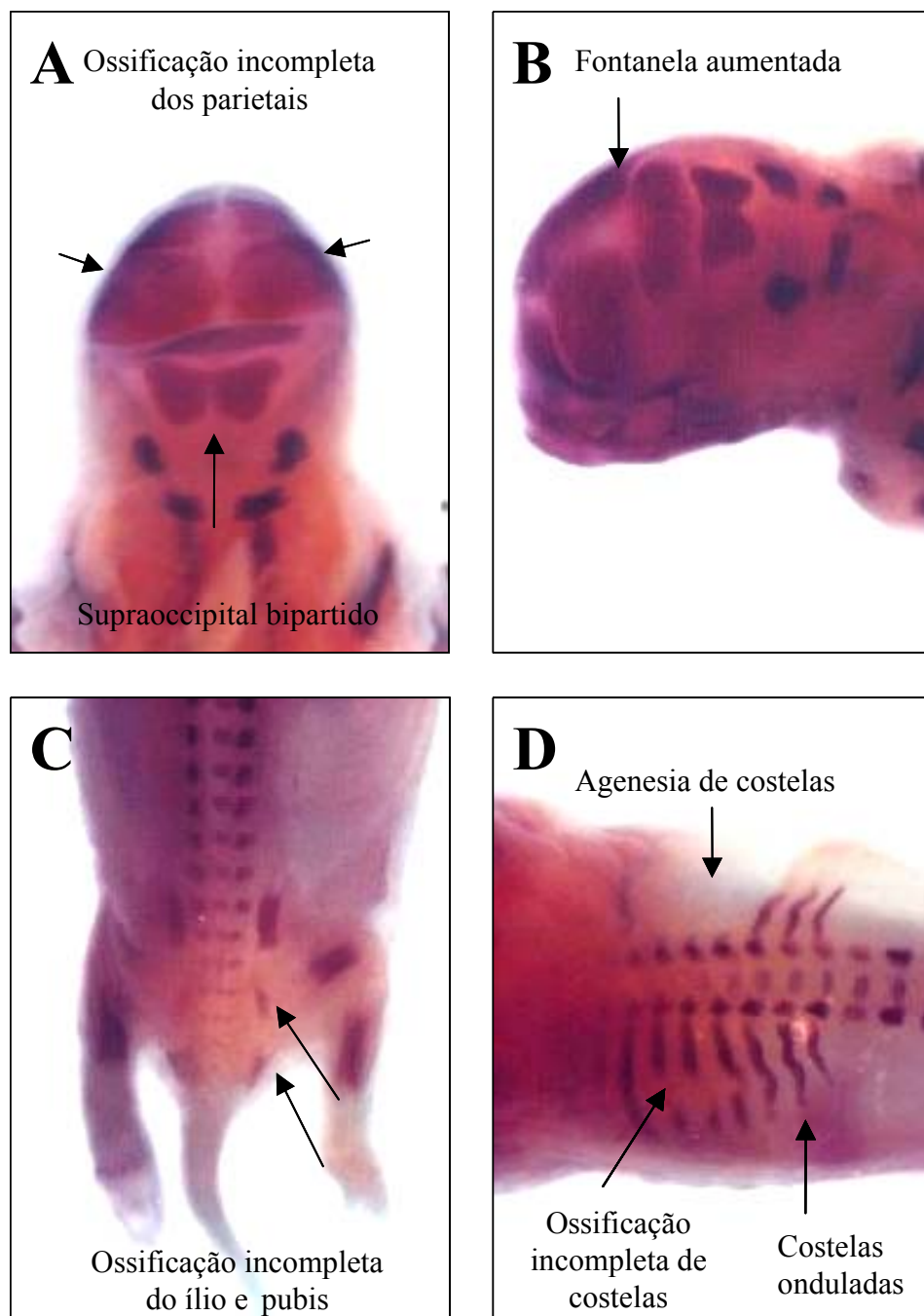


FIGURA 5. Principais alterações esqueléticas de fetos diafanizados de progenitoras tratadas com 500 (A,C), 750 (D) ou 1000mg/kg (B) de glifosato-Roundup® do 6º ao 15º dia de gestação.

Costelas supranumerárias ou disformes, esternobras não ossificadas e fêmures curtos ocorreram em 0,6% dos animais do grupo controle. Entretanto, estas malformações não foram observadas nos grupos expostos ao glifosato.

Ossificação incompleta das esternobras (2,7%), esternobras bipartidas (2,7%), ossificação incompleta dos úmeros (0,7%) e fusão dos zigomáticos (0,7%) foram observadas somente no grupo exposto à dosagem de 500mg/kg.

No grupo exposto a 750mg/kg de glifosato, a taxa de esternobras disformes foi de 11,7% e, portanto, significativamente diferente dos demais grupos (teste qui-quadrado, $P < 0,001$). No mesmo grupo, foram observados ainda ílios arqueados (2,5%), agenesia de falanges nos membros anteriores (1,9%), extra-ossificação dos parietais (1,2%), ossificação incompleta da região occipital e das vértebras cervicais (1,2%), mandíbula curta (1,2%), costelas fusionadas (1,2%), clavículas arqueadas (1,2%), zigomáticos disformes (0,6%), vértebras cervicais desalinhadas (0,6%), esterno ondulado (0,6%), clavículas irregulares (0,6%), escápulas disformes (0,6%), ossificação incompleta dos rádios e das ulnas (0,6%), metacarpos não-ossificados (0,6%) e fêmures arqueados (0,6%).

Vértebras cervicais e torácicas disformes (1,3%) foram observadas somente nos fetos expostos à dosagem de 1000mg/kg de glifosato.

4.3 Discussão

O ensaio de teratogenicidade revelou um aumento na incidência de alterações no desenvolvimento esquelético dos fetos expostos a todas as dosagens testadas do herbicida e toxicidade materna com um índice de letalidade de 50% das progenitoras tratadas com 1000mg/kg de glifosato-Roundup[®].

4.3.1 Toxicidade materna

O ganho relativo de massa corporal das progenitoras tratadas com 1000mg/kg e o consumo relativo de ração das progenitoras tratadas com 750 e 1000mg/kg de glifosato mostraram redução durante o período de administração do tratamento. Embora, esta redução não tenha apresentado significância estatística, sugere toxicidade materna. Esta, ficou bem caracterizada nesse estudo pela taxa de 50% de letalidade das progenitoras tratadas com 1000mg/kg de glifosato. Este resultado mostrou que a formulação comercial Roundup[®] pode ser mais tóxica que o glifosato grau técnico. Adam *et al.* (1997) e Dallegrave *et al.* (2002), em ensaios de toxicidade aguda, sugeriram que o aumento de toxicidade da formulação comercial em relação ao glifosato grau técnico deve-se à presença de outro componente, o surfactante polioxietilenamina, que seria mais tóxico que a substância ativa.

Conforme WHO (1994), a administração de dose equivalente a 3500mg/kg de glifosato grau técnico a ratas Charles River COBS CD, do 6º ao 19º dia de gestação, determinou retardo de crescimento, redução da atividade geral, aumento na incidência de diarreia, dispnéia e secreção nasal sanguinolenta e, ainda, uma taxa de letalidade de 24%. Em relação aos sinais reprodutivos, houve aumento na incidência

de reabsorções precoces, decréscimo no número de sítios de implantação e na viabilidade dos fetos.

Os efeitos reprodutivos relatados para o glifosato grau técnico, em dose equivalente a 3500mg/kg, não foram observados até a dosagem de 1000mg/kg da formulação comercial Roundup[®]. Este resultado pode ser devido ao fato de que as dosagens utilizadas no presente trabalho foram menores que as doses referidas no ensaio com o glifosato grau técnico, ou ainda, devido a capacidade do polioxietilenamina induzir, diretamente, efeitos sistêmicos.

A massa relativa dos órgãos não foi afetada. Provavelmente, porque a administração do tratamento, nos ensaios de teratogenicidade, é realizada somente no segundo terço da gestação (durante 10 dias) e, também, a avaliação dos órgãos se dá seis dias após a interrupção do mesmo.

4.3.2 Toxicidade fetal

A exposição ao herbicida glifosato-Roundup[®] revelou que o mesmo não demonstrou sinais de fetotoxicidade, expressa pelos índices taxa de natalidade, proporção de sexo, malformações externas e massa corporal. Entretanto, este ensaio mostrou um aumento significativo da frequência de fetos exibindo alterações esqueléticas em todos os grupos expostos ao glifosato. Como sinais de toxicidade materna não foram observados em todos os grupos, as alterações não devem estar relacionadas à toxicidade materna, mas, provavelmente, ao desenvolvimento esquelético fetal propriamente dito.

Lork (1977) classifica os desvios da normalidade encontrados no esqueleto como variações do normal, retardos do desenvolvimento do esqueleto e malformações. As variações individuais do normal consistem na ausência dos centros de ossificação esperados para o momento da cesariana, como por exemplo, os das falanges terminais em ratos. Retardos do desenvolvimento ósseo consistem na ausência dos centros de ossificação em estruturas bilaterais ou na presença de forma e/ou tamanho claramente sugestivos de um estágio precoce de desenvolvimento. Nesta classe, estão incluídas ossificações incompletas dos ossos do crânio e fontanelas aumentadas. As malformações do esqueleto consistem, por sua vez, na ausência parcial ou total de ossos importantes, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias, fusões, fendas ou duplicidade (espinha bífida).

O ensaio de teratogênese em ratas tratadas com dose equivalente a 3500mg/kg de glifosato grau técnico determinou um aumento significativo de fetos apresentando ossificação incompleta das esternebras (WHO, 1994). Já no presente ensaio, sinais de retardo do desenvolvimento do esqueleto foram observados em várias estruturas, como crânio, esternebras e membros (especialmente os membros posteriores), em todos os grupos expostos ao glifosato. Embora, na ausência de tratamento, retardos do desenvolvimento ósseo possam ser relacionados a tamanho e/ou massa corporal do feto (SOUZA *et al.*, 1997), nesse estudo, há um aumento significativo na frequência de alterações ósseas nos grupos expostos ao glifosato, sem relação ao tamanho ou à massa corporal fetal.

O aumento da ocorrência de várias alterações esqueléticas foi estatisticamente significativo, quando comparados os grupos expostos ao glifosato

e o controle. Os retardos do desenvolvimento esquelético, como ossificação incompleta dos ossos do crânio e fontanelas aumentadas, apresentaram uma relação de dose-dependência. Porém, esta relação não se manifestou para todas as alterações observadas. As malformações esqueléticas não mostraram relação de dose-dependência, mas foram significativamente mais frequentes em pelo menos um dos grupos expostos ao glifosato em relação ao controle. Tais malformações incluíram bipartição dos ossos interparietais, supraoccipital e esternebras, ausência de vértebras caudais, costelas onduladas e não-ossificação dos metatarsos e das falanges dos membros posteriores.

Embora o mecanismo preciso de toxicidade não esteja ainda claro, sabe-se que a exposição materna (durante a gestação) a pesticidas como o glifosato induz a uma variedade de anormalidades na atividade específica de enzimas hepáticas, cardíacas e cerebrais, tanto nas ratas gestantes quanto em seus fetos (DARUICH *et al.*, 2001).

Os resultados aqui apresentados mostraram um aumento significativo no risco potencial ao sistema esquelético de ratos expostos ao glifosato- Roundup® durante a fase de organogênese fetal. Estudos adicionais são necessários para determinar não só os mecanismos envolvidos, como também os constituintes do produto responsáveis pelo efeito sobre o desenvolvimento esquelético fetal.

5 ENSAIO DE FERTILIDADE E PERFORMANCE REPRODUTIVA

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Produto

Foi utilizado o produto comercial Roundup[®], conforme especificações referidas no item 4.1.1.

5.1.2 Animais

Foram utilizados 192 ratos Wistar adultos (90 dias), 144 fêmeas e 48 machos (com massa corporal de $247,7 \pm 1,8$ g e $326,7 \pm 5,7$ g, respectivamente), com origem, adaptação e manutenção semelhantes às referidas anteriormente no item 4.1.2.

5.1.3 Tratamento dos machos

Foram constituídos três grupos experimentais (n=12/grupo), cada qual recebendo, respectivamente, 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato (Roundup[®]), diariamente, por via oral (com o auxílio de sonda flexível). O grupo controle (n=12) foi tratado com água destilada (veículo), em igual volume (10ml/kg). Machos com 90 dias de idade no início do experimento foram tratados por 70 dias antes do acasalamento, durante os 15 dias do período de acasalamento e durante o

repouso sexual (7 dias), conforme segmento I recomendado pelo EPA (1996a) para ensaios de toxicidade reprodutiva, totalizando 92 dias de tratamento. A massa corporal foi avaliada diariamente durante os períodos de pré-acasalamento e acasalamento. Os consumos de água e ração durante o período pré-acasalamento foram medidos a cada três dias e relacionados à massa corporal média no referido período (consumo relativo à massa corporal individual).

5.1.4 Tratamento das fêmeas

Foram constituídos três grupos experimentais (n=36/grupo), cada qual recebendo, respectivamente, 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato (Roundup[®]), diariamente, por via oral (com o auxílio de sonda flexível). O grupo controle (n=36) foi tratado com água destilada (veículo), em igual volume (10ml/kg). Fêmeas com 90 dias de idade no início do experimento foram tratadas por 15 dias antes do acasalamento, de 1 à 15 dias durante o período de acasalamento e durante a gestação (21 à 23 dias), perfazendo um total de 37 à 53 dias. Parte das fêmeas (n=15/grupo) seguiu o mesmo tratamento durante o período de lactação (21 dias), conforme segmento I recomendado pelo EPA (1996a) para ensaios crônicos de toxicidade reprodutiva. A massa corporal foi avaliada diariamente durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os consumos de água e ração durante os períodos de pré-acasalamento e gestação foram medidos a cada três dias e relacionados à massa corporal média no referido período (consumo relativo à massa corporal individual).

5.1.5 Acasalamento

As fêmeas (aos 105 dias de idade) foram colocadas na caixa (45 x 30 x 12cm) do respectivo macho, e acasaladas durante o ciclo escuro (das 21h às 9h), por 15 dias consecutivos (média de três ciclos estrais), na proporção de três fêmeas para cada macho (com 160 dias).

Foi considerado como dia zero da gestação aquele em que se detectou a presença de espermatozóides e de células queratinizadas (estro) na citologia vaginal. As fêmeas gestantes permaneceram nas respectivas caixas individuais (30 x 15 x 12cm), enquanto as consideradas não gestantes retornaram diariamente à caixa do macho, durante cada ciclo escuro, até o final do período de acasalamento.

5.1.6 Sacrifício dos machos

Ao final do período de acasalamento, sete dias após a última cópula, os machos foram sacrificados, sempre no período da manhã, e avaliados quanto às toxicidades sistêmica e reprodutiva.

Foi mensurada a massa corporal e procedida à anestesia com tiopental sódico (50mg/kg), por via intraperitoneal. Cada rato foi incisado na região abdominal, e, mediante exposição da veia cava caudal, procedeu-se à coleta de 4ml de sangue. O sangue foi transferido para um tubo de ensaio, onde permanecia em temperatura ambiente até a retração do coágulo. Posteriormente, o sangue foi centrifugado, o soro removido do tubo, transferido para dois tubos *ependorf* e congelado (duplicata). Imediatamente após a coleta de sangue, com o animal ainda

anestesiado, o diafragma do macho foi incisado, como forma de proceder ao sacrifício.

Foram removidos fígado, rins, adrenais, pulmões, coração, baço, estômago, bexiga e cérebro. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada com a massa corporal de cada indivíduo. Todos os órgãos foram inspecionados quanto a possíveis alterações macroscópicas e conservados em formol tamponado a 10%, para posterior análise histopatológica. Os órgãos sistêmicos, após fixação em formol, foram embebidos em parafina, seccionados a 3 μ m. Os fragmentos foram montados sobre lâmina, fixados com xilol, corados com hematoxilina/eosina e observados em microscópio óptico a 40, 100 e 400x.

Foram também removidos os órgãos sexuais como testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal. Foi mensurada a massa destes órgãos e relacionada à massa corporal de cada indivíduo, sendo que a próstata estava livre de seu envoltório e a vesícula seminal livre de seu conteúdo. Um testículo de quatro machos de cada grupo experimental e do grupo controle foi acondicionado em fixador *Bouin*, para posterior análise histopatológica. Após fixação em *Bouin*, os testículos foram processados conforme referido anteriormente para os órgãos sistêmicos e observados em microscópio óptico a 40, 100 e 400x (RUSSEL *et al.*, 1990). Foram analisados 100 túbulos seminíferos (com espermatídes alongadas) quanto a presença de espermatogênese completa e mensurado o diâmetro de 20 túbulos por testículo. Os demais testículos foram liberados da túnica albugínea, mergulhados em 10ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, com Triton X-100 a 0,05%, e homogeneizados em velocidade média, por um minuto, em

homogenizador Fisatom 720 (Tissuemizer®). Cem microlitros do homogeneizado de cada testículo foram diluídos em 900µl de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após a diluição, o número de espermátides resistentes à homogeneização (estágios de 17 a 19) foi contado em câmara de Neubauer. Na câmara, foi contada $\frac{1}{4}$ da área de cada retículo (total 0,1mm³). O valor resultante da contagem de espermátides de cada testículo foi multiplicado pelo fator de diluição utilizado (10^2), pelo fator de correção da câmara (10^2) e ajustado para cm³ ($\times 10^2$). Sendo assim, o valor total contado resultou em milhões de espermátides ($\times 10^6$). Os valores resultantes da contagem dos testículos direito e esquerdo de cada rato foram somados, de forma a resultar na contagem por animal. Naqueles ratos em que um dos testículos foi removido e fixado em *Bouin*, para análise histopatológica, o valor obtido do outro testículo foi multiplicado por dois para avaliação indireta da produção espermática individual.

De forma semelhante ao processamento realizado com os testículos, a cauda dos epidídimos foi isolada, cortada em pequenos pedaços, mergulhada e homogeneizada em iguais volume e diluição utilizados para a contagem de espermátides. Os espermatozóides foram contados em câmara de Neubauer. Somadas as contagens direita e esquerda de cada animal, o mesmo fator de multiplicação (10^6) foi aplicado para obtenção do número de espermatozóides por rato.

Para avaliação morfológica dos espermatozóides, os ductos deferentes direito e esquerdo de cada macho foram lavados com 1ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Posteriormente, uma gota deste lavado foi misturada a uma gota de

eosina a 2%, e foi procedido o esfregaço sobre lâmina de vidro para microscopia. Foram avaliados 200 espermatozoides de cada macho quanto a possíveis defeitos de cabeça e/ou de cauda, em microscópio óptico com aumento de 400 vezes (ROBB *et al.*, 1978).

A concentração sérica de testosterona foi determinada por radioimunoensaio, utilizando-se o *kit* para diagnóstico de testosterona 125I RIA (ICN Biomedicals - Costa Mesa/Califórnia, lote: RTK0115, 16,17). As amostras foram analisadas em duplicata, utilizando-se 50µl de soro de cada macho em sistema de duplo anticorpo, lidas em leitor automatizado e reportadas em ng/ml. Foram consideradas as médias das medidas com coeficiente de variação intraensaio menor que 10%. Quando este coeficiente foi superior a 10% ou as concentrações estavam fora da curva padrão, o ensaio foi repetido, alterando-se a quantidade de soro, caso necessário. Se as concentrações estavam abaixo da curva padrão, utilizavam-se 100µl de soro e dividia-se o resultado por 2. Se as concentrações estavam acima, utilizavam-se 25µl e multiplicava-se o resultado por 2. Foram também considerados os coeficientes interensaios e aceitos somente aqueles inferiores 10%.

5.1.7 Gestação

A massa corporal das fêmeas gestantes foi mensurada diariamente, e os consumos de água e ração, a cada três dias. Os animais foram inspecionados quanto à presença de hemorragia, aborto, ou outros sinais clínicos como frêmito

vocal, piloereção, cianose, ataxia e convulsões, durante todo o período de gestação (BRITO, 1994).

Metade das fêmeas gestantes de cada grupo experimental, assim como metade do grupo controle, foram sacrificadas no 21º dia de gestação para avaliação teratogênica e de toxicidade sistêmica.

5.1.8 Sacrifício das progenitoras ao final da gestação

Mensurada a massa corporal, cada fêmea foi anestesiada com cloridrato de cetamina (90mg/kg), por via intramuscular, precedido de cloridrato de xilazina (5mg/kg), por via intramuscular, como medicação pré-anestésica. A pele e a parede abdominal foram incisadas, e o útero exposto. O útero foi removido e o ligamento largo divulsionado para verificação da massa uterina. Foi mensurada a massa corporal da fêmea sem o útero. Na continuação, o útero foi incisado na sua face lateral, e os fetos foram removidos individualmente. Foram feitas secção do cordão umbilical (0,5cm do abdômen fetal), secagem em papel toalha, observação de sinais vitais, sexagem, mensuração da massa corporal e avaliação macroscópica externa quanto à presença de malformações. Das progenitoras, foram retirados os ovários e contados os corpos lúteos (usando-se microscópio estereoscópico, com aumento de 10x). Foram avaliados também os sítios de implantação uterina, após remoção dos botões embrionários. Foram removidos fígado, rins, adrenais, pulmões, coração, baço, estômago, bexiga e cérebro. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada fêmea sem o útero. Todos os órgãos foram inspecionados quanto a possíveis alterações

macroscópicas e, posteriormente, conservados em formol tamponado a 10%, para posterior análise histopatológica conforme referido no item 5.1.6.

5.1.9 Lactação

Parte das fêmeas gestantes de cada grupo experimental e do grupo controle (n=15/grupo) foram deixadas parir a termo. Após o parto, as fêmeas foram transferidas para caixas maiores (45 x 30 x 12cm), juntamente com suas ninhadas. A massa corporal (g) das progenitoras foi avaliada diariamente, até o desmame.

5.1.10 Sacrifício das progenitoras ao final da lactação

O desmame foi realizado no 21º dia de lactação, quando as progenitoras foram retiradas das caixas contendo suas ninhadas e colocadas em caixas coletivas para avaliação da fase do ciclo estral. As fêmeas, quando comprovadamente em estro, pela presença de células queratinizadas na citologia vaginal, foram sacrificadas para avaliação de sinais de toxicidade sistêmica e/ou reprodutiva. A massa corporal foi mensurada e, mediante anestesia com tiopental sódico (50mg/kg), por via intraperitoneal, a pele e a parede abdominal foram incisadas. O útero foi exposto e removido, juntamente com os ovários. Liberados dos tecidos adjacentes, útero, ovários e ovidutos foram separados. O número de sítios de implantação uterina foi contado, usando-se um microscópio estereoscópico, com aumento de 10x. Previamente, os sítios de implantação foram corados de azul escuro, pela técnica de coloração histológica descrita por Salewski (1964). Esta constou de imersão do útero durante 10min em solução a 10% de sulfeto de

amônio, seguida da lavagem em água corrente e imersão em solução a 1% de ácido clorídrico e ferrocianeto de potássio a 20% por 10min.

Foram removidos fígado, rins, pulmões, coração, estômago, bexiga e cérebro. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada fêmea. Todos os órgãos foram inspecionados quanto a possíveis alterações macroscópicas e conservados em formol tamponado a 10%, para posterior análise histopatológica, conforme referido no item 5.1.6.

5.1.11 Variáveis avaliadas

As variáveis avaliadas nos machos foram a massa corporal relativa durante as fases de pré-acasalamento e acasalamento, os consumos relativos de água e ração durante o pré-acasalamento, a massa relativa dos órgãos, como fígado, rins, adrenais, pulmões, coração, baço, estômago, bexiga, cérebro, testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata, e os índices de fertilidade. Estes últimos incluíram a produção diária de espermatozóides (que equivale ao nº de espermátidas/ 6,1), o número de espermatozóides, o tempo de trânsito espermático (que equivale ao nº de espermatozóides/ produção diária), o percentual de espermatozóides anormais, o percentual de túbulos com espermatogênese completa, o diâmetro dos túbulos seminíferos e os níveis séricos de testosterona. Também foi avaliada a histopatologia de testículos, fígado e rins.

As variáveis avaliadas nas fêmeas foram a massa corporal relativa durante as fases de pré-acasalamento e acasalamento e os consumos relativos de água e ração durante o pré-acasalamento.

Também foram avaliadas as taxas reprodutivas referentes ao acasalamento, conforme as fórmulas a seguir (EPA, 1996b).

$$\text{Taxa de acasalamento} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas com espermatozói- de na citologia vaginal}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas}} \times 100$$

$$\text{Taxa de gestação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas gestantes}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas com espermatozói- de na citologia vaginal}} \times 100$$

$$\text{Taxa de fertilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas gestantes}} \times 100$$

Nas progenitoras foram avaliadas a massa corporal relativa durante as fases de gestação e lactação, os consumos relativos de água e ração durante a gestação, a massa relativa dos órgãos, como fígado, rins, adrenais, pulmões, coração, baço, estômago, bexiga, cérebro, ovários e ovidutos, e os índices reprodutivos, incluindo o número de fetos por progenitora e as perdas pré e pós-implantação, calculadas conforme referido anteriormente no item 4.1.8.

As variáveis avaliadas nos fetos foram a massa corporal e os índices fetais, que incluíram taxas de vitalidade, proporção de sexos e malformações macroscópicas externas, calculadas conforme referido anteriormente no item 4.1.8.

Nas lactantes, foram avaliados a massa relativa do útero e os índices reprodutivos, incluindo as perdas pós-implantação, o número de filhotes por progenitora, a massa corporal dos filhotes ao nascimento, a proporção de sexos, calculados conforme referido anteriormente no item 4.1.8.

Também foram calculadas as taxas de natalidade, viabilidade e desmame, conforme as fórmulas a seguir (EPA, 1996b).

$$\text{Taxa de natalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ total de filhotes nascidos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de viabilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes vivos até o 4}^\circ \text{ dia pós-natal}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de desmame} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de filhotes ao desmame}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos}} \times 100$$

5.1.12 Análise estatística

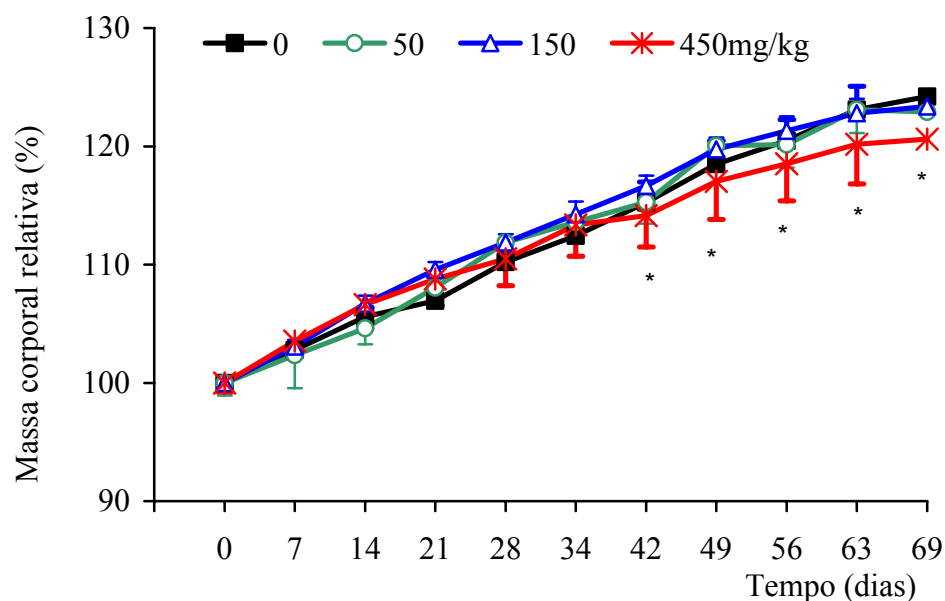
Os dados foram expressos como frequência absoluta ou relativa (porcentagem), média e erro padrão da média, conforme a variável avaliada. A análise estatística incluiu os testes de análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de MR), análise de variância de uma via (ANOVA) e qui-quadrado (ZAR, 1999).

As variáveis quantitativas (que apresentaram distribuição normal), referentes à influência do glifosato em desenvolvimento ponderal, consumo de água e ração, índices de fertilidade, massa relativa dos órgãos de ratos e ratas progenitoras e índices fetais, foram comparadas por meio da análise de variância de medidas repetidas ou da análise de variância de uma via, seguida do teste de Bonferroni quando indicado. As variáveis qualitativas, referentes às taxas reprodutivas das progenitoras e aos índices fetais, foram comparadas por meio do teste qui-quadrado. Todas as análises foram feitas prevendo um nível de significância 0,05. No texto, foram citados os níveis de significância (*P*) alcançados em cada teste estatístico realizado. Os programas utilizados para efetuar a análise estatística foram o SPSS *for Windows* 8.0 e o EXCEL 4.0 (LAPPONI, 1995).

5.2 Resultados

5.2.1 Variáveis dos machos

A Figura 6 mostra o desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) durante o período de pré-acasalamento. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,888$, ANOVA de MR), nem interações entre grupos e dias ($P = 0,751$, ANOVA de MR). Conforme esperado, ocorreu aumento significativo na massa corporal relativa ao longo dos dias de tratamento para todos os grupos ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

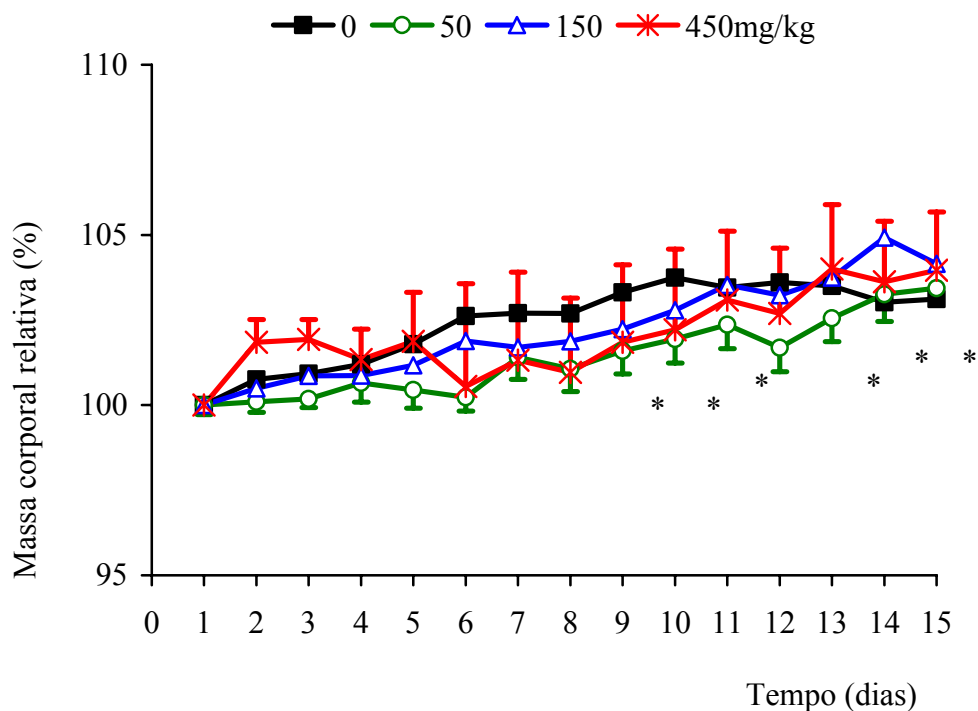


* Diferença significativa entre os dias 42, 49, 56, 63, 69 e os demais
($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 6. Massa corporal relativa dos machos (1º dia = 100%) tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 70 dias prévios ao acasalamento. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=12/grupo).

O desenvolvimento ponderal também não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 7) durante o período de acasalamento ($P = 0,727$, ANOVA de MR), manifestando somente diferença entre os dias de tratamento ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

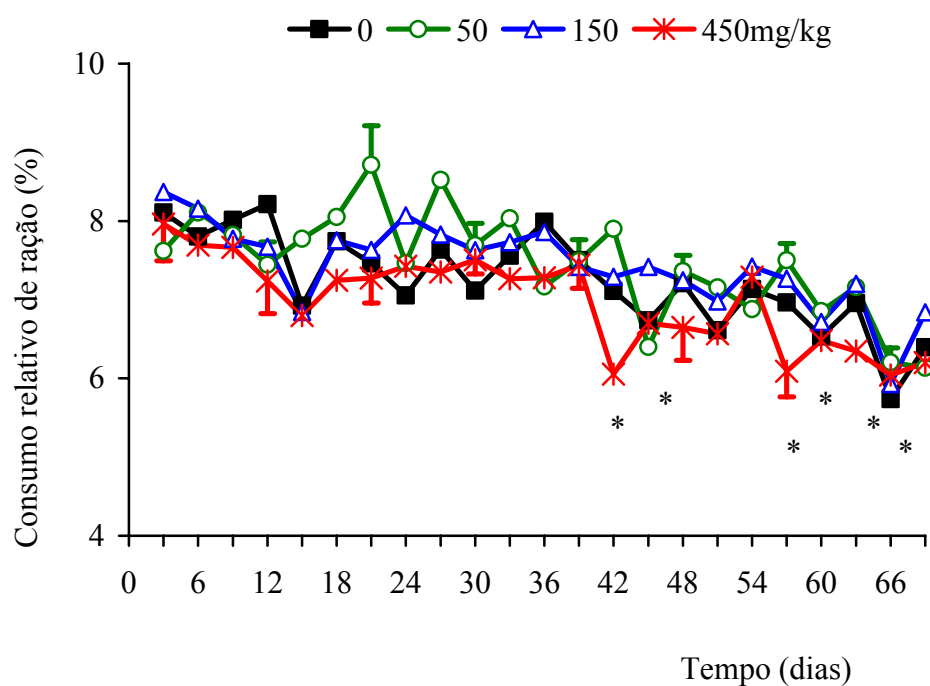
O aumento de massa corporal relativa observado no final do período de tratamento foi semelhante para todos os grupos, sem apresentar interação entre os dias e grupos ($P = 0,437$, ANOVA de MR).



* Diferença significativa entre os dias 9,10,11,13,14, 15 e os demais
($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 7. Massa corporal relativa dos machos (1º dia = 100%) tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias de acasalamento. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=12/grupo).

O consumo relativo de ração (Figura 8) durante o período de pré-acasalamento não manifestou diferença significativa entre os grupos ($P = 0,152$, ANOVA de MR). Entretanto, foram observadas diferenças entre os dias ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), mostrando redução de consumo no final do período de tratamento, assim como interação entre dias e grupos ($P < 0,001$, ANOVA de MR).

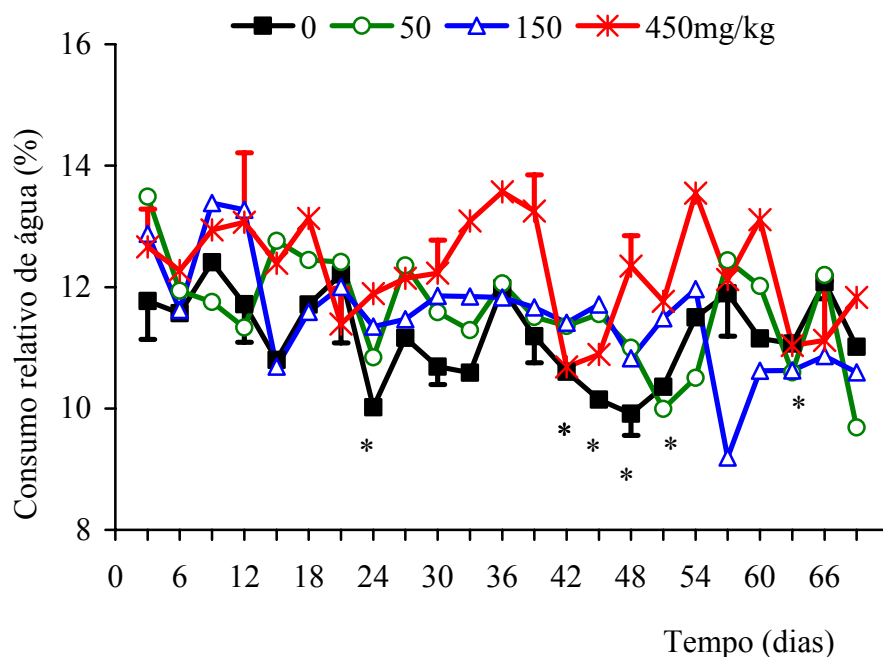


* Diferença significativa entre os dias 42, 45, 57, 60, 63, 66 e os demais ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 8. Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®

durante os 70 dias de pré-acasalamento. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=12/grupo).

O consumo relativo de água (Figura 9) durante o período de pré-acasalamento não manifestou diferença significativa entre os grupos ($P = 0,179$, ANOVA de MR). Entretanto, foram observadas diferenças entre os dias ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), mostrando redução significativa de consumo nos períodos de tratamento indicados em relação aos demais períodos, assim como interação entre dias e grupos ($P = 0,027$, ANOVA de MR).



* Diferença significativa entre os dias 24, 42, 45, 48, 51, 63 e os demais
($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 9. Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 70 dias de pré-acasalamento. Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=12/grupo).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5, pode-se observar que houve aumento significativo das massas relativas do fígado ($P < 0,001$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni) e dos rins direito e esquerdo ($P < 0,001$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni) no grupo tratado com 450mg/kg de glifosato por 92 dias. Os demais órgãos, como as adrenais direita e esquerda, a bexiga, o baço, o cérebro, o coração, o estômago e os pulmões, não manifestaram diferenças significativas nas suas massas relativas ($P = 0,701; 0,459; 0,721; 0,289; 0,729; 0,609; 0,092; 0,201$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 5. Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento e acasalamento. Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=12/grupo).

Massa relativa (%)	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	50	150	450
Adrenal direita	0,007 ± 0,0006	0,007 ± 0,0005	0,007 ± 0,0003	0,008 ± 0,0016
Adrenal esquerda	0,008 ± 0,0005	0,007 ± 0,0004	0,007 ± 0,0005	0,009 ± 0,0017
Baço	0,18 ± 0,006	0,17 ± 0,012	0,17 ± 0,004	0,19 ± 0,011
Bexiga	0,037 ± 0,001	0,039 ± 0,002	0,040 ± 0,002	0,044 ± 0,005
Cérebro	0,48 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01
Coração	0,32 ± 0,008	0,31 ± 0,006	0,32 ± 0,009	0,33 ± 0,009
Estômago	0,53 ± 0,008	0,53 ± 0,016	0,52 ± 0,02	0,63 ± 0,02
Fígado	3,80 ± 0,19	3,68 ± 0,09	3,54 ± 0,09	4,51 ± 0,21*
Pulmões	0,54 ± 0,63	0,44 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,53 ± 0,03
Rim direito	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,37 ± 0,02*
Rim esquerdo	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,38 ± 0,01*
Epidídimo direito	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Epidídimo esquerdo	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Próstata	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Testículo direito	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Testículo esquerdo	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01

Vesícula seminal	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02
------------------	-------------	-------------	-------------	-------------

* Diferença significativa em relação aos demais grupos,
 $P < 0,05$ (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

A massa relativa dos órgãos reprodutivos (Tabela 5), como os testículos direito e esquerdo, os epidídimos direito e esquerdo, a vesícula seminal e a próstata, não sofreu alterações significativas ($P = 0,798; 0,946; 0,103; 0,410; 0,289$ e $0,952$, respectivamente, ANOVA).

A análise histopatológica do fígado (Figura 10 - A, B e C) revelou sinais de hepatotoxicidade, caracterizados por tumefação de hepatócitos (B) e necrose multifocal (C), principalmente nos fígados dos machos tratados por 92 dias com 450mg/kg de glifosato. Com incidência de 5/8 animais avaliados. Com relação aos rins (Figura 11 - A e B), os sinais foram menos intensos que os hepáticos, aparecendo congestão generalizada dos vasos para todos os grupos tratados com glifosato.

Apesar de não ter havido aumento na massa relativa dos órgãos reprodutivos, a análise histopatológica testicular (Figura 12 - A, B e C) revelou sinais de toxicidade reprodutiva, caracterizados pela presença de congestão dos vasos (A), degeneração das espermátides para todos os grupos tratados e um acentuado decréscimo na espermatogênese (B), com degeneração tubular (C) para os grupos tratados com 150 e 450mg/kg de glifosato.

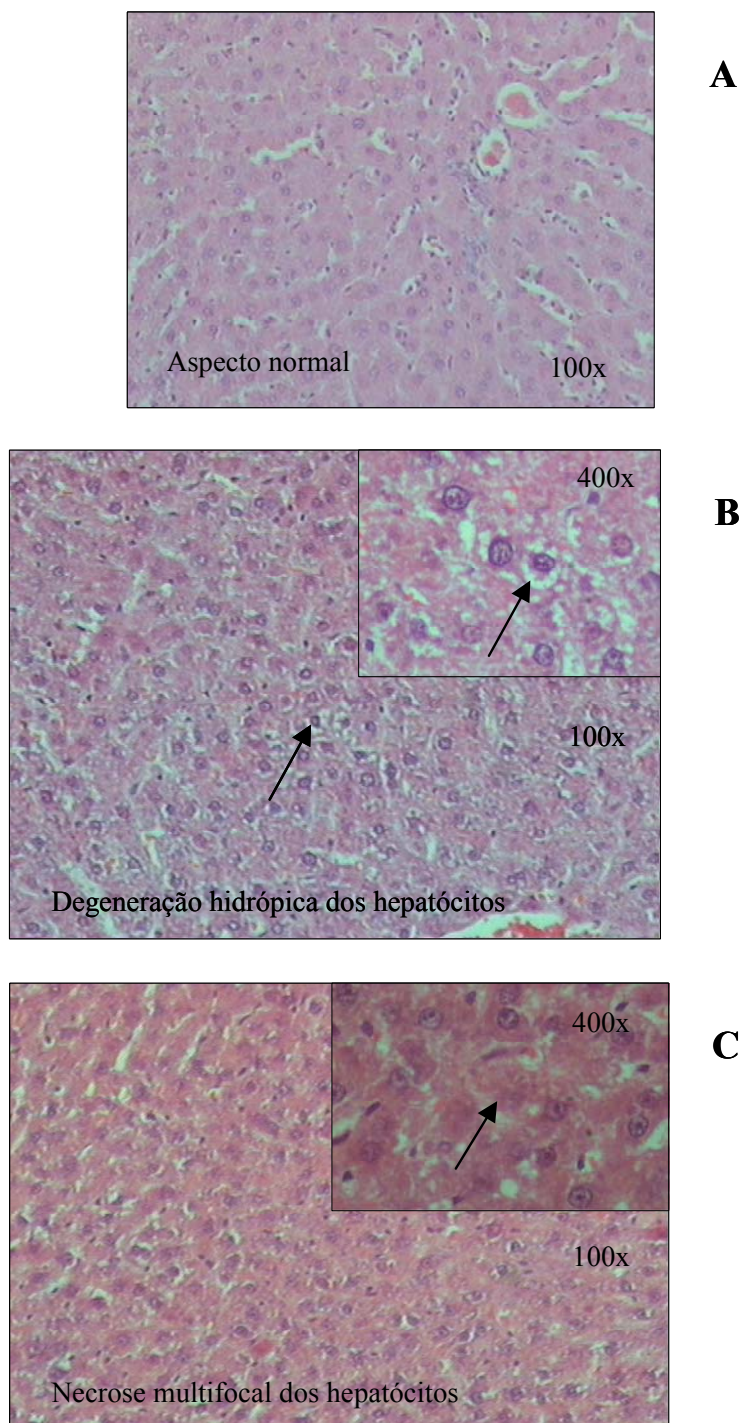


FIGURA 10. Alterações histopatológicas de fígado de machos tratados com zero (A), 150 (B) ou 450mg/kg (C) de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento e o acasalamento. As setas apontam a alteração histológica citada no aumento registrado (100 ou 400x).

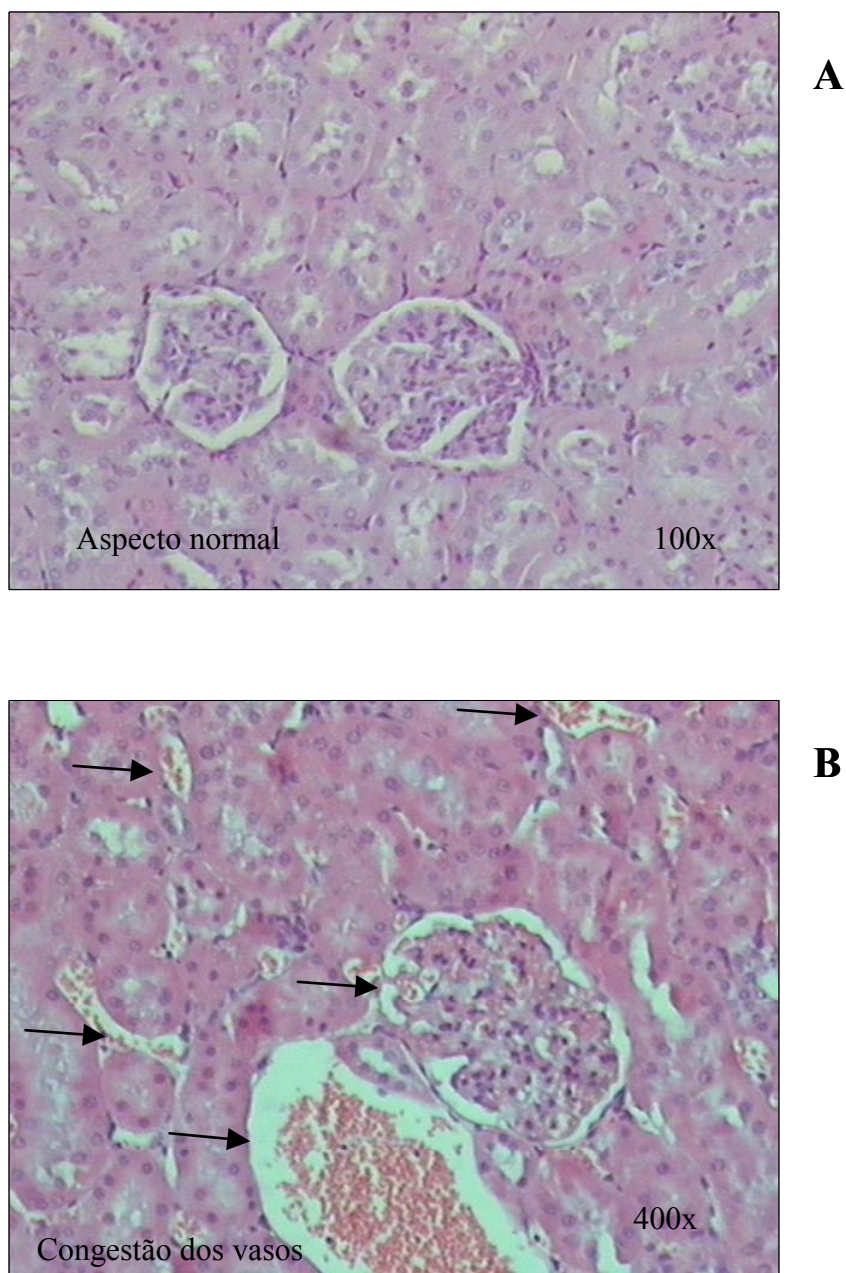


FIGURA 11. Alteração histopatológica de rins de machos tratados com zero (A) ou 450mg/kg (B) de glifosato-Roundup[®] durante o pré-acasalamento e o acasalamento. As setas apontam a alteração histológica citada no aumento registrado (100 ou 400x).

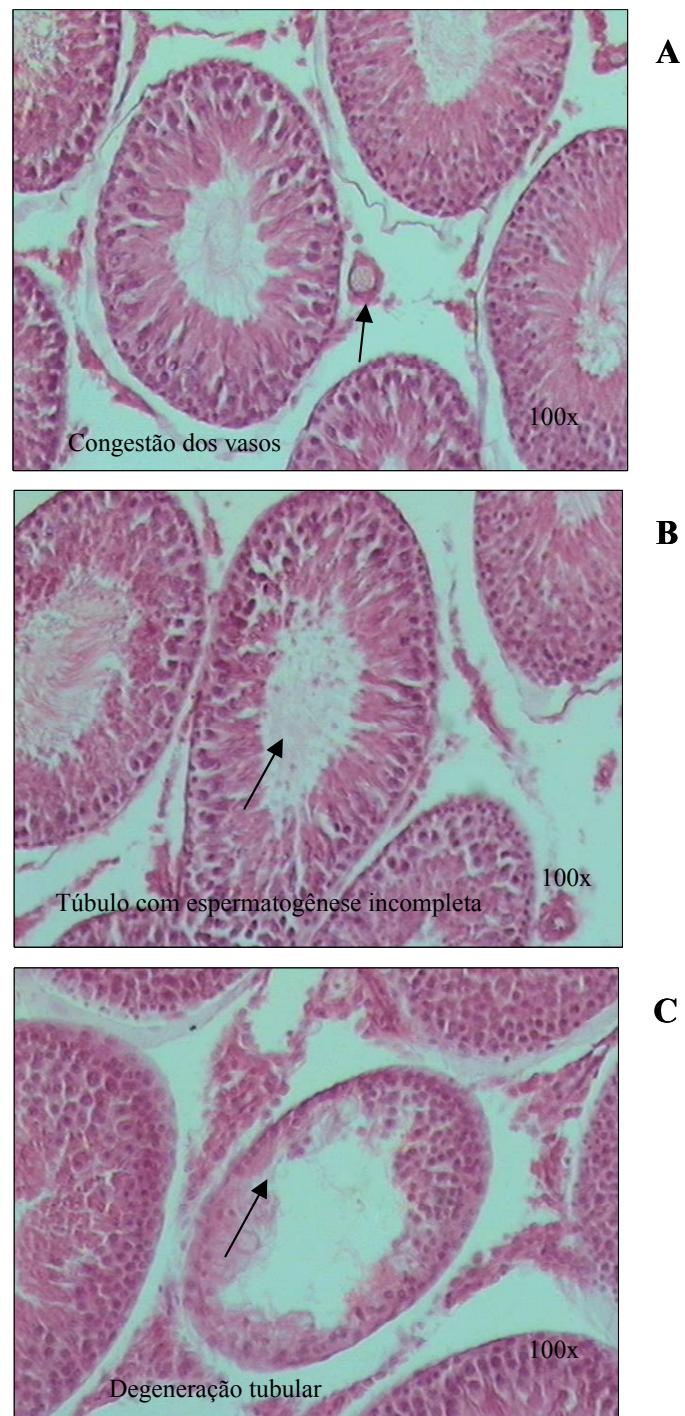


FIGURA 12. Alterações histopatológicas de testículos de machos tratados com 50 (A), 150 (B) ou 450mg/kg (C) de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento e o acasalamento. As setas apontam a alteração histológica citada no aumento registrado (100x).

A Tabela 6 mostra os índices de fertilidade. Observam-se alterações significativas na produção diária de espermatozóides, no número de espermatozóides, no percentual de espermatozóides anormais e nos níveis séricos de testosterona.

TABELA 6. Índices de fertilidade dos machos tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante o pré-acasalamento e o acasalamento. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual (^a n=12/grupo ou ^b n=4/grupo).

	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Produção diária de espermatozóides ($\times 10^6$) ^a	21,3 \pm 1,8	14,7 \pm 1,5*	14,3 \pm 0,7*	13,3 \pm 1,2*
Número de espermatozóides ($\times 10^6$) ^a	357,7 \pm 27,1	233,0 \pm 20,2*	265,6 \pm 26,1	255,4 \pm 24,9*
Tempo de trânsito espermático (dias) ^a	18,6 \pm 2,5	10,3 \pm 3,0	7,3 \pm 2,1	9,9 \pm 2,9
Espermatozóides anormais (%) ^a	4,05 \pm 0,43	11,9 \pm 1,6	12,4 \pm 2,0	14,7 \pm 3,4*
Túbulos com espermatogênese completa (%) ^b	94,0 \pm 2,0	81,5 \pm 2,5	81,0 \pm 1,7	78,5 \pm 3,0
Diâmetro tubular (μm) ^b	184,5 \pm 0,10	194,8 \pm 0,29	195,9 \pm 0,33	187,7 \pm 0,75
Testosterona sérica (ng/ml) ^a	3,36 \pm 0,58	4,23 \pm 0,55	3,13 \pm 0,44	1,62 \pm 0,2*

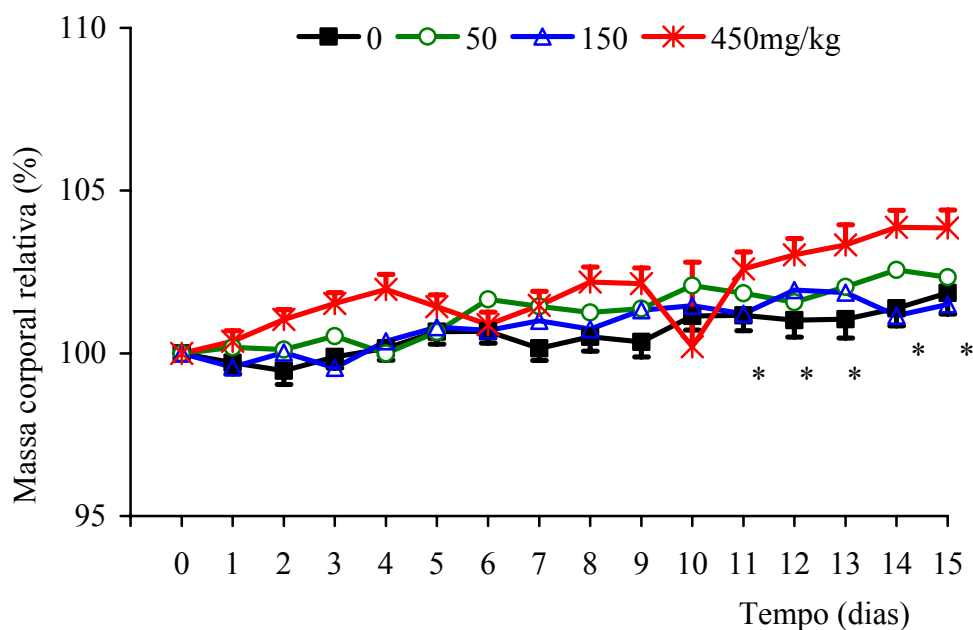
* Diferença significativa em relação aos demais grupos testados, $P < 0.05$ (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

A produção diária de espermatozóides foi significativamente reduzida em todos os grupos tratados ($P < 0,001$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). Entretanto, somente os grupos tratados com 50 e 450mg/kg de glifosato mostraram redução no número de espermatozóides ($P = 0,005$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). Embora não significativa, houve também uma redução do número de espermatozóides do grupo tratado com 150mg/kg. Apesar de mostrar

redução dos níveis séricos de testosterona, só apresentaram significância estatística na maior dosagem ($P = 0,007$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). De forma semelhante, observou-se um aumento no percentual de espermatozóides anormais, que atingiu significância estatística somente nos animais tratados com 450mg/kg de glifosato ($P = 0,009$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). Não houve alteração estatisticamente significativa no tempo de trânsito espermático ($P = 0,666$, ANOVA) e no percentual de túbulos com espermatozoides incompletos ($P = 0,833$, teste qui-quadrado). Também, o diâmetro tubular não foi afetado pelo tratamento ($P = 0,159$, ANOVA).

5.2.2 Variáveis das fêmeas

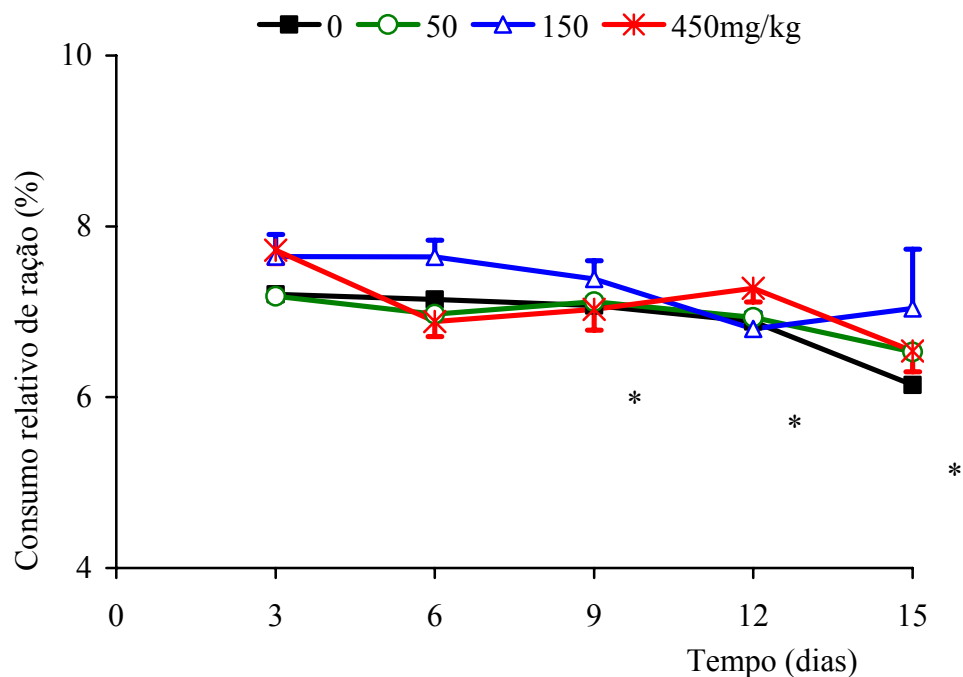
A Figura 13 mostra o desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) durante o período de pré-acasalamento. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,299$, ANOVA de MR), nem interação entre grupos e dias ($P = 0,293$, ANOVA de MR). Conforme esperado, ocorreu aumento significativo de massa corporal relativa ao longo dos dias de tratamento para todos os grupos ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).



* Diferença significativa entre os dias 11, 12, 13, 14, 15 e os demais ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 13. Massa corporal relativa das fêmeas (1º dia = 100%) tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias prévios ao acasalamento. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=36/grupo).

O consumo relativo de ração (Figura 14) durante o período de pré-acasalamento não manifestou diferença significativa entre os grupos ($P = 0,359$, ANOVA de MR), nem interação entre dias e grupos ($P < 0,857$, ANOVA de MR). Entretanto, foram observadas diferenças entre os dias ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), mostrando redução de consumo no final do período de tratamento.

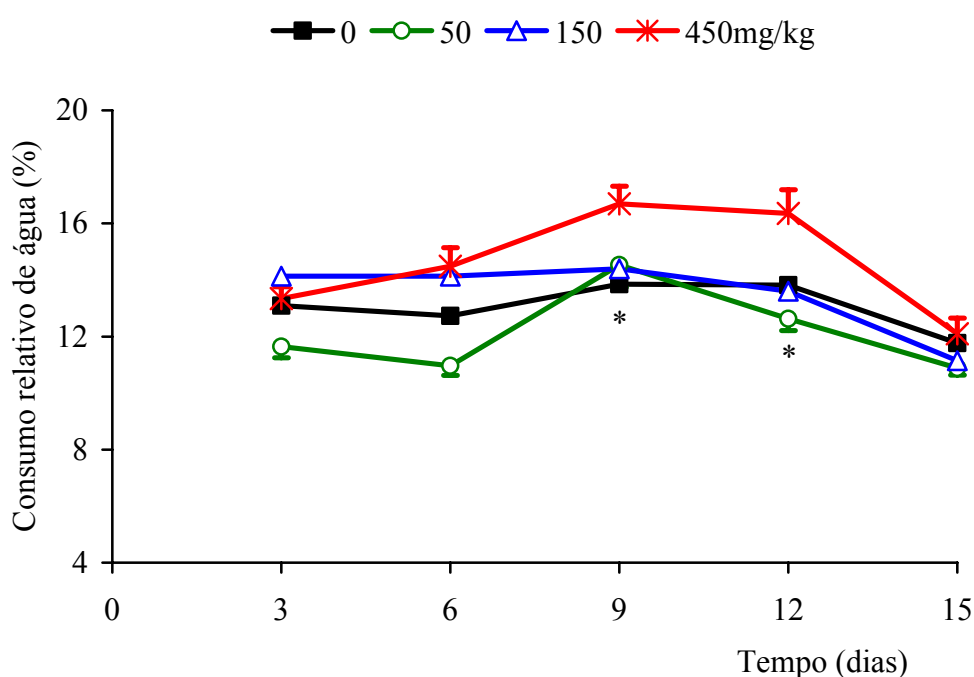


* Diferença significativa entre os dias 9, 12, 15 e os demais
($P < 0,001$; ANOVA de MR, seguida do teste Bonferroni).

FIGURA 14. Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias prévios ao acasalamento. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=36/grupo).

O consumo relativo de água (Figura 15) durante o período de pré-acasalamento manifestou diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), entre os dias ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), bem como interação entre dias e grupos ($P = 0,003$, ANOVA de MR).

A redução de consumo no final do período de tratamento para a maioria dos grupos em relação ao consumo inicial mostra as diferenças entre os dias. Entretanto, o grupo tratado com 450mg/kg de glifosato nos dias 9 e 12 mostrou maior consumo relativo de água em relação aos demais grupos.



* Diferença significativa entre os dias 9, 12 e os demais e entre os tratamentos (450 > 0, 50 e 150mg/kg) ($P = 0,003$; ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 15. Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante os 15 dias prévios ao acasalamento. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=36/grupo).

O aumento no consumo relativo de água para as fêmeas tratadas com a maior dosagem de glifosato nos dias 9 e 12 aparentemente não teve significância

biológica, já que o mesmo não foi acompanhado de outras alterações, como perda relativa de massa corporal, alterações no consumo de ração ou quaisquer sinais clínicos de toxicidade. Também, como se pode observar na Figura 15, o consumo relativo de água retornou a limiares semelhantes aos demais grupos ainda dentro do período de pré-acasalamento.

A Tabela 7 mostra as taxas reprodutivas referentes ao acasalamento entre os machos e as fêmeas pré-tratados com glifosato-Roundup[®]. Como se pode observar, as taxas reprodutivas não foram afetadas pelo tratamento prévio, apesar de alguns índices de fertilidade dos machos, como o número de espermatozóides, a produção diária de espermatozóides, a taxa de espermatozóides anormais e os níveis séricos de testosterona, terem sido significativamente afetados (Tabela 6).

TABELA 7. Taxas reprodutivas dos machos e fêmeas tratados com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante o pré-acasalamento e o acasalamento. Dados expressos em percentual (n=12 machos e 36 fêmeas/grupo).

Taxas	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450

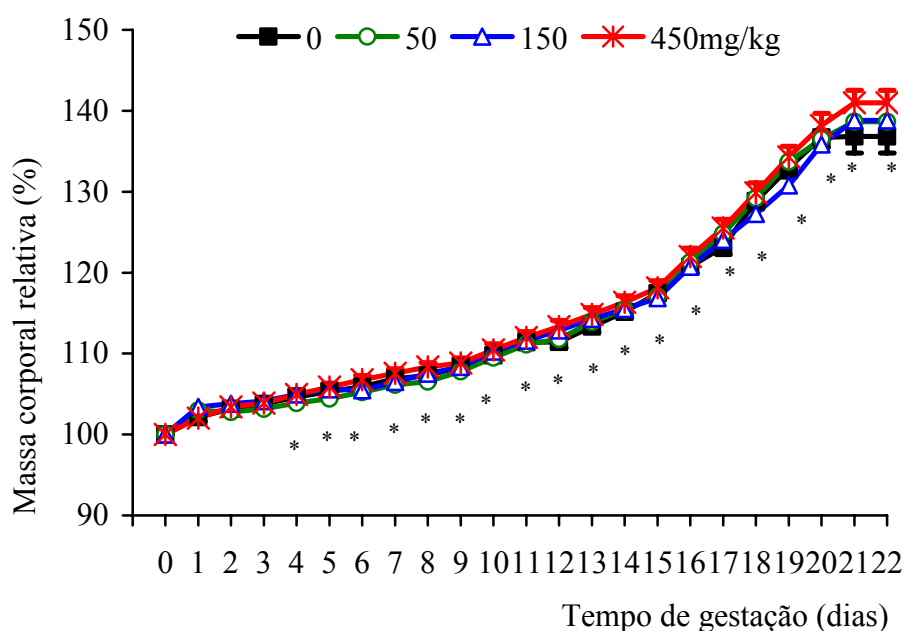
	83,3	80,6	97,2	88,9
--	------	------	------	------

Gestação (%)	76,7	82,8	94,3	84,4
Fertilidade (%)	63,9	66,7	91,7	75,0

Diferença não significativa entre os grupos,
 $P > 0,05$ (qui-quadrado).

5.2.3 Variáveis das progenitoras ao final da gestação

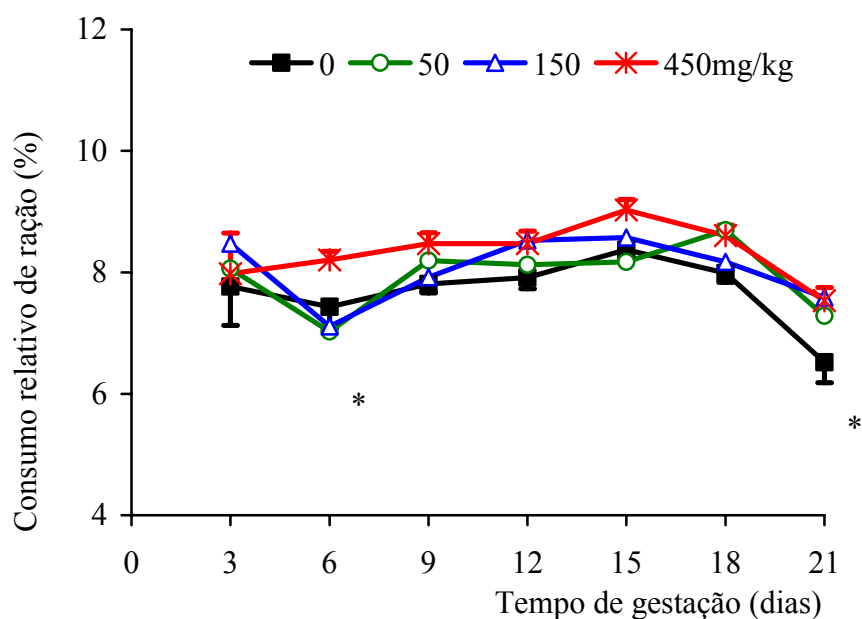
A Figura 16 mostra o desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) durante o período de gestação. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,902$, ANOVA de MR), nem interação entre grupos e dias ($P = 0,678$, ANOVA de MR). Conforme esperado, principalmente durante o período de gestação, ocorreu aumento significativo de massa corporal relativa para todos os grupos ao longo dos dias de tratamento ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).



* Diferença significativa entre os dias 4 ,5 ,6 ,7 ,8 ,9 ,10 ,11 ,12 ,13 ,14 ,15 ,16 ,17 ,18 ,19 ,20 ,21 ,22 e os demais ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 16. Massa corporal relativa (1º dia = 100%) durante a gestação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 23, 24, 30 e 26, respectivamente).

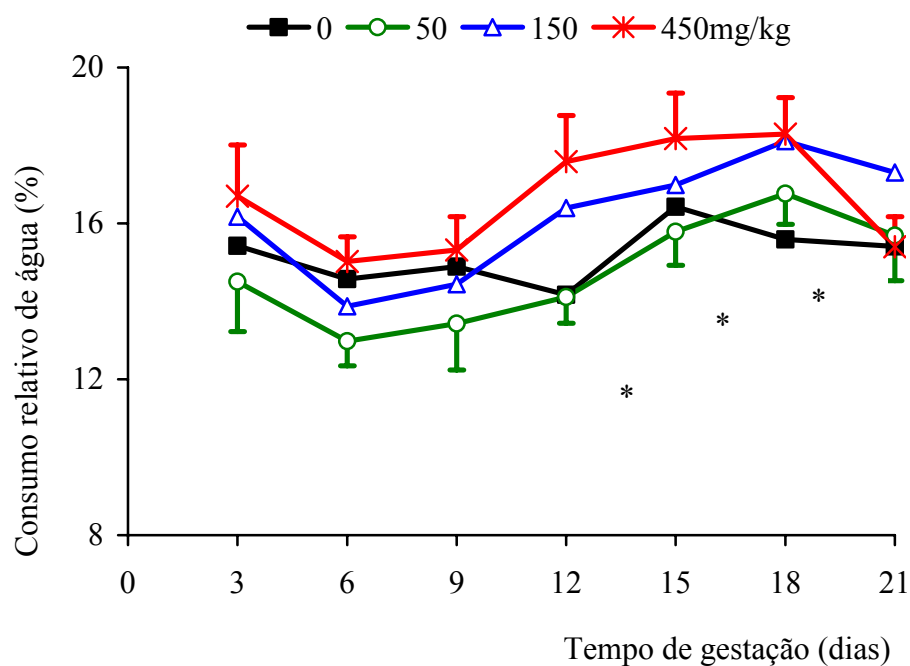
O consumo relativo de ração (Figura 17) durante o período de gestação manifestou diferença significativa entre os grupos de tratamento ($P = 0,048$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni) e entre os dias ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni). Não houve interação entre dias e grupos ($P = 0,630$, ANOVA de MR). O grupo tratado com 450mg/kg de glifosato manifestou um aumento no dia 6, diferenciando-se dos demais grupos. No dia 21, o grupo controle apresentou uma queda de consumo mais acentuada que os demais grupos de tratamento.



* Diferença significativa entre os dias 6, 21 e os demais ($P < 0,001$; ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 17. Consumo relativo de ração (consumo médio de ração em relação à média da massa corporal, a cada de 3 dias) durante a gestação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 23, 24, 30$ e 26 , respectivamente).

O consumo relativo de água (Figura 18) durante o período de gestação não manifestou diferenças entre os grupos ($P = 0,094$, ANOVA de MR) nem interação entre dias e grupos de tratamento ($P = 0,338$, ANOVA de MR). Conforme esperado durante o período de gestação, houve aumento significativo do consumo de água para todos os grupos ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), com uma leve redução pré-parto.



* Diferença significativa entre os dias 12, 15, 18 e os demais
($P < 0,001$; ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 18. Consumo relativo de água (consumo médio de água em relação à média da massa corporal, a cada 3 dias) durante a gestação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 23, 24, 30$ e 26 , respectivamente).

A Tabela 8 mostra os índices reprodutivos das progenitoras (fetos/progenitora, perdas pré e pós-implantação), avaliados no final da gestação. Não houve diferenças significativas entre os grupos ($P = 0,715; 0,192; 0,369$, respectivamente, ANOVA), para nenhum dos índices avaliados.

TABELA 8. Índices reprodutivos das progenitoras tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.

Índices reprodutivos	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Nº de progenitoras	8	9	15	11
Nº de fetos	91	99	156	126
Fetos/progenitora (média \pm epm)	11,4 \pm 0,84	11,0 \pm 0,73	10,4 \pm 0,89	11,5 \pm 0,31
Perdas pré-implantação (%)	10,6	4,0	20,6	8,8
Perdas pós-implantação (%)	0	1,5	3,5	0,8

Diferença não significativa entre os grupos,
 $P > 0,05$ (ANOVA ou qui-quadrado).

A massa relativa dos órgãos (Tabela 9), como adrenais direita e esquerda, baço, coração, fígado, pulmões, rins direito e esquerdo, não apresentou diferenças significativas ($P = 0,230; 0,971; 0,841; 0,295; 0,214; 0,235; 0,406$ e $0,295$, respectivamente, ANOVA).

A massa relativa dos órgãos reprodutivos, como os ovários direito e esquerdo e os ovidutos direito e esquerdo, também não sofreu alterações significativas (Tabela 9) ($P = 0,570; 0,872; 0,140; 0,208$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 9. Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média.

Massa relativa (%)	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Nº de progenitoras	8	9	15	11
Adrenal direita	0,015 \pm 0,001	0,013 \pm 0,001	0,012 \pm 0,006	0,010 \pm 0,001
Adrenal esquerda	0,015 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,013 \pm 0,007	0,012 \pm 0,001
Baço	0,25 \pm 0,017	0,21 \pm 0,012	0,22 \pm 0,009	0,20 \pm 0,020
Coração	0,37 \pm 0,014	0,36 \pm 0,16	0,32 \pm 0,007	0,30 \pm 0,028
Fígado	4,82 \pm 0,09	4,64 \pm 0,12	4,87 \pm 0,13	4,57 \pm 0,44
Pulmões	0,58 \pm 0,03	0,57 \pm 0,03	0,51 \pm 0,02	0,47 \pm 0,045
Rim direito	0,34 \pm 0,017	0,31 \pm 0,014	0,33 \pm 0,010	0,30 \pm 0,028
Rim esquerdo	0,32 \pm 0,017	0,31 \pm 0,009	0,32 \pm 0,010	0,30 \pm 0,028
Ovário direito	0,023 \pm 0,002	0,021 \pm 0,001	0,020 \pm 0,002	0,018 \pm 0,002
Ovário esquerdo	0,022 \pm 0,002	0,017 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001	0,016 \pm 0,002
Oviduto direito	0,004 \pm 0,004	0,005 \pm 0,001	0,005 \pm 0,001	0,006 \pm 0,003
Oviduto esquerdo	0,004 \pm 0,004	0,006 \pm 0,001	0,006 \pm 0,001	0,006 \pm 0,001

Diferença não significativa entre os grupos,

$P > 0,05$ (ANOVA).

5.2.4 Variáveis fetais

A massa corporal e os índices fetais, como vitalidade, proporção de sexos e malformações macroscópicas externas, não manifestaram diferenças significativas entre os grupos, como mostra a Tabela 10 (massa corporal: $P = 0,509$, ANOVA; vitalidade: $P = 0,999$, qui-quadrado; proporção de sexos: $P = 0,993$, qui-quadrado; malformações: $P = 0,291$, qui-quadrado). Em relação à taxa de malformações, somente o grupo exposto à dosagem de 50mg/kg apresentou um feto com anasarca.

TABELA 10. Índices dos fetos das progenitoras tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante o pré-acasalamento, o acasalamento e a gestação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.

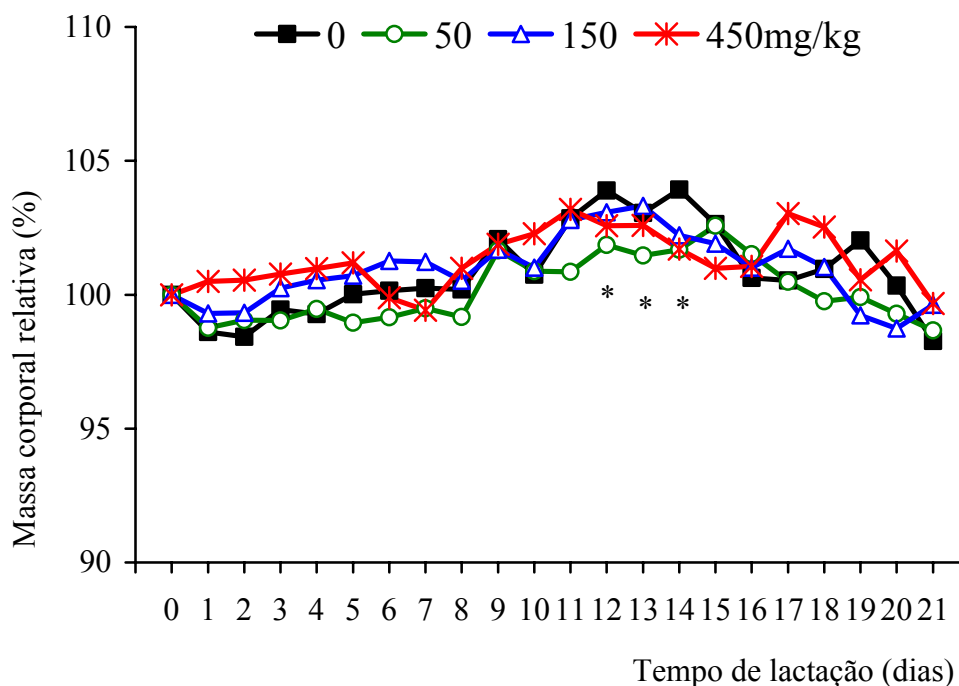
Índices fetais	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Nº de fetos	91	99	156	126
Massa corporal (g)	4,7 \pm 0,03	4,7 \pm 0,04	4,7 \pm 0,05	4,7 \pm 0,03
Taxa de vitalidade (%)	100	99,0	99,4	100
Proporção de sexo (macho:fêmea)	0,9:1	1,2:1	0,9:1	1,2:1
Taxa de malformações (%)	0	1,0	0	0

Diferença não significativa entre os grupos,
 $P > 0,05$ (ANOVA ou qui-quadrado).

5.2.5 Variáveis das progenitoras ao final da lactação

A Figura 19 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante o período de lactação. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,913$, ANOVA de MR), nem interação entre grupos e dias ($P = 0,839$, ANOVA de MR). Conforme observado, ocorreram diferenças significativas na massa corporal relativa para todos os grupos entre os dias 12, 13

e 14 de lactação ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni) mostrando um leve aumento em relação aos demais dias.



* Diferença significativa entre os dias 12, 13, 14 e os demais

($P < 0,001$; ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 19. Massa corporal relativa (1º dia = 100%) durante a lactação das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n = 15/grupo).

Os índices reprodutivos das progenitoras (perdas pós-implantação, filhotes/progenitora, massa corporal dos filhotes, proporção de sexos, taxas de natalidade, viabilidade e desmame), avaliados no final da lactação, não manifestaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 11) ($P = 0,552$;

0,938; 0,352; respectivamente, ANOVA e $P = 0,991; 0,993; 0,999; 0,937$, respectivamente, qui-quadrado).

TABELA 11. Índices das progenitoras tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.

	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Perdas pós-implantação (%)	8,0	1,7	10,0	4,0
Progenitoras	15	15	15	15
Filhotes	160	161	165	162
Filhotes/progenitora	10,7 \pm 0,69	10,8 \pm 0,68	10,3 \pm 0,77	10,8 \pm 0,66
Massa corporal (g)	5,8 \pm 0,04	6,0 \pm 0,04	5,9 \pm 0,04	6,1 \pm 0,04
Proporção de sexo (macho:fêmea)	0,9:1	1:1	1:1	1,3:1
Taxa de natalidade (%)	99,4	99,4	99,4	100
Taxa de viabilidade (%)	99,4	99,4	99,4	98,8
Taxa de desmame (%)	95,0	98,8	97,0	90,7

Diferença não significativa entre os grupos,
 $P > 0,05$ (ANOVA ou qui-quadrado).

A massa relativa dos órgãos (Tabela 12), como adrenais direita e esquerda, baço, bexiga, cérebro, coração, estômago, fígado, pulmões, rins direito e esquerdo, não apresentou diferenças significativas ($P = 0,659; 0,949; 0,130; 0,345; 0,720; 0,637; 0,752; 0,222; 0,083; 0,089; 0,368$, respectivamente, ANOVA).

A massa relativa dos órgãos reprodutivos (Tabela 12), como os ovários direito e esquerdo, os ovidutos direito e esquerdo e o útero, não sofreu alterações significativas ($P = 0,075; 0,181; 0,370; 0,110; 0,239$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 12. Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas tratadas com zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante o pré-acasalamento, o acasalamento, a gestação e a lactação. Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=15/grupo).

Massa relativa (%)	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	50	150	450
Adrenal direita	0,015 ± 0,0010	0,015 ± 0,0007	0,016 ± 0,0005	0,016 ± 0,0006
Adrenal esquerda	0,017 ± 0,0010	0,016 ± 0,0010	0,016 ± 0,0009	0,017 ± 0,0007
Baço	0,23 ± 0,160	0,23 ± 0,008	0,23 ± 0,009	0,23 ± 0,010
Bexiga	0,05 ± 0,0009	0,05 ± 0,0010	0,05 ± 0,0008	0,05 ± 0,009
Cérebro	0,59 ± 0,015	0,71 ± 0,015	0,72 ± 0,015	0,69 ± 0,015
Coração	0,41 ± 0,007	0,43 ± 0,018	0,41 ± 0,009	0,40 ± 0,008
Estômago	0,84 ± 0,009	0,84 ± 0,006	0,63 ± 0,018	0,75 ± 0,010
Fígado	4,76 ± 0,20	4,79 ± 0,14	4,97 ± 0,17	5,35 ± 0,16
Pulmões	0,61 ± 0,019	0,58 ± 0,018	0,59 ± 0,027	0,64 ± 0,018
Rim direito	0,36 ± 0,008	0,39 ± 0,009	0,38 ± 0,012	0,41 ± 0,009
Rim esquerdo	0,36 ± 0,008	0,36 ± 0,007	0,38 ± 0,009	0,39 ± 0,010
Ovário direito	0,016 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,018 ± 0,0009
Ovário esquerdo	0,018 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,015 ± 0,0005
Oviduto direito	0,005 ± 0,0006	0,006 ± 0,0016	0,004 ± 0,0004	0,005 ± 0,0005
Oviduto esquerdo	0,005 ± 0,0005	0,005 ± 0,0004	0,004 ± 0,0002	0,004 ± 0,0003
Útero	0,17 ± 0,012	0,18 ± 0,022	0,15 ± 0,005	0,15 ± 0,005

Diferenças não significativas entre os grupos,
 $P > 0,05$ (ANOVA).

5.3 Discussão

O ensaio de fertilidade e performance reprodutiva revelou sinais de toxicidade sistêmica e reprodutiva somente para os machos tratados com o herbicida. As principais alterações sistêmicas foram aumento na massa relativa de fígado e rins, acompanhado de alterações histopatológicas como degeneração hidrópica e necrose multifocal dos hepatócitos e congestão renal. Os efeitos sobre

o aparelho reprodutivo foram redução na produção diária de espermatozóides, no número de espermatozóides, aumento no percentual de espermatozóides anormais, redução nos níveis séricos de testosterona e alterações histopatológicas testiculares, caracterizadas por congestão dos vasos, degeneração das espermátides e degeneração tubular.

5.3.1 Toxicidade masculina

O ganho relativo de massa corporal dos machos tratados com 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato durante os 70 dias do pré-acasalamento e os 15 dias de acasalamento não sofreu alterações significativas, assim como os consumos de água e ração avaliados durante o pré-acasalamento. Entretanto, sinais de toxicidade sistêmica foram observados neste ensaio, por meio do aumento na massa relativa de fígado e rins, acompanhado de alterações histopatológicas. Não somente sinais de toxicidade sistêmica, mas, principalmente, sinais de toxicidade reprodutiva foram observados mediante decréscimo no número de espermatozóides, na produção diária de espermatozóides e na concentração sérica de testosterona, como também mediante aumento da percentagem de espermatozóides anormais e de degeneração dos túbulos seminíferos.

Em ratos, a toxicidade sistêmica do glifosato técnico foi observada, principalmente nos machos, por aumento na massa relativa do fígado, rins e testículos, em várias concentrações administradas via ração. Também, foi observado o aumento das enzimas fosfatase alcalina e alanina aminotransferase em machos expostos a concentrações maiores ou iguais a 6250mg/kg de glifosato, revelando, portanto, sinais de hepatotoxicidade (WHO, 1994).

Segundo Amann (1982), as principais variáveis de toxicidade masculina são a massa relativa dos testículos, a histologia testicular, o número de espermatozóides e a morfologia espermática. A massa relativa dos órgãos sexuais não foi afetada neste ensaio. Entretanto, a falta deste efeito sobre os órgãos

sexuais não pode negligenciar significativas alterações em outras variáveis que podem ser mais sensíveis (DALSENTER *et al.*, 1999).

Segundo Orth (1982), a produção diária e a maturação dos espermatozóides podem ser criticamente dependentes do número de células de Sertoli presentes nos testículos. Estas células, no rato adulto, não se dividem e constituem uma população fixa.

A atividade funcional das estruturas do trato reprodutivo masculino é controlada pelo nível sérico de testosterona. A espermatogênese nos túbulos seminíferos, a maturação dos espermatozóides nos epidídimos e a atividade secretora das glândulas sexuais acessórias requerem adequados níveis de testosterona (WALLER *et al.*, 1995).

Conforme os resultados descritos, os níveis séricos de testosterona mostraram significativa redução nos animais expostos à maior dosagem. Este fato poderia explicar tanto a redução do número de espermatozóides, da produção diária de espermatozóides, como o aumento na percentagem de espermatozóides anormais. Também, a degeneração tubular poderia explicar a redução dos níveis de testosterona.

Apesar dos efeitos sobre as variáveis reprodutivas masculinas, a fertilidade, avaliada mediante as taxas reprodutivas referentes ao acasalamento, não apresentou redução significativa. Isto se deve a uma característica da espécie em questão que reduções de até 60% na concentração espermática não são capazes de comprometer a fertilidade masculina (AMANN, 1982).

Embora o mecanismo preciso de toxicidade não esteja ainda claro, a exposição masculina ao pesticida glifosato-Roundup[®] induziu uma variedade de anormalidades no trato reprodutivo dos ratos. Os resultados aqui apresentados mostraram um aumento significativo no risco potencial deste pesticida desregular o sistema endócrino masculino.

5.3.2 Toxicidade materna

O ganho relativo de massa corporal e os consumos relativos de água e ração das progenitoras mostraram não haver sinais de toxicidade materna. Também, a massa relativa dos órgãos, tanto sistêmicos quanto reprodutivos, não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados com glifosato em relação ao grupo controle. Os índices reprodutivos avaliados nas fêmeas ao final da gestação, como também aqueles avaliados ao final da lactação, não sofreram qualquer alteração em relação ao grupo controle. Apesar dos machos terem revelado sinais de hepato e nefrotoxicidade, além de sinais específicos de toxicidade reprodutiva, estas variáveis não foram alteradas nas fêmeas tratadas com as mesmas dosagens.

O período de tratamento das fêmeas sacrificadas no final da gestação foi de 37 a 51 dias (dependendo do tempo de acasalamento) e das fêmeas sacrificadas no final da lactação foi de 58 a 79 dias (dependendo do tempo de acasalamento, de gestação e do ciclo estral no pós-desmame). O período de tratamento dos machos foi de 92 dias. Sendo assim, as diferenças quanto aos sinais de toxicidade sistêmica evidenciados nos machos e não nas fêmeas podem se dever a diferenças no período de tratamento. Entretanto, conforme WHO (1994), a redução da massa corporal de ratos expostos via ração é observada em machos em concentrações de 25000mg/kg e em fêmeas somente em concentrações de 50000mg/kg. Também, a redução na massa relativa de fígado e rins foi observada somente nos machos, nas várias concentrações testadas. Estes resultados sugerem uma possível sensibilidade maior dos ratos machos à exposição ao glifosato em relação às fêmeas.

5.3.3 Toxicidade fetal

As progênies avaliadas no final da gestação não sofreram qualquer alteração devido à exposição ao herbicida glifosato Roundup® nas dosagens testadas neste ensaio (dosagens inferiores ao do ensaio de teratogênese referido no item 4). As etapas de pré-implantação, implantação, organogênese e desenvolvimento fetal avaliadas, respectivamente, mediante as taxas de perdas pré e pós-implantação, malformações macroscópicas externas, vitalidade, massa corporal e sexo dos fetos, revelaram que a exposição pré-natal dos progenitores, associada à exposição durante o período gestacional, não influenciaram negativamente as progênies até o momento da cesariana.

Ensaio de teratogênese realizados com doses equivalentes a 300, 1000 e 3500mg/kg de glifosato técnico revelaram sinais de embriofetotoxicidade, caracterizados por aumento da incidência de reabsorções precoces, decréscimo do número total de sítios de implantação e do número de fetos viáveis somente para a maior dose (WHO, 1994). Apesar da maior dosagem utilizada neste ensaio ser 7,7 vezes menor que a dose que manifestou efeitos embriofetotóxicos (WHO, 1994), deve-se atentar para o fato que, neste ensaio, ambos progenitores foram tratados previamente ao acasalamento e que o produto utilizado não foi o glifosato técnico e sim, o produto comercial Roundup®. Também, que a maior dosagem utilizada neste ensaio é 2,2 vezes menor do que a utilizada no ensaio de teratogênese, referido no item 4, em função do caráter crônico do tratamento.

A relevância da avaliação teratogênica em ratos expostos não só durante o período de organogênese, mas oriundos de progenitores machos e fêmeas expostos durante o pré-acasalamento, o acasalamento e toda a gestação, prende-se ao fato de que os gametas podem ter se alterado antes da fertilização e manifestarem efeitos posteriores a esta. Também, mudanças nas concentrações hormonais podem interferir na manutenção e/ou no desenvolvimento gestacional,

afetando diretamente o desenvolvimento sexual ou geral e a viabilidade dos embriões e/ou fetos (KELLY, 1991 e MAcLUSKY & NAFTOLIN, 1981).

6 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO PRÉ E PERINATAL

6.1 Materiais e métodos

6.1.1 Tratamento dos progenitores

As progênes foram expostas, ao glifosato (Roundup[®]) durante toda a gestação (21 a 23 dias) e a lactação (21 dias). Os progenitores são oriundos do ensaio de fertilidade e performance reprodutiva referido anteriormente nos itens 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3 e 5.1.4 e 5.1.5.

6.1.2 Desenvolvimento ponderal até a puberdade

Logo após o nascimento, os filhotes foram identificados individualmente, por meio de marcação permanente com tinta nanquim, via intradérmica, nos coxins plantares (DALLEGRAVE, 1999). A massa corporal (g) dos filhotes foi avaliada individualmente, nos dias: zero, 7, 14 e 21 (quando foram desmamados). Após o desmame, os filhotes foram mantidos em caixas coletivas (por ninhada), e tiveram sua massa corporal avaliada, individualmente, nos dias: 28, 35, 42, 49, 56 e 63. Aos 35 dias, os filhotes foram separados por sexo, ainda mantidos em caixas coletivas (por ninhada).

6.1.3 Desenvolvimento geral e sexual até a puberdade

Foram avaliadas diariamente até a puberdade as características de desenvolvimento geral e sexual dos filhotes como, descolamento das orelhas, surgimento da penugem e dos pêlos, erupção dos dentes incisivos, abertura dos

olhos, descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal (EPA, 1996a).

Testes para avaliação do desenvolvimento comportamental das ninhadas foram realizados desde o nascimento até a puberdade, em dois machos e duas fêmeas de cada ninhada, selecionados aleatoriamente. Os testes incluíram endireitamento em superfície (dia zero), reflexo de preensão nos membros anteriores (3º dia), aversão à altura (9º dia), equilíbrio em roda - *rota rod* (18º dia) e atividade locomotora espontânea (49º dia).

No endireitamento em superfície foi mensurado o tempo em segundos que o animal levou para retornar à estação (decúbito ventral), quando colocado em decúbito dorsal.

O animal foi considerado responsivo (2) ao teste de reflexo de preensão, quando o mesmo encontrava-se suspenso (seguro pela nuca) e foi capaz de agarrar com as duas mãos a barra metálica colocada defronte ao seu queixo; foi considerado parcialmente responsivo (1), quando agarrava a barra com apenas uma das mãos; e foi considerado não responsivo (0), quando não foi capaz de agarrar a barra metálica.

O reflexo de aversão à altura foi considerado bom (2), quando o animal girou 180º ao ser colocado com o focinho e as patas na borda de uma mesa; foi considerado questionável (1), quando o giro não foi completo e/ou quando ele andou para trás; e foi considerado ausente (0), quando não houve reação.

No teste do equilíbrio em roda foi mensurado o tempo (máximo 1min) que o animal permaneceu em equilíbrio sobre um cilindro metálico rotatório (15rpm).

A atividade locomotora espontânea foi avaliada mediante permanência por trinta minutos na caixa que registrava automaticamente o número de vezes que cada animal cruzava qualquer um dos três feixes de luz, interrompido em consequência da locomoção espontânea do mesmo.

Os testes de equilíbrio em roda e da atividade locomotora espontânea foram realizados durante o ciclo escuro (EPA, 1996a).

6.1.4 Sacrifício dos machos na puberdade

A partir do 65° dia de vida, aleatoriamente, foi selecionado um macho de cada uma das ninhadas para ser sacrificado na puberdade (n=15/grupo). A massa corporal foi mensurada, e mediante anestesia com tiopental sódico (50mg/kg), por via intraperitoneal, a pele e parede abdominal foram incisadas, e, mediante exposição da veia cava caudal, procedeu-se à coleta de sangue. Os órgãos sexuais foram removidos, assim como o fígado, rins, adrenais, baço, coração e pulmões. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada macho.

Para avaliação das variáveis relacionadas à toxicidade reprodutiva, o protocolo de sacrifício dos machos púberes da segunda geração seguiu o protocolo de sacrifício dos machos da geração paterna (item 5.1.6), exceto, quanto ao volume de solução de cloreto de sódio 0,9% utilizado na lavagem dos ductos deferentes que foi de 0,5ml e, na quantidade de soro utilizada para medir a concentração de testosterona, que foi de 100µl (dividindo-se o resultado por 2).

6.1.5 Sacrifício das fêmeas na puberdade

A partir do 65º dia de vida, aleatoriamente, foi selecionada uma fêmea de cada uma das ninhadas para ser sacrificada na puberdade (n=15/grupo).

As fêmeas púberes, quando comprovadamente em estro mediante presença de células queratinizadas na citologia vaginal, foram sacrificadas para avaliação de sinais de toxicidade sistêmica e/ou reprodutiva. A massa corporal foi mensurada e, mediante anestesia com tiopental sódico (50mg/kg), por via intraperitoneal, a pele e a parede abdominal foram incisadas, o útero exposto e removido juntamente com os ovários e os ovidutos. Foram removidos, fígado, rins, adrenais, baço, coração e pulmões. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada fêmea.

6.1.6 Comportamento sexual

Foram constituídos, quinze casais, não consangüíneos, dentro de cada um dos grupos experimentais, como também no grupo controle.

Diariamente, durante o ciclo escuro, as fêmeas foram examinadas quanto à fase do ciclo mediante citologia vaginal. As fêmeas em estro foram selecionadas para o acasalamento. Cada macho foi colocado individualmente, por 10min (para reconhecimento do ambiente), em uma caixa de acrílico (50cm³) contendo maravalha limpa e iluminada por uma lâmpada vermelha (15W). Na seqüência, foi colocada a respectiva fêmea e o casal foi filmado durante 30min. Posteriormente, a fêmea foi avaliada quanto à presença de espermatozóides na citologia vaginal e/ou presença do tampão vaginal (evidências de cópula). As fêmeas copuladas foram consideradas gestantes e colocadas em caixas

individuais. O casal em que a fêmea não manifestou evidências de cópula, retornou as caixas de origem e foi permitida mais uma oportunidade, por ocasião do próximo estro da fêmea. Os casais em que a fêmea não permitiu a cópula, por ocasião de dois estros consecutivos, foram descartados da avaliação do comportamento sexual. Entretanto, os casais mantiveram contato nos estros subseqüentes das fêmeas e ambos foram incluídos na avaliação de fertilidade em idade adulta.

6.1.7 Sacrifício dos machos na idade adulta

Uma semana após a cópula, a massa corporal foi mensurada, e mediante anestesia com tiopental sódico (50mg/kg), por via intraperitoneal, a pele e a parede abdominal foram incisadas, e, mediante exposição da veia cava caudal, procedeu-se a coleta de sangue. Os órgãos sexuais foram removidos, assim como fígado, rins, adrenais, baço, coração e pulmões. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada macho.

Para avaliação das variáveis relacionadas à toxicidade reprodutiva, o protocolo de sacrifício dos machos adultos da segunda geração seguiu o protocolo de sacrifício dos machos da geração paterna (item 5.1.6).

6.1.8 Desenvolvimento da progênie até a puberdade

As progenitoras foram mantidas em caixas individuais durante toda a gestação (30 x 15 x 12cm). A massa corporal das fêmeas foi avaliada

semanalmente, durante os períodos de gestação e lactação. As mesmas foram inspecionadas durante todo o período, quanto a sinais de hemorragia, aborto ou possível alteração sistêmica (redução no ganho de massa corporal). Após o parto, as fêmeas foram transferidas para caixas maiores (45 x 30 x 12cm), juntamente com suas ninhadas.

Os filhotes foram verificados individualmente, quanto ao sexo e a presença de malformações. A massa corporal (g) de cada ninhada foi avaliada, nos dias zero, 7, 14 e 21, juntamente com a massa corporal (g) das progenitoras. Também foram avaliadas, neste período, as características de desenvolvimento geral dos filhotes, tais como: descolamento das orelhas, surgimento da penugem e dos pêlos, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos e descida dos testículos.

O desmame foi realizado no 21º dia pós-natal. Após o desmame, os filhotes foram mantidos em caixas coletivas (por ninhada), e tiveram sua massa corporal avaliada, individualmente, nos dias: 28, 35, 42 e 49. Foram ainda avaliados quanto à separação prepucial e à abertura do canal vaginal. Os filhotes da terceira geração foram sacrificados aos 49 dias de idade, em cuba saturada com éter etílico.

6.1.9 Sacrifício das fêmeas na idade adulta

Para avaliação das variáveis relacionadas às toxicidades sistêmica e reprodutiva, o protocolo de sacrifício das fêmeas adultas da segunda geração seguiu o protocolo de sacrifício das fêmeas da geração paterna (item 5.1.10). Sendo assim, o desmame foi realizado no 21º dia de lactação, e o sacrifício no

primeiro estro após este período. Foram removidos fígado, rins, adrenais, baço, coração e pulmões, além dos órgãos sexuais (útero, ovários e ovidutos). A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada fêmea.

6.1.10 Variáveis avaliadas

As variáveis avaliadas nos filhotes até a puberdade foram a massa corporal relativa, a idade no surgimento das características de desenvolvimento geral e sexual, como descolamento das orelhas, surgimento da penugem e dos pêlos, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos, descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal. Também foram avaliadas as características de desenvolvimento comportamental como o tempo de retorno à estação no teste do endireitamento em superfície, a responsividade ao reflexo de preensão nos membros anteriores, o escore da reação de aversão à altura, o tempo de equilíbrio em roda e o número de vezes que o filhote cruzou os feixes de luz no teste da atividade locomotora espontânea.

Nos machos púberes (65 dias) foram avaliados a massa relativa dos órgãos como fígado, rins, adrenais, baço, coração, pulmões, testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata, os índices de fertilidade, que incluíram, a produção diária de espermatozóides, o número de espermatozóides, o tempo de trânsito espermático, o percentual de espermatozóides anormais, o percentual de túbulos com espermatogênese completa, o diâmetro dos túbulos seminíferos e os níveis de plasmáticos de testosterona. Também foi avaliada a histopatologia dos testículos.

Nas fêmeas púberes (65 ± 5) foi avaliada a massa relativa dos órgãos como fígado, rins, adrenais, baço, coração, pulmões, útero, ovários e ovidutos.

Nos machos adultos foram avaliadas as características de comportamento sexual que incluíram o percentual de animais que ejacularam, as latências de monta, intromissão, ejaculação e pós-ejaculação, o número de penetrações por minuto e o número de penetrações até a ejaculação. Após o sacrifício, foram avaliadas as mesmas variáveis referidas anteriormente para os machos à puberdade.

Também foram avaliadas as taxas reprodutivas referentes ao acasalamento conforme as fórmulas referidas no item 5.1.11.

Nas fêmeas adultas foi avaliado o comportamento sexual que incluiu a receptividade ao macho, avaliada mediante comportamento de lordose. Foram considerados os índices: 3 para as fêmeas que manifestavam o comportamento de lordose e mantinham-se paradas durante a investida (monta, intromissão ou ejaculação); 2 para aquelas que manifestavam a lordose, mas moviam-se antes do macho terminar a investida; 1 para as que manifestavam lordose de forma sutil e não permitiam a investida do macho na maioria das tentativas. As progenitoras foram avaliadas, semanalmente, quanto à massa corporal relativa durante as fases de gestação e lactação, a massa relativa dos órgãos e os índices reprodutivos incluindo, perdas pós-implantação, número de filhotes por progenitora, massa corporal da ninhada ao nascimento, proporção de sexos. Todas calculadas conforme referido anteriormente no item 4.1.8. Também foram calculadas as taxas de natalidade, viabilidade e de desmame, conforme referido anteriormente no item 5.1.11.

6.1.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como frequência absoluta ou relativa (porcentagem), média e erro padrão da média, mediana e percentis, conforme variável avaliada.

A análise estatística incluiu os testes: análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de MR), análise de variância de uma via (ANOVA), Kruskal-Wallis e qui-quadrado (ZAR, 1999).

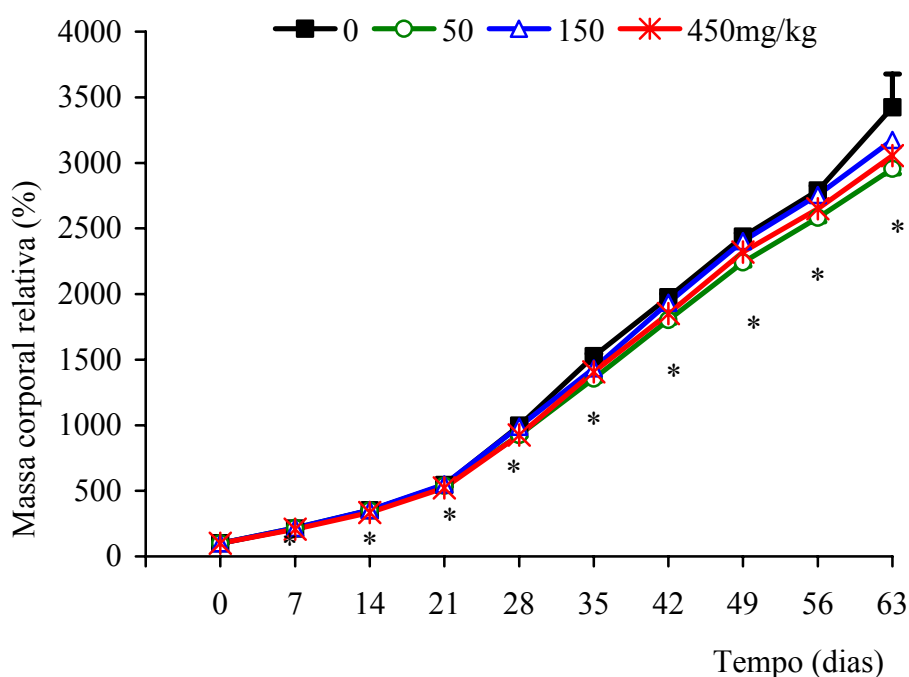
As variáveis quantitativas (que apresentaram distribuição normal), referentes à influência do glifosato em desenvolvimento ponderal, massa relativa dos órgãos das progênes, índices de fertilidade e comportamento geral e sexual foram comparadas por meio da análise de variância de medidas repetidas ou análise de variância, seguida do teste de Bonferroni quando indicado. As variáveis qualitativas, referentes às taxas reprodutivas, características de desenvolvimento e/ou comportamento das progênes foram comparadas por meio dos testes qui-quadrado ou Kruskal-Wallis. Todas as análises foram feitas prevendo um nível de significância $\alpha = 0,05$. No texto foram citados os níveis de significância (P) alcançados em cada teste estatístico realizado.

Os programas utilizados para efetuar a análise estatística foram o SPSS *for Windows* 8.0 e o EXCEL 4.0 (LAPPONI, 1995).

6.2 Resultados

6.2.1 Variáveis de desenvolvimento ponderal até a puberdade

A Figura 20 mostra o desenvolvimento ponderal relativo das progênes (massa corporal do 1º dia = 100%) desde o nascimento até a puberdade. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,349$, ANOVA de MR) apesar do esperado aumento significativo na massa corporal relativa para todos os grupos entre os dias ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni) e da interação entre dias e grupos ($P = 0,002$, ANOVA de MR).



* Diferença significativa entre todos os dias,
($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni).

FIGURA 20. Massa corporal relativa dos filhotes (1º dia = 100%) das progênes expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® durante a gestação e a lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=160, 161, 165 e 162, respectivamente).

6.2.2 Variáveis de desenvolvimento geral e sexual até a puberdade

A Figura 21 mostra a idade no surgimento das características de desenvolvimento geral das progênes expostas ao glifosato-Roundup[®] durante as fases pré e perinatal. A idade (dias) no aparecimento das características como descolamento das orelhas, surgimento da penugem, erupção dos dentes incisivos, surgimento do pêlo e abertura dos olhos, foi semelhante para todos os grupos ($P = 0,076; 0,830; 0,098; 0,532; 0,113$, respectivamente, Kruskal-Wallis).

A idade no surgimento das características de desenvolvimento sexual das progênes expostas ao glifosato-Roundup[®] durante as fases pré e perinatal encontra-se representada na Figura 22. A idade (dias) na descida dos testículos, como também na separação prepucial, não revelaram diferenças significativas entre os grupos ($P = 0,421$ e $0,102$, respectivamente, Kruskal-Wallis). A abertura do canal vaginal ocorreu em período semelhante para todos os grupos ($P = 0,062$, Kruskal-Wallis).

A Figura 23 mostra as características comportamentais avaliadas durante o desenvolvimento das progênes. Não houve diferença entre os grupos nos testes de reflexo de preensão e aversão à altura ($P = 0,061; 0,165$, respectivamente, Kruskal-Wallis), como também no endireitamento em superfície, equilíbrio em roda e atividade locomotora espontânea ($P = 0,054; 0,271$ e $0,081$, respectivamente, ANOVA).

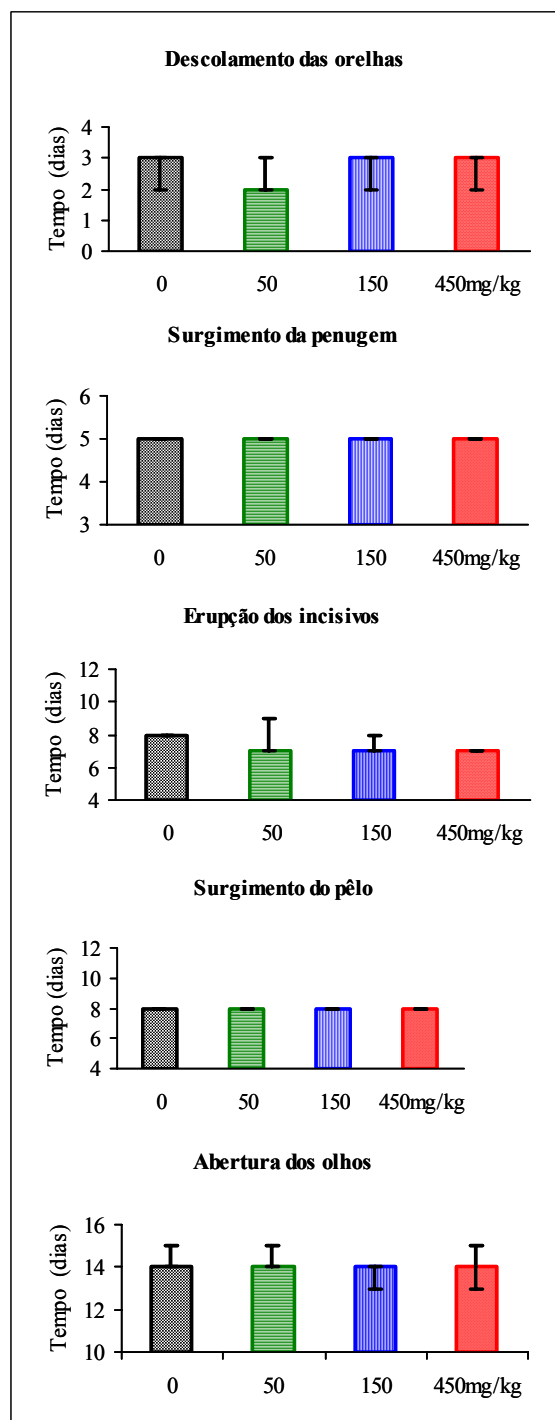


FIGURA 21. Características de desenvolvimento geral dos filhotes das progênes expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante a gestação e a lactação. Dados expressos em mediana \pm percentis (n=160, 161, 165 e 162, respectivamente).

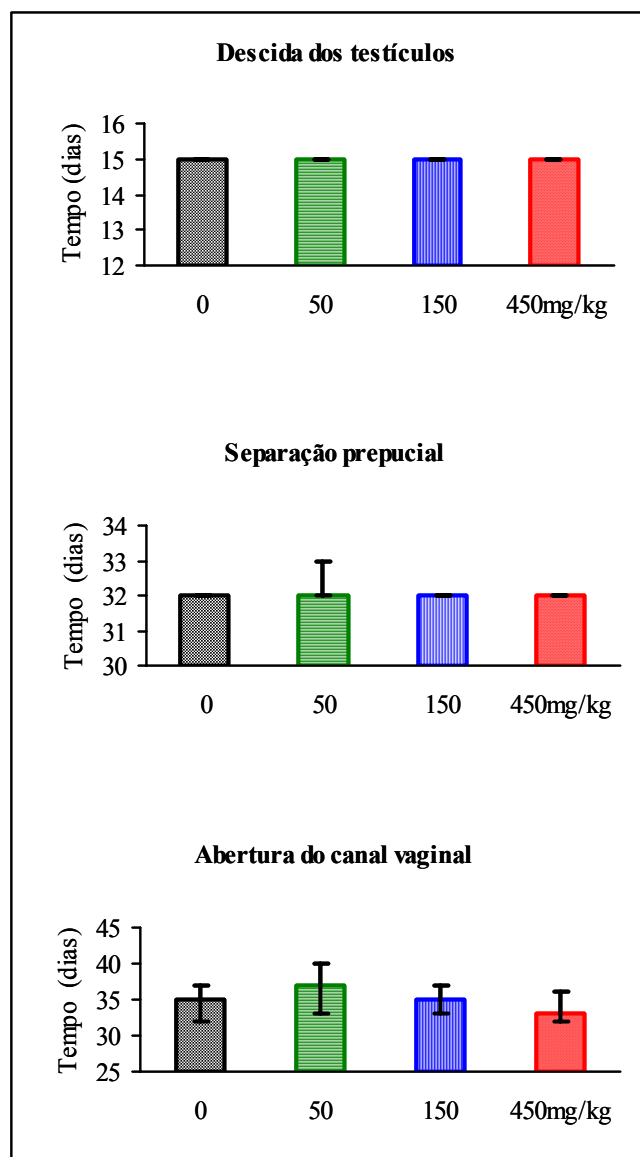


FIGURA 22. Características de desenvolvimento sexual dos filhotes das progênes expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante a gestação e a lactação. Dados expressos em mediana \pm percentis (n=75, 80, 83 e 93 machos e 85, 81, 82 e 69 fêmeas, respectivamente).

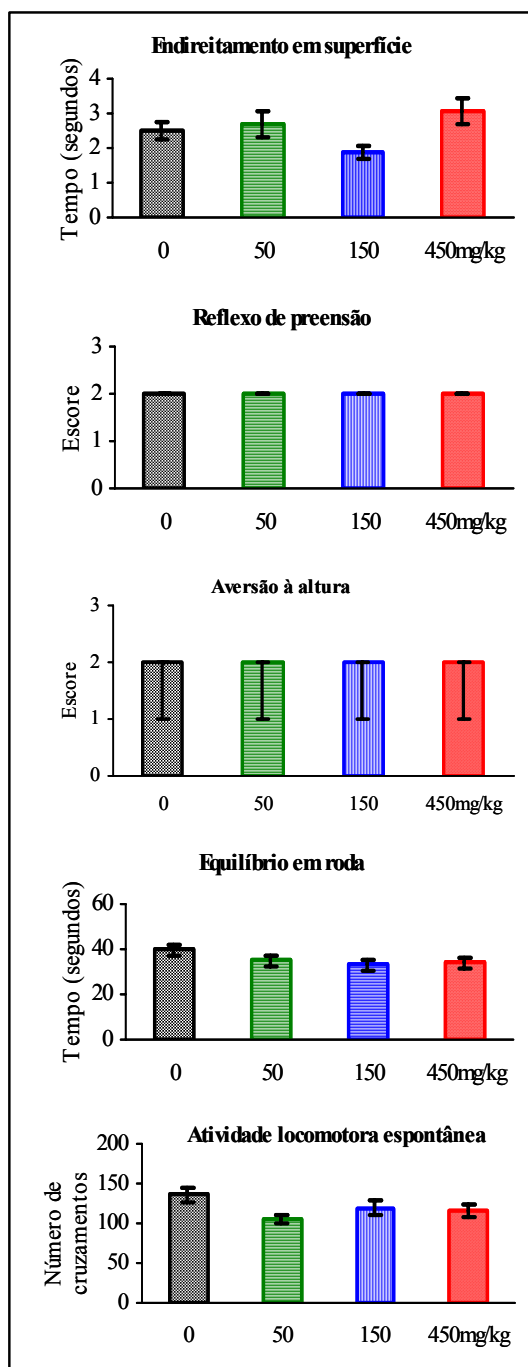


FIGURA 23. Características de desenvolvimento comportamental dos filhotes das progênies expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante a gestação e a lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou mediana \pm percentis (n= 30 machos e 30 fêmeas/grupo).

6.2.3 Variáveis dos machos na puberdade

A Tabela 13 apresenta a massa relativa dos órgãos dos machos na puberdade. Não houve diferença significativa na massa relativa dos órgãos, como adrenais direita e esquerda, baço, coração, fígado, pulmões e rins direito e esquerdo ($P = 0,053; 0,379; 0,116; 0,531; 0,293; 0,056; 0,960$ e $0,955$, respectivamente, ANOVA).

A massa relativa dos órgãos reprodutivos (Tabela 13), como epidídimos direito e esquerdo, próstata, testículos direito e esquerdo, veícula seminal, não sofreu alterações significativas ($P = 0,074; 0,193; 0,129; 0,560; 0,279$ e $0,098$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 13. Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=15/grupo).

Massa relativa (%)	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	50	150	450
Adrenal direita	0,008 ± 0,0005	0,008 ± 0,0001	0,008 ± 0,0001	0,010 ± 0,0002
Adrenal esquerda	0,009 ± 0,0004	0,008 ± 0,0005	0,009 ± 0,0004	0,009 ± 0,0007
Baço	0,27 ± 0,008	0,25 ± 0,007	0,25 ± 0,006	0,30 ± 0,010
Coração	0,38 ± 0,008	0,41 ± 0,033	0,38 ± 0,005	0,38 ± 0,020
Fígado	4,88 ± 0,09	5,01 ± 0,08	4,72 ± 0,08	4,72 ± 0,20
Pulmões	0,53 ± 0,012	0,49 ± 0,017	0,48 ± 0,012	0,56 ± 0,028
Rim direito	0,41 ± 0,008	0,41 ± 0,006	0,40 ± 0,006	0,40 ± 0,018
Rim esquerdo	0,40 ± 0,007	0,39 ± 0,005	0,39 ± 0,006	0,39 ± 0,018
Epidídimo direito	0,14 ± 0,003	0,13 ± 0,003	0,12 ± 0,003	0,14 ± 0,007
Epidídimo esquerdo	0,13 ± 0,006	0,13 ± 0,003	0,12 ± 0,004	0,14 ± 0,007
Próstata	0,09 ± 0,005	0,07 ± 0,004	0,10 ± 0,004	0,09 ± 0,005
Testículo direito	0,57 ± 0,018	0,54 ± 0,010	0,55 ± 0,009	0,57 ± 0,03
Testículo esquerdo	0,56 ± 0,019	0,51 ± 0,033	0,56 ± 0,009	0,56 ± 0,027
Vesícula seminal	0,17 ± 0,010	0,15 ± 0,007	0,15 ± 0,007	0,18 ± 0,013

Diferença não significativa entre os grupos, $P > 0,05$ (ANOVA).

Apesar de não ter havido alteração na massa relativa dos órgãos reprodutivos, a análise histopatológica testicular (Figura 24) revelou sinais de toxicidade reprodutiva caracterizados por decréscimo no número de espermatídes alongadas e presença de vacuolização das espermatídes dos machos expostos a 150 (com incidência de 4/5 animais) e 450mg/kg de glifosato-Roundup® (com incidência de 4/5 animais).

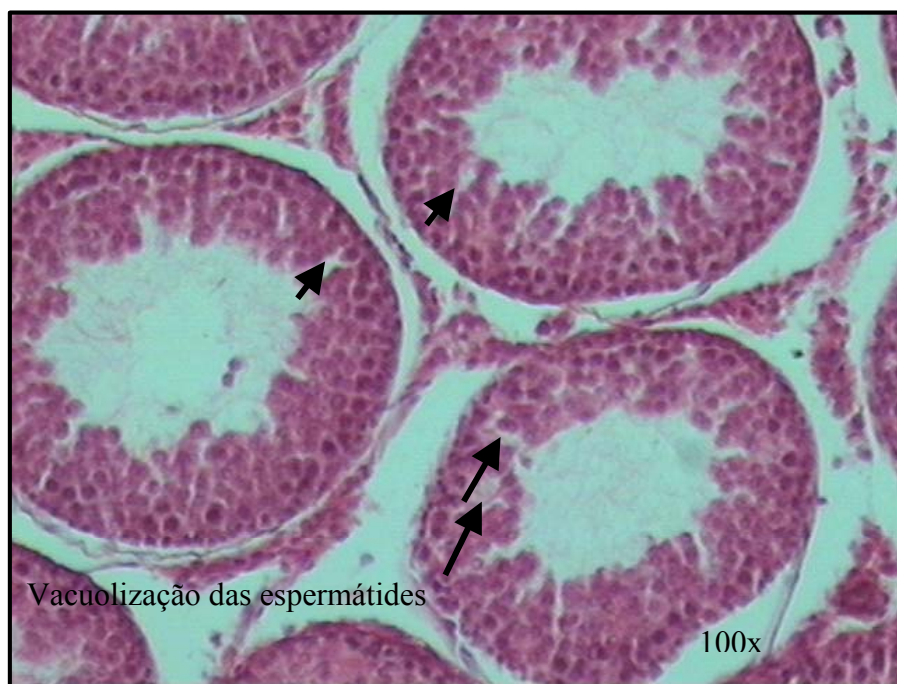


FIGURA 24. Alteração histopatológica de testículo de macho púbere exposto a 150mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação. As setas apontam a alteração histológica citada no aumento registrado (100x)

Os índices de fertilidade apresentados na Tabela 14 mostram que houve um aumento significativo no percentual de espermatozoides anormais que, atingiu significância estatística, somente nos animais expostos a 50mg/kg de glifosato-Roundup[®] ($P < 0,001$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). As outras variáveis mensuradas como produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides, tempo de trânsito espermático, percentual de túbulos com espermatogênese completa e diâmetro tubular não sofreram alterações estatisticamente significativas ($P = 0,741$; 0,157; 0,499; 0,963 e 0,915, ANOVA ou qui-quadrado). Apesar da redução dos níveis séricos de testosterona, a diferença entre os grupos não atingiu significância estatística ($P = 0,051$, ANOVA).

TABELA 14. Índices de fertilidade dos machos púberes expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®]. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual (^a n=15/grupo ou ^b n=5/grupo).

	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Produção diária de espermatozoides ($\times 10^6$) ^a	11,1 \pm 0,7	12,2 \pm 0,7	12,1 \pm 1,0	11,7 \pm 0,5
Número de espermatozoides ($\times 10^6$) ^a	44,2 \pm 4,2	53,9 \pm 7,1	67,2 \pm 11,2	57,4 \pm 6,7
Tempo de trânsito espermático (dias) ^a	4,1 \pm 0,4	4,6 \pm 0,7	5,3 \pm 0,6	5,1 \pm 0,7
Espermatozoides anormais (%) ^a	8,6 \pm 0,9	16,7 \pm 1,9*	9,2 \pm 0,8	11,6 \pm 1,3
Túbulos com espermatogênese incompleta (%) ^b	84,0 \pm 3,4	77,0 \pm 2,9	78,7 \pm 3,5	75,0 \pm 2,1
Diâmetro tubular (μm) ^b	166,7 \pm 0,4	159,6 \pm 0,4	159,6 \pm 0,7	160,4 \pm 0,1
Testosterona sérica (ng/ml) ^a	5,2 \pm 1,2	4,0 \pm 1,0	3,2 \pm 1,1	1,5 \pm 0,2

* Diferença significativa entre os grupos, $P < 0.05$ (qui-quadrado ou ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

6.2.4 Variáveis das fêmeas na puberdade

A Tabela 15 apresenta a massa relativa dos órgãos das fêmeas na puberdade. Não houve diferença significativa na massa relativa dos órgãos, como adrenais direita e esquerda, baço, coração, fígado, pulmões, rins direito e esquerdo ($P = 0,333; 0,756; 0,126; 0,187; 0,215; 0,732; 0,135$ e $0,104$, respectivamente, ANOVA).

A massa relativa dos órgãos reprodutivos (Tabela 14), como ovários direito e esquerdo, ovidutos direito e esquerdo, e útero, não sofreu alterações significativas ($P = 0,134; 0,152; 0,178; 0,064$ e $0,368$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 15. Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=15/grupo).

Massa relativa (%)	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	50	150	450
Adrenal direita	0,022 ± 0,006	0,014 ± 0,0008	0,018 ± 0,003	0,015 ± 0,0006
Adrenal esquerda	0,016 ± 0,001	0,014 ± 0,0008	0,015 ± 0,002	0,016 ± 0,0007
Baço	0,29 ± 0,009	0,26 ± 0,013	0,31 ± 0,05	0,32 ± 0,012
Coração	0,42 ± 0,012	0,39 ± 0,007	0,42 ± 0,05	0,40 ± 0,008
Fígado	5,07 ± 0,24	4,80 ± 0,27	4,82 ± 0,49	4,65 ± 0,29
Pulmões	0,60 ± 0,06	0,54 ± 0,016	0,53 ± 0,08	0,62 ± 0,04
Rim direito	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,40 ± 0,01
Rim esquerdo	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,01
Ovário direito	0,017 ± 0,0007	0,016 ± 0,0006	0,019 ± 0,003	0,019 ± 0,001
Ovário esquerdo	0,017 ± 0,0009	0,016 ± 0,009	0,017 ± 0,0010	0,019 ± 0,001
Oviduto direito	0,008 ± 0,0002	0,005 ± 0,0004	0,007 ± 0,0010	0,007 ± 0,0003
Oviduto esquerdo	0,007 ± 0,0004	0,006 ± 0,0004	0,007 ± 0,0010	0,007 ± 0,0004
Útero	0,25 ± 0,033	0,20 ± 0,010	0,21 ± 0,020	0,21 ± 0,011

Diferença não significativa entre os grupos, $P > 0,05$ (ANOVA).

6.2.5 Variáveis dos machos na idade adulta

A Tabela 16 mostra a massa relativa dos órgãos sistêmicos dos machos na idade adulta. Não houve diferenças significativas entre os grupos na massa relativa dos órgãos, como adrenais direita e esquerda, baço, coração, fígado, pulmões, rins direito e esquerdo. ($P = 0,178; 0,118; 0,477; 0,441; 0,857; 0,387; 0,101$ e $0,178$, respectivamente, ANOVA).

A massa relativa dos órgãos reprodutivos (Tabela 16), como epidídimos direito e esquerdo, próstata, testículos direito e esquerdo, vesícula seminal, não sofreu alterações significativas ($P = 0,085; 0,747; 0,675; 0,768; 0,764$ e $0,799$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 16. Massa relativa dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos adultos expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=15/grupo).

Massa relativa (%)	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	50	150	450
Adrenal direita	0,008 \pm 0,0003	0,006 \pm 0,0003	0,007 \pm 0,0006	0,007 \pm 0,0005
Adrenal esquerda	0,007 \pm 0,0005	0,007 \pm 0,0004	0,007 \pm 0,0005	0,007 \pm 0,0006
Baço	0,19 \pm 0,005	0,16 \pm 0,005	0,19 \pm 0,006	0,19 \pm 0,008
Coração	0,31 \pm 0,004	0,31 \pm 0,006	0,33 \pm 0,009	0,31 \pm 0,008
Fígado	4,14 \pm 0,11	3,91 \pm 0,11	4,12 \pm 0,13	3,91 \pm 0,13
Pulmões	0,49 \pm 0,015	0,48 \pm 0,014	0,49 \pm 0,031	0,45 \pm 0,029
Rim direito	0,35 \pm 0,010	0,33 \pm 0,005	0,35 \pm 0,006	0,34 \pm 0,010
Rim esquerdo	0,34 \pm 0,09	0,33 \pm 0,006	0,35 \pm 0,005	0,33 \pm 0,010
Epidídimo direito	0,16 \pm 0,005	0,16 \pm 0,004	0,17 \pm 0,002	0,16 \pm 0,005
Epidídimo esquerdo	0,16 \pm 0,005	0,17 \pm 0,005	0,17 \pm 0,006	0,16 \pm 0,006
Próstata	0,13 \pm 0,008	0,13 \pm 0,008	0,14 \pm 0,008	0,15 \pm 0,011
Testículo direito	0,38 \pm 0,011	0,40 \pm 0,012	0,40 \pm 0,009	0,36 \pm 0,012
Testículo esquerdo	0,38 \pm 0,012	0,41 \pm 0,011	0,41 \pm 0,011	0,37 \pm 0,008
Vesícula seminal	0,20 \pm 0,008	0,22 \pm 0,014	0,21 \pm 0,012	0,23 \pm 0,011

Diferença não significativa entre os grupos, $P > 0,05$ (ANOVA).

Apesar de não ter havido alteração na massa relativa dos órgãos reprodutivos, a análise histopatológica testicular (Figura 25) revelou sinais de toxicidade reprodutiva caracterizados por intensa degeneração celular conduzindo a ausência de lúmen tubular dos machos expostos a 50, 150 e 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] (com incidência de 3/5; 3/5 e 4/5 animais, respectivamente).



FIGURA 25. Alteração histopatológica de testículo de macho adulto exposto a 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. As setas apontam a alteração histológica citada no aumento indicado (100x).

Os índices de fertilidade apresentados na Tabela 17 mostram alterações significativas na produção diária de espermatozóides e no número de espermatozóides, ambas atingindo significância estatística somente nos animais expostos a 50 e 450mg/kg de glifosato-Roundup® ($P = 0,014$ e $0,004$, respectivamente, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). Outras variáveis mensuradas, como tempo de trânsito espermático, percentual de túbulos com espermatogênese completa, diâmetro tubular e níveis séricos de testosterona, não sofreram alterações estatisticamente significativas ($P = 0,722$; $0,471$; $0,522$ e $0,075$, respectivamente, ANOVA ou qui-quadrado). Apesar de mostrar aumento, as diferenças no percentual de espermatozóides anormais entre os grupos não atingiu significância estatística ($P = 0,066$, ANOVA).

TABELA 17. Índices de fertilidade dos machos adultos expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual (^a n=15/grupo ou ^b n=5/grupo).

	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	50	150	450
Produção diária de espermatozóides ($\times 10^6$) ^a	20,5 \pm 1,7	15,3 \pm 1,1*	19,7 \pm 1,9	14,7 \pm 1,0*
Número de espermatozóides ($\times 10^6$) ^a	344,7 \pm 30,8	251,0 \pm 18,7*	368,7 \pm 36,0	257,1 \pm 17,9*
Tempo de trânsito espermático (dias)	17,7 \pm 1,5	17,5 \pm 1,8	20,2 \pm 2,2	18,5 \pm 2,0
Espermatozóides anormais (%) ^a	5,4 \pm 0,5	8,3 \pm 1,1	8,4 \pm 1,0	7,7 \pm 0,7
Túbulos com espermatogênese completa (%) ^b	92,0 \pm 1,2	73,5 \pm 2,8	74,5 \pm 1,9	65,0 \pm 3,7
Diâmetro tubular (μm) ^b	180,8 \pm 0,3	187,3 \pm 1,2	173,4 \pm 0,3	185,1 \pm 0,4
Testosterona sérica (ng/ml) ^a	3,9 \pm 0,8	3,4 \pm 0,4	6,3 \pm 1,0	3,3 \pm 1,3

* Diferença significativa entre os grupos, $P < 0,05$ (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

A Figura 26 mostra as características de comportamento sexual masculinas (A, B, C, D e E) e femininas (F) avaliadas durante o acasalamento.

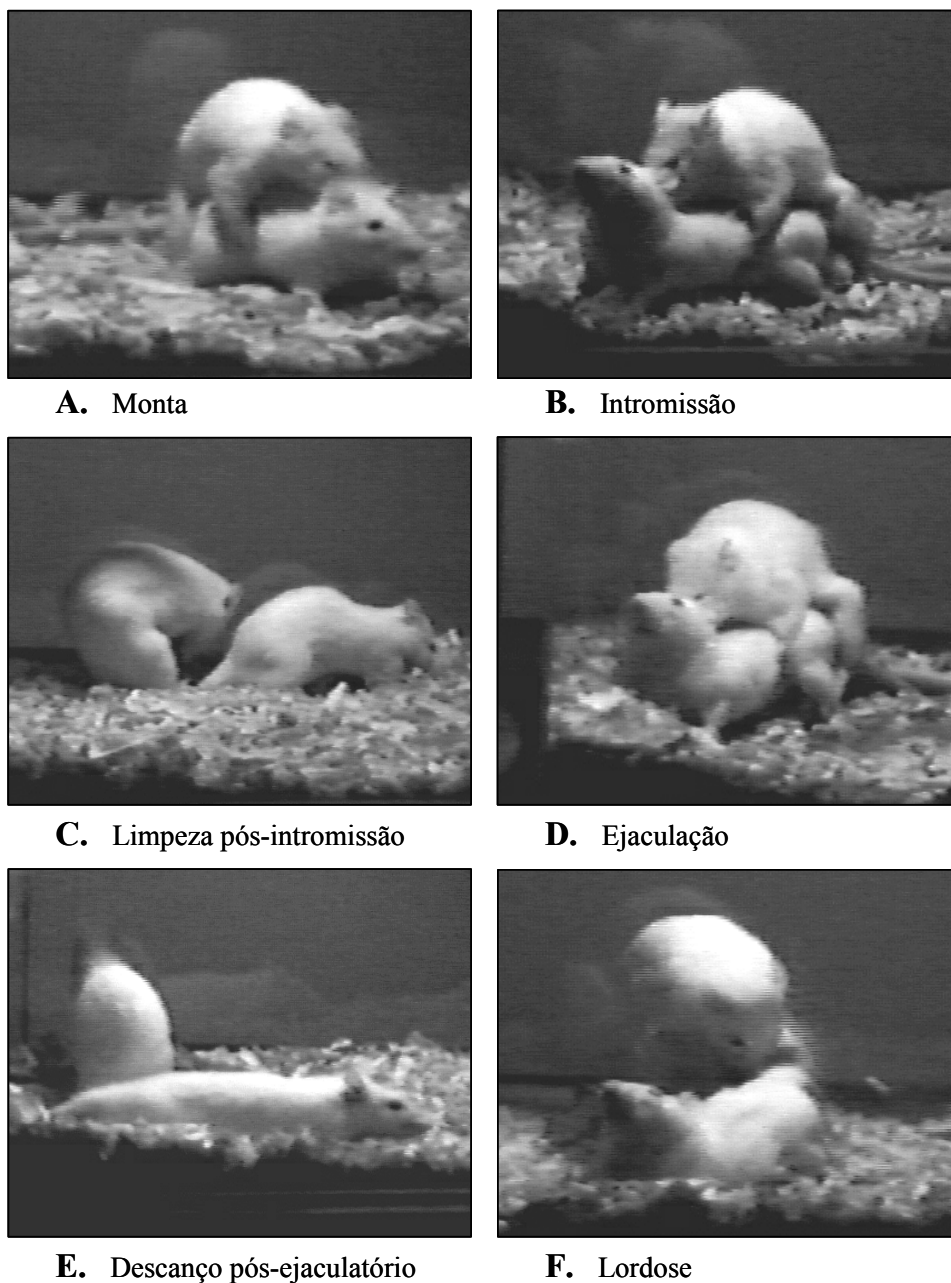


FIGURA 26. Características de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] avaliadas durante a primeira experiência sexual (n=12, 12, 11 e 11 casais/grupo, respectivamente).

A Tabela 18 mostra os resultados do estudo de comportamento sexual dos machos na idade adulta. Como pode-se observar não houve diferença significativa entre os grupos expostos pré e perinatalmente ao glifosato-Roundup[®] nas características de comportamento sexual masculinas frente à primeira experiência sexual. A exceção, da latência pós-ejaculação, que foi menor no grupo exposto à 450mg/kg em relação ao grupo exposto à 150mg/kg ($P = 0,042$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). Entretanto, não foi significativamente diferente dos animais do grupo controle, representando uma variabilidade entre os grupos, e não, um efeito da exposição ao herbicida. O percentual de animais que ejacularam, as latências de monta, intromissão e pós-ejaculação, não foram afetados pelos tratamentos ($P = 0,922$; $0,063$; $0,240$ e $0,835$, respectivamente, qui-quadrado ou ANOVA). Também, o número de intromissões por minuto e o número de intromissões até a ejaculação não foram afetados pela exposição ao herbicida ($P = 0,467$ e $0,143$, respectivamente, ANOVA). A latência de ejaculação foi significativamente maior no grupo exposto a dosagem de 150mg/kg em relação ao exposto a 50mg/kg de glifosato ($P = 0,042$, ANOVA, seguida do teste de Bonferroni). Entretanto, ambos grupos não foram significativamente diferentes do grupo controle.

TABELA 18. Características de comportamento sexual dos machos adultos expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®]. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.

	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
n° de animais investigados	12	12	11	11
Animais que ejacularam (%)	100	75	90,9	81,8
Latência de monta (min)	4,9 \pm 2,6	12,3 \pm 2,3	6,5 \pm 1,9	4,63 \pm 1,4
Latência de intromissão (min)	1,9 \pm 0,5	4,0 \pm 1,6	5,8 \pm 1,5	4,4 \pm 1,6
Latência de ejaculação (min)	15,8 \pm 1,5	14,0 \pm 2,4	16,6 \pm 1,8*	15,4 \pm 2,2
Latência de pós-ejaculação (min)	4,8 \pm 0,2	5,1 \pm 0,2	5,5 \pm 0,5	3,9 \pm 0,4*
n° de intromissões (min)	1,18 \pm 0,11	0,94 \pm 0,17	0,90 \pm 0,12	0,96 \pm 0,14
n° de intromissões até a ejaculação	17,0 \pm 2,6	22,2 \pm 3,2	14,2 \pm 1,6	14,3 \pm 2,3

* Diferença significativa entre os grupos (150 > 50mg/kg), $P < 0.05$ (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

A Tabela 19 mostra as taxas reprodutivas referentes ao acasalamento entre machos e fêmeas expostos ao glifosato-Roundup[®] durante as fases pré e perinatal. Como pode-se observar, as taxas reprodutivas não foram afetadas pela exposição prévia, apesar dos índices de fertilidade dos machos, como a produção diária de espermatozóides e o número de espermatozóides, terem sido significativamente afetados (Tabela 17). O comportamento sexual destes machos, durante a primeira experiência sexual, não foi afetado (Tabela 18).

TABELA 19. Taxas reprodutivas dos machos e fêmeas expostos a zero, 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. Dados expressos em percentual (n= 15 casais/grupo, respectivamente).

Taxas	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Acasalamento (%)	86,7	80,0	93,3	86,7
Gestação (%)	92,3	100	100	100
Fertilidade (%)	80,0	80,0	93,3	86,7

Diferença não significativa entre os grupos, $P > 0,05$ (qui-quadrado).

6.2.6 Variáveis das fêmeas na idade adulta

A Figura 27 mostra os resultados do estudo de comportamento sexual das fêmeas na idade adulta. Como pode-se observar não houve diferença significativa entre os grupos ($P = 0,640$, Kruskal-Wallis), expostos pré e perinatalmente ao glifosato-Roundup[®], no índice de lordose (principal característica de comportamento sexual feminina), frente à primeira experiência sexual.

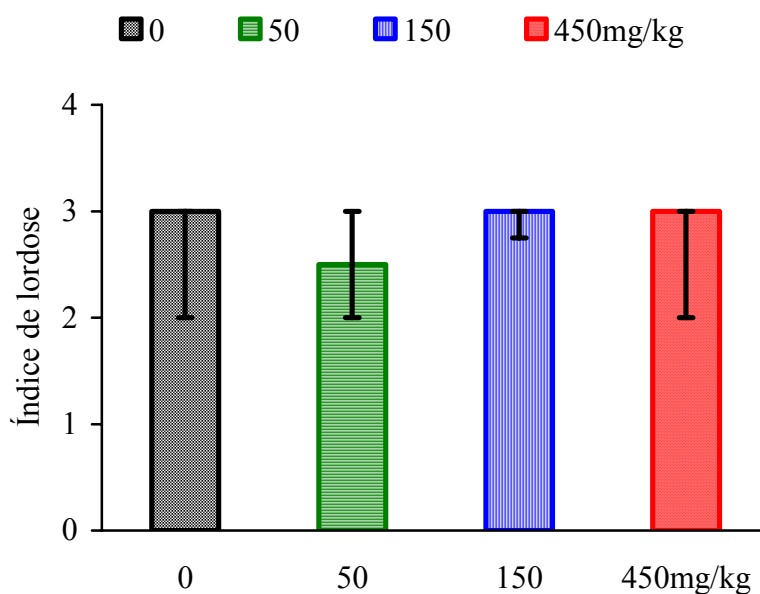
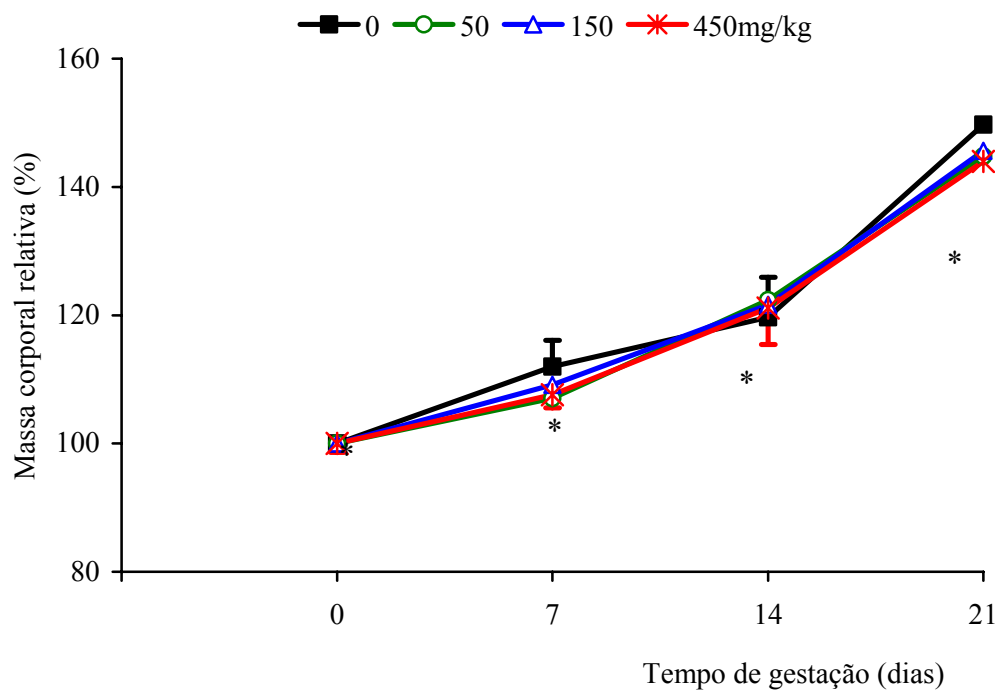


FIGURA 27. Característica de comportamento sexual das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®]. Dados expressos em mediana \pm percentis (n=12, 12, 11 e 11, respectivamente).

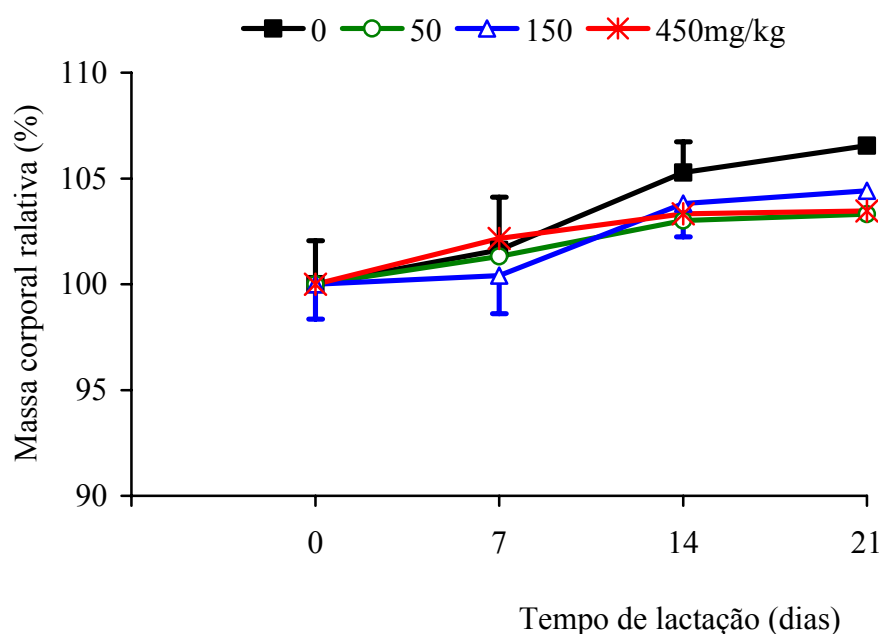
A Figura 28 mostra o desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) durante o período de gestação. Não ocorreram diferenças entre os grupos de tratamento ($P = 0,960$, ANOVA de MR). Apesar do aumento significativo na massa corporal relativa para todos os grupos entre os dias ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni), não houve interação entre grupos e dias ($P = 0,994$, ANOVA de MR).



* Diferença significativa entre todos os dias,
($P < 0,001$; ANOVA de MR, Bonferroni).

FIGURA 28. Massa corporal relativa durante a gestação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n= 11, 12, 14 e 13, respectivamente).

A Figura 29 mostra o desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) durante o período de lactação. Como pode-se observar não ocorreram diferenças significativas na massa corporal relativa entre os grupos de tratamento ($P = 0,862$, ANOVA de MR), entre os dias ($P = 0,064$, ANOVA de MR), como também não houve interação entre grupos e dias ($P = 0,564$, ANOVA de MR).



Diferença não significativa entre os grupos,
($P > 0,05$, ANOVA de MR)

FIGURA 29. Massa corporal relativa durante a lactação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup® via útero e lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n= 11, 12, 14 e 13, respectivamente).

A Tabela 20 apresenta a massa relativa dos órgãos das fêmeas na idade adulta. Não houve diferença significativa na massa relativa dos órgãos, como adrenais direita e esquerda, baço, coração, fígado, pulmões, rins direito e esquerdo ($P = 0,892; 0,576; 0,480; 0,147; 0,645; 0,917; 0,578$ e $0,512$, respectivamente, ANOVA).

A massa relativa dos órgãos reprodutivos (Tabela 20), como ovários direito e esquerdo, ovidutos direito e esquerdo e útero, não sofreu alterações significativas ($P = 0,478; 0,499; 0,328; 0,598$ e $0,642$, respectivamente, ANOVA).

TABELA 20. Massa relativa dos órgãos (massa do órgão em relação à massa corporal) das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup®. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n= 11, 12, 14 e 13, respectivamente).

Massa relativa (%)	Glifosato-Roundup® (mg/kg)			
	0	50	150	450
Adrenal direita	0,013 \pm 0,0010	0,014 \pm 0,0010	0,014 \pm 0,0009	0,014 \pm 0,0006
Adrenal esquerda	0,015 \pm 0,0009	0,016 \pm 0,0009	0,016 \pm 0,0009	0,017 \pm 0,0011
Baço	0,24 \pm 0,010	0,22 \pm 0,010	0,23 \pm 0,0076	0,27 \pm 0,017
Coração	0,43 \pm 0,012	0,43 \pm 0,010	0,40 \pm 0,0055	0,43 \pm 0,010
Pulmões	0,58 \pm 0,030	0,60 \pm 0,040	0,58 \pm 0,020	0,61 \pm 0,038
Fígado	5,14 \pm 0,22	5,26 \pm 0,29	5,24 \pm 0,17	5,09 \pm 0,25
Rim direito	0,39 \pm 0,014	0,37 \pm 0,009	0,39 \pm 0,007	0,38 \pm 0,010
Rim esquerdo	0,38 \pm 0,014	0,37 \pm 0,009	0,38 \pm 0,008	0,37 \pm 0,009
Ovário direito	0,021 \pm 0,0010	0,019 \pm 0,0010	0,019 \pm 0,0005	0,020 \pm 0,0013
Ovário esquerdo	0,018 \pm 0,0011	0,019 \pm 0,0011	0,018 \pm 0,0008	0,022 \pm 0,0036
Oviduto direito	0,009 \pm 0,0029	0,006 \pm 0,0004	0,005 \pm 0,0004	0,006 \pm 0,0006
Oviduto esquerdo	0,007 \pm 0,0003	0,006 \pm 0,0005	0,005 \pm 0,0004	0,006 \pm 0,0004
Útero	0,20 \pm 0,015	0,17 \pm 0,009	0,19 \pm 0,016	0,19 \pm 0,024

Diferença não significativa entre os grupos,
 $P > 0,05$ (ANOVA).

Os índices reprodutivos das progenitoras, apresentados na Tabela 21, foram avaliados no final da lactação. Número de filhotes/progenitora, massa corporal dos filhotes, perdas pós-implantação, proporção de sexos, taxas de natalidade, viabilidade e desmame, não manifestaram diferenças significativas entre os grupos ($P = 0,561$ e $0,180$, respectivamente, ANOVA e $P = 0,980$; $0,991$; $0,993$; $0,999$; $0,937$, respectivamente, qui-quadrado).

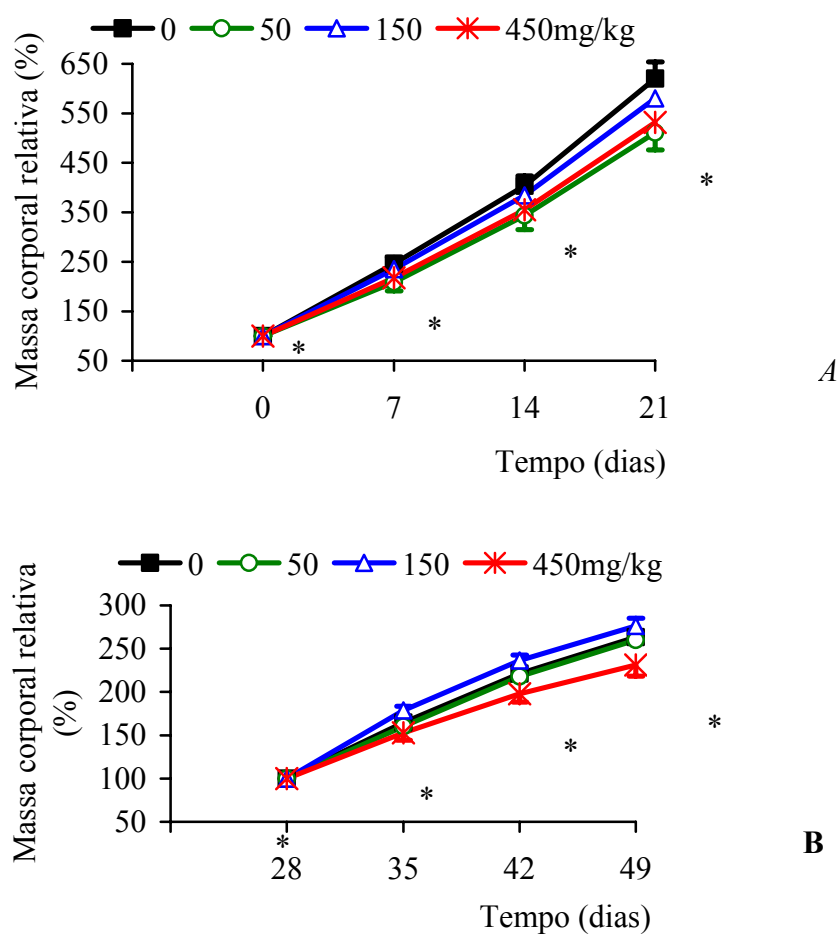
TABELA 21. Índices das progenitoras expostas via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média ou percentual.

	Glifosato-Roundup [®] (mg/kg)			
	0	50	150	450
Perdas pós-implantação (%)	2,6	1,6	5,0	6,4
Progenitoras	11	12	14	13
Filhotes	111	124	134	117
Filhotes/progenitora	10,1 \pm 0,6	10,3 \pm 0,7	9,6 \pm 0,6	9,0 \pm 0,9
Massa corporal (g)	6,1 \pm 0,33	6,3 \pm 0,31	6,2 \pm 0,21	6,7 \pm 0,21
Proporção de sexo (macho:fêmea)	1,02:1	1,03:1	0,7:1	1,4:1
Taxa de natalidade (%)	100	100	100	100
Taxa de viabilidade (%)	99,1	99,2	99,3	99,1
Taxa de desmame (%)	100	100	100	100

Diferença não significativa entre os grupos,
 $P > 0,05$ (ANOVA ou qui-quadrado).

6.2.7 Variáveis das progênes

O desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) dos filhotes de progenitores expostos via útero e lactação a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®], encontra-se representado na Figura 30 A e B.



Diferença significativa entre todos os dias,
($P < 0,001$; ANOVA de MR, Bonferroni).

FIGURA 30. Massa corporal relativa das ninhadas do nascimento (1º dia = 100%) ao desmame (A) e dos filhotes do desmame (1º dia = 100%) à puberdade (B) de progenitores expostos a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n= 11, 12, 14 e 13 ninhadas e 111, 124, 134 e 117 filhotes, respectivamente).

A Figura 30 A representa o desenvolvimento ponderal relativo das ninhadas desde o nascimento até o desmame e a Figura 30 B representa o desenvolvimento ponderal relativo individual do desmame até a puberdade (massa corporal no desmame = 100%).

Conforme esperado, houve aumento significativo da massa corporal relativa para todos os grupos entre os dias, nos dois períodos ($P < 0,001$, ANOVA de MR, seguida do teste de Bonferroni). Entretanto, não ocorreram diferenças significativas entre os grupos de tratamento ($P = 0,512$ (A) e $0,213$ (B); ANOVA de MR), nem interação entre grupos e dias ($P = 0,772$ (A) e $0,119$ (B); ANOVA de MR).

A Figura 31 mostra a idade no surgimento das características de desenvolvimento geral dos filhotes de progenitores expostos ao glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. A idade (dias) no aparecimento das características, como descolamento das orelhas, surgimento da penugem, erupção dos dentes incisivos, surgimento do pêlo e abertura dos olhos, foi semelhante para todos os grupos ($P = 0,063$; $1,0$; $0,055$; $1,0$; $0,102$, respectivamente, Kruskal-Wallis).

A idade no surgimento das características de desenvolvimento sexual dos filhotes de progenitores expostos ao glifosato-Roundup[®] via útero e lactação, encontra-se representada na Figura 32. A idade (dias) na descida dos testículos, como também na separação prepucial, não revelou diferenças significativas entre os grupos ($P = 0,421$ e $0,350$, respectivamente, Kruskal-Wallis). A abertura do canal vaginal ocorreu em período semelhante para todos os grupos ($P = 0,071$, Kruskal-Wallis).

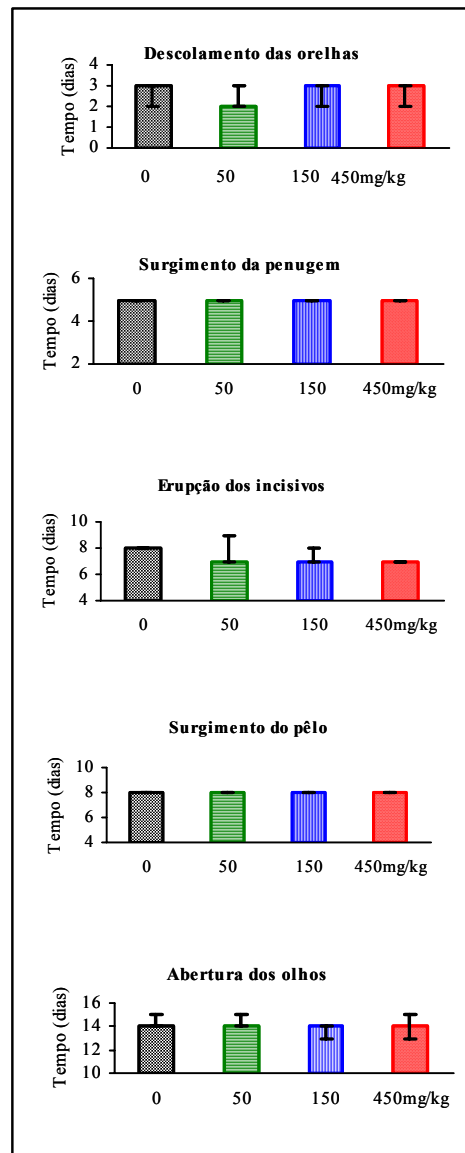


FIGURA 31. Características de desenvolvimento geral dos filhotes de progenitores expostos a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. Dados expressos em mediana \pm percentis (n= 111, 124, 134 e 117, respectivamente).

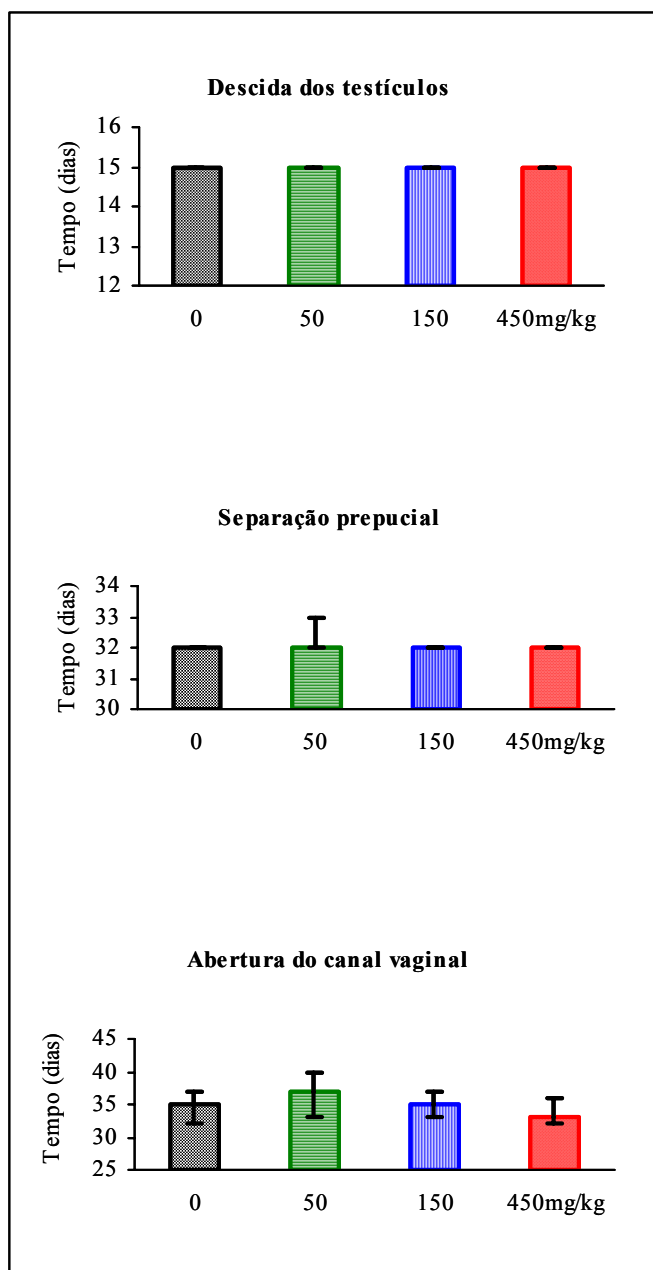


FIGURA 32. Características de desenvolvimento sexual dos filhotes de progenitores expostos a zero (controle), 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] via útero e lactação. Dados expressos em mediana \pm percentis (n= 56, 62, 57 e 69 machos e 55, 60, 77 e 48 fêmeas, respectivamente).

Conforme os dados apresentados os filhotes de progenitores expostos ao glifosato-Roundup[®] durante o desenvolvimento pré e perinatal não sofreram alterações no desenvolvimento ponderal, geral e sexual até a puberdade.

6.3 Discussão

O ensaio de toxicidade pré e perinatal revelou sinais de toxicidade reprodutiva somente para os machos, tanto na puberdade quanto na idade adulta, em dosagens que não causaram toxicidade materna. Os principais efeitos foram aumento no percentual de espermatozóides anormais na puberdade e redução na produção diária de espermatozóides e número de espermatozóides na idade adulta. As alterações histológicas testiculares evidenciadas foram decréscimo no número de espermátides alongadas e presença de vacuolização celular na puberdade, e intensa degeneração tubular na idade adulta.

6.3.1 Toxicidade Masculina

O ganho relativo de massa corporal nas fases de lactação e pré-pubertal não foi afetado pela exposição pré e perinatal ao herbicida, assim como, as características de desenvolvimento geral, sexual e comportamentais. Estes resultados revelam ausência de toxicidade sistêmica durante o desenvolvimento dos descendentes masculinos de progenitoras tratadas com 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante as fases de gestação e lactação. Fases estas, em que se dá a diferenciação sexual cerebral e a conseqüente definição do sexo gonadal. Também inicia-se o desenvolvimento de todo o trato reprodutivo que irá

definir a capacidade reprodutiva futura em termos de fertilidade e performance reprodutiva (KELLY, 1991).

A diferenciação sexual e a formação do comportamento reprodutivo são largamente afetadas por hormônios produzidos nas gônadas. Hormônios estes, suscetíveis a substâncias presentes nas progenitoras e transferidas, via placentária ou leite à progênie em desenvolvimento. A exposição a estrógenos pode feminizar fetos machos e, conseqüentemente, conduzir à redução de fertilidade ou mesmo, infertilidade no animal adulto (BERNARDI, 1996).

Neste estudo, as características de desenvolvimento sexual como descida dos testículos e separação prepucial não mostraram diferenças das respostas fisiológicas esperadas para a espécie (BAKER *et al.*, 1980). Estas variáveis são sinais externos do desenvolvimento sexual de ratos machos, dependentes da secreção de andrógenos (WALLER *et al.*, 1995), e que não foram significativamente afetados neste ensaio. Entretanto, a exposição ao herbicida nas fases pré e perinatal foi capaz de mostrar uma redução dose-dependente na fase de puberdade, que atingiu níveis marginais à significância estatística. A produção pulsátil de testosterona, regulada pelos picos de LH, pode explicar a alta variabilidade normalmente associada às concentrações séricas de testosterona. A determinação dos níveis de testosterona em uma única amostra é um fator limitante da análise do estado hormonal (SHARPE, 1988).

Durante o desenvolvimento pré e perinatal, a exposição a hormônios androgênicos é essencial para que as glândulas sexuais acessórias exibam uma responsividade adequada na fase adulta (MABLY *et al.*, 1992). Neste ensaio, a

massa relativa dos órgãos sexuais não foi afetada, porém a ausência deste efeito não pode negligenciar alterações significativas em outras variáveis mais sensíveis (DALSENTER *et al.*, 1999).

O aumento do percentual de espermatozóides anormais e alterações histológicas testiculares como vacuolização das espermátides, manifestadas na puberdade, assim como a redução da produção diária e do número de espermatozóides, acompanhada da degeneração tubular observada na idade adulta, pode ter resultado da interferência do herbicida com o balanço hormonal e com a produção de células de Sertoli durante o desenvolvimento do trato reprodutivo.

A produção diária de espermatozóides e a maturação destes são variáveis criticamente dependentes do número de células de Sertoli presentes nos testículos, que no rato, constituem uma população fixa que não se divide na idade adulta (ORTH, 1982).

O comportamento sexual, assim como as taxas reprodutivas referentes ao acasalamento não foram afetados pela exposição pré e perinatal ao herbicida. O comportamento sexual é altamente influenciado pelos níveis séricos de testosterona (KELLY, 1991), que na idade adulta, não demonstraram diferenças significativas. Porém, a concentração espermática e a morfologia dos túbulos seminíferos mostraram alterações significativas no final do período de acasalamento. Entretanto, conforme Amann (1982), as taxas reprodutivas dos ratos não constituem variáveis seguras para avaliação da fertilidade e sim, variações na massa testicular, histologia testicular, concentração e patologia espermáticas. O mesmo autor refere que perdas de até 60% não comprometem a

fertilidade dos ratos. Porém, na espécie humana o limiar de subfertilidade é muito próximo do limite de produção espermática necessário para assegurar a fertilidade (ZENICK & CLEGG, 1989).

A exposição pré e perinatal a substâncias desreguladoras endócrinas pode produzir alterações no sistema reprodutivo que não são percebidas antes da idade adulta e que são, usualmente, irreversíveis (COLBORN *et al.*, 1993). Sendo assim, conforme os resultados apresentados, a exposição masculina ao pesticida glifosato-Roundup[®] durante as fases pré e perinatal induziu alterações sobre as variáveis reprodutivas dos ratos, manifestadas na puberdade e idade adulta. Embora o mecanismo preciso de toxicidade não esteja ainda claro, os resultados aqui apresentados mostraram um aumento significativo no risco potencial deste pesticida desregular o sistema endócrino masculino.

6.3.2 Toxicidade Feminina

O ganho relativo de massa corporal, as características de desenvolvimento geral, sexual e comportamental, nas fases de lactação e pré-puberal não foram afetadas pela exposição pré e perinatal ao herbicida. Sendo assim, não houve sinais de toxicidade sistêmica durante o desenvolvimento dos descendentes femininos de progenitoras tratadas com 50, 150 ou 450mg/kg de glifosato-Roundup[®] durante as fases de gestação e de lactação.

Também, a massa relativa dos órgãos sistêmicos e reprodutivos não apresentou diferença significativa entre os grupos expostos ao glifosato em relação ao grupo controle, quando avaliada na puberdade e na idade adulta.

O comportamento sexual e as taxas reprodutivas avaliadas desde o acasalamento até o parto, assim como os índices reprodutivos avaliados no final da lactação, não sofreram qualquer alteração em relação ao grupo controle. Apesar dos machos terem revelado sinais específicos de toxicidade reprodutiva estas variáveis não foram alteradas nas fêmeas expostas às mesmas doses durante o desenvolvimento do trato reprodutivo. Vários mecanismos podem ser responsabilizados por este efeito relacionado ao sexo, tanto o mecanismo de interferência hormonal induzido pelo herbicida, quanto a sensibilidade do sexo frente a alterações hormonais.

As progênies (da segunda geração) avaliadas desde o nascimento até a puberdade tiveram seu desenvolvimento ponderal, geral e sexual dentro do esperado, conforme a fisiologia da espécie (BAKER *et al.*, 1980).

Concluiu-se que a exposição pré e perinatal ao herbicida glifosato-Roundup[®], nas doses administradas às progenitoras, não alterou o desenvolvimento reprodutivo feminino, a fertilidade e a performance reprodutiva na idade adulta, como também o desenvolvimento das progênies da segunda geração, caracterizando ausência de toxicidade materna e de desenvolvimento das progênies.

7 DISCUSSÃO GERAL

Com o advento da revolução industrial no século XVII, os métodos de produção agrícola se modernizaram, com o desenvolvimento de mecanização automotiva, adubos industrializados, pesticidas e técnicas de hibridização genética. Esse processo teve origem nos países desenvolvidos e se estendeu aos países de terceiro mundo após a 2ª Guerra Mundial. A transferência de tecnologia dos países situados em regiões temperadas para as regiões tropicais e subtropicais foi realizada, no entanto, sem qualquer avaliação de impacto ambiental. As contradições e limitações das chamadas “modernas tecnologias agrícolas” advieram após 30 anos de disseminação. Processos intensos e irreversíveis de degradação de solo, água, fauna e flora trouxeram desequilíbrios biológicos e ecológicos aos ecossistemas tropicais e subtropicais. O uso de agroquímicos tem trazido também repercussões sobre a saúde dos agricultores e consumidores, principalmente pelos resíduos de agrotóxicos que podem permanecer nos alimentos e no ambiente. Além disso, ocorrem acidentes ocupacionais com venenos agrícolas. No Brasil, estima-se anualmente uma taxa de 300.000 intoxicações agudas causadas por pesticidas, com 5000 óbitos (ANVISA, 2002).

O mercado de produtos químicos para defesa agrícola é avaliado em US\$ 2,5 bilhões no Brasil, e os herbicidas são os segmentos líderes, representando 52%

das vendas. Este segmento cresceu cerca de 42,7% nos últimos quatro anos (SINDAG, 2002).

Aprovado pela EPA/US, inclusive para uso em jardinagem doméstica, o Roundup[®] é utilizado há mais de 30 anos em 100 países e é o herbicida mais comercializado no Brasil (MONSANTO, 2002). Segundo a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2002), dos 11 produtos Roundup[®] com diferentes especificações, apenas um tem seu uso regulamentado (o produto utilizado nos ensaios realizados neste trabalho). Quatro estão com avaliação concluída, cinco estão em avaliação e um foi cancelado (Roundup[®] técnico Br).

Conforme a MONSANTO (2002), a biotecnologia de produção de sementes geneticamente modificadas, resistentes a insetos e tolerantes a herbicidas, traz benefícios econômicos aos agricultores, devido ao potencial aumento da produtividade e redução dos custos de produção, resultando em alimentos mais nutritivos e colaborando na preservação do ambiente, por exigirem menos defensivos químicos. Entretanto, o verdadeiro impacto ao ambiente e todos os seres vivos que dele dependem ainda não foi suficientemente estudado, podendo ir além daqueles previstos até o presente momento.

Os resultados apresentados neste trabalho fornecem subsídios que fundamentam a necessidade de uma reavaliação do potencial desregulador endócrino do produto comercial Roundup[®], uma vez que as NOEL doses variam daquelas referidas não só para a substância ativa, como também para o surfactante.

Segundo Williams *et al.* (2000), estudos com o herbicida Roundup[®] e seus ingredientes ativos falharam em demonstrar algum efeito indicativo de modulação endócrina, não apresentando efeitos adversos sobre desenvolvimento, reprodução ou sistema endócrino em humanos e outros mamíferos. Com a finalidade de prever o potencial de risco para humanos, estudos subcrônicos, crônicos, de desenvolvimento e reprodução com glifosato, AMPA (principal metabólito do glifosato) e POEA (surfactante) determinaram as NOEL doses em animais. Os riscos potenciais para humanos foram calculados dividindo a menor NOEL dose aplicada pelo pior caso estimado para exposição crônica. Os riscos agudos foram calculados em comparação com a DL₅₀ máxima estimada para humanos. Com base nesses estudos, a revisão elaborada por Williams *et al.* (2000) conclui que, sob as presentes e esperadas condições de uso, o Roundup[®] não apresenta riscos à saúde humana.

Estudos relatam toxicidade aguda muito baixa com o uso de herbicida Roundup[®] em ratos, assim como de glifosato, com DL₅₀ oral acima de 5000mg/kg para ambos produtos (WHO, 1994), sendo, que são assim classificados pela EPA/US como praticamente não tóxicos (classe IV). Entretanto, a toxicidade oral aguda do POEA, com base na DL₅₀ oral aguda de 1960mg/kg, fundamenta a classificação deste como levemente tóxico (classe III) (WILLIAMS *et al.*, 2000). Como o produto Roundup[®] é comercializado em diferentes países, com diferentes formulações, (MARTINEZ *et al.*, 1990), que variam nas concentrações de glifosato e POEA, a verdadeira toxicidade do produto comercial pode ser variável (ADAM *et al.*, 1997; DALLEGRAVE *et al.*, 2002). Tominack (2000) chama

atenção para a necessidade de se reavaliar toxicologicamente não só as substâncias ativas, como também os outros componentes presentes nas formulações comerciais. Estas formulações são as principais responsáveis pelas exposições agudas, subcrônicas ou crônicas, via manipulação dos produtos, ou mesmo, da ingestão dos resíduos nos alimentos.

Em estudos de teratogenicidade, baseados em efeitos maternos e sobre o desenvolvimento, a NOEL dose para o glifosato foi de 1000mg/kg/dia e para o POEA de 15mg/kg/dia (WILLIAMS *et al.*, 2000). Comparativamente, o ensaio de teratogênese realizado neste trabalho mostrou que 1000mg/kg de glifosato da formulação Roundup[®], comercializada no Brasil, manifestou alto grau de toxicidade sistêmica materna (50% de letalidade). Com a administração de 500 a 1000mg/kg, não houve interferência sobre as variáveis reprodutivas. Porém, o desenvolvimento esquelético fetal foi significativamente afetado em todos os grupos expostos ao glifosato-Roundup[®]. Relacionando a NOEL dose estabelecida para o POEA (WILLIAMS *et al.*, 2000), pode-se presumir que, devido à alta concentração deste (18%) presente na formulação utilizada neste ensaio, a toxicidade materna foi exacerbada. A dosagem de 1000mg/kg de glifosato da formulação utilizada é acompanhada de 500mg/kg de POEA, o que ultrapassa cerca de 33 vezes a NOEL dose prevista para o surfactante. É importante relatar que, conforme Filmor (1973) *appud* Williams *et al.* (2000, p. 130), este surfactante foi capaz de reduzir os níveis séricos de cálcio de cães tratados com 90mg/kg/dia por 10 semanas. Ensaio farmacocinéticos, realizados com o glifosato, demonstraram que, após absorção e distribuição em diferentes tecidos, a

baixa eliminação deste, presente nos ossos, se deve à ligação do ácido fosfônico ao íon cálcio na matriz óssea, ligação esta já demonstrada no solo por Sprankle *et al.* (1975) *appud* Williams *et al.* (2000, p. 122). Sendo assim, ambos componentes da formulação comercial podem estar envolvidos com os efeitos sobre o sistema esquelético observados nos fetos expostos ao Roundup[®]. Não somente este fator, como também a provável redução dos esteróides endógenos, frente ao mecanismo de interferência hormonal proposto por Walsh *et al.* (2000), em que o Roundup[®] seria capaz de reduzir a expressão da proteína reguladora da esteroidogênese, afetando a síntese de todos hormônios esteróides. A redução dos glicocorticóides, considerados essenciais à gestação por acelerarem o desenvolvimento de vários sistemas e órgãos nos tecidos fetais, mesmo quando estes se encontram em estágios de diferenciação (FINDLING *et al.*, 2000), pode ter contribuído para o aumento das alterações de desenvolvimento ósseo manifestadas pelos fetos expostos ao Roundup[®].

Em estudos subcrônicos, em que ratos foram tratados por 90 dias, a dosagem sem efeito tóxico observado foi maior que 1445mg/kg/dia para o glifosato e 36mg/kg/dia para o POEA (STOUT, 1987 e 1990 *appud* WILLIAMS *et al.*, 2000, p. 157 e 158, respectivamente). Segundo Reyna (1990) *appud* Williams *et al.* (2000, p. 157), a NOEL dose para toxicidade reprodutiva em ratos foi de 694mg/kg/dia, dose esta baseada em sinais sistêmicos e não reprodutivos. A menor dosagem (50mg/kg) de glifosato-Roundup[®], administrada pelo período de 92 dias para ratos machos adultos, no ensaio de fertilidade e performance reprodutiva, foi capaz de causar efeitos de toxicidade sistêmica e reprodutiva.

Entretanto, nesta formulação, a concentração de POEA presente equivale à dosagem de 25mg/kg, sendo portanto, menor do que aquela referida como NOEL dose para toxicidade subcrônica.

Os sinais de toxicidade sistêmica revelados pela administração subcrônica (92 dias) aos machos, caracterizados por aumento de 8% na massa relativa dos rins e 16% na do fígado (grupo tratado com 450mg/kg) e por lesões histopatológicas (grupos tratados com 50, 150 e 450mg/kg de glifosato) em rins (congestão generalizada) e fígado (degeneração hidrópica e necrose multifocal), podem se dever às concentrações de POEA presentes na formulação. Porém, somente as dosagens de 150 e 450mg/kg utilizadas neste ensaio, associadas a dosagens de 75 e 225mg/kg de POEA, justificariam a toxicidade sistêmica demonstrada neste ensaio pelo produto comercial utilizado.

Como freqüentemente os herbicidas são formulados em combinação com surfactantes e outros ingredientes, a possibilidade de interações sinérgicas é uma questão preocupante. Estudos realizados com glifosato e POEA resultaram em dados contraditórios. Apesar de Martinez e Brown (1991) *appud* Williams *et al.* (2000, p. 147) referirem sinergismo, Adam *et al.* (1997), concluíram que não há evidências de interação entre glifosato e POEA.

As dosagens que manifestaram toxicidade reprodutiva masculina em todos os grupos tratados com o herbicida, no ensaio de fertilidade e performance reprodutiva, foram de 1,5 a 13,9 vezes menores do que aquela que, segundo Reyna (1990) *appud* Williams *et al.* (2000, p. 157), não manifestou qualquer

efeito sobre o sistema reprodutivo e foi limite para ausência de efeito sistêmico (694mg/kg de glifosato).

A toxicidade reprodutiva masculina foi caracterizada por redução de 26 a 35% no número de espermatozóides e 31 a 38% na produção diária de espermatozóides dos grupos tratados com o glifosato-Roundup[®], em relação ao grupo controle. Também ocorreu um aumento de 3 a 3,6 vezes no percentual de espermatozóides anormais (grupos tratados com o herbicida em relação ao controle), uma redução de 52% nos níveis séricos de testosterona (grupo tratado com 450mg/kg de glifosato em relação ao controle) e alterações histológicas nos testículos, caracterizadas por congestão dos vasos, degeneração das espermatídes (todos grupos) e degeneração tubular (grupos tratados com 150 e 450mg/kg de glifosato). Sendo assim, neste trabalho, a LOEL dose de toxicidade sistêmica e reprodutiva masculina foi de 50mg/kg de glifosato-Roundup[®], associada à 25mg/kg de POEA. Apesar da manifestação de toxicidade referida para os machos, as fêmeas tratadas com as mesmas dosagens não manifestaram sinais de toxicidade sistêmica ou reprodutiva, caracterizando a NOEL dose para ensaios de toxicidade subcrônica com fêmeas como maior que 450mg/kg de glifosato-Roundup[®].

A diferença de efeitos nos machos em relação às fêmeas já foi reportada pela WHO (1994). Sinais de aumento na massa relativa do fígado e alterações histológicas hepáticas aparecem em machos expostos à metade das concentrações em que os primeiros sinais de toxicidade se manifestam nas fêmeas.

Foram observados não só efeitos sistêmicos, como também importantes efeitos sobre o sistema reprodutivo masculino. Muitos mecanismos podem estar envolvidos na desregulação endócrina dos hormônios sexuais. Agentes químicos podem estar interferindo no sistema hormonal em uma ou mais das seguintes formas: (1) mimetizando os efeitos dos hormônios naturais, ligando-se ao receptor, (2) antagonizando os efeitos dos hormônios endógenos, bloqueando a ligação destes ao receptor, (3) reagindo direta ou indiretamente com estruturas hormonais alterando-as, (4) interferindo com a síntese dos hormônios, alterando os níveis de receptores hormonais, (5) interferindo com o transporte e a eliminação destes hormônios (BAKER, 2001). Segundo Thomas (1995), o fígado possui sistemas enzimáticos capazes de afetar a meia-vida dos hormônios esteróides. Sendo assim, xenobióticos passíveis de interferir em processos enzimáticos, como alguns pesticidas organoclorados e organofosforados, são capazes de induzir sistemas de hidroxilases hepáticas, que, por sua vez, hidroxilam os esteróides, tornando-os mais polares e, conseqüentemente, mais facilmente excretados pelos rins.

A função reprodutiva do macho depende da interação de vários sistemas, órgãos e glândulas acessórias (COLBORN *et al.*, 1993). O desenvolvimento reprodutivo depende da comunicação endócrina através do ciclo de vida dos mamíferos. Proteínas e hormônios esteróides, fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras afetam a expressão de genes e síntese de proteínas em células-alvo de diferentes tecidos (WHO, 2001). O sistema reprodutivo do macho pode ser alvo de lesão produzida por um desregulador endócrino durante a

passagem pela barreira hemato-testicular, que atue (1) diretamente sobre as células de Leydig (não protegidas pela barreira), (2) por meio da inibição da divisão ou diferenciação celular, (3) da interferência no metabolismo intermediário ou (4) na produção de andrógenos. Todas essas formas podem afetar a espermatogênese (WILSON *et al.*, 1981).

Neste trabalho, a toxicidade reprodutiva masculina não foi evidenciada somente nos machos adultos tratados conforme referido para o ensaio de fertilidade e performance reprodutiva, mas também nos machos expostos ao herbicida via útero e lactação. No ensaio de exposição pré e perinatal, somente os machos revelaram sinais de toxicidade reprodutiva, tanto na puberdade quanto na idade adulta, em dosagens que não causaram toxicidade materna. Os principais efeitos na puberdade foram aumento de até 1,9 vezes no percentual de espermatozóides anormais dos grupos expostos ao glifosato, em relação ao grupo controle, e uma redução de 23 a 71% na média dos níveis séricos de testosterona. Apesar de não ter atingido significância estatística, a redução dos níveis de testosterona evidenciada nesta fase pode justificar a redução das contagens espermáticas e de espermatozóides manifestadas na idade adulta. Houve uma redução de 25 a 28% na produção diária de espermatozóides nos grupos expostos ao herbicida, em relação ao grupo controle, e de 25 a 27% no número de espermatozóides dos grupos expostos a 50 e 450mg/kg de glifosato em relação ao grupo controle. Também, a histologia testicular revela distúrbios de desenvolvimento caracterizados por um decréscimo no número de espermátides alongadas e pela presença de vacuolização celular na puberdade, e de intensa

degeneração tubular na idade adulta. Esta última, corroborando com a redução da concentração espermática revelada nesta fase.

Os efeitos observados na vida pós-natal podem ser influenciados por alterações hormonais decorrentes da exposição pré-natal a agentes desreguladores endócrinos e, frequentemente, são irreversíveis, pois as alterações são produzidas durante a formação e/ou diferenciação dos órgãos sexuais (NEUBERT & CHAHOUD, 1995). A diferenciação sexual do macho inicia na vida intra-uterina, onde o cromossoma Y determina o desenvolvimento da gônada masculina, e esta, por sua vez, secreta hormônios capazes de imprimir características de masculinização no cérebro do indivíduo em formação (KELLY, 1991). Os eventos da diferenciação sexual do padrão masculino são determinados pela secreção dos hormônios testosterona e substância inibidora dos ductos de Müller (MIS) por parte das células do testículo fetal. A testosterona secretada pelas células de Leydig é a responsável pela masculinização do sistema nervoso, dos órgãos sexuais e dos rudimentos da glândula mamária. A glicoproteína (MIS), produzida pelas células de Sertoli, promove a reabsorção dos ductos de Müller, inibindo a subsequente formação de ovidutos, útero, cérvix e vagina (MAcLUSKY & NAFTOLI, 1981). Em várias espécies de vertebrados superiores, parte integral do processo é a indução da permanente e irreversível diferenciação sexual do sistema nervoso central, em resposta aos hormônios gonadais secretados na fase precoce de desenvolvimento (MAcLUSKY & NAFTOLI, 1981).

O controle endócrino da reprodução envolve uma série de interações do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, constituindo uma ampla variedade de sítios

alvo para ação de substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas (EPA, 1997).

Segundo Walsh *et al.* (2000), embora a disfunção reprodutiva seja tipicamente caracterizada por alterações nos níveis séricos de hormônios esteróides, alterações na espermatogênese, perdas de fertilidade, como também os mecanismos envolvidos na indução de infertilidade provocada pela exposição a pesticidas, ainda não estão claros. As células de Leydig têm papel crucial na função reprodutiva do macho por produzirem testosterona. Para investigar os eventos moleculares envolvidos nas alterações da biossíntese de esteróides, induzida por pesticidas, são utilizadas células tumorais de Leydig da linhagem MA-10 de camundongos. Ensaios *in vitro*, utilizando células da linhagem MA-10, revelaram que o pesticida organoclorado lindano foi capaz de inibir a expressão da proteína reguladora da esteroidogênese aguda (*STAR protein*), reduzindo a esteroidogênese por limitar agudamente a transferência do colesterol para a membrana interna da mitocôndria, onde o citocromo P450 atua na clivagem da cadeia lateral do colesterol. A enzima P450_{scc} atua na clivagem do colesterol e este evento dá início à síntese de todos os hormônios esteróides. Este mecanismo proposto por Walsh *et al.* (2000) vem corroborar com os resultados *in vivo* demonstrados por Dalsenter *et al.* (1997) em que o lindano foi capaz de afetar o trato reprodutivo de ratos machos expostos no 9º ou 14º dia pós-natal, reduzindo os níveis de testosterona, tanto na puberdade quanto na idade adulta, como também reduzindo a massa testicular e a concentração espermática na idade adulta.

O mesmo mecanismo proposto para o lindano foi demonstrado por Walsh *et al.* (2000) para o Roundup[®]. Este autor refere que somente o Roundup[®], e não o glifosato, foi capaz de inibir a expressão da *STAR protein* e, conseqüentemente, reduzir a síntese de todos os hormônios esteróides. Sendo assim, provavelmente outro componente da formulação comercial seria o principal responsável por este efeito (WALSH *et al.*, 2000).

Tanto os resultados *in vivo*, apresentados neste trabalho, quanto aqueles *in vitro*, desenvolvidos por Walsh *et al.* (2000), indicam que o herbicida Roundup[®] é capaz de provocar efeitos de modulação endócrina. Esses resultados reforçam a necessidade de se estudar mais profundamente o outro componente da formulação comercial, o polioxietilenamina.

Inúmeras substâncias, incluindo os pesticidas, têm sido implicadas como capazes de alterar a atividade hormonal, afetando, indiretamente, a capacidade reprodutiva (STEVENS *et al.*, 1997).

O fipronil é referido por Colborn (1998) como uma substância suspeita de atuar como desregulador endócrino. Conforme Ohi (2002), o fipronil foi capaz de alterar os níveis hormonais de progesterona e estradiol durante o ciclo reprodutivo, acarretando em alterações no ciclo estral e reduzindo a taxa de gestação em ratas Wistar.

A deltametrina, também suspeita de desregular o sistema endócrino, foi investigada quanto a capacidade de indução de efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo de ratos expostos durante períodos críticos do desenvolvimento sexual. A exposição *in útero* e lactacional à deltametrina induziu uma redução na

massa de testículos e epidídimos, na produção espermática diária, no diâmetro médio dos túbulos seminíferos e também alterou o comportamento sexual dos ratos na idade adulta (ANDRADE, 2002).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, nos três ensaios de toxicidade reprodutiva com o glifosato-Roundup[®], embora o glifosato não esteja presente na lista das substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas (EPA, 2002; COLBORN, 2002), sugere-se a necessidade de desenvolver outros ensaios *in vivo* e *in vitro*, não só para estabelecer os mecanismos envolvidos, como também procurar determinar qual ou quais as substâncias são responsáveis pelos efeitos sobre o sistema reprodutivo e a possibilidade de interações sinérgicas entre estas.

8 CONCLUSÕES

Pesticidas capazes de afetar o sistema endócrino, incluindo efeitos sobre a reprodução, são denominados de desreguladores endócrinos (COLBORN *et al.*, 1993).

O Roundup[®] é o herbicida mais utilizado no Brasil, onde é comercializado em formulação contendo glifosato e polioxietilenamina (ANVISA, 2002a e 2002b).

O herbicida glifosato-Roundup[®] (na formulação comercializada no Brasil) induz toxicidade reprodutiva em ratos Wistar, nos ensaios de fertilidade e performance reprodutiva e exposição pré e perinatal.

A exposição de ratos Wistar ao herbicida glifosato-Roundup[®] durante o período de organogênese fetal (segmento II) induz retardos no desenvolvimento esquelético de fetos (em dosagens de 500, 750 e 1000mg/kg) e toxicidade materna caracterizada por letalidade (em dosagem de 1000mg/kg).

Toxicidade sistêmica e reprodutiva masculina são evidenciadas em ensaio de performance reprodutiva de machos e fêmeas adultos (segmento I). Os principais efeitos sistêmicos observados são: aumento na massa relativa do fígado e rins (em dosagem de 450mg/kg) e alterações histopatológicas no fígado (degeneração hidrópica e necrose multifocal) e nos rins (congestão) em todos os grupos tratados com o herbicida. As alterações reprodutivas incluem: redução no número de espermatozoides (em dosagens de 50, 150 e 450mg/kg), na produção

diária de espermatozóides (em dosagens de 50 e 450mg/kg), aumento no percentual de espermatozóides anormais (em dosagem de 450mg/kg), redução dos níveis séricos de testosterona (em dosagem de 450mg/kg) e alterações histológicas nos testículos caracterizadas por congestão dos vasos, degeneração das espermátides (em dosagens de 50, 150 e 450mg/kg) e degeneração tubular (dosagens de 150 e 450mg/kg).

A exposição pré e perinatal ao herbicida (segmento III) induz efeitos reprodutivos somente nos machos das progênes expostas, em doses que não causam sinais de toxicidade materna. Os principais efeitos incluem: aumento no percentual de espermatozóides anormais (em dosagem de 50mg/kg) em puberdade e redução da produção diária e do número de espermatozóides em idade adulta (em dosagens de 50 e 450mg/kg). Também, alterações histológicas testiculares caracterizadas por decréscimo no número de espermátides alongadas e pela presença de vacuolização celular em puberdade e por intensa degeneração tubular em idade adulta, revelando presença de distúrbios de desenvolvimento.

A partir dos resultados obtidos, com os três ensaios de toxicidade reprodutiva, conclui-se que o herbicida glifosato-Roundup[®] (comercializado no Brasil) manifesta maior grau de toxicidade sistêmica, reprodutiva masculina e de desenvolvimento esquelético fetal, do que o referido para o glifosato grau técnico (WHO, 1994). E, frente à toxicidade reprodutiva masculina evidenciada neste estudo, pode-se sugerir que o glifosato-Roundup[®] seja capaz de conferir efeitos de modulação endócrina e, conseqüentemente, manifestar potencial desregulador endócrino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A. *et al.* The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats. **Veterinary Human Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 147-51, June.1997.

AMANN, R.P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 2, n. 82, p. 13-25, 1982.

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

ANDRADE, A.J.M. **Efeitos do piretróide deltametrina sobre o sistema reprodutivo de ratos machos púberes e adultos expostos *in utero* e durante a lactação.** 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ANKLEY, G.; MIHAICH, H.; STAHL, R. *et al.* Overview of a workshop on screening methods for detecting potencial (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 68-87, 1998.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Agroecologia: o paradigma da agricultura do século XXI. **Toxicologia**, 2002a. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/agro/apres.htm>>. Acesso em: 22 nov. 2002.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Agrotóxicos: nomenclatura. **Agrotóxicos**, 2002b. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/agrotox/agrotoxnomcml_2.asp.htm>. Acesso em: 22 nov. 2002.

AUGER, J. *et al.* Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **New England Journal Medical**, v. 332, p. 281-285, 1995.

BABABUNMI, E.A.; OLORUNGSOGO, O.O; BASSIR, O. Toxicology of glyphosate in rats and mices. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 45, p. 319-320, 1978.

BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. (Eds). **The laboratory rat.** v. II. Research Applications, Academics Press, 1980.

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

BENDVOLD, E. *et al.* Depressed semen quality in Swedish men from barren couples: a study over three decades. **Archives Andrology**, v. 26, p. 189-194, 1991.

BENNETTI, J.P.; VICKERY, B.H. Rats and mice. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970. p. 299-315.

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 517-524.

BERNSTEIN, M.E. Agents affecting the male reproductive system: effects of struture on activity. **Drug metabolism reviews**. v. 15, n. 5-6, p. 941-996, 1984.

BJERKE, D.L. *et al.* effects of in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin. Exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 127, p. 250-257, 1994.

BLACK, D.L.; MARKS, T.A. Role of maternal toxicity in assessing developmental toxicity in animals: a discussion. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 16, p. 189-202, 1992.

BLAKLEY, B.R. Effect of Roundup and Tordon 202C herbicides on antibody production in mice. **Veterinary Human Toxicology**, v. 39, n. 4, Aug., 1997.

BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: UNICAMP, 1994. 122p.

CAMARGO, P.N. **Herbicidas orgânicos: fundamentos químico-estruturais**. São Paulo: Manole, 1986.

CHABNER, B.A. *et al.* Antineoplastic agents. In: GILMAN, A.G. (Eds) **The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 1233-1288.

CHAHOUD, I. **Atlas of external and skeletal anomalies in rats**. CD-ROOM, Berlin: PR & C Multimedia, Leipzig, 1997.

CHAHOUD, I.; KWASIGROCH, E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, J.; KWASIGROCH, T.E. **Methods in prenatal toxicology**. Berlin: Georg Thieme Publishers Stuttgart, 1977. p. 78-91.

COBEA - COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

COLBORN, T. Endocrine disruption from environmental toxicants. In: ROM WN (Ed.) **Environmental and Occupational Medicina**, 3. ed. Philadelphia: Lippicott-Raven Publishers, 1998. p. 803-812.

COLBORN, T. **Widespread pollutants effects with endocrine-disrupting**, 2002. Disponível em: <<http://www.ourstolenfuture.org/basics/chemlist.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2002.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F.S.; SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378-384, 1993.

DALLEGRAVE, E. **Influência dos extratos hidroalcoólicos de *Medicago sativa* Linnaeus (1753) e *Pennisetum purpureum* Schumacher (1827) sobre o desenvolvimento ponderal e fertilidade de ratas e desenvolvimento da progênie**. 1999. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DALLEGRAVE, E. *et al.* Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 1, p. 29-34, 2002. Disponível em: <<http://www.cpb.uokhsc.edu/ojvr/absglyphosate.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2002.

DALSENTER, P.R. *et al.* Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. **Human and Experimental Toxicology**, v. 16, p. 146-153, 1997.

DALSENTER, P.R. *et al.* Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Human and Experimental Toxicology**, v. 18, p. 583-589, 1999.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M.S. Effect of herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research**, v. 85, s. A., p. 226-231, 2001.

ELDRIDGE, J.C. *et al.* Atrazine: mechanisms of hormonal imbalance in female SD rats. In: CHAPIN, R.E. *et al.* Symposium overview – Endocrine modulation of reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 29, p. 1-17, 1996.

ENDOCRINE DISRUPTORS. 2000. Disponível em: <<http://endocrine.ei.jrc.it/>>. Acesso em: 21 set. 2000.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment** – EPA/630/R-96/009, Washington, Sept. 1996a.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Health effects test guidelines reproduction and fertility effects.** - OPPTS 870: 3800, Washington, 1996b.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Endocrine disruptor screening program - report to congress** (2000) - DC: U.S.EPA, Washington, 2000.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Illinois Environmental Protection Agency: Endocrine disruptors strategy**, 2002. Disponível em: <<http://www.nihs.gov/hse/enviro/illiepatable.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2002.

FAQI, A.S. *et al.* Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 150, p. 383-392, 1998.

FINDLING, J.W.; ARON, D.C.; TYRRELL, J.B. Glicocorticóides & androgênios supra-renais. In: GREENSPAN, F.S.; STREWLER, G.J. **Endocrinologia Básica & Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 235-265.

FROHBERG, H. An introduction to research in teratology In: NEUBERT, D.; MERKER, J.; KWASIGROCH, T.E. **Methods in Prenatal Toxicology**. Berlin: Georg Thieme Publishers Stuttgart, 1977. p. 1-13.

FUJII, T.; INAZU, N.; HASE, C. Transgenerational effects of exposure to herbicides, linuron and glyphosate during prepubertal period in rats. **Toxicology Letters**, v. 95, n. 1, July, p. 216-217, 1998.

GFELLER, R.W.; MESSONNIER, S.P. **Small animal toxicology e poisonings**. St. Louis: Mosby, 1998. p.148-150.

GILLESBY, B. E.; ZACHAREWSKI, T.R. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 3-14, 1998.

HAYES, A.W. (Ed). **Principes and methods of toxicology**. 3. ed. New York: Raven Press, 1994.

HOEF, AM.; *et al.* Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. **Food Addit. Contam.** v. 15, n. 7, p. 767-74, Oct., 1998.

HOOGHEEM, T.J. The safety of Roundup pesticide. **American Medical Association**, v.262, n. 19, p. 2679, 1989.

KELCE, W.R. *et al.* Environmental antiandrogens. In: CHAPIN, R.E. *et al.* Symposium overview – Endocrine modulation of reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 29, p. 1-17, 1996.

KELLY, D.D. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**. 3. ed. Connecticut: Prentice-Hall International Inc., 1991. p. 959-973.

LANGELOH, A.; MELLO, J.R.. Plantas tóxicas. In: MAGALHÃES, H.M. **Farmacologia veterinária: temas escolhidos**. Guaíba: Agropecuária, 1998. p. 17-36.

LAPPONI, J.C. **Estatística usando o Excel**. São Paulo: Laponi treinamento, 1995. 289p.

LEMONICA, I.P.; DAMASCENO, D.C.; DI-STASI, L.C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 2, p. 223-227, 1996.

LORK, D. Evaluation of skeleton. In: NEUBERT, D.; MERKER, H.J.; KWASIGROCH, T.E. **Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977. 474 p.

MABLY, T.A. *et al.* The male reproductive system is highly sensitive to in utero and lactational TCDD exposure. In: GALLO, M.A.; SCHEUPLEIN, R.J.; VAN DER HEIJDEN, K.A. **Biological basis for risk assessment of dioxins and related compounds**. Banbury report 35. Cold Spring Harbor Laboratory, 1991. p. 69-78.

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

MACLUSKY, N.J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v. 211, n. 20, Mar., p. 1294-1303, 1981.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Herbicidas em alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 109p.

MONSANTO. **Tecnologia em benefício da agricultura**, 2002. Disponível em:<<http://www.monsanto.com.br/institucional/perfil/teperfil3.htm>>. Acesso em: 22 nov. 2002.

MOSES, M. The safety of Roundup pesticide. **American Medical Association**, v. 262, n. 19, p. 2679, 1989.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Significance of species and strain differences in pre-and perinatal toxicology. **Acta histochemica**, v. XXXI, p. 23-35, 1985.

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

NEUBERT, D.; MERKER, H. J.; KWASIGROCH, T. E. **Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977. 474 p.

OHI, M. **Efeitos reprodutivos e tóxicos do fipronil (frontline® top-spot™) em ratos**. 2002. 73f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

OJEDA, S.R.; URBANSKI, H.F. Puberty in the rat. In: KNOBIL, E.; NEIL L. **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1988. p. 1699-1737.

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

OSWEILER, G.D. **Toxicologia veterinária**. Trad. Zanchet *et al.* Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 526p.

PAUMGARTTEN, F.J.R. *et al.* Study of the effects of β -myrcene on rat fertility and general reproductive performance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, p. 955-965, 1997.

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

RUSSEL, L.D. *et al.* **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater : Cache River Press, 1990. 286p.

SAFE, S.H.; GAIDO, K. Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 119-126, 1998.

SALEWSKI, E. Färbemethoden zum makroskopischen nachweis von implantationsstellen am uterus der ratte. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, v. 247, p. 367, 1964.

SHARPE, R.M. Endocrinology and paracrinology of the testis. In: LAMB, J.C.; FOSTER, P.M.D. **Physiology and toxicology of male reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p. 71-102.

SHARPE, R.M.; SKAKKEBAEK, N.E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **The Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para defesa agrícola. **Defensivos agrícolas ampliam mercado**, 2002. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd396/defensivos_agricolas.htm>. Acesso em: 22 nov. 2002.

SMITH, E.A.; OEHME, F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary Human Toxicology**, v. 34, n. 6, Dec., p.531-543, 1992.

SOUZA, C.A.M. *et al.* Study of the embryofeto-toxicity of crown-of-thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1325-1332, 1997.

STEVENS, J.T. *et al.* FIFRA - Subdivision F testing guidelines: Are these tests adequate to detect potential hormonal activity for crop protection chemicals? Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide **Acta Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 50, n.5, Apr., p. 415-431, 1997.

TAYLOR, W.R.; VAN DIKE, G.C. Revised procedores for staining and clearing smal fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 9, p. 107-119, 1985.

THOMAS, J.A. Toxic responses of the reproductive system. In: KLAASSEN, C.D.; WATKINS, J.B. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 547-581.

TOMINACK, R.L. Herbicide formulations. **Clinical Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 129-135, 2000.

VENDA de agrotóxicos atinge US\$ 2 bi. **Folha de São Paulo**, 2 fev. 1999. Agrofolha. Disponível em: <<http://www.uol.com.br/folha/arquivos>>. Acesso em: 15 fev. 2000.

WALLER, D.P.; KILLINGER, J.M. ZANEVELD, L.J.D. Physiology and toxicology of male reproductive tract. In: THOMAS, J.A. *et al.* **Endocrine Toxicology**. Raven, 1995. pp. 269-333.

WALSH, L.P. *et al.* Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 769-776, 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Glyphosate. Geneva, **Environmental Health Criteria**, v. 159, p. 1-177, 1994.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. Geneva, **Environmental Health Criteria**, v. 225, p. 1-187, 2001.

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

WILSON, J.D.; GEORG, F.W.; GRIFFIN, J.E. The hormonal control of sexual development. **Science**, v. 211, n. 20, Mar., p. 1278-1284, 1981.

WISE, L.D.; BECK, S.L.; BELTRAME, D.; *et al.* Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). **Teratology**, v. 55, p. 249-292, 1997.

YOUSEF, M.I.; SALEM, M.H.; BERTHEUSSEN, K. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. **Journal Environmental Science Health British**, v. 30, n. 4, p. 513-534, 1995.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 123 p.

ZENICK, H.; CLEGG, E.D. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: HAYES, A.W. (Ed). **Principles and methods of toxicology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1989. p. 275-309.

ANEXOS

Artigos referentes aos ensaios de toxicidade reprodutiva e aguda.

ANEXO 1

Artigo sobre o Ensaio de Teratogenicidade

The teratogenic potential of herbicide glyphosate-Roundup[®] to Wistar rats.

Aceito para publicação na Toxicology Letters em 10 de dezembro de 2002.

The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats

Eliane Dallegrave¹, Fabiana DiGiorgio Mantese¹, Ricardo Soares Coelho¹, Janaína Drawans Pereira¹, Paulo Roberto Dalsenter², Augusto Langeloh¹

¹Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

²Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Biológicas, Centro Politécnico,
Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brasil

Abstract

The aim of this study was to assess the teratogenicity of the herbicide glyphosate-Roundup® (as commercialized in Brazil) to Wistar rats. Dams were treated orally with water or 500, 750 or 1,000 mg/kg glyphosate from day 6 to day 15 of pregnancy. Cesarean sections were performed on day 21 of pregnancy, and number of corpora lutea, implantation sites, living and dead fetuses, and resorptions were recorded. Weight and gender of the fetuses were determined, and fetuses were examined for external malformations and skeletal alterations. The organs of the dams were removed and weighed. Results showed a 50% mortality rate for dams treated with 1,000 mg/kg glyphosate. Skeletal alterations were observed in 15.4%, 33.1%, 42.0% and 57.3% of fetuses from the control, 500, 750 and 1,000 mg/kg glyphosate groups, respectively. We may conclude that glyphosate-Roundup® is toxic to the dams and induces developmental retardation of the fetal skeleton.

Keywords: Teratogenicity; herbicide-Roundup®; glyphosate; polyoxyethyleneamine; rats; skeletal alterations.

1. Introduction

Glyphosate is the active ingredient of Roundup®, marketed as a non-selective, broad spectrum, post-emergence herbicide. It is used to control weeds in emerged grasses, broad-leaf weeds, pastures and rice, corn and soy plantations (Smith and Oehme, 1992). Technical glyphosate has been tested for acute, chronic and reproductive toxicity such as embryotoxicity and/or teratogenicity.

Acute studies have reported that products containing glyphosate and polyoxyethyleneamine (the surfactant) may be more toxic than glyphosate alone (Adam et al., 1997). The LD₅₀ of oral acute glyphosate for rats and rabbits ranges from 4 to 6 g/kg (Atkinson, 1985), while the LD₅₀ of the polyoxyethyleneamine for rats ranges from 1 to 2 g/kg (Sawada et al., 1988). Two chronic administration studies using technical glyphosate were conducted on rats, one in 1979-1981 and the other in 1988-1990 (WHO, 1994): the animals received 3, 10 and 32 mg/kg/day in the first study and 100, 410 and 1,060 mg/kg/day in the second. In the first study a significant increase in the incidence of interstitial cell tumors was observed in rat testes; however, the absence of the same effect with the higher doses used in the second study was the basis to exclude glyphosate from the carcinogenic category (WHO, 1994).

Teratogenicity studies showed that oral administration of high doses of technical glyphosate during pregnancy (3,500 mg/kg to Charles River COBS CD rats from day 6 to day 19 of pregnancy and 350 mg/kg to rabbits from day 6 to day 27 of pregnancy) caused maternal toxicity. The major effects observed were mortality of the dams, and increased number of fetuses with reduced ossification of sternbra (WHO, 1994). Since the acute toxicity of glyphosate is increased when the substance is combined with polyoxyethyleneamine, the aim of the present study was to assess the potential teratogenic effects [reproductive toxicity protocols: segment II (EPA, 1996)] of subchronic administration of Roundup®, as marketed in Brazil (36% glyphosate and 18% polyoxyethyleneamine) to Wistar rats.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

The Roundup® formulation (lot: BS 1096/98, Monsanto of Brazil) consisting of 360 g/L glyphosate (N-phosphonomethylglycine) and 18% (w/v) polyoxyethyleneamine (the surfactant) was used. The solutions of the Roundup® formulation were prepared by the addition of appropriate volumes of distilled water.

2.2 Animals

Adult male and virgin female Wistar rats (90 days old, 200-280 g) bred in the animal facilities of our own Department were used. All breeding phases and all experiments conformed to the rules of the Ethics and Animal Experimentation Committee of our institution. All animals were housed in polyethylene (65 x 25 x 15 cm) home cages, with sawdust-covered floors. Animals were maintained in a colony room at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under conditions of controlled humidity and on a 12 h-light/dark cycle (lights on from 9 a.m. to 9 p.m.), with free access to standard laboratory rat chow and water.

2.3 Mating

Three female rats were placed in a cage with one male during the dark period (between 9 p.m. and 9 a.m.) for mating. On the subsequent morning (9 a.m.), vaginal smears were obtained from all females and examined. Females showing sperm were housed in individual cages, and this was considered the zero day of pregnancy (Paumgartten et al., 1997).

2.4 Treatment

Sixty pregnant rats were divided into four groups ($n = 15 \pm 1/\text{group}$). The control group received distilled water and the experimental groups received 500, 750 or 1,000 mg/kg glyphosate-Roundup® diluted in water. The dosing regimen was based on no observed adverse effect level (NOAEL) for developmental toxicity in rats (maternal and fetal effects), which was 1,000 mg/kg glyphosate (Williams, 2000).

Treatments were administered orally by gavage in a volume of 10 mL/kg from day 6 up to day 15 of pregnancy, defined as the critical period for the structural development span of the embryonic stage for rats (WHO, 2001).

2.5 Cesarean section

Each dam was submitted to cesarean section 21 days after the beginning of pregnancy. The animals were anesthetized with a combination of 5 mg/kg xylazine (2% xylazine chloride; Virbac®) and 90 mg/kg ketamine (5%ketamine chloride; Vetanarcol®) injected intramuscularly (Allen et al., 1998). The abdomen was incised, the gravid uterus was removed and weighed with its contents. The number of living and death fetuses and implantation sites was recorded. The heart, lungs, liver, spleen and kidneys of the dams were removed and weighed. The fetuses were examined and the prevalence of teratogenic characteristics [reproductive toxicity protocols: segment II (EPA, 1996)] was determined. Body weight, gender and external malformations were recorded. The fetuses were numbered with a marker and fixed in 5% formalin for future skeletal analysis.

2.6 Maternal variables

Body weight was recorded daily during pregnancy, with the value recorded on day zero (sperm-positive smear) being considered as 100%. The differences in weight observed during the experiment were expressed as relative weight gain. Food and water intake was recorded every three days throughout pregnancy. Food and water consumption during each three-day period (grams and mL, respectively) were related to body weight during the same period for the determination of relative consumption.

Maternal toxicity was characterized by decreased relative weight (expressed as percentage of body weight), decreased water or food intake, decreased relative weight of the organs (expressed as percentage of body weight) after cesarean section, and occurrence of death during pregnancy. Reproductive indices including embryo resorptions, number of corpora lutea, implantation sites and pups, and pup viability were also assessed (EPA, 1996).

2.7 Fetal variables

The fetal variables recorded were body weight (g), sex ratio (male/female), occurrence of external malformations, and skeletal alterations. After the tissue had been cleared with trypsin and the bones stained with alizarin (Taylor and VanDyke, 1985), skeletal alterations were evaluated according to the atlas of rat skeletal anomalies (Chahoud, 1997).

2.8 Statistical analysis

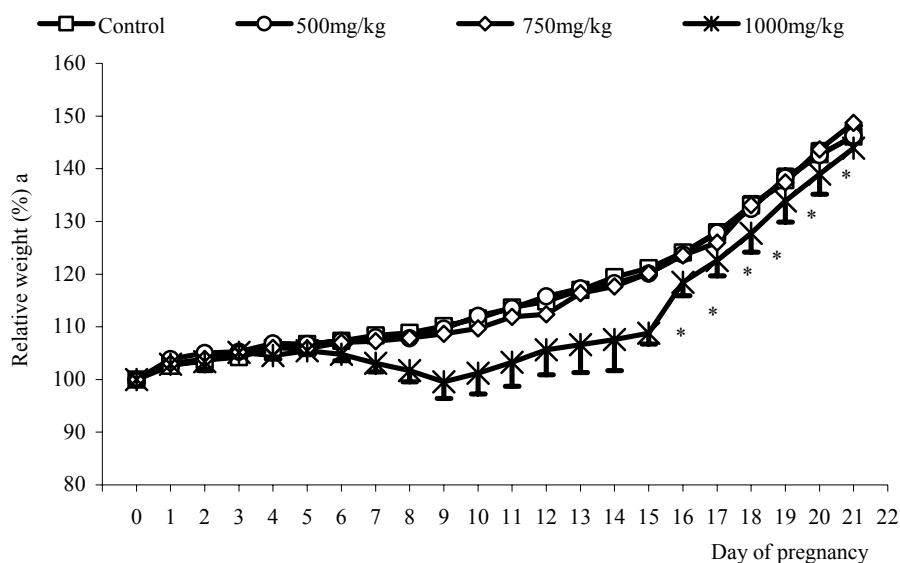
Parametric data, expressed as mean \pm SEM, were analyzed by repeated measure ANOVA or one-way ANOVA, followed by the Duncan test when appropriate. The nonparametric data, expressed as proportion or percentage, were analyzed by the chi-square test. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

3 Results

3.1 Maternal variables

The total weight gain (mean \pm SEM) was 106.4 ± 9.0 , 84.9 ± 7.0 , 107.4 ± 9.5 and 102.2 ± 8.3 g for the control, 500, 750 and 1,000 mg/kg glyphosate groups, respectively ($P = 0.693$, one-way ANOVA). These results, which are illustrated in Figure 1, showed that the expected weight gain occurred in all groups during pregnancy. Although the group receiving the highest dose showed a decrease in body weight during the treatment period, this difference was not statistically significant. Fifty percent of the dams treated with 1,000 mg/kg glyphosate died between day 7 and day 14 of pregnancy. No deaths were observed with the lower doses.

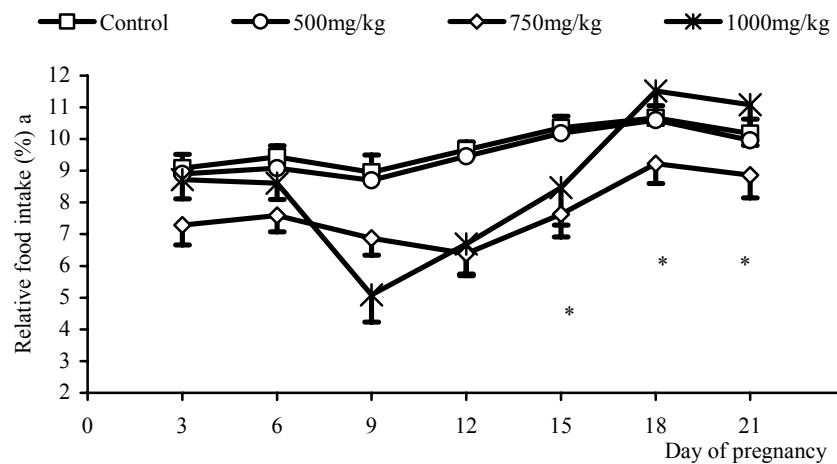
Figure 1. Relative weight gain of the dams (with respect to day zero which represented 100%) treated with water (control), 500, 750 or 1,000 mg/kg of glyphosate-Roundup® from day 6 to day 15 of pregnancy. Data are reported as mean \pm SEM.



* Significant difference among days 17, 18, 19, 20, 21 and 22 (Duncan test).
Significant difference among days ($P < 0.001$, repeated measure ANOVA).
No significant difference among groups ($P > 0.05$, repeated measure ANOVA), and no interactions between treatment and days.

The expected steady increase in food intake (Figure 2) and water intake (Figure 3) occurred in all groups during pregnancy.

Figure 2. Relative food intake of the dams treated with water or 500, 750 or 1,000 mg/kg of glyphosate-Roundup® from day 6 to day 15 of pregnancy. Data are reported as mean \pm SEM.



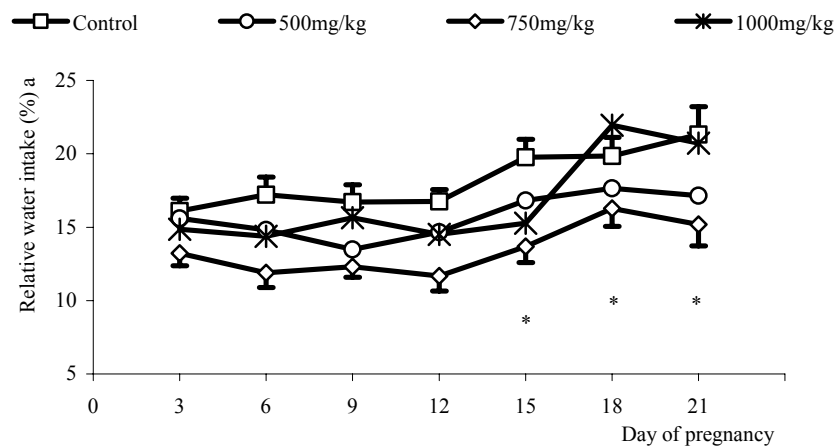
* Significant difference among days 9, 15 and 18 (Duncan test).

Significant difference among days ($P < 0.001$, repeated measure ANOVA).

Significant interactions between treatment and 3-day period ($P < 0.001$, repeated measure ANOVA, Duncan test).

No significant difference among groups ($P > 0.05$, repeated measure ANOVA).

Figure 3. Relative water intake of the dams treated with water or 500, 750 or 1,000 mg/kg of glyphosate-Roundup® from day 6 to day 15 of pregnancy. Data are reported as mean \pm SEM.



* Significant difference among days 15, 18 and 21 (Duncan test).

Significant difference among days ($P < 0.001$, repeated measure ANOVA).

Significant interactions between treatment and 3-day period ($P < 0.001$, repeated measure ANOVA, Duncan test).

No significant difference among groups ($P > 0.05$, repeated measure ANOVA).

No significant difference in relative weight of the maternal organs was observed among the experimental groups ($P > 0.05$, one way ANOVA) (Table 1). Likewise, the number of fetuses, corpora lutea, implantation sites and embryo resorption was similar for all groups ($P > 0.05$, one way ANOVA or chi-square test) (Table 2).

Table 1. Relative weight of the organs of dams treated with water, or 500, 750 or 1,000 mg/kg glyphosate-Roundup® from day 6 to day 15 of pregnancy. Data are reported as mean \pm SEM based on the percentage of the organ weight in relation to total body weight.

Organs	Control	Glyphosate-Roundup® (mg/kg)		
		500	750	1,000
Number of dams	15	15	16	07
Heart (%)	0.30 \pm 0.012	0.35 \pm 0.008	0.33 \pm 0.008	0.34 \pm 0.021
Lungs (%)	0.49 \pm 0.024	0.55 \pm 0.044	0.53 \pm 0.019	0.47 \pm 0.031
Liver (%)	4.57 \pm 0.130	4.73 \pm 0.130	4.89 \pm 0.100	5.11 \pm 0.190
Right kidney (%)	0.30 \pm 0.009	0.33 \pm 0.009	0.31 \pm 0.005	0.33 \pm 0.008
Left kidney (%)	0.30 \pm 0.008	0.31 \pm 0.020	0.31 \pm 0.006	0.32 \pm 0.010
Spleen (%)	0.23 \pm 0.009	0.24 \pm 0.012	0.22 \pm 0.009	0.22 \pm 0.010

There was no significant difference among groups ($P > 0.05$, one way ANOVA) for each organ evaluated.

Table 2. Reproductive indices of the dams treated with water or 500, 750 or 1,000 mg/kg glyphosate-Roundup® from day 6 to 15 day of pregnancy.

Reproductive Indices	Control	Glyphosate-Roundup® (mg/kg)		
		500	750	1,000
Number of dams	15	15	16	07
Number of fetuses	154	148	162	75
Corpora lutea (mean \pm SEM)	11.4 \pm 0.5	11.6 \pm 0.6	10.1 \pm 0.8	12.9 \pm 0.9
Implantation sites (mean \pm SEM)	10.5 \pm 0.7	09.8 \pm 0.8	11.6 \pm 0.4	11.4 \pm 1.1
Embryo resorption (%)	2.4	3.3	2.6	3.8
Fetuses/dams (mean \pm SEM)	10.3 \pm 0.8	09.7 \pm 0.9	10.1 \pm 0.9	10.7 \pm 1.1

There was no significant difference among groups ($P > 0.05$, chi-square test or one way ANOVA, according the analyzed data).

3.2 Fetal variables

Concerning the fetal variables, the mean (\pm SEM) weight of the fetuses, expressed in grams, was 5.1 \pm 0.03 for the control group and 5.0 \pm 0.03, 5.1 \pm 0.03 and 5.1 \pm 0.05 for the 500, 750 and 1,000 mg/kg glyphosate groups, respectively. There was no significant difference among groups ($P = 0.889$, one way ANOVA).

The male:female sex ratio for the fetuses was 0.94:1 for the control group and 1.06:1, 1.01:1, and 1.5:1 for the groups that received 500, 750 and 1,000 mg/kg glyphosate, respectively. Although the group treated with the highest dose presented the highest sex ratio, no statistically significant differences were observed among groups ($P = 0.724$, chi-square test).

Only two glyphosate groups showed fetuses with external malformations, with rates of 2.0% in the low dose group (500 mg/kg) and 0.6% in the medium dose group (750 mg/kg). The majority of the animals showed anasarca, except for one fetus in the 750 mg/kg group whose development stopped at the beginning of pregnancy and which was not reabsorbed. There were no significant differences in external malformation rates among the four groups studied ($P = 0.170$, chi-square test).

Concerning the total percentage of skeletal alterations, the groups exposed to glyphosate-Roundup® showed significant differences compared to control ($P < 0.001$, chi-square test). The percentage of altered fetuses was 15.4, 33.1, 42.0, and 57.3 for the control and the 500, 750, and 1,000 mg/kg glyphosate groups, respectively. The most frequent skeletal alterations observed were incomplete skull ossification and enlarged fontanel (Table 3), which occurred more frequently in the experimental groups compared to control ($P < 0.001$, chi-square test).

Table 3. Percentage of skeletal alterations in fetuses from dams treated with water or 500, 750 or 1,000 mg/kg glyphosate-Roundup® from day 6 to day 15 pregnancy.

Regions or structures	Abnormalities (%)	Control	Glyphosate-Roundup® (mg/kg)		
			500	750	1,000
Number of fetuses		154 (15) ^a	148 (15) ^a	162 (16) ^a	75 (7) ^a
Skull, General	Incomplete Ossification	10.4	29.1*	38.9*	56.0*
	Enlarged Fontanel	1.9	25.7*	37.0*	53.3*
Interparietal	Bipartite	0.6	18.9*	4.9*	0.0
Supraoccipital	Bipartite	9.7	19.6*	1.2	0.0
	Incomplete Ossification	3.2	0.0	1.2	13.3*
Premaxilla	Misshapen	0.0	0.7	1.2	0.0
Maxilla	Short	0.6	0.7	0.0	1.3
Squama	Incomplete Ossification	0.0	0.0	3.1*	2.7*
Thoracic vertebrae	Incomplete Ossification	0.6	0.0	0.6	0.0
	Incomplete Ossification	2.6	4.1	3.1	0.0
Lumbar vertebrae	Misshapen	0.0	0.7	1.9	0.0
Sacral vertebrae	Misshapen	1.3	0.0	0.6	0.0
	Unossified	0.6	0.0	0.6	0.0
Caudal vertebrae	Absent	1.9	0.0	7.4*	14.7*
	Unossified	0.0	2.0	1.9	0.0
Ribs	Absent	1.3	2.7	3.1	4.0
	Incomplete Ossification	1.9	2.0	5.6	4.0
	Bifurcated	0.0	0.7	0.6	0.0
	Wavy	0.6	2.0	4.9*	0.0
	Incomplete Ossification	1.9	14.9*	0.0	2.7
Sternebra	Bipartite	3.9	14.2*	0.6	9.3
	Incomplete Ossification	0.0	0.0	17.9*	1.3
Scapula	Incomplete Ossification	0.6	3.4	1.2	4.0
Metacarpal bones	Incomplete Ossification	1.3	1.4	0.6	2.7
Fore Phalanges	Unossified	5.2	2.7	4.3	1.3
Femur	Incomplete Ossification	3.2	3.4	13.0*	0.0
	Bent	0.0	1.4	2.5	0.0
Tibia /Fibula	Incomplete Ossification	2.6	2.7	11.7*	8.0
Metatarsal bones	Unossified	4.5	1.4	13.6*	10.7
Hind Phalanges	Unossified	7.1	20.9*	22.2*	2.7
Ileum	Incomplete Ossification	11.7	4.7	1.2	0.0
Ischium	Incomplete Ossification	4.5	2.7	9.3	0.0
Pubis	Incomplete Ossification	3.9	2.7	11.1*	0.0

^a = (number of dams)

* Significant difference compared to the control group ($P < 0.05$, chi-square test).

Supernumerary and misshapen ribs, unossified sternebra, and short femur occurred in 0.6% of the control animals, but were not observed in the glyphosate groups.

The general occurrence of incomplete ossification and bipartite sternebra was higher in the 500 mg/kg glyphosate group; humerus incomplete ossification and zygomatic fusion were only noted in this group (rates of 2.7% and 0.7%, respectively). Some skeletal alterations occurred only in fetuses from dams treated with 750 mg/kg glyphosate. The rate of misshapen sternebra was 11.7% ($P < 0.001$, chi-square test, compared to the other groups), and the rate of bent ileum and agenesis of fore paw phalanges were 2.5% and 1.9%, respectively ($P > 0.05$, chi-square test). Parietal extra ossification, occipital and cervical incomplete ossification, short mandible, fused ribs and bent clavicle were observed in 1.2% of the animals ($P > 0.05$, chi-square test). Misshapen zygomatic, misaligned or dumbbell cervical vertebrae, wavy sternum, irregular clavicle, misshapen clavicle, misshapen scapula, radius/ulna incomplete ossification, unossified metacarpal and bent femur occurred at a rate of 0.6% ($P > 0.05$, chi-square test).

Misshapen atlas and other cervical and thoracic vertebrae appeared in 1.3% of the fetuses from 1,000 mg/kg glyphosate-treated dams ($P > 0.05$, chi-square test) but were not observed in any other group.

Table 3 presents the percentage of skeletal alterations that occurred in two or more of the groups analyzed in this study. Bipartite interparietal and unossified hind phalanges were significantly more frequent in the 500 and 750 mg/kg glyphosate groups ($P < 0.001$, chi-square test, compared to control). Incomplete ossification of squama and absence of caudal vertebrae appeared more frequently in the 750 and 1,000 mg/kg glyphosate groups ($P < 0.001$, chi-square test, compared to control).

4 Discussion

According to Palmer (1977), almost any type of malformation ever recorded can occur sporadically in any given species, and more than one cause can generate a malformation. Moreover, the definitions of normality and abnormality can be extremely questionable. Consequently, discrepancies among investigators, already evident with obvious malformations, become greatly magnified with less important malformations. As a result, extra information gained by recording more subtle changes can actually hinder the interpretation of data. Furthermore, the nomenclature used to describe observations of fetal and neonatal morphology often varies considerably among laboratories, investigators and textbooks in the fields of teratology and developmental toxicology. In this study we evaluated the toxicity of glyphosate-Roundup[®] as commercialized in Brazil, based on the International Federation of Teratology Societies parameters (Wise et al., 1997) and the atlas of rat skeletal anomalies (Chahoud, 1997).

Lork (1977) classified the deviations from normal found on the skeleton as individual variations of normal, developmental retardations of the skeleton, and malformations. The individual variations of normal consist of lack of development of the ossification centers to be expected at cesarean section, such as the ossification centers of the terminal phalanges in rats. Developmental retardations consist of missing ossification centers in bilateral bone structures or the presence of shape and size clearly matching an earlier stage of development. Larger fontanelles and incomplete development of skull bones belong to this class. Malformations consist of the absence of important bones or parts of bones, shortenings, bendings, asymmetry, fusions or clefts.

Signs of delayed ossification in several body structures such as skull, sternebra and limbs (especially hind paw), were observed in the groups receiving all glyphosate-Roundup[®] doses. Although in the absence of treatment retarded ossification can be related to body weight and/or size (Souza et al., 1997), in this study there was a clear increase in the frequency of this alteration in the glyphosate-Roundup[®]-treated groups. However, this alteration was not related to body weight or size. The occurrence of multiple alterations was significantly higher in the treated groups compared to control, but did not show a dose-related pattern. However, developmental retardations of the skeleton such as incomplete ossification of skull and enlarged fontanel showed a dose-related response.

According to the WHO (1994), the administration of a dose level equivalent to 3,500 mg/kg per day of technical glyphosate to pregnant Charles River COBS CD rats from day 6 to day 19 of pregnancy determined an increased incidence of soft stools, diarrhea, breathing rattles, red nasal discharge and reduced activity, increased maternal mortality (24% during the treatment period), growth retardation, increased incidence of early resorptions, decrease of total number of implantations and viable fetuses, and increased number of fetuses with reduced ossification of sternebra (WHO, 1994). Although the precise toxicity mechanism is yet to be clarified, it is known that maternal exposure to agrochemicals such as glyphosate during pregnancy induces a variety of functional abnormalities in the specific activity of the liver enzymes, and in the heart and brain of the pregnant rats and their fetuses (Daruich et al., 2001).

The maternal toxicity observed in this study shows that the formulation commercialized in Brazil is more toxic than the technical glyphosate, as determined by Adam et al. (1997) and Dallegre et al. (2002). Both studies suggested that the surfactant present in the commercial formulations is more toxic than glyphosate. Despite the reproductive signs such as early resorptions, reduced implantation sites and reduced number of viable fetuses related by the WHO (1994) for exposure to 3,500 mg/kg technical glyphosate, in the present study these effects were not observed at the 1,000 mg/kg of glyphosate in the commercial formulation. Probably, because the other components of the formulation directly affected the systemic organ of the dams, the reproductive

effects did not show in this study at the 1,000 mg/kg of glyphosate. However, a significant increase in the frequency of fetuses exhibiting skeletal alterations was observed in all glyphosate-Roundup[®]-exposed groups, indicating that these alterations were not directly associated with maternal toxicity and that the effects were probably related to fetal skeletal development.

The developmental retardations of the skeleton reported in the present study shows that the effect of glyphosate-Roundup[®] was more marked than that of technical glyphosate (WHO, 1994). The higher maternal toxicity reported here in comparison to that of technical glyphosate is probably related to the presence of other components in the commercial formulation, such as the surfactant polyoxyethyleneamine (Adam, 1997; Dallegrove, 2002). Despite the fact that the doses used in this study would never be expected to correspond to human exposure levels under normal circumstances, as reported by Williams *et al.* (2000) for glyphosate and polyoxyethyleneamine in adults or children (margins of exposure = 5,420, 3,370 and 461, 577, respectively), this results shows that the commercial formulation poses an increased potential risk for the rat skeletal system. To better understand this fact, additional studies should be carried out to determine the mechanisms of effects of the commercial formulation on the skeletal system of the fetuses, since humans are also potentially exposed to this commercial formulation.

References

- Adam, A., Marzuki, A., Rahman, H.A., Aziz, M.A., 1997. The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats. *Vet. Hum. Toxicology*. 39:3, 147-151.
- Allen, D.G., Pringle, J.K., Smith, D.A., Pasloske, K., 1998. Handbook of veterinary drugs. Lippincott-Raven, Philadelphia, U.S., pp. 597-694.
- Atkinson, D., 1985. Toxicological properties of glyphosate: a summary. In: Grossband, E., Atkinson, D. (Eds). *The herbicide glyphosate*. Butterworths, London, England, pp. 127-133.
- Chahoud, I., 1997. Atlas of external and skeletal anomalies in rats. CD-room. Leipzig, Berlin.
- Dallegrove, E., Mantese, F.D.G., Dalsenter, P.R., Langeloh, A., 2002. Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. *Online Journal of Veterinary Research*. 1, 29-36.**
- Daruich, J., Zirulnik, F., Gimenez, M.S., 2001. Effect of herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environmental Research*. 85 (section A), 226-231.
- EPA – Environmental Protection Agency, 1996. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment – EPA/630/R-96/009, Washington, U.S., pp. 1-163.
- Lorke, D., 1977. Evaluation of skeleton. In: Neubert, D., Merker, H.J., Kwasigroch, T.E. (Eds), *Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 52-71.
- Palmer, A.K., 1977. Incidence of Sporadic malformations, anomalies and variations in random bred laboratory animals. In: Neubert, D., Merker, H.J., Kwasigroch, T.E. (Eds), *Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 52-71.
- Pau mgarten, F.R.J., De-Carvalho, R.R., Souza, C.A.M., Madi, K., Chahoud, I., 1997. Study of the effects of β -myrcene on rat fertility and general reproductive performance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31, 955-965.
- Sawada, Y., Nagai, Y., Ueyama, M., et al., 1988. Probable toxicity of the surface active agent in commercial herbicide containing glyphosate [letter]. *Lancet*. p. 289.
- Smith, E.A., Oehme, F.W., 1992. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Vet. Hum. Toxicol*. 34:6, 531-543.
- Taylor, W.R., VanDyke, G.C., 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, 9:2, 107-119.
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31, 117-165.
- Wise, L.D., Beck, S.L., Beltrame, D., et al., 1997. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). *Teratol*. 55, 249-292.
- WHO –World Health Organization, 1994. Glyphosate. *Environmental Health Criteria*. 159, pp. 1-177.
- WHO –World Health Organization, 2001. Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. *Environmental Health Criteria*. 225, pp. 1-187.

Acknowledgments

We thank Maria Beatriz Cardoso Ferreira for technical assistance. This work was partly supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

ANEXO 2

Artigo sobre Toxicidade Oral Aguda

Oral acute toxicity of glyphosate in Wistar rats

Publicado no Online Journal of Veterinary Research desde 11 de março de 2002.

©1996-2002 All Rights Reserved. Online Journal of Veterinary Research. You may not store these pages in any form except for your own personal use. All other usage or distribution is illegal under international copyright treaties. Permission to use any of these pages in any other way besides the before mentioned must be gained in writing from the publisher. This article is exclusively copyrighted in its entirety to OJVR publications. This article may be copied once but may not be, reproduced or re-transmitted without the express permission of the editors.

OJVRTM

Online Journal of Veterinary Research©

Volume 1: 29-34, 2002.

Oral acute toxicity of glyphosate in Wistar rats

Dallegrave E^a, Mantese FD^a, Dalsenter PR,^b Langeloh A^a

^a Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil. ^bDepartment of Pharmacology, Instituto de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brazil. Address for correspondence: Eliane Dallegrave, Mestre em Ciências Veterinárias, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite / 500, sala 202, 90046-900 - Porto Alegre/RS. Brasil. Email: elianed@vortex.ufrgs.br

ABSTRACT

Dallegrave E, Mantese FD, Dalsenter PR, Langeloh A: Oral acute toxicity of glyphosate in Wistar rats, Online Journal of Veterinary Research 1:29-34, 2002 The acute toxicity of glyphosate (N-phosphonomethylglycine with the surfactant polyoxyethyleneamine: Roundup®) was determined 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours after the oral administration of 1, 2, 3 or 4g/kg to Wistar rats. Each animal was observed for immediate toxicity up to 12h and for death up to 24h. Signs of toxicity included salivation, diarrhea, gasping, blood-stained nose discharges and seizures. Post mortem examination showed lung hyperemia and liver congestion. The oral acute LD50 was found to be 2.31g/kg (95%confidence limits = 1.81 – 2.95) in Wistar rats, a value 54% lower than that reported in the literature (> 5g/kg).

KEYWORDS: Glyphosate; N-phosphonomethylglycine; polyoxyethyleneamine; DL₅₀; rats; Acute toxicity; Roundup®.

INTRODUCTION

The herbicide Roundup® is a water-based product which contains glyphosate (N-phosphonomethylglycine) as the active ingredient and polyoxyethyleneamine (POEA) as the surfactant agent (Menkes *et al* 1991). Glyphosate is marketed as a non-selective, broad spectrum, post-emergence herbicide, used to control weeds in emerged grasses, broad-leaf weeds, pastures and cultures as rice, corn and soy (Smith and Oehme 1992). Numerous acute toxicity studies have been performed to determine LD50 values of glyphosate and herbicide formulations containing this active ingredient (WHO 1994). The oral acute LD50 in rats of the glyphosate and/or Roundup® formulation used in United States has been reported to be greater than 5g/kg (WHO 1994). This value suggests that glyphosate and its formulations have minor toxicity by oral administration (WHO 1994). However, the formulation of Roundup® varies in different countries. The commercial product marketed in Brazil contains glyphosate 36% and polyoxyethyleneamine 18%. Teratogenicity studies [segment II (EPA 1996)] previously developed in our laboratory using this Roundup® formulation administered to pregnant Wistar rats, showed that 50% of the dams treated orally with 1g/kg/day died between treatment days 2 and 9(unpublished data). The aim of the present study was to determine the acute LD50 of glyphosate-Roundup® as marketed in Brazil administered orally to Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Adult male and female Wistar rats bred at our own Department were used, in accordance with the rules of the Ethics and Experimental Animals Committee. All animals were individually housed in polyethylene cages, with sawdust bedding. Animals were maintained in a colony room with temperature of $22 \pm 2^\circ$ C, controlled humidity and 12h-light/dark cycle. Adult rats (90 days old, 200-280g), were fasted overnight, and provided free access to water. Five groups of 14 animals (7 males and 7 females) were treated orally (1.1ml/100g body weight) with water or 1, 2, 3 or 4g/kg of glyphosate. The various solutions of the Roundup® formulation (lot: BS 1096/98 – 36% glyphosate and 18% w/v polyoxyethyleneamine) were prepared by addition of appropriate volumes of distilled water.

Each animal was observed for one minute at 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12h after dosing, for the presence of respiratory, digestive and neurological alterations. Moreover number of deaths at 24h were noted. Animals that died within 12h of administration were immediately necropsied, and analyzed for macroscopical alterations in lungs, liver and kidneys.

Data are shown as cumulative frequency of death and/or toxicity signs. The LD50, 95% confidence limits and correlation index were calculated by the Litchfield and Wilcoxon method (computer software: LETAL.EXE, US. 1.3. FKS, 1991). Statistical analysis for toxic effects (salivation, diarrhea, gasping, blood-stained nose discharges and seizures) was done by chi-square test. Statistical significance was set at $P < 0.05$ (Zar 1999).

RESULTS

Salivation, diarrhea, blood-stained nose discharges and seizures were the signs of toxicity observed only in glyphosate treated groups (Table 1).

Table 1 shows that in controls, two rats exhibited gasping after oral administration and other controls did not exhibit any abnormality. In rats treated with 1g/kg glyphosate, gasping was observed at 2h in 21.4% followed by diarrhea in 64.3% of the animals. Diarrhea was most frequent in this group ($P = 0.003$). Blood-stained nose discharges occurred in 14.3% of the animals. Immediately after 2g/kg dose administrations, salivation occurred in 21.4% and gasping in 35.7% increasing to 50% gasping at 4, 10 and 12h ($P < 0.001$). Diarrhea occurred in 30.8%, reaching 60.0% at 8h ($P = 0.004$). Blood-stained nose discharges and seizures were observed in 7.7% reaching 20% by 4h.

Table 1. Toxicity signs following oral administration of glyphosate-Roundup® or distilled water to Wistar rats

Dose (g/kg)	Time (hours)						
	0	2	4	6	8	10	12
Salivation							
0	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
1	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
2	3/14	3/13	3/10*	1/10	2/10	0/10	0/10
3	5/14*	3/13	2/13	1/12	0/12	1/12	0/12
4	7/10*	3/09*	2/06*	0/06	0/06	1/05	1/05
Diarrhea							
0	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
1	0/14	2/14	6/14*	6/14*	9/14*	8/14*	8/14*
2	0/14	4/13*	5/10*	5/10*	6/10*	6/10*	6/10*
3	0/14	3/13	3/13	3/12	4/12*	3/12	3/12
4	0/10	1/09	1/06	2/06*	2/06*	2/05*	2/05*
Gasping							
0	0/14	2/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
1	3/14	1/14	1/14	1/14	1/14	2/14	2/14
2	5/14*	6/13*	5/10*	1/10	3/10*	5/10*	5/10*
3	5/14*	5/13*	4/13*	1/12	2/12	3/12	3/12
4	5/10*	5/09*	4/06*	1/06	1/06	2/05*	2/05*
Blood-stained nose discharges							
0	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
1	0/14	0/14	0/14	0/14	2/14	2/14	2/14
2	0/14	1/13	2/10	0/10	1/10	1/10	1/10
3	0/14	1/13	1/13	1/12	1/12	1/12	1/12
4	0/10	1/09	0/06	0/06	0/06	1/05	1/05
Seizures							
0	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
1	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
2	0/14	1/13	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10
3	0/14	0/13	1/13	0/12	0/12	0/12	0/12
4	0/10	0/09	2/06*	0/06	0/06	0/05	0/05

Values indicate the number of animals with the toxic effect/total number of animals remaining alive.

N= 14.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$) by chi-square test.

Rats given 3g/kg, 35.7% exhibited salivation and gasping immediately after oral administration ($P = 0.03$). Diarrhea appeared in 23.1% at 2h, reaching 33.3% by 8h ($P = 0.03$). Rats treated with 4g/kg glyphosate exhibited salivation (70%) and gasping (50%) immediately ($P = 0.002$ and $P = 0.008$, respectively) and also exhibited blood-stained nose discharges (11.1%) and seizures (33.3%) ($P = 0.03$).

Death occurred in all glyphosate dose-groups 30min to 24h (Table 2).

Table 2. Cumulative death during the period of 24h following the oral administration of glyphosate-Roundup® or distilled water to Wistar rats.

Dose (g/kg)	Time (hours)								Cumulative death in 24h (%)
	0	2	4	6	8	10	12	24	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	1	7,1
2	0	1	4	4	4	4	4	5	35,7*
3	0	1	1	2	2	2	2	7	50,0*
4	4	5	8	8	8	9	9	13	92,9*

Values indicate the number of dead animals. N = 14.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$) by chi-square test.

In the 1g/kg glyphosate dose-group, one rat died, while 5 died in the 2g/kg glyphosate dose-group. The percentage of death that occurred in the groups treated with glyphosate 2, 3, and 4 g/kg were 35.7, 50.0, and 92.9%, respectively and were significantly different from control ($P = 0.03$, 0.008 and 0.0003, respectively). No Sex differences were seen in experimental groups for all variables evaluated.

Post mortem examination showed lung hyperemia and liver congestion in all animals treated with glyphosate. The oral acute LD50 calculated for glyphosate (Roundup®) was 2.31g/kg, (95% confidence limits: 1.81 – 2.95) and the correlation index was 0.948.

DISCUSSION

The results showed that the oral acute toxicity of glyphosate (Roundup® formulation commercialized in Brazil) was 54% lower than those previously reported by others (WHO 1994; referring to unpublished technical reports from Bio/Dynamics Inc., 1988 and NOTOX 1987; LD50 oral acute being > 5 g/kg). Toxic signs were salivation, diarrhea, gasping, blood-stained nose discharges and seizures. Salivation and gasping appeared initially followed by diarrhea, blood-stained nose discharges and seizures in some rats, with increasing frequency with higher doses of glyphosate.

According to Bababunmi *et al* (1978) and Olorunsogo and Bababunmi (1980), the administration of glyphosate by oral or intraperitoneal route caused severe stress, increased respiration, elevated rectal temperatures, and occasional asphyxia and seizures in mice and rats. Lung hyperemia was a common lesion observed in the glyphosate groups. The primary mechanism of the acute glyphosate toxicity was likely to be an uncoupling of oxidative phosphorylation in rat mitochondria. For the same researchers (Bababunmi *et al* 1978), the median lethal dose of glyphosate was 4.704g/kg in rats, 49% higher than that found in this study.

Acute toxicity studies vary considerably between laboratories, rats strain, age, gender, however, other factors are to be considered such as the commercial formulation with different concentrations of surfactant. Adam *et al* (1997) determined the oral and intratracheal toxicity of Roundup® and its components to rats. The oral administration of polyoxyethyleneamine-POEA (1g/kg), mixture of glyphosate (2g/kg) + POEA (1g/kg), or Roundup® (containing 2g/kg glyphosate and 1g/kg POEA) produced diarrhea and blood-stained nose discharges. In the group that received 2g/kg glyphosate, only transient diarrhea was observed. Both POEA and glyphosate caused lung hemorrhages and lung epithelial cell damage. Death was only seen in the POEA group after 24h. The authors suggested that the polyoxyethyleneamine and preparations that contained POEA were more toxic than glyphosate. The results agree with those reported by Adam *et al* (1997) and showed that the oral acute toxicity of glyphosate-Roundup® formulation to Wistar rats was highest than the glyphosate alone. According to Sawada *et al.* (1988), the oral LD50 of polyoxyethyleneamine (POEA) falls within the range of 1 to 2g/kg.

The proportion of glyphosate to surfactant in Roundup® formulation varies in different countries or regions. In Asia, Roundup® is available as 41% glyphosate and 15-18% POEA, and in North America the concentrated product contains 18% glyphosate and 7% POEA (Martinez *et al* 1990). In Brazil, Roundup® formulation contains glyphosate 36% and POEA 18%. Tominack (2000) calls attention to the need of evaluating other ingredients formulated along with the active ingredient in pesticides. For example, surfactants are nearly universally present in herbicide formulations or added prior to its application. In the United States, the strategy of the Environmental Protection Agency has been to categorize currently used formulation ingredients into four lists based on their toxicology profiles. This suggests that other ingredients, like surfactants, needed a careful evaluation for its potential toxicity, either alone or as formulations. Accordingly, the present study showed that Roundup® glyphosate formulation used in Brazil is more toxic than previously reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Ph.D. Maria Beatriz Cardoso Ferreira for technical assistance and Ph.D. Elaine Elisabetsky for English revision. This work was partly supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) / Brasil.

REFERENCES

- Adam A, Marzuki A, Rahman HÁ and Aziz MA (1997), *The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats*, Vet. Human Toxicol. 39 p 147-151
- Bababunmi EA, Olorunsogo OO, Bassir O (1978), *Toxicology of glyphosate in rats and mice*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 45 p 319-320
- EPA-Environmental Protection Agency (1996), *Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment – EPA/630/R-96/009*, p 1-162
- Litchfield JT, and Wilcoxon F (1987), *Confidence limits of ED₅₀*, In: Tallarida RJ and Murray RB (1987), *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*, Springer-Verlag, New York, p 153-166
- Martinez TT, Long WC, Hiller H (1990), *Comparison of the toxicology of the herbicide Roundup by the oral and pulmonary routes of exposure*, Proc. West Pharmacol. Soc. 33 p 193-197
- Menkes DB, Temple WA and Edwards IR (1991), *Intentional self-poisoning with glyphosate-containing herbicides*, Hum. Exp. Toxicol. 10 p 103-107
- Olorunsogo OO, Bababunmi E A (1980), *Inhibition of succinate-linking reduction of pyridine nucleotide in rat liver mitochondria "in vivo" by N-(phosphonomethyl)glycin*, Toxicol. Lett. 7 p 149-152
- Sawada Y, Nagai Y, Ueyama M *et al* (1988), *Probable toxicity of the surface active agent in commercial herbicide containing glyphosate [letter]*, Lancet. p 289
- Smith EA and Oehme FW (1992), *The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review*, Vet. Human Toxicol 34 p 531-543
- Tallarida RJ and Jacob LS (1987), *Quantal dose-response: probits* In: Tallarida RJ and Murray RB (1987), *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*, Springer-Verlag, New York, p 31-35

Tominack RL (2000), *Herbicide formulations*, Journal of Toxicology–Clinical Toxicology 38 p 129-135

WHO-World Health Organization (1994), *Glyphosate*, Environmental Health Criteria 159 p 1-177

Zar JH (1999), *Biostatistical analysis*, Prentice Hall, New Jersey, p 486-515

©1996-2002 All Rights Reserved. Online Journal of Veterinary Research. You may not store these pages in any form except for your own personal use. All other usage or distribution is illegal under international copyright treaties. Permission to use any of these pages in any other way besides the before mentioned must be gained in writing from the publisher. This article is exclusively copyrighted in its entirety to OJVR publications. This article may be copied once but may not be, reproduced or re-transmitted without the express permission of the editors.
