



SETAC – Brazil

Influência do Fenarimol no Desenvolvimento Animal e Reprodução em Ratos

V. CASTRO,^{1*} S. SCRAMIN¹ & M. MELO²

¹Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Ecotoxicologia, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

RESUMO

A busca de indicadores de efeitos devido à exposição de organismos não-alvo a fungicidas vem se intensificando. Atualmente, as alterações bioquímicas e as relacionadas a parâmetros do desenvolvimento estão entre as medidas de eventos mais estudados como possíveis indicadores na dependência da ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento, já que muitos desses produtos alteram vários aspectos do sistema reprodutivo. Aos indicadores usados tradicionalmente como porcentagem de fertilidade, abortos e natimortos, foram acrescentados outros parâmetros relativos ao desenvolvimento físico reprodutivo (dia médio de descida do testículo e abertura de vagina), além do estabelecimento de método *in vitro* para avaliação da possível interferência dos pesticidas na atividade da CYP19 aromatase, que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos. Neste trabalho procurou-se avaliar os possíveis efeitos do fungicida Fenarimol após exposição perinatal, uma vez que o transporte placentário do Fenarimol aumenta a partir do 18º dia da prenhez e é excretado pelo leite materno. As fêmeas de ratos Wistar foram expostas a 150 ou 300 mg.kg⁻¹ de Fenarimol (S.C.) durante o período inicial ou final da prenhez ou durante os seis primeiros dias da lactação. As taxas de viabilidade ao nascimento (VA) e ao desmame (VD) foram observadas conforme: VA = 100 × (número de filhotes natimortos/nascidos vivos) e VD = 100 × (número de filhotes desmamados/nascidos vivos). Todos os filhotes tiveram seu desenvolvimento físico reprodutivo acompanhado até o 26º dia de vida. As duas doses estudadas, apesar de terem afetado de forma pontual os parâmetros físicos observados, não demonstraram clara evidência de efeito dose-resposta ao Fenarimol dentro da mesma fase (prenhez e lactação). Tais observações enfatizam a importância de estudos prospectivos desses produtos, com o uso de indicadores que evidenciem alterações sutis. A obtenção de dados de alvos mais sensíveis poderá contribuir para o aprimoramento dos instrumentos com os quais os riscos possam ser minimizados em relação à saúde ambiental. Assim é que, para a avaliação da provável interferência do fungicida na atividade da aromatase, está sendo adaptado o método no qual são utilizados microssomos de fígado de ratos como fonte da enzima a ser avaliada em presença do Fenarimol.

Palavras-chave: Fenarimol, ratos, bioindicadores, desenvolvimento animal, reprodução.

ABSTRACT

Fenarimol effects on the animal development and rats reproduction

The search of biomarkers of effects due to the non-target organisms' exposure to fungicides comes intensifying itself. Nowadays the alterations of biochemical and of developmental parameters are among the measures of events most studied as possible biomarkers depending of the critical periods in the development; since many of these products alter several aspects of the reproductive system. Beyond the biomarker used traditionally as fertility percentage, abortions and still-born, were added other parameters related to the reproductive physical development (average day of testicle descent and vagina opening); and *in vitro* establishment of the method for evaluation of the possible pesticides interference in CYP19 aromatase activity, that catalyzes the conversion of androgens in estrogens. In this work, it was evaluate the possible effects of the fungicide Fenarimol after perinatal exposure, since the fenarimol placental transport increases from the 18th gestational day and is excreted via maternal milk. The females Wistar rats were exposed to 150 or 300 mg.kg⁻¹ of Fenarimol

*Corresponding author: Vera Castro, e-mail: castro@cnpma.embrapa.br.

(S.C.) during the initial or final gestational period or during the six first days of suckling. The birth (VA) and weaning (VD) viability were observed as: $VA = 100 \times (\text{number of stillborn/born alive})$ and $VD = 100 \times (\text{number of weaned/born alive})$. All pups had its reproductive physical development accompanied till the 26th life day. Both studied doses, in spite of having affected the observed physical parameters in a punctual way, did not cause clear evidence of a dose-response effect to Fenarimol within the same phase (gestation and lactation). Such observations emphasize the importance of these products prospective studies, with the biomarkers use that may evidence subtle alterations. The obtained data of more sensitive targets will be able to contribute for the amelioration of the methods and polices that are able to minimize the risks regarding the environmental health. Thus, it is being adapted the method for the evaluation of possible fungicide interference in aromatase activity, in which are used mice liver microsomes as enzyme source to be evaluated at the presence of Fenarimol.

Key words: Fenarimol, rats, biomarkers, animal development, reproduction.

INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da utilização de produtos químicos introduziu o conceito de análise de risco dentro da avaliação de impacto ambiental. O risco refere-se à probabilidade de um organismo ou uma determinada população sofrer dano. Esta avaliação é realizada, quanto à saúde ambiental, identificando órgãos ou sistemas afetados que podem levar a enfermidades e desequilíbrios e estabelecendo as condições de exposição e dose ao agroquímico que levam ao dano e/ou enfermidade. Os agroquímicos podem ocasionar prejuízos ao desenvolvimento embrionário, provocando aborto ou deficiências na formação do feto (Nurminen, 1995). O estudo do efeito desses produtos durante a fase de lactação também é importante devido à possibilidade de sua eliminação por esta via e, conseqüentemente, de expor o filhote ao mesmo. Essa exposição pode levar a alterações fisiológicas e comportamentais, uma vez que ao nascer os animais não possuem todos os sistemas fisiológicos maduros (Thiel *et al.*, 1994; Hällén *et al.*, 1995; Vogel & Hagler, 1996; Pohl *et al.*, 1998).

Para ajudar a determinar os riscos através da exposição a substâncias químicas em humanos a USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) vem requerendo freqüentemente tipos específicos de testes toxicológicos, usualmente em ratos e camundongos. Muitos agentes ambientais (entre eles os pesticidas) afetam o sistema reprodutivo, e os testes confirmam informações de seus efeitos sobre vários aspectos deste, incluindo gestação, parto, lactação, desmame, crescimento e desenvolvimento da prole (Claudio *et al.*, 1999). A exposição a agroquímicos pode ocasionar alterações na modulação do sistema endócrino de animais silvestres e do ser humano, que resultariam em efeitos prejudiciais reprodutivos e na indução de certos tipos de câncer. Um dos possíveis mecanismos de ação para esse efeito é a interferência com a síntese de esteróides, mais precisamente com a enzima CYP19 aromatase, que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos, sendo responsável pelo balanço homeostático entre o que tradicionalmente são considerados hormônios femininos e masculinos. Em vertebrados, a aromatase está presente no cérebro, e o *imprinting* perinatal é governado por hormônios esteróides no cérebro, em desenvolvimento.

Em alguns estudos foi observado que o transporte placentário de Fenarimol ocorre ao redor de 0,1% da dose administrada, correspondente a 350 mg.kg^{-1} na ração do dia 0 aos dias 14, 15, 16, 17 ou 18 quando o [¹⁴C] Fenarimol (8,2 μCi) foi administrado em dose única, embora a partir do 18^o dia da prenhez sua taxa de concentração seja 1,0. A sua concentração no leite materno alcança concentrações 3 a 5 vezes aquelas encontradas no plasma materno. Após a administração de [¹⁴C] em ratas no quinto dia de lactação, aparecem altas concentrações de radioatividade no hipotálamo dos neonatos, que aumentam rapidamente e decrescem mais lentamente. Essas altas concentrações do fungicida coincidem com a época do desenvolvimento do comportamento sexual (Hirsch *et al.*, 1986).

Tais observações, em relação ao desenvolvimento e/ou expressão do sistema reprodutor masculino, enfatizam a importância do estudo prospectivo dos efeitos desse fungicida. Assim, a avaliação perinatal é importante para o desenvolvimento do estudo do desenvolvimento animal e da teratologia (Nelson, 1991).

O objetivo do trabalho foi avaliar alguns parâmetros reprodutivos em ratas expostas ao Fenarimol e avaliar alguns possíveis efeitos no desenvolvimento físico de ratos expostos perinatalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados e exposição ao Fenarimol

Os animais utilizados foram ratos Wistar, mantidos em condições padronizadas de biotério. Para o acasalamento, cada macho foi colocado com duas fêmeas de ciclo estral regular. A presença de espermatozoides no lavado vaginal das ratas foi considerada como indicativa do 1^o dia de prenhez. Foi anotado o ganho de peso de cada fêmea durante a prenhez e dos filhotes do 1^o até o 23^o dia de vida. As fêmeas foram expostas durante o início (1-6 dias; Pri) ou o final da prenhez (15-21 dias, Prf) ou os seis primeiros dias da lactação (Lac), por via subcutânea, nas doses fracionadas de princípio ativo de 150 ou 300 $\text{mg.kg}^{-1}/\text{d}$ de Fenarimol, Rubigan®, Dow AgroSciences.

Número de animais utilizados

Foram usadas 10 fêmeas para cada grupo experimental. Na análise do desenvolvimento físico foram utilizados todos os filhotes de cada ninhada.

Parâmetros analisados

Foram avaliadas as taxas de viabilidade ao nascimento e ao desmame das proles conforme descrito: VA = $100 \times$ (número de filhotes natimortos/nascidos vivos) e VD = $100 \times$ (número de filhotes desmamados/nascidos vivos). Os filhotes foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento físico. A presença ou ausência dos parâmetros observados deu-se de acordo com a idade do filhote e por determinado número de dias consecutivos até o aparecimento do mesmo em todos os filhotes avaliados (Alder, 1983; Hossain *et al.*, 1999). Foram anotados, por filhote, os dias respectivos em que ocorreram a abertura de vagina (20 a 26 dias de vida) e a descida dos testículos (20 a 26 dias de vida).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de viabilidade ao nascimento e ao desmame das proles das fêmeas expostas ao Fenarimol ou não (controle) estão descritas na Tabela 1. Os resultados desta avaliação quanto ao potencial de toxicidade do fungicida são registrados em porcentagem.

A taxa ao nascimento foi calculada para verificar a possibilidade de efeitos observados nos testes devido a problemas na prenhez das ratas. Verificamos, dos resultados obtidos, que há efeito do fungicida na curva de sobrevivência dos filhotes. Quantidades distintas de Fenarimol não interferem na curva de sobrevivência dos filhotes, ou seja, o número de ratos vivos cujas ninhadas foram expostas na mesma fase, porém submetidas a doses distintas de Fenarimol, é estatisticamente similar. Períodos distintos de exposição interferem na curva de sobrevivência dos filhotes,

ou seja, o número de ratos vivos cujas ninhadas foram tratadas com uma mesma dose, porém em fases distintas, é estatisticamente diferente. Os dados presentes são uma confirmação da sensibilidade dos animais no período perinatal a este fungicida, que pode ser excretado no leite (Hirsch *et al.*, 1986).

Na Tabela 2 estão descritos os resultados obtidos dos parâmetros de desenvolvimento físico dos filhotes, abertura de vagina e descida dos testículos, sendo estes parâmetros observados em todos os filhotes das ninhadas. São apresentados os dias médios e respectivos desvios-padrão para que 100% dos filhotes de cada ninhada ($n = 10$) pertencentes a um mesmo grupo apresentem o parâmetro estudado.

Apesar da diversidade de estudos existentes, o impacto dos pesticidas na saúde nem sempre é bem conhecido. Sabe-se, por exemplo, que a exposição de fêmeas a pesticidas durante a fase reprodutiva pode levar a alterações fetais com reflexos físicos e comportamentais, na dependência da ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal, durante a prenhez e imediatamente após o nascimento.

O Fenarimol produz a inibição da atividade da aromatase CYP19, com conseqüente prejuízo da síntese de estradiol, concorrendo para falhas na diferenciação sexual cerebral de machos (Hirsch *et al.*, 1987; Vinggaard *et al.*, 2000). A aromatase citocromo P450 é produzida pelo gene CYP19. Um dos principais passos no desenvolvimento e diferenciação sexual no cérebro é a conversão intraneuronal de andrógenos em estrógenos. Esse passo é catalisado pela enzima denominada aromatase citocromo P450 (CYP19). Durante o desenvolvimento, a formação local de estrógeno em determinadas regiões cerebrais desempenha importante função no mecanismo através do qual os esteróides sexuais desempenham sua ação neuroendócrina central, influenciando a diferenciação cerebral, a regulação do controle gonadotrófico e o comportamento (Stoffel-Wagner, 1999; Honda *et al.*, 1998). Conseqüentemente, ele pode promover alterações neurocomportamentais e reprodutivas.

Tabela 1 — Avaliação da taxa de viabilidade ao nascimento e ao desmame em ratas ($n = 10$) expostas oralmente ao Fenarimol (150 ou 300 mg.kg⁻¹, S.C.). Os dados são apresentados em porcentagem (teste $\chi^2 - p < 0,05$; * = estatisticamente significativo). São apresentados também a média de dias de duração em dias da prenhez das fêmeas de cada grupo e seus respectivos desvios-padrão.

Grupos	Taxa de viabilidade ao nascimento (%)	Taxa de viabilidade ao desmame (%)	Duração da prenhez (dias)
ConPri	96,67 (3/90)	83,33 (75/90)	21,7 ± 0,95
ConPrf	100,0 (0/85)	97,64 (83/85)	21,7 ± 0,48
ConLac	97,19 (3/107)	85,04 (91/107)	22,0 ± 0,82
FenPri 150	100,0 (0/89)	77,52 (69/89)	22,0 ± 1,15
FenPri 300	98,95 (1/96)	79,16 (76/96)	21,7 ± 0,82
FenPrf 150	96,93 (3/98)	95,91 (94/98)*	21,6 ± 0,70
FenPrf 300	91,14 (7/79)	97,46 (74/79)*	22,0 ± 0,67
FenLac 150	100,0 (0/90)	77,77 (70/90)*	22,7 ± 0,67
FenLac 300	100,0 (0/89)	77,52 (69/89)*	22,3 ± 0,48

Tabela 2 — Desenvolvimento físico e neurocomportamental dos filhotes de fêmeas expostas a 150 ou 300 mg.kg⁻¹ de Fenarimol, S.C. São apresentados os dias médios e respectivos desvios-padrão para que 100% dos filhotes de cada ninhada (n = 10) pertencentes a um mesmo grupo apresentem o parâmetro estudado (teste t de Student – p < 0,05; * = estatisticamente significativo).

Grupos	Média de dias para apresentar a característica avaliada	
	Abertura de vagina	Descida de testículo
ConPri	17,0 ± 0,00	17,2 ± 1,25
ConPrf	17,6 ± 0,92	17,6 ± 0,91
ConLac	17,2 ± 0,98	16,7 ± 1,27
FenPri150	16,0 ± 0,00	16,6 ± 1,02
FenPri300	17,7 ± 0,90	17,5 ± 0,81
FenPrf150	18,6 ± 0,49	18,4 ± 0,49*
FenPrf300	18,0 ± 0,45	17,9 ± 0,70
FenLac150	16,6 ± 1,43	16,2 ± 1,99
FenLac300	17,8 ± 0,60	16,6 ± 1,43

Em relação aos dados obtidos dos parâmetros físicos de amadurecimento sexual, o Fenarimol causou atraso na descida dos testículos quando administrado no final da prenhez. Porém, os dados só apresentaram significância na menor dose. Apesar disso, esse achado indica que a exposição ao fungicida nessa fase do desenvolvimento pode ocasionar prejuízos reprodutivos em longo prazo. Estudos posteriores deverão ser realizados para esclarecer a falta de um efeito dose-resposta evidente. O conhecimento obtido através do uso de protocolos experimentais contendo índices relacionados ao desenvolvimento embriofetal poderá levar a melhores escolhas na prevenção do risco à saúde humana devido ao uso de agrotóxicos (Nurminen, 1995; Nelson, 1991).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDER, S., 1983, Behavioral teratology. In: Q. Zbinden, G. Racagni, V. E. Cuomo & B. Weiss. *Application of behavioral pharmacology in toxicology*. Raven Press, New York, pp. 57-66.
- CLAUDIO, L., BEARER, C. F. & WALLINGA, D., 1999, Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. *American J. of Industrial Med.*, 35: 543-553.
- HALLÉN, I. P., JORHEM, L. & OSKARSSON, A., 1995, Placental and lactational transfer of lead in rats: a study on the lactational process and effects on offspring. *Arch. Toxicol.*, 69: 596-602.
- HIRSCH, K., ADAMS, E., HOFFMAN, D., MARKHAM, J. & OWEN, N., 1986, Studies to elucidate the mechanism of Fenarimol-induced infertility in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 86: 391-399.
- HIRSCH, K., WEAVER, D., BLACK, L., FALCONE, J. & MACLUSKY, N., 1987, Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism for Fenarimol-induced infertility in the male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 91: 235-245.
- HONDA, S., HARADA, N., ITO, S., TAKAGI, Y. & MAEDA, S., 1998, Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252: 445-449.
- HOSSAIN, M., DEVI, P. & BISHT, K., 1999, Effect of prenatal gamma irradiation during the late fetal period on the postnatal development of the mouse. *Teratology*, 59: 133-138.
- NELSON, B., 1991, Evidence for behavioral teratogenicity in humans. *J. Appl. Toxicol.* 11: 33-37.
- NURMINEN, T., 1995, Maternal pesticide exposure and pregnancy outcome. *J. Occupac. Medic.*, 37: 935-940.
- POHL, H., SMITH-SIMON, C. & HICKS, H., 1998, Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: developmental effects. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.*, 28: 55-60.
- STOFFEL-WAGNER, B., WATZKA, M., SCHRAMM, J., BIDLINGMAIER, F. & KLINGMULLER, D., 1999, Expression of cyp19 (aromatase) mRNA in different areas of the human brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 70: 237-241.
- THIEL, R., KOCK, E., ULBRICH, B. & CHAHOUD, I., 1994, Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo- p- dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behavior in Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, 69: 79-86.
- VINGGAARD, A., HNIDA, C., BREINHOLT, V. & LARSEN, J., 2000, Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicology in Vitro*, 14: 227-234.
- VOGEL, G. & HAGLER, M., 1996, Effects of neonatally administered inpridole on adult behaviors of rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 55(1): 155-161.