Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PGCS)

Cristiana Livramento Oliveira Pinto

Perfil inflamatório e oxidativo de testículos e epidídimos de camundongos adultos expostos ao clorotalonil

Uberaba
2026

Cristiana Livramento Oliveira Pinto

Perfil inflamatório e oxidativo de testículos e epidídimos de camundongos adultos expostos ao clorotalonil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientadora: Profª. Drª. Gláucia Eloisa Munhoz De Lion Siervo

Uberaba
2026

Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

P727p

Pinto, Cristiana Livramento Oliveira
Perfil inflamatório e oxidativo de testículos e epidídimos de camundongos adultos expostos ao clorotalonil / Cristiana Livramento Oliveira Pinto. – 2026.
54 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2026
Orientador: Prof. Dr. Gláucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo

1. Testículo. 2. Epididimo. 3. Organoclorado. 4. Estresse oxidativo. 5. Disruptores endócrinos. I. Siervo, Gláucia Eloisa Munhoz de Lion. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.681

Sônia Maria Rezende Paolinelli – Bibliotecária CRB-6/1191

Cristiana Livramento Oliveira Pinto

Perfil inflamatório e oxidativo de testículos e epidídimos de camundongos adultos expostos ao clorotalonil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientadora: Profª. Drª. Gláucia Eloisa Munhoz De Lion Siervo

26 de fevereiro de 2026

Banca Examinadora:

_____
Profa. Dra. Gláucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

_____
Prof. Dr. Wilian de Assis Silveira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

_____
Profa. Dra. Rafaela Pires Erthal Michelato
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Dedico este trabalho a minha amada avó…

AGRADECIMENTOS

À minha avó, dedico esta vitória, pois, sem seus sacrifícios, nada disso teria sido possível. Agradeço por cada conselho, por cada palavra sábia e por estar sempre disposta a ouvir meus infinitos desabafos.

Agradeço também às minhas amigas Deiny e Janaíne, que me incentivaram a ingressar no mestrado, compartilhando experiências e oferecendo apoio constante ao longo dessa trajetória. Da mesma forma, agradeço ao Gabriel, à Nicoly e à Paula, que foram de grande ajuda tanto no biotério quanto na rotina de laboratório, bem como a todas as integrantes do grupo de pesquisa em Reprodução e Desenvolvimento (ReproDevo). A todos vocês, minha eterna gratidão.

Registro ainda meu agradecimento a todos os integrantes do Laboratório de Patologia Geral, pela paciência, pelos ensinamentos e pela convivência, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha querida orientadora, que me recebeu de braços abertos, não há palavras suficientes para expressar o quanto sou grata por todo o incentivo e dedicação. Agradeço pela confiança depositada em mim, pelo tempo investido em minha orientação e pela contribuição inestimável para a construção e o amadurecimento da minha formação acadêmica.

"*I am seeking, i am striving. I am in it with all my heart*"

Vincent Van Gogh

RESUMO

Entre os agrotóxicos consumidos no Brasil, o clorotalonil (CHL) é o quinto ingrediente ativo mais comercializado e o terceiro entre os compostos da classe dos organoclorados. Evidências da literatura demonstram que o CHL é capaz de induzir nefrotoxicidade, carcinogênese, asma, irritação de mucosas e toxicidade reprodutiva. Contudo, ainda são escassos os estudos que investigam os efeitos da exposição a baixas doses de CHL sobre parâmetros reprodutivos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a exposição ao CHL na vida adulta influencia os níveis hormonais, bem como parâmetros oxidativos nos testículos e inflamatórios nos epidídimos de camundongos machos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEUA-UFTM; parecer nº 23/2023). Foram utilizados 24 camundongos machos adultos da linhagem C57BL/6, com idade inicial de 50 dias, distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: controle (CTRL), que recebeu apenas o veículo (água); clorotalonil 1 mg/kg (CHL1); e clorotalonil 10 mg/kg (CHL10). O composto foi administrado via gavagem durante 50 dias consecutivos. Ao final do período experimental, os animais foram pesados e eutanasiados por superdosagem de cetamina e xilazina, via intraperitoneal. Testículos, epidídimos e amostras de sangue foram coletados e processados conforme as técnicas específicas para cada análise. Nos epidídimos, foram quantificadas as citocinas IL-1β, TNF-α, IFN-γ e IL-10 por ensaio imunoenzimático (ELISA). Nos testículos, foram avaliados marcadores de estresse oxidativo (AOPP, MDA, GSH e TEAC) e realizada a análise da expressão gênica relativa dos receptores androgênico (*AR*) e estrogênico alfa (*ER-α*) por RT-qPCR. Além disso, as concentrações séricas de testosterona e estradiol foram determinadas por meio de kits comerciais de ELISA. A exposição ao CHL promoveu redução das citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-10 na região da cabeça do epidídimo. Não foram observadas alterações nos marcadores de dano oxidativo AOPP e MDA. Os níveis de GSH foram reduzidos em ambos os grupos expostos ao CHL, e houve aumento da capacidade antioxidante total (TEAC) no grupo CHL10. A expressão gênica relativa dos receptores *AR* e *ER-α* apresentou aumento no grupo CHL1. Os níveis séricos de estradiol e testosterona aumentaram exclusivamente no grupo exposto à maior dose. Dessa forma, conclui-se que a exposição a baixas doses de clorotalonil altera o perfil antioxidante dos testículos de camundongos adultos, induz uma resposta inflamatória epididimária desregulada e atua como um desregulador endócrino.

Palavras-chaves: Organoclorado, testículo, epidídimo, estresse oxidativo, disruptores endócrinos.

ABSTRACT

Among the pesticides consumed in Brazil, chlorothalonil (CHL) is the fifth most commercialized active ingredient and the third within the organochlorine class. Evidence from the literature demonstrates that CHL is capable of inducing nephrotoxicity, carcinogenesis, allergic dermatitis, asthma, mucosal irritation, and reproductive toxicity. However, studies investigating the effects of low-dose CHL exposure on reproductive parameters remain scarce. Therefore, the present study aimed to evaluate whether exposure to CHL during adulthood influences testosterone and estradiol levels, as well as oxidative parameters in the testes and inflammatory parameters in the epididymis of male mice. The experimental protocol was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Triângulo Mineiro (CEUA-UFTM; approval no. 23/2023). Twenty-four adult male C57BL/6 mice, with an initial age of 50 days, were randomly assigned to three experimental groups: control (CTRL), which received only the vehicle (water); chlorothalonil 1 mg/kg (CHL1); and chlorothalonil 10 mg/kg (CHL10). The compound was administered orally by gavage for 50 consecutive days. At the end of the experimental period, the animals were weighed and euthanized by intraperitoneal overdose of ketamine and xylazine. Testes, epididymides, and blood samples were collected and processed according to the specific analytical procedures. In the epididymides, the cytokines IL-1β, TNF-α, IFN-γ, and IL-10 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In the testes, oxidative stress markers (AOPP, MDA, GSH, and TEAC) were evaluated, and relative gene expression of androgen receptor (AR) and estrogen receptor alpha (ER-α) was assessed by RT-qPCR. In addition, serum testosterone and estradiol concentrations were determined using commercial ELISA kits. CHL exposure resulted in a reduction of TNF-α, IFN-γ, and IL-10 levels in the caput region of the epididymis. No changes were observed in oxidative damage markers AOPP and MDA. Conversely, GSH levels were reduced in both CHL-exposed groups, and total antioxidant capacity (TEAC) was increased in the CHL10 group. Relative gene expression of AR and ER-α was increased in the CHL1 group. Serum estradiol and testosterone levels were increased exclusively in the group exposed to the highest dose, whereas the lower-dose group exhibited hormone concentrations similar to those of the control group. In conclusion, exposure to low doses of chlorothalonil alters the antioxidant profile of the testes in adult mice, induces a dysregulated epididymal inflammatory response, and acts as an endocrine disruptor.

Keywords: Organochlorine, testis, epididymis, oxidative stress, endocrine disruptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração do sistema genital masculino.

Figura 2 - Ilustração do epitélio de um túbulo seminífero.

Figura 3 - Diferença entre o epidídimo de camundongo e o humano.

Figura 4 - Ilustração da regulação dos hormônios sexuais masculinos.

Figura 5 - Progressão de peso de camundongos adultos expostos ao clorotalonil.

Figura 6 - Dosagem das citocinas na região da cabeça e corpo do epidídimo.

Figura 7 - Dosagem das citocinas na região da cauda do epidídimo.

Figura 8 - Dosagem de AOPP e MDA no testículo.

Figura 9 - Dosagem GSH no testículo.

Figura 10 - Dosagem de TEAC no testículo.

Figura 11 - Expressão gênica relativa *AR* e *ER-a* no testículo.

Figura 12 - Dosagem sérica de testosterona e estradiol.

LISTA DE SIGLAS

AChE- Acetilcolinesterase

AMH - Hormônio anti-Mülleriano

AOPP - Produtos de oxidação proteica avançada

AR - receptor de andrógeno

CAT - Catalase

CHL - Clorotalonil

CTR - Controle

DHT - di-hidrotestosterona

DRfA - Dose de Referência Aguda

ELISA - Ensaio imunoenzimático

ER-α - receptor de estrógeno alfa

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FSH - Hormônio Folículo-Estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

GSH - Glutationa reduzida

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

HHG - Hipotálamo–Hipófise–Gonadal

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

IDA - Ingestão Diária Aceitável

LH - Hormônio luteinizante

MDA - Malondialdeído

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa de Avaliação de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato

RIPA - RadioImmunoprecipitation Assay buffer

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TEAC - Capacidade Antioxidante Total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13
2 DESENVOLVIMENTO.....15
2.1 AGROTÓXICOS.....15
2.2 CLOROTALONIL.....16
2.3 SISTEMA GENITAL MASCULINO.....18
2.3.1 Testículo.....20
2.3.2 Epidídimo.....21
2.3.3 Hormônios sexuais.....23
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA GENITAL MASCULINO.....25
2.5 INFLAMAÇÃO NO SISTEMA GENITAL MASCULINO.....27
2.6 DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA NO SISTEMA GENITAL MASCULINO.....28
3 JUSTIFICATIVA.....30
4 HIPÓTESE.....30
5 OBJETIVOS.....30
5.1 OBJETIVO GERAL.....30
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....30
6 METODOLOGIA.....31
6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....31
6.2 COLETA DOS MATERIAIS.....31
6.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO NO EPIDÍDIMOS.....32
6.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO TESTÍCULO.....32
6.4.1 Quantificação de produtos de proteína de oxidação avançada (AOPP).....32
6.4.2 Quantificação de malondialdeído pela técnica TBARS.....33
6.4.3 Quantificação de glutationa reduzida (GSH).....33
6.4.4 Quantificação de capacidade antioxidante total (TEAC).....33
6.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO E ESTRÓGENO ALFA POR RT-qPCR NO TESTÍCULO.....33
6.6 NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL.....34
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....34
7 RESULTADOS.....34
7.1 MASSA CORPORAL.....34
7.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO NO EPIDÍDIMO.....35
7.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO TESTÍCULO.....37
7.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO E ESTRÓGENO ALFA POR RT-qPCR.....40
7.4 NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL.....41
8 DISCUSSÃO.....42
9 CONCLUSÃO.....46
REFERÊNCIAS.....47
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

(CEUA-UFTM).....55

1 INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade até a Idade Moderna, substâncias de diferentes naturezas têm sido utilizadas com o objetivo de otimizar a produção e o armazenamento de alimentos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2024), agrotóxicos são quaisquer substâncias ou misturas de substâncias empregadas para prevenir, destruir ou controlar pragas incluindo insetos, fungos, roedores ou espécies indesejadas de plantas que causam danos à produção e ao armazenamento das safras. No Brasil, a comercialização desses produtos foi intensificada a partir da década de 1960, com forte incentivo estatal, o que levou o país a se tornar atualmente o maior consumidor mundial de agrotóxicos (Carneiro et al., 2015). Embora o impacto econômico positivo desses compostos seja evidente, sua baixa seletividade faz com que muitos apresentem efeitos adversos relevantes à saúde humana, figurando entre as principais causas de morte por intoxicação em determinados países (OMS, 2024).

Uma revisão sistemática demonstrou redução de 50% a 60% na contagem total de espermatozoides entre os anos de 1973 e 2011 (Levine et al., 2017). Estima-se que pelo menos 30 milhões de homens em todo o mundo apresentem problemas de infertilidade, com maiores taxas observadas na África e no Leste Europeu. Entretanto, a ausência de consenso entre os estudos, aliada à utilização de dados provenientes de publicações desatualizadas, dificulta a obtenção de estatísticas globais precisas (Meacham et al., 2007). Atualmente, reconhece-se que tais alterações decorrem, em grande parte, do estilo de vida contemporâneo e da exposição crônica a agentes tóxicos da Era Moderna, entre os quais se destacam os agrotóxicos (Borght; Wyns, 2018).

O clorotalonil (CHL) é um fungicida organoclorado de amplo espectro de ação, cujo mecanismo envolve a inativação de enzimas contendo grupos sulfidrila, bem como a depleção de glutationa e de tióis solúveis celulares, promovendo desequilíbrio do balanço redox no organismo-alvo (Van Scoy; Tjeerdsma, 2014; Vincent; Sisler, 1968). No Brasil, o clorotalonil destacou-se como o quinto ingrediente ativo mais comercializado no período de 2019 a 2022, totalizando 36.845,33 toneladas, além de figurar como o terceiro ingrediente ativo mais utilizado entre os organoclorados, estando presente em 26 produtos formulados (IBAMA, 2022). Evidências na literatura indicam que esse composto pode provocar dermatite, irritação ocular severa, distúrbios gastrointestinais, danos hepáticos, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, além de potencial carcinogênico (Hao et al., 2019). No âmbito da toxicidade reprodutiva, estudos demonstram que o CHL é capaz de inibir o desenvolvimento ovariano em camundongos, reduzir a motilidade espermática, comprometer a espermatogênese *in vivo*, interferir na sinalização do receptor de estrogênio e alterar padrões

de metilação de histonas e do DNA, processos possivelmente interligados às vias estrogênicas e à disfunção espermatogênica (Zhang et al., 2019). Contudo, os efeitos dessa substância sobre o balanço redox e os aspectos inflamatórios de órgãos reprodutivos ainda não estão completamente elucidados.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a exposição ao clorotalonil compromete a morfologia dos testículos e epidídimos (dados não publicados). Dessa forma, para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nessas alterações, torna-se necessária a investigação dos níveis séricos de hormônios sexuais, do balanço redox e do perfil inflamatório desses órgãos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são predominantemente de origem química e considerados como potencialmente tóxicos aos organismos não alvo. Além disso, podem atuar como poluentes ambientais, apresentando capacidade de acumulação em solos e corpos hídricos (Machado et al., 2016).

Essas substâncias são frequentemente classificadas de acordo com seu grau de toxicidade em: classe I (extremamente perigosos), classe II (altamente perigosos), classe III (moderadamente perigosos) e classe IV (pouco perigosos). Também podem ser categorizadas segundo o mecanismo de ação, incluindo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e rianóides. Outras classificações consideram o tipo de praga a ser controlada (inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas e nematicidas), o modo de ação (sistêmico ou de contato) e o espectro de ação (OMS, 2024).

Os organofosforados atuam por meio da inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE), impedindo a hidrólise da acetilcolina em ácido acético e promovendo o acúmulo desse neurotransmissor, o que resulta em hiperestimulação dos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, tanto no sistema nervoso central quanto periférico (Brunton; Hilal-Dandan; Knollmann, 2021). Os carbamatos também inibem a AChE, porém de forma reversível, sendo, portanto, considerados menos tóxicos quando comparados aos organofosforados. Já os rianóides e piretróides interferem, respectivamente, nos canais de cálcio e nos canais de sódio dependentes de voltagem. Ambos podem se ligar a receptores do sistema nervoso e causar disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), resultando em alterações hormonais e comprometimento da fertilidade masculina (Wang et al., 2020).

Os organoclorados, classe à qual pertence o clorotalonil, apresentam mecanismos de ação diversos, incluindo a inibição do receptor GABA, levando à hiperestimulação do sistema nervoso, e a interferência nos canais de sódio (Nunes; Tajara, 1998). Devido à sua natureza lipofílica, esses compostos tendem a se acumular nos tecidos, inclusive nos órgãos do sistema reprodutor masculino, onde podem mimetizar ou antagonizar hormônios, comprometendo sua função. Estruturalmente, caracterizam-se por hidrocarbonetos organizados em anéis aromáticos ou cíclicos saturados, o que lhes confere elevada persistência ambiental, estabilidade química e longa meia-vida, podendo permanecer por décadas no ambiente e afetar populações expostas (Lin et al., 2021).

Em razão de seu uso extensivo, os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde humana têm sido amplamente descritos na literatura. Estudos apontam aumento do risco para diferentes tipos de câncer, como próstata e colo do útero, frequentemente associados a mecanismos de estresse oxidativo (Liu et al., 2024). Além disso, essas substâncias podem causar acúmulo de neurotransmissores, disfunções neurológicas e prejuízos a neurônios dopaminérgicos, essenciais para o controle motor, sendo que a exposição combinada a múltiplos pesticidas pode potencializar esses efeitos (Paul et al., 2023). Muitos agrotóxicos são ainda classificados como desreguladores endócrinos, capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios, comprometendo a homeostase de processos fundamentais como reprodução e desenvolvimento (Zoeller et al., 2012).

As principais vias de exposição aos agrotóxicos incluem ingestão de alimentos ou água contaminados, inalação e contato direto com a pele ou os olhos (Thompson et al., 2003). Exposições mais intensas são observadas, em geral, em indivíduos ocupacionalmente expostos, como trabalhadores da agricultura e pecuária, agentes de controle de endemias e profissionais envolvidos na formulação, transporte e comercialização desses produtos (INCA, 2019). Em virtude de sua elevada toxicidade e potencial bioacumulador, diversos agrotóxicos tiveram seu uso ou comercialização proibidos, como o DDT (diclorodifeniltricloroetano), o clordano e o paration (NPIC, 2024). Apesar de banidos nos Estados Unidos há mais de 30 anos, resíduos desses compostos ainda são detectados em ambientes domésticos e em indivíduos que sequer viveram durante o período de uso intensivo, evidenciando seu elevado potencial de persistência e bioacumulação (Whitmore et al., 1993).

2.2 CLOROTALONIL

O CHL é um dos fungicidas mais utilizados mundialmente, pertencente ao grupo químico das isoftalonitrilas, sendo indicado para pulverização em diversas culturas agrícolas, incluindo hortaliças, cereais, leguminosas, frutas e plantas ornamentais (NORTOX, 2021). No Brasil, destacou-se como o quinto ingrediente ativo mais comercializado (Tabela 1) e o terceiro mais utilizado entre os organoclorados (Tabela 2), estando presente em 26 produtos formulados no período de 2019 a 2022 (IBAMA, 2022).

Tabela 1 - Ingredientes ativos mais vendidos em 2022 (por tonelada).

Ranking	Ingrediente Ativo	Toneladas
1º	Glifosato	530,219
2º	2,4-D	59,098
3º	Mancozebe	45,564
4º	Atrazina	42,394
5º	Clorotalonil	36,282
6º	Acefato	32,8
7º	Ometo de diquate	20,992
8º	S-metolacloro	11,6
9º	Malationa	11,356
10º	Sal de amônio	10,819

Fonte: adaptado do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 2022.

Tabela 2 - Produtos formulados deferidos em 2019-2022 por ingrediente ativo.

Ranking	Ingrediente Ativo	Número de Produtos
1º	Azoxistrobina	46
2º	Glufosinato de amônio	31
3º	Clorotalonil	26
4º	Ciproconazol	25
5º	Sulfentrazona	25
6º	Difenoconazol	20
7º	Fipronil	20
8º	Mancozebe	20
9º	S-metolacloro	19
10º	Tebuconazol	18

Fonte: adaptado do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 2022.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece a Ingestão Diária Aceitável (IDA), definida como a quantidade estimada de substância (mg/kg de peso corporal) que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem risco apreciável à saúde. Para o clorotalonil, a IDA é de 0,03 mg/kg. Além disso, a Dose de Referência Aguda (DRfA) determina a quantidade que pode ser ingerida em um período de 24 horas sem causar efeitos adversos, sendo fixada em 0,6 mg/kg para esse composto.

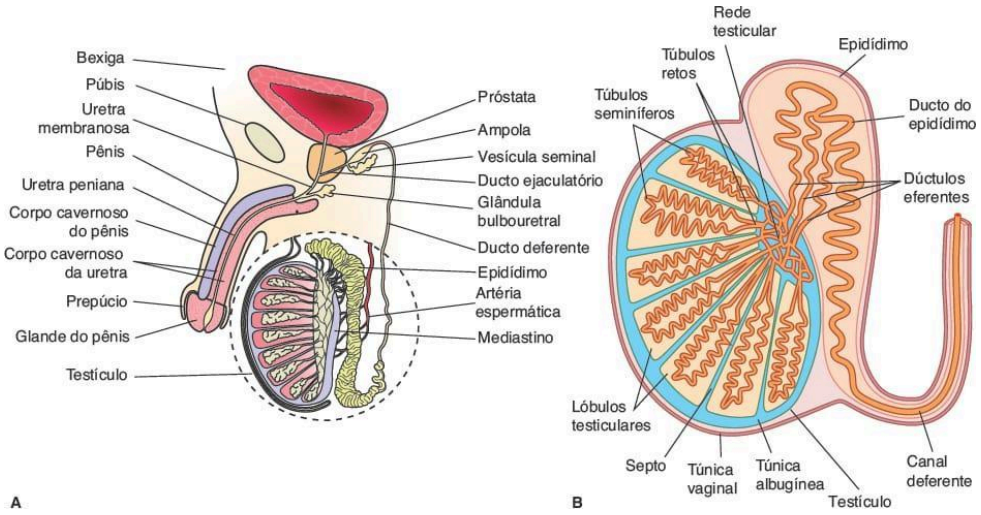
Entre os efeitos adversos observados em modelos experimentais, a exposição ao clorotalonil por inalação está associada a danos ao trato respiratório e aos pulmões, enquanto a exposição oral afeta predominantemente os rins, podendo resultar em tumores renais. No contexto reprodutivo e do desenvolvimento, altas doses do composto foram associadas à toxicidade materna, incluindo mortalidade, diarreia, abortos pós-implantação, redução do ganho de peso da prole e alterações no consumo alimentar (NORTOX, 2024).

Estudo conduzido por Wang et al. (2024) demonstrou que o CHL (concentrações 0, 10, 20, 30 μM) compromete a maturação oocitária ao interferir na organização do fuso meiótico e prejudicar a função mitocondrial, induzindo estresse oxidativo em gametas de camundongos. De forma complementar, Guillante et al. (2024), ao investigarem os efeitos do clorotalonil nas concentrações 0.1 e 10.0 μg/L por sete dias em Danio rerio, observaram alterações na expressão de genes relacionados ao eixo HHG, bem como prejuízos espermáticos, incluindo redução da fluidez da membrana plasmática e disfunção mitocondrial. Apesar desses achados, ainda há uma lacuna significativa na literatura quanto aos efeitos da exposição a baixas doses de clorotalonil.

2.3 SISTEMA GENITAL MASCULINO

A fertilidade masculina depende da produção de milhões de espermatozoides por ejaculado. Para que esse processo ocorra de forma adequada, é fundamental que os órgãos e tecidos do sistema genital masculino estejam em equilíbrio homeostático. O sistema genital masculino tem como principais funções a produção, maturação, armazenamento e condução dos gametas masculinos, além da síntese de hormônios essenciais à saúde reprodutiva do indivíduo. Esse sistema é constituído pelos testículos, epidídimos, ductos deferentes, pênis e glândulas acessórias, como a próstata, as vesículas seminais e as glândulas bulbouretrais, como representado na figura 1 (Setchell; Breed, 2006; Risbridger; Taylor, 2006).

Figura 1 - Ilustração do sistema genital masculino.



Fonte: Junqueira, 2023. Componentes do sistema genital masculino: A) O testículo e o epidídimo estão representados em aumento diferente das outras estruturas; B) Estrutura do testículo e epidídimo.

A espermatogênese é um processo cíclico, altamente complexo e rigorosamente organizado que ocorre nos túbulos seminíferos. Nesse processo, as espermatogônias diploides proliferam e se diferenciam, dando origem a espermatozoides maduros. A duração da espermatogênese varia entre as espécies, sendo de aproximadamente 40 dias em camundongos e 70 dias em humanos (França; Russell, 1998; França et al., 1998; GODINHO, 1999; Hess; França, 2007).

Com base em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases distintas: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das diferentes populações de espermatogônias; (b) fase meiótica ou espermatocitária, na qual ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões meióticas, reducional e equacional, resultando na formação de células haplóides denominadas espermátides; e (c) fase de diferenciação ou espermiogênese, durante a qual as espermátides arredondadas sofrem profundas alterações morfológicas e funcionais, incluindo a formação do acrossoma, do flagelo e a condensação da cromatina nuclear, originando uma célula altamente especializada, o espermatozoide. Após sua passagem pelo epidídimo, o espermatozoide torna-se funcionalmente apto à fertilização (Russell et al., 1990).

As células germinativas organizam-se nos túbulos seminíferos em associações celulares específicas, denominadas estádios, que se sucedem de forma ordenada ao longo do tempo, compondo o ciclo do epitélio seminífero (Russell et al., 1990). Em cada estádio, os diferentes tipos celulares encontram-se funcionalmente inter-relacionados. A duração do ciclo

do epitélio seminífero é considerada uma constante biológica espécie-específica (Clermont, 1972) e encontra-se sob controle do genótipo das células germinativas (França et al., 1998).

Após a espermiogênese, o espermatozoide apresenta três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça contém o núcleo, com cromatina altamente condensada, e o acrossoma, uma vesícula citoplasmática rica em enzimas hidrolíticas e outras moléculas essenciais para a penetração do ovócito. A peça intermediária abriga a bainha mitocondrial, fundamental para o metabolismo energético da célula e responsável pela produção de ATP necessário ao movimento flagelar. A cauda é composta por um complexo estrutural formado principalmente por microtúbulos e componentes especializados do citoesqueleto, incluindo o axonema, as fibras densas e a bainha fibrosa (Toshimori; Eddy, 2015).

O espermatozoide é um dos principais produtos finais do sistema reprodutor masculino e, após a ejaculação, desempenha a função de fecundar o ovócito, transmitir o material genético paterno e contribuir para a formação de um novo indivíduo. Alterações no DNA, na motilidade ou na morfologia espermática, bem como processos inflamatórios, estresse oxidativo ou danos histológicos nos órgãos reprodutivos, podem comprometer direta ou indiretamente a capacidade fecundante dos espermatozoides, impactando negativamente os índices de fertilidade. Ademais, danos transmitidos pelo gameta à prole podem persistir ao longo de toda a vida do indivíduo gerado.

2.3.1 Testículo

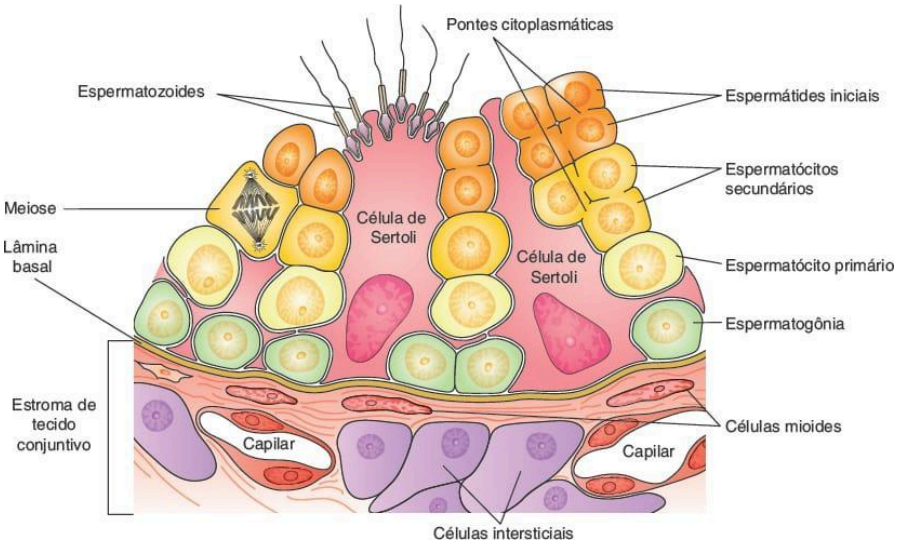
O testículo é o órgão responsável pela produção de espermatozoides e andrógenos, sendo essencial para a manutenção das funções reprodutivas e das características sexuais secundárias masculinas (Russell; França, 1995). Trata-se de um órgão de formato arredondado, organizado em dois compartimentos principais: o compartimento tubular, constituído pelos túbulos seminíferos, formados por células germinativas associadas às células de Sertoli no epitélio seminífero; e o compartimento intertubular, que abriga as células de Leydig, produtoras de andrógenos, além de vasos sanguíneos, nervos e outros tipos celulares (Oliveira, 2014).

Os túbulos seminíferos representam a maior parte do volume testicular, ocupando entre 70% e 90% do parênquima testicular na maioria dos mamíferos (França; Godinho, 2003). Esses túbulos formam alças altamente contorcidas, cujas extremidades se conectam à *rete testis*. Estruturalmente, são compostos pela túnica própria, pelo epitélio seminífero e pelo lúmen tubular. A túnica própria é formada por matriz extracelular e células peritubulares

mióides, dotadas de capacidade contrátil, que auxiliam na propulsão dos espermatozoides e do fluido intratubular (Russell et al., 1993).

O epitélio seminífero é constituído pelas células de Sertoli e pelas células germinativas em diferentes estágios de diferenciação (Figura 2). O lúmen tubular corresponde à região central dos túbulos e é o local onde ocorre a secreção de fluido pelas células de Sertoli, sob a influência dos andrógenos, especialmente da testosterona. Esse fluido desempenha papel fundamental no transporte dos espermatozoides imóveis ao longo dos ductos intratesticulares.

Figura 2 - Ilustração do epitélio de um túbulo seminífero.



Fonte: Junqueira, 2023. Trecho de um túbulo seminífero no qual há as células da linhagem espermatogênica e as células de Sertoli. Nas paredes laterais das células de Sertoli, alojam-se células da linhagem espermatogênica. Em torno do túbulo há células mióides, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células de Leydig.

2.3.2 Epidídimo

A integridade histológica do epidídimo é de extrema relevância, uma vez que aproximadamente 40% dos casos de infertilidade masculina podem estar relacionados a alterações na maturação espermática (Cornwall, 2009). Ele é um órgão constituído por um único ducto longo e altamente enovelado, cujo comprimento varia de aproximadamente um metro em camundongos, três metros em ratos e entre três e seis metros em humanos (Robaire; Hinton; Orgebin-Crist, 2006). Anatomicamente, é dividido em três regiões principais: cabeça, corpo e cauda. A cabeça conecta-se ao testículo por meio dos ductos eferentes, cujo número pode variar de quatro a dez, dependendo da espécie, dando continuidade ao corpo e à cauda

epididimários (Cornwall, 2009) (Figura 3). Em ratos, descreve-se ainda a presença de uma zona intermediária entre o segmento inicial e a cabeça (Robaire; Hinton, 2015).

Figura 3 - Diferença entre o epidídimo de camundongo e o humano.



Descrição: Camundongo: 1) segmento inicial, cabeça proximal; 2) cabeça médio; 3) cabeça distal; 4) corpo; 5) cauda. Humano: ED (ductos eferentes); 1) cabeça anterior; 2) cabeça posterior; 3) corpo anterior; 4) corpo médio; 5) corpo posterior; 6) cauda anterior; 7) cauda posterior; DD (ducto deferente).
Fonte: Yeung; Cooper, 2002; Dacheux et al., 2006.

A principal função do epidídimo é promover o desenvolvimento da motilidade progressiva e da capacidade fertilizante dos espermatozoides, criando um microambiente favorável à maturação espermática por meio da absorção e secreção de substâncias pelo epitélio epididimário, além de atuar no armazenamento e transporte dos gametas (Robaire; Hinton; Orgebin-Crist, 2006).

Histologicamente, o epidídimo apresenta epitélio colunar pseudoestratificado estereociliado, sendo as células principais responsáveis por aproximadamente 65% a 80% da população celular total. Essas células desempenham funções endocíticas e secretórias, possuem microvilosidades na região apical e estão distribuídas ao longo de todo o ducto epididimário, apresentando variações estruturais regionais em seu aparato secretório e endocítico. As células principais são unidas por junções de oclusão, formando a barreira hemato-epididimária, estrutura semelhante à barreira hemato-testicular, cuja função é proteger os espermatozoides de agentes lesivos e da resposta imunológica, uma vez que os gametas e

proteínas intraluminais podem ser reconhecidos como não próprios pelo sistema imune local (Robaire; Hinton; Orgebin-Crist, 2006).

Além das células principais, o epitélio epididimário contém células basais, apicais, estreitas/claras, que também exercem funções endocíticas e secretórias. As células basais, que não entram em contato direto com o lúmen, são sugeridas como participantes da regulação do transporte de água e eletrólitos pelas células principais (Robaire; Hinton, 2015).

As células halo foram inicialmente descritas por sua semelhança morfológica com linfócitos e monócitos, sendo associadas a atividades imunológicas. Estudos mais recentes identificam ainda a presença de células dendríticas, dotadas de capacidade de apresentação antigênica, reforçando o papel imunorregulador do epidídimo (Robaire; Hinton, 2015).

2.3.3 Hormônios sexuais

O desenvolvimento, a diferenciação e a manutenção do sistema reprodutor masculino dependem de uma regulação endócrina altamente coordenada, envolvendo interações entre o hipotálamo, a hipófise e os testículos, constituindo o denominado eixo hipotálamo–hipófise–gonadal (HHG). Esse eixo regula eventos fundamentais que se iniciam ainda durante a vida embrionária, estendem-se pelo período fetal, infância, puberdade e permanecem ativos ao longo da vida adulta, assegurando a espermatogênese, a produção hormonal e a fertilidade masculina (Li et al., 2024).

No desenvolvimento embrionário, a determinação sexual masculina é estabelecida geneticamente no momento da fertilização pela presença do cromossomo Y, porém a atuação de diferentes hormônios é de extrema importância para a diferenciação gonadal e desenvolvimento de diferentes características fenotípicas (Welsh. et al., 2008). O hormônio anti-Mülleriano (AMH) atua promovendo a regressão dos ductos de Müller, estruturas embrionárias que, na ausência de AMH, dariam origem ao útero e tubas uterinas (Edelsztein et al 2022). O AMH continua sendo secretado pelas células de Sertoli até a puberdade, sendo então um marcador de células de Sertoli imaturas (Josso; Rey; Picard, 2013).

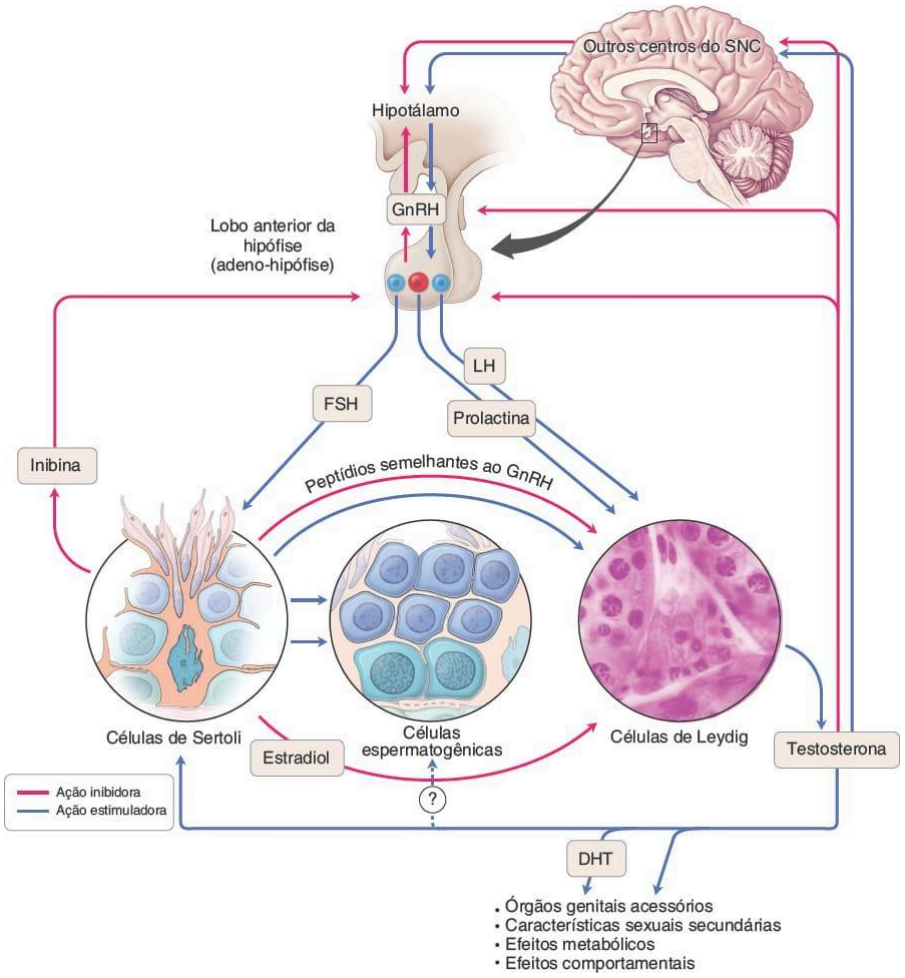
Outro hormônio presente no desenvolvimento embrionário é a testosterona. Ela é responsável pela diferenciação dos ductos de Wolff em estruturas reprodutivas masculinas internas como epidídimo, ducto deferente e vesículas seminais. A di-hidrotestosterona (DHT) é um produto da testosterona sintetizado pela ação da enzima 5α-redutase. A DHT possui maior afinidade pelo receptor androgênico e é essencial para a diferenciação dos genitais externos masculinos, incluindo pênis, escroto e próstata (Lymperi; Giwercman, 2018).

Após o nascimento, os níveis de gonadotrofinas permanecem altos, a testosterona atinge seu pico por volta dos três meses de vida. Essa fase é conhecida como minipuberdade e desempenha um papel crucial no desenvolvimento do pênis e dos testículos do recém-nascido. Após a minipuberdade, o eixo HHG fica inativo até a puberdade. Nesse período as células de Leydig liberam ativamente andrógenos, enquanto as células de Sertoli secretam altos níveis de AMH (Kuiri-Hanninen; SankilampiI; Dunkel, 2014).

A puberdade propriamente dita é marcada pela reativação do eixo HHG pela retomada da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo de forma mais expressiva e pela maturação gonadal. Nessa fase, o hormônio luteinizante (LH) estimula a diferenciação das células de Leydig e produz testosterona, consequentemente a estimulação da testosterona e do hormônio folículo-estimulante (FSH) nas células de Sertoli leva eventualmente ao início da espermatogênese (Oduwole; Peltoketo; Huhtaniemi, 2018). Acontece também a proliferação das células germinativas, com um aumento significativo no volume dos testículos e no diâmetro dos túbulos seminíferos (Koskenniemi; Virtanen; Toppari, 2017).

Ao final da puberdade, o sistema reprodutor masculino se encontra completamente desenvolvido, porém a manutenção dos níveis hormonais na vida adulta pelo eixo HHG ainda é de grande importância uma vez que os hormônios andrógenos são essenciais para a espermatogênese, a função sexual e a libido, principalmente a testosterona. A sinalização do FSH é indispensável para a proliferação, diferenciação e funcionamento adequado das células de Sertoli e germinativas (Guarnotta et al., 2022) Além da testosterona, o estradiol também tem papel importante nos sistema reprodutor masculino adulto, fazendo feedback negativo sobre o eixo HHG e na regulação da espermatogênese (Hess; Cooke, 2018) (Figura 4).

Figura 4 - Ilustração da regulação dos hormônios sexuais masculinos.



Fonte: Pawlina, 2025.

Desequilíbrios hormonais, sejam eles devidos a predisposições genéticas ou influências ambientais, podem desencadear distúrbios reprodutivos e de desenvolvimento. Sendo então a regulação hormonal um dos principais fatores para garantir a homeostase do sistema reprodutor masculino (Guarnotta et al., 2022).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA GENITAL MASCULINO

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) e a capacidade antioxidante do organismo. Esse processo ocorre quando a geração de oxidantes excede quantitativamente a ação dos sistemas antioxidantes, seja por produção excessiva de ERO/ERN ou pela redução da eficiência dos mecanismos de neutralização (Barati; Nikzad; Karimian, 2019).

As ERO, frequentemente denominadas radicais livres, são agentes oxidantes derivados do metabolismo do oxigênio molecular (O_2) e caracterizam-se pela presença de pelo menos um elétron desemparelhado, o que lhes confere alta reatividade química. Entre as principais ERO destacam-se o oxigênio singleto ($^1O_2$), radical hidroxila (•OH), ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), hidroperoxila (HO_2•), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e hidroperóxidos fosfolipídicos (PLOOH). Os antioxidantes, por sua vez, podem ser classificados como não enzimáticos endógenos como vitamina E (α-tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina A, carotenoides, bilirrubina, ácido úrico e albumina ou enzimáticos, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase (Agarwal et al., 2014).

O aumento do estresse oxidativo pode resultar em peroxidação lipídica, oxidação e desnaturação de proteínas, fragmentação do DNA e indução de morte celular por apoptose. Entretanto, a produção de ERO também ocorre em condições fisiológicas normais, desempenhando papéis importantes em processos bioquímicos e imunológicos (Phaniendra; Jestadi; Periyasamy, 2014).

A produção endógena de ERO ocorre principalmente em organelas como mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático. Nos espermatozoides, a geração de ERO pode ocorrer por duas vias principais: por meio do sistema Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), localizado na membrana plasmática, e por reações oxidorredutases dependentes de NADPH no nível mitocondrial, sendo esta última considerada a principal fonte de ERO espermática (Agarwal et al., 2014).

Durante processos de elevada atividade metabólica, como a capacitação espermática, ocorre aumento fisiológico da produção de ERO, incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (Lewis; Aitken, 2001). Evidências indicam que níveis moderados de ERO são essenciais para a fosforilação de resíduos de tirosina e para a capacitação espermática, enquanto a redução excessiva dessas espécies pode comprometer tais processos (Aitken et al., 1995).

Apesar de expressarem enzimas redox ao longo do desenvolvimento testicular e epididimário e de estarem imersos no plasma seminal, um dos fluidos corporais mais ricos em antioxidantes de baixo peso molecular, os espermatozoides são altamente sensíveis ao estresse oxidativo e apresentam capacidade limitada de reparo dos danos induzidos por ERO (Conrad et al., 2014; Aitken; Drevet, 2020). Nesse contexto, estima-se que níveis elevados de ERO contribuam para 30% a 80% dos casos de infertilidade masculina, impactando significativamente a qualidade espermática (Wagner; Cheng; Ko, 2018).

2.5 INFLAMAÇÃO NO SISTEMA GENITAL MASCULINO

A inflamação é uma resposta biológica a lesões e danos teciduais, caracterizada pelo recrutamento de leucócitos e moléculas plasmáticas para o local da injúria ou infecção. Pode ser classificada em inflamação aguda ou crônica. Na inflamação aguda, três eventos principais ocorrem: aumento do fluxo sanguíneo local (vasodilatação), elevação da permeabilidade capilar, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas de alto peso molecular e intensificação da migração de leucócitos para o tecido afetado. Quando o agente causador não é eliminado, instala-se a inflamação crônica, caracterizada pela coexistência de processos inflamatórios e reparativos, além do recrutamento e ativação de macrófagos, linfócitos e outras células imunes, que coordenam a liberação de citocinas inflamatórias (Agarwal, 2011).

A inflamação crônica resulta da persistência de estímulos pró-inflamatórios, como toxinas, infecções e fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo alimentação inadequada e sedentarismo (Wirtz et al., 2017; Ham et al., 2022). Esse processo pode levar a consequências severas, como fibrose tecidual e distúrbios metabólicos, devido à produção contínua de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), que, associado a quimiocinas, perpetua a inflamação e intensifica o dano tecidual mediado por macrófagos e linfócitos (Wang et al., 2023).

No testículo em condições fisiológicas, células imunes como macrófagos residentes, células dendríticas, linfócitos circulantes, mastócitos e eosinófilos localizam-se predominantemente no tecido intersticial, na zona peritubular e na cápsula testicular (Wang et al., 1994; Anton et al., 1998). A maioria dos macrófagos testiculares apresenta fenótipo M2, associado a menor atividade pró-inflamatória e à liberação preferencial de citocinas anti-inflamatórias, como TGF-β e IL-10. Esses macrófagos, em conjunto com os linfócitos T reguladores (Treg), desempenham papel essencial na manutenção da tolerância imunológica testicular (Bryniarski et al., 2004; Maresz et al., 2008; Hedger, 2011). A ruptura dessa homeostase imunológica pode resultar em inflamação testicular e, consequentemente, em infertilidade masculina.

Diferentemente do observado no testículo, o epidídimo apresenta macrófagos, linfócitos e células halo tanto no epitélio quanto no tecido intersticial, frequentemente identificados histologicamente como células halo, que exercem funções imunorreguladoras (Flickinger et al., 1997; Serre; Robaire, 1999). Os linfócitos intraepiteliais epididimários são predominantemente células T CD8+, e o aumento de sua densidade tem sido associado a distúrbios espermáticos (Serre; Robaire, 1999). Além disso, macrófagos localizados no lúmen

do ducto epididimário exercem função fagocítica, removendo espermatozoides malformados ou senescentes (Hedger, 2011;Robaire; Hinton; Orgebin-Crist, 2015).

No restante do trato reprodutor masculino, o tecido linfóide associado à mucosa e o tecido linfóide difuso da mucosa constituem componentes importantes da imunidade local. As células M participam do transporte de antígenos e da ativação de respostas imunes, enquanto a ação imunossupressora do plasma seminal contribui para a inibição da atividade imunológica local, protegendo os espermatozoides, inclusive no trato reprodutivo feminino (Ma et al., 2024).

2.6 DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA NO SISTEMA GENITAL MASCULINO

Um desregulador endócrino (DE) é um agente exógeno que interfere na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo, responsáveis pela manutenção da homeostase e pela regulação dos processos de desenvolvimento. Podem derivar de fontes naturais animais, humanas ou vegetais, sendo os químicos os mais conhecidos (EPA, 2011).

Os DEs químicos inclui várias classes de substâncias, como dioxinas, alquilfenóis, agrotóxicos, ftalatos, bisfenol A, medicamentos (glicosídeos cardíacos, nitrofuranos, carbamazepina), metais pesados, entre outros. (De Coster; Van Larebeke, 2012). Entre os agrotóxicos sabe-se que os organoclorados apresentam maior potencial como DEs devido à característica lipofílica e, consequentemente, ao seu potencial de bioacumulação (Yilmaz et al., 2019).

A maioria dos DEs químicos tem uma função estrogênica ou antiandrogênica (Guarnotta et al., 2022). Os DEs podem afetar diferentes alvos hormonais, incluindo a produção de hormônios e a expressão de receptores hormonais, atuando como agonistas ou antagonistas dos receptores. Podem ainda atuar como moduladores hormonais, tendo impacto nas vias de sinalização. Alguns DEs tem efeitos sobre a esteroidogênese, podendo estimular ou inibir enzimas esteróides, como a proteína reguladora aguda esteróide (StAR), aromatase, 3β-, 11β- e 17β-hidroxiesteróide desidrogenases, afetando assim a síntese hormonal (Hampl; Kubátová; Stárka, 2016).

A toxicidade reprodutiva dos DEs incluiu redução da fertilidade tanto em homens como em mulheres, podendo causar câncer de mama e testicular, defeitos congênitos dos órgãos reprodutivos, alterações no início da puberdade, alteração da proporção entre nascimentos de meninos e meninas (Guarnotta et al., 2022).

Desta forma, é de extrema importância o estudo por trás dos mecanismo envolvidos na desregulação endócrina, uma vez que pode comprometer significativamente a fertilidade masculina, causando redução na contagem de espermatozoides, diminuição da motilidade espermática, morfologia espermática anormal, disfunção erétil e até baixa libido (Cannarella et al., 2022).

3 JUSTIFICATIVA

A exposição crônica a agrotóxicos vem cada vez mais sendo associada a diversos distúrbios de saúde. Estudos epidemiológicos mostram uma relação entre a presença de agrotóxicos, alterações de níveis hormonais e diminuição da qualidade seminal, principalmente em individuos do sexo masculino de regiões rurais (Rebelo et al., 2011). Com a sanção da lei no 14.785 de 2023 que acelera o registo e reavaliação de agrotóxicos, é esperado um aumento no uso destes produtos, bem como o uso de produtos com impacto ainda desconhecido para a saúde humana. Assim, faz-se necessário aprofundar os estudos das causas e os mecanismos que possam levar ao comprometimento do sistema reprodutor masculino, a fim de conhecer e prevenir possíveis problemas reprodutivos.

4 HIPÓTESE

A hipótese desse estudo é que as alterações morfológicas observadas previamente após exposição ao clorotalonil sejam decorrentes do desbalanço hormonal, da alteração do balanço redox testicular, causando dano oxidativo em testículos, e do aumento de marcadores inflamatórios no epidídimo de camundongos.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição ao clorotalonil na vida adulta interfere nos níveis de testosterona e estradiol, em parâmetros oxidativos nos testículos e inflamatórios nos epidídimos de camundongos machos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a capacidade antioxidante dos testículos pela quantificação de glutationa reduzida (GSH) e capacidade antioxidante total (TEAC) após exposição ao clorotalonil.
- Avaliar os danos oxidativos nos testículos pela quantificação da peroxidação lipídica (MDA) e oxidação protéica (AOPP) após exposição ao clorotalonil.
- Quantificar os níveis das citocinas IL-1□, TNF-α, IFN-γ e IL-10 nas regiões de cabeça + corpo e cauda dos epidídimos após exposição ao clorotalonil.
- Dosar os níveis séricos testosterona e estradiol após exposição ao clorotalonil.
- Quantificar a expressão gênica dos receptores de andrógeno (*AR*) e estrógeno alfa (*ER-α*) nos testículos de camundongos expostos ao clorotalonil.

6 METODOLOGIA

Este estudo integra um projeto de pesquisa mais amplo, intitulado *"Impacto do agrotóxico clorotalonil sobre aspectos reprodutivos de camundongos machos adultos"*, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEUA-UFTM), sob o Parecer nº 23/2023/CEUA/PROPPG (Anexo A).

6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 24 camundongos machos adultos da linhagem C57BL/6, com idade inicial de 50 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Os animais foram aclimatados por um período de 10 dias no Laboratório Multiusuário de Modelos Biológicos (LaMMoBi), previamente ao início do experimento. Após a aclimatação, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n = 8 animais por grupo): grupo controle (CTRL), que recebeu apenas o veículo (água); grupo Clorotalonil 1 mg/kg (CHL1), que recebeu 1 mg/kg de clorotalonil diluído em água; e grupo Clorotalonil 10 mg/kg (CHL10), que recebeu 10 mg/kg de clorotalonil diluído em água (Li et al., 2020; Zhang et al., 2019).

As doses administradas foram definidas com base na exposição humana ao composto, considerando a dose humana equivalente (*human equivalent dose* – HED), conforme descrito por Nair e Jacob (2016). Assim, as doses de 10 mg/kg/dia e 1 mg/kg/dia em camundongos correspondem, respectivamente, a 810 μg/kg/dia e 81 μg/kg/dia em humanos. Todos os grupos receberam os tratamentos diariamente, por via oral, utilizando-se a técnica de gavagem, durante 50 dias consecutivos.

O período de exposição adotado neste estudo corresponde a um ciclo completo da espermatogênese em camundongos, estimado em aproximadamente 35 dias (Clermont, 1972), acrescido do tempo necessário para o trânsito espermático ao longo do epidídimo, que é de cerca de nove dias nessa espécie (Robaire; Hinton, 2015). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em biotério sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à ração peletizada padrão para roedores, sendo pesados duas vezes por semana.

6.2 COLETA DOS MATERIAIS

Ao final do período de exposição, os camundongos foram pesados e eutanasiados por superdosagem de Cetamina (Cetamin, Syntec, dose 300 mg/kg) e Xilazina (Xilazin, Syntec, dose 30mg/kg), via intraperitoneal. Os testículos e epidídimos foram coletados e armazenados

à seco em tubos de criopreservação em uma temperatura de -80 ºC. O sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugado (6200 rpm), de forma a obter o soro, que foi armazenado em uma temperatura de -80 ºC.

6.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO NO EPIDÍDIMOS

Para realização da avaliação do perfil inflamatório do epidídimo, os órgãos foram separados em cabeça + corpo e cauda, a fim de avaliar esse parâmetro por região do órgão. Foi obtido um sobrenadante através da homogeneização das porções dos epidídimos em tampão RIPA (RadioImmunoprecipitation Assay buffer), utilizando o TissueLyser LT (Qiagen) e armazenado em -80 ºC (n=6/grupo). Posteriormente foi quantificado a quantidade de proteína total de todas as amostras utilizando um espectrofotômetro de microvolume (Nanodrop, Thermo Scientific). Foram quantificadas as seguintes citocinas IL-1□, TNF-α, IFN-γ e IL-10, através do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizados os kits comerciais BD Biosciences, San Jose, CA, USA, de acordo com as instruções do fabricante.

6.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO TESTÍCULO

Para avaliar o estresse oxidativo foram quantificados os marcadores de dano oxidativo malondialdeído (MDA) (Siervo et al., 2015), que infere peroxidação lipídica e os produtos avançados da oxidação proteica (AOPP), que inferem oxidação proteica (Witko-Sarsat et al., 1996). A capacidade antioxidante foi avaliada pela quantificação de glutationa reduzida (GSH) (Tietze, 1969) e pela capacidade antioxidante total (TEAC) (Erel 2004). Para todos esses ensaios, foi obtido um sobrenadante através da homogeneização (6000 rpm) dos testículos em PBS (NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 9,1 mM e NaH_2PO_4 1,7 mM, pH 7,4), utilizando o TissueLyser LT (Qiagen) (n=5/grupo). Em seguida o sobrenadante foi aliquotado e armazenado em -80 ºC. Foi quantificado a quantidade de proteína total de todas as amostras utilizando um espectrofotômetro de microvolume (Nanodrop, Thermo Scientific).

6.4.1 Quantificação de produtos de proteína de oxidação avançada (AOPP)

Os produtos de oxidação proteica avançada (AOPP) foram quantificados segundo o protocolo de Witko-Sarsat (1996), utilizando o reagente chloramine T (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como curva padrão. Os níveis de AOPP foram medidos em um comprimento de onda de 340nm, e os resultados expressos em μM/mg de proteína.

6.4.2 Quantificação de malondialdeído pela técnica TBARS

O malondialdeído (MDA) foi quantificado pela técnica TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) (Siervo et al., 2015), a fim de estimar a peroxidação lipídica. Em meio ácido e sob alta temperatura (90 °C), o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil), formando um complexo cromóforo rosa. As medições foram feitas a 535 nm e 572 nm, resultados expressos em Equivalente de μM TBA/mg de proteína.

6.4.3 Quantificação de glutationa reduzida (GSH)

Os níveis de GSH (glutationa reduzida) foram determinados utilizando o método descrito por Tietze (1969). Foi utilizado o ácido 5,50-ditiobis 20-nitro benzóico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como curva padrão, evidenciados pela formação de uma cor amarela. Os níveis de GSH foram medidos a 412 nm, e os resultados expressos em μM/mg de proteína.

6.4.4 Quantificação de capacidade antioxidante total (TEAC)

O método de Erel (2004) baseia-se na descoloração cinética do radical cátion ABTS•+ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) gerado por peróxido de hidrogênio em meio ácido. Na presença de antioxidantes, o ABTS•+ é reduzido de forma proporcional à capacidade antioxidante total da amostra, resultando em diminuição da absorbância. A curva padrão foi o Trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), as medições foram feitas em um comprimento de onda de 660nm, e os resultados expressos em Equivalente de μM Trolox/mg de proteína.

6.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO E ESTRÓGENO ALFA POR RT-qPCR NO TESTÍCULO

O RNA dos testículos foi extraído de forma manual (n=5/grupo) utilizando o método trizol clorofórmio. O cDNA foi sintetizado a partir de 200 ng do RNA extraído usando um kit RT-PCR (Ultra Script®, cDNA Synthesis Kit, PCR Biosystems, Londres, Inglaterra) e a pureza do cDNA foi avaliado por espectrofotometria de microvolume (Nanodrop, Thermo Scientific). Os primers selecionados para avaliação da expressão gênica foram o receptor de andrógeno e estrógeno (*AR* e *ER-α*), utilizado o gene constitutivo *GAPDH* como normalizador da reação (Tabela 3). Foi utilizado o kit qPCRBIO SyGreen Mix Hi-ROX (PCR Biosystems, Londres, Inglaterra) para amplificação, seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica relativa foi calculada usando o método $2^{-(\Delta-\Delta Ct)}$.

Tabela 3 - Lista de primers.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Referência
androgen receptor (AR)	tagggctgggaagggtcta c	tgcttaagcctgggaaagt g	Dart et al., 2013
estrogen receptor (ER)	aagtgttacgaagtgggca tga	tctctgacgcttgtgcttcaa c	Moutard et al., 2023
GAPDH	ggtgaaggtcggtgtgaac g	ctcgctcctggaagatggt g	Zhu et al., 2024

Fonte: da autora.

6.6 NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL

O quantificação dos níveis séricos de testosterona e estradiol foram realizados através de kit comercial de ELISA (Wuhan USCN Business Co.). Foi utilizado o soro obtido através do sangue dos camundongos (n=8/grupo) em concentrações diluídas em 1:2 para testosterona e a concentração pura para estradiol.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

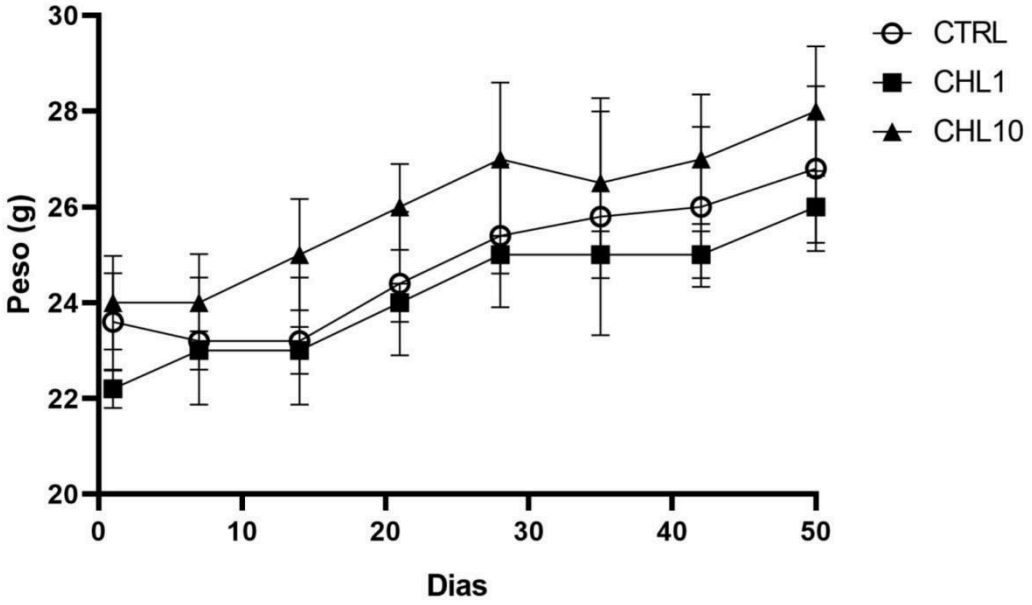
Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias e normalidade pelo software GraphPAD Prism (Version 9.5). A depender da distribuição dos dados, foi utilizado o teste ANOVA, com teste *a posteriori* de Tukey ou o teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis, com teste *a posteriori* de Dunn, utilizando o mesmo software. Os valores foram considerados significativos quando $p<0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 PESO CORPORAL

A exposição ao CHL não alterou o peso corporal dos animais (Figura 5). O peso corporal final dos animais do grupo CTR foi de 26,8g ± 1,72 (média ± desvio padrão), enquanto do grupo CHL1 foi 25,8g ± 0,74 e do grupo CHL10 foi 27,4g ± 1,35.

Figura 5 - Progressão de peso de camundongos adultos expostos ao clorotalonil.

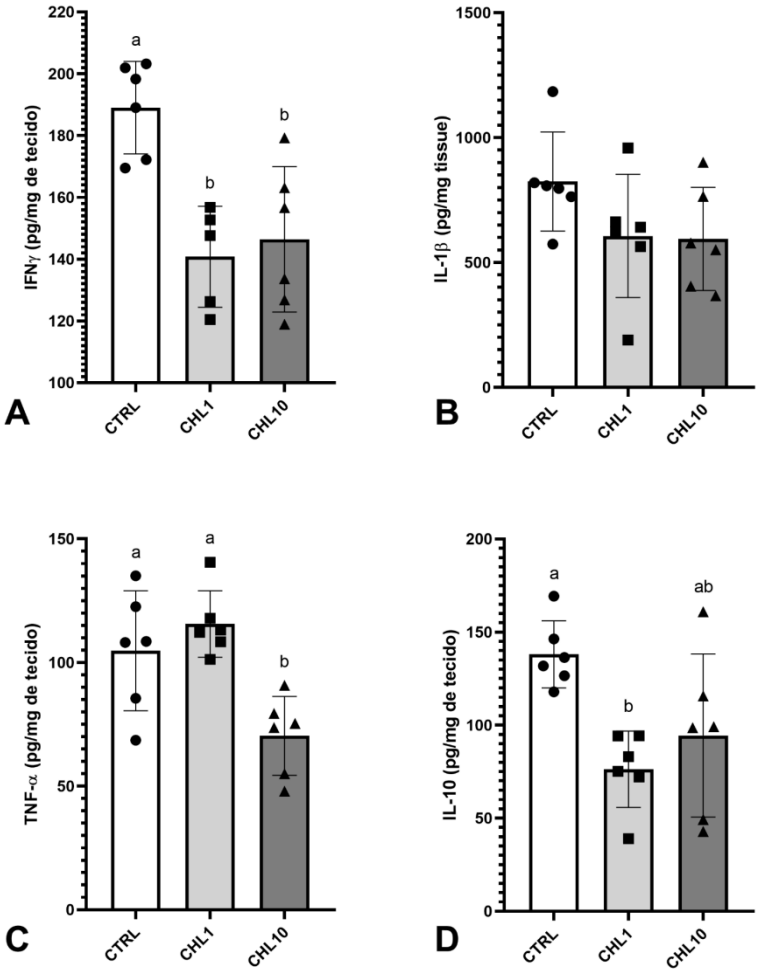


Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste ANOVA, p>0,05. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

7.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO NO EPIDÍDIMO

Quanto à avaliação do perfil inflamatório, houve alterações significativas nos níveis de citocinas nas regiões de cabeça e corpo do órgão (Figura 6). Foi observada uma diminuição significativa na concentração de IFNγ no grupo CHL1 (p=0,0022) e CHL10 (p=0,0041), quando comparado ao grupo CTR (Figura 6A). Houve também uma diminuição na concentração de TNF-α nos grupos CHL10 em relação ao CTR (p=0,0148) e ao CHL1 (p=0,0019) (Figura 6C). Em relação à IL-10, observou-se uma redução somente no grupo exposto a menor dose (p=0,0072) (Figura 6D). Não houve alterações significativas nos níveis de IL-1β (Figura 6B) (p = 0.156).

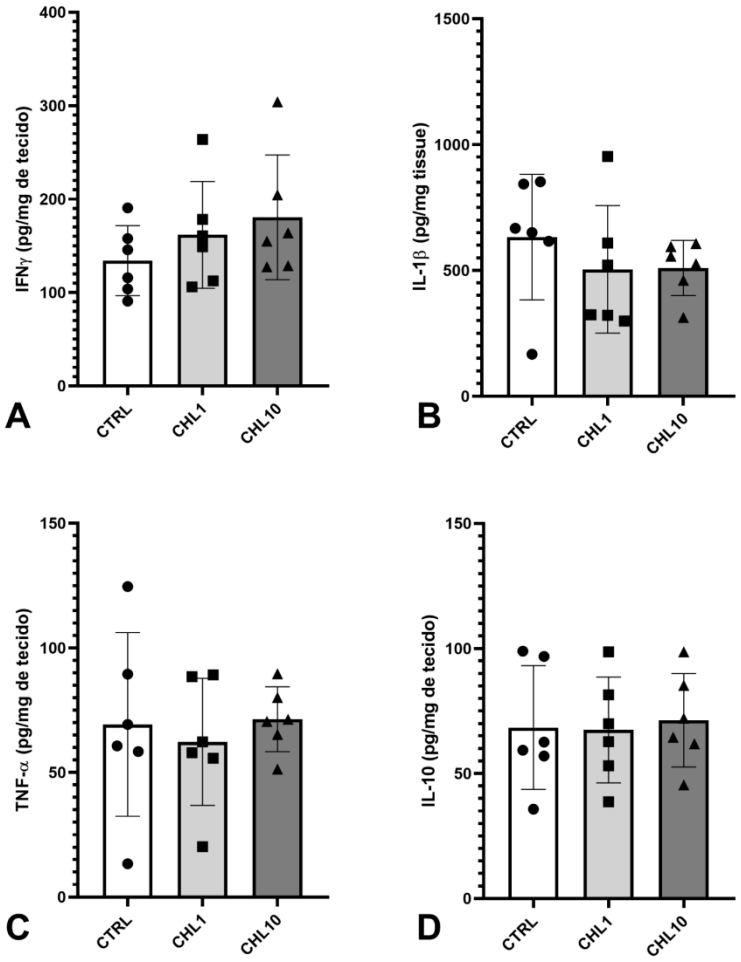
Figura 6 - Dosagem das citocinas na região da cabeça e corpo do epidídimo.



Valores expressos em média ± desvio padrão. A) Dosagem da citocina IFNγ na região da cabeça e corpo; B) Dosagem da citocina IL-1β na região da cabeça e corpo; C) Dosagem da citocina TNF-*α* na região da cabeça e corpo; D) Dosagem da citocina IL-10 na região da cabeça e corpo . ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. [a,b] Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si, p<0,05. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

Diferente da região da cabeça e corpo, a região da cauda não apresentou alterações significativas nas concentrações das citocinas avaliadas (Figura 7), IFN-γ (p = 0.366), IL-1β (p = 0.518), TNF-α (p = 0.832), e IL-10 (p = 0.950).

Figura 7 - Dosagem das citocinas na região da cauda do epidídimo

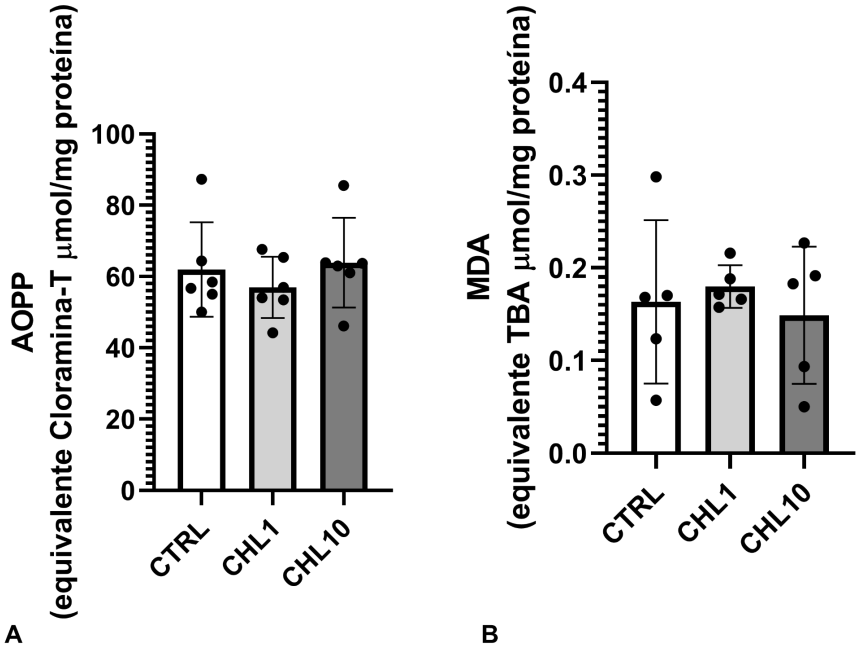


Valores expressos em média ± desvio padrão. A) Dosagem da citocina IFNγ na região da cauda; B) Dosagem da citocina IL-1β na região da cauda; C) Dosagem da citocina TNF-*α* na região da cauda; D) Dosagem da citocina IL-10 na região da cauda. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. [a,b] Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si, $p<0,05$. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

7.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO TESTÍCULO

Para avaliar a oxidação proteica foi quantificado marcador de dano oxidativo AOPP, porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 8A). Também não houve diferença significativa nos níveis de MDA (Figura 8B).

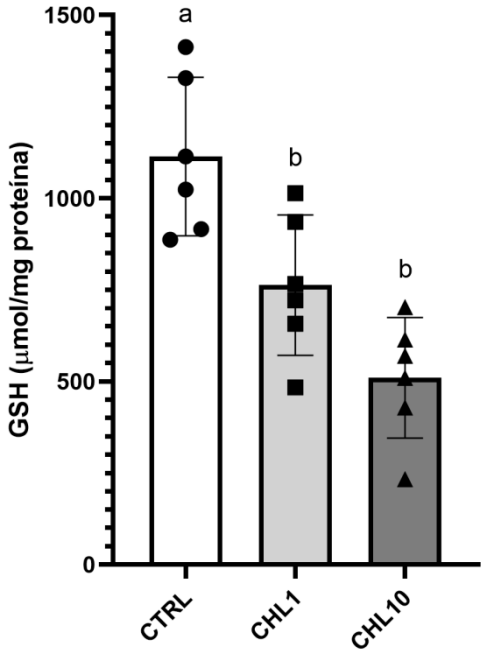
Figura 8 - Quantificação de produtos de proteína de oxidação avançada (AOPP) e malondialdeído (MDA)



Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. A) Dosagem de AOPP no testículo; B) Dosagem de MDA pela técnica TBARS no testículo. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

Já em relação aos parâmetros antioxidantes, foi observada uma diminuição nos níveis de GSH testicular nos grupos que receberam o CHL em comparação ao controle (CTR vs CHL1, p=0,0166; CTR vc CHL10, p=0,0002) (Figura 9), independente da dose.

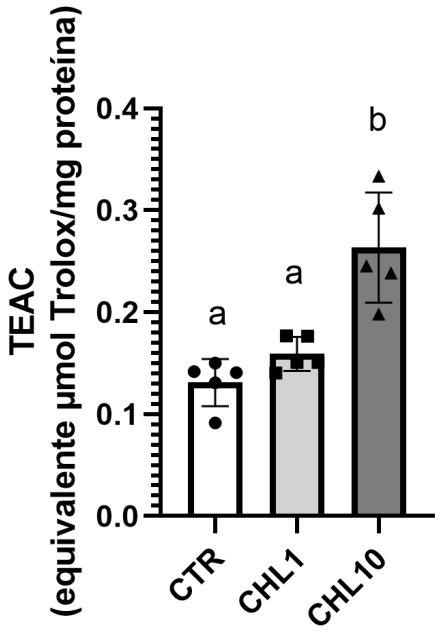
Figura 9 - Quantificação de GSH no testículo.



Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. [a,b] Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si, p<0,05. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

Houve um aumento na capacidade antioxidante total no grupo CHL10 quando comparado aos demais grupos (CTR vs CHL10, p=0,0002; CHL1 vs CHL10, p=0,0014) (Figura 10).

Figura 10 - Quantificação da capacidade antioxidante total (TEAC) no testículo.

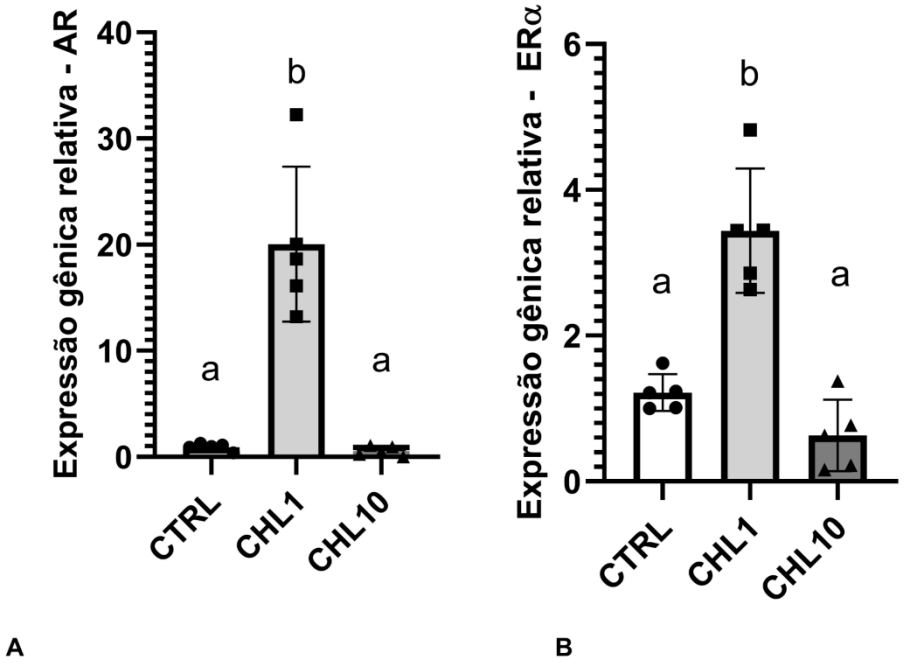


Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. [a,b] Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si, p<0,05. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

7.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO E ESTRÓGENO ALFA POR RT-qPCR

A análise da expressão gênica do receptor de andrógeno (AR) demonstrou um aumento significativo da expressão relativa no grupo CHL1 (CTR vs CHL1, p<0,0001; CHL1 vs CHL10, p<0,0001) em relação aos demais grupos (Figura 11A). A expressão gênica do receptor de estrógeno-α também aumentou significativamente no grupo CHL1 (CTR vs CHL1, p=0,0002; CHL1 vs CHL10, p<0,0001) (Figura 11B).

Figura 11 - Expressão gênica relativa *AR* e *ER*-α no testículo.

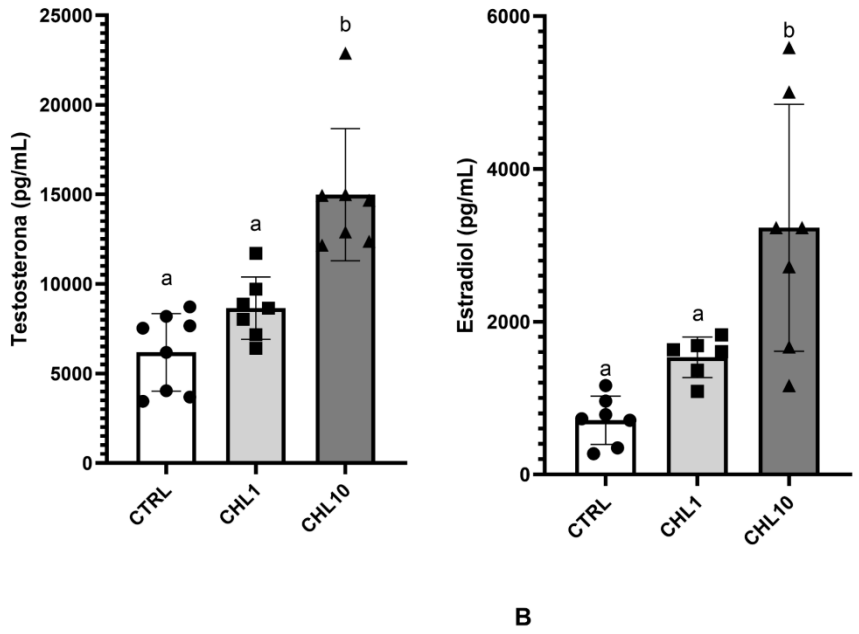


Valores obtidos pelo método $2^{-(\Delta-\Delta Ct)}$, normalizados pelo *GAPDH*, utilizando o grupo controle como referência, expressos em média ± desvio padrão. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. A) Dosagem da expressão gênica relativa de *AR*; B) Dosagem da expressão gênica relativa de *ER-a*. [a,b] Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si, p<0,05. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

7.4 NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL

Em relação a testosterona, a exposição a maior dose de CHL foi capaz de aumentar os níveis séricos deste hormônio, quando comparado ao grupo controle (CTR vs CHL10, p=0,0003; CHL1 vs CHL10, p=0,0406). As concentrações séricas de testosterona foram similares entre os grupos CHL1 e CTRL (p=0,5263) (Figura 12A). Da mesma forma, as concentrações séricas de estradiol aumentaram no grupo que recebeu a maior dose (CHL10) em relação ao controle (CTR vs CHL10, p=0,0005) e a menor dose (CHL1 vs CHL10, p=0,0176). As concentrações desse hormônio no grupo CTRL e CHL1 foram similares entre si (Figura 12B).

Figura 12 - Concentrações séricas de testosterona e estradiol.



Valores expressos em média ± desvio padrão. Kruskall Wallis com teste *a posteriori* de Dunn. A) Dosagem da concentração sérica do hormônio testosterona; B) Dosagem da concentração sérica do hormônio estradiol. [a,b] Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si, $p<0,05$. CTRL: grupo controle. CHL1: grupo clorotalonil 1mg/kg. CHL10: grupo clorotalonil 10mg/kg.
Fonte: da autora.

8 DISCUSSÃO

Dados da Organização Internacional do Trabalho (OIT) indicam que os agrotóxicos são responsáveis por aproximadamente 70 mil casos anuais de intoxicações agudas e crônicas, configurando-se como uma importante causa de óbito em países em desenvolvimento (INCA, 2022). O CHL é um composto amplamente utilizado, cuja exposição tem sido associada a distúrbios gastrointestinais, danos hepáticos, toxicidade reprodutiva e carcinogênese (Hao et al., 2019). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a exposição às mesmas doses de CHL utilizadas no presente trabalho é capaz de comprometer a atividade mitocondrial de espermatozoides. Além disso, análises histológicas evidenciaram alterações no epitélio epididimário, como espessamento epitelial e presença de infiltrado inflamatório. Nos testículos, o CHL promoveu alterações histopatológicas, interferiu na dinâmica da espermatogênese e modulou enzimas da via esteroidogênica, com subexpressão dos genes *Cyp17a1* (P450c17) e *Cyp19a1* (P450arom) (dados não publicados). Nesse contexto, o presente estudo buscou elucidar os mecanismos por trás das alterações previamente observadas.

A IDA de CHL estabelecida pela ANVISA em 2024 é de 0,03 mg/kg/dia para humanos, dose que pressupõe que não há risco à saúde quando exposto diariamente. Entretanto, no Brasil, a própria ANVISA já relatou a presença de resíduos de CHL acima do limite permitido em diversos alimentos (ANVISA, 2022). Corroborando esses achados, um estudo realizado na China demonstrou que a exposição a resíduos de CHL por meio de uma dieta padrão pode atingir aproximadamente 383,58 μg/kg/dia (Zhang et al., 2016), valor superior a IDA estabelecida (30 μg/kg/dia). Considerando esse cenário e utilizando o conceito de dose humana equivalente (HED) (Nair; Jacob, 2016), as doses empregadas neste estudo correspondem a exposições humanas estimadas entre 81 μg/kg/dia (1 mg/kg/dia no animal) e 810 μg/kg/dia (10 mg/kg/dia no animal), visando mimetizar níveis realistas de exposição ambiental ao CHL.

A avaliação da evolução da massa corporal dos camundongos expostos ao CHL demonstrou que as doses administradas não interferiram nesse parâmetro, sugerindo que a exposição a essas doses de CHL não é suficiente para induzir sinais evidentes de toxicidade sistêmica, como alterações no peso corporal, em animais adultos. Em contraste, Zhang et al. (2019) observaram redução do peso corporal em camundongos púberes expostos à dose de 10 mg/kg, indicando que a idade e o estágio de desenvolvimento podem influenciar a susceptibilidade aos efeitos tóxicos do CHL.

De acordo com a U.S. Environmental Protection Agency (EPA), um desregulador endócrino (DE) é definido como um agente exógeno capaz de interferir na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pela manutenção da homeostase e pela regulação dos processos de desenvolvimento (EPA, 2011). Diversos contaminantes ambientais, incluindo agrotóxicos, apresentam potencial para perturbar o funcionamento do sistema endócrino, caracterizando-se como DE (Damstra, 2020). No presente estudo, a exposição ao CHL na dose de 10 mg/kg em camundongos adultos foi capaz de alterar significativamente os níveis séricos de testosterona e estradiol, evidenciando disrupção endócrina direta no eixo HHG. Para aprofundar a compreensão desses efeitos, foi avaliada a expressão gênica relativa dos receptores de andrógeno (*AR*) e estrogênio alfa (*ER-α*). As análises por RT-qPCR mostraram um aumento da expressão desses receptores no grupo CHL1, indicando que o CHL apresenta potencial de disrupção endócrina mesmo em baixas doses. O aumento das concentrações de estradiol é compatível com a maior expressão de receptores associados à sinalização estrogênica, enquanto a elevação dos níveis de testosterona pode estar associada à desinibição do feedback

negativo ou alterações no processo de aromatização, possivelmente decorrentes das mudanças transcricionais em moduladores da resposta hormonal.

Resultados semelhantes foram observados por Guillante et al. (2024), que demonstraram que o CHL nas concentrações 0,1 e 10 μg/L foi capaz de afetar o eixo HHG em zebrafish (*Danio rerio*), desregulando a expressão de genes envolvidos na esteroidogênese e, consequentemente, a produção hormonal. Em camundongos fêmeas, Hao et al. (2019) relataram que o CHL mas doses 0,1, 1, 10, and 50 mg/kg reduziu a expressão de proteínas associadas à produção de hormônios esteroides e diminuiu a expressão do receptor de *ER-α* nos ovários. Diferentemente desses achados, no presente estudo foi observado aumento das concentrações séricas de testosterona e estradiol, o que pode representar uma resposta compensatória do organismo frente à exposição ao contaminante. Ademais, outros agrotóxicos organoclorados, classe à qual o clorotalonil pertence, já foram amplamente descritos como DE (Martyniuk; Mehinto; Denslow, 2020).

O epidídimo é responsável pelo transporte, maturação e armazenamento dos espermatozoides, sendo essencial para o desenvolvimento da motilidade e da capacidade fecundante dessas células (Robaire; Hinton, 2015). Assim, a integridade estrutural e funcional desse órgão é fundamental para a manutenção da fertilidade masculina. Estudos que avaliam os efeitos de organoclorados no epidídimo frequentemente relatam a presença de células epiteliais desprendidas e leucócitos na luz dos ductos epididimários, sugerindo a indução de uma resposta inflamatória local (Mazen; Zidan, 2017). No presente estudo, a avaliação do perfil inflamatório revelou redução das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IFN-γ, bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, nas regiões de cabeça e corpo do epidídimo, sem alterações significativas na cauda. As diferentes respostas em cada região do órgão podem ser explicadas pelas diferenças funcionais de cada microambiente, uma vez que a cabeça e o corpo apresentam maior atividade secretória e imunológica, enquanto a cauda possui um perfil mais imunotolerante, associado à sua função de armazenamento de espermatozoides maduros (Mazen; Zidan, 2017). A literatura mostra que a exposição a agrotóxicos pode perturbar a homeostase celular, causar lesões teciduais e atuar como estímulo antigênico, ativando receptores Toll-like em células epiteliais. Esse processo resulta na liberação de alarminas e mediadores quimiotáticos que promovem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, os quais secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, IL-1β e TNF-α (Lopes-Ferreira et al., 2023). Nesse sentido, a redução das citocinas TNF-α e IFN-γ observada nos grupos expostos ao CHL, associada à presença de células redondas na luz dos vasos sanguíneos epididimários identificadas em análises histológicas (dados não publicados), pode

indicar disfunção imune ou exaustão inflamatória. A IL-10, por sua vez, é uma citocina anti-inflamatória fundamental para a manutenção da barreira hemato-epididimária e para a prevenção de respostas autoimunes contra antígenos espermáticos (Lopes-Ferreira et al., 2023). Assim, a redução dos níveis de IL-10 no grupo CHL1, em comparação ao grupo controle, pode predispor o tecido epididimário ao desenvolvimento de inflamação patológica, mesmo na ausência de elevação de citocinas pró-inflamatórias clássicas.

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante celular. A elevação da produção de ERO é um achado recorrente em estudos que investigam os efeitos de agrotóxicos sobre o sistema reprodutor masculino (Miao et al., 2022). Apesar dos efeitos deletérios relatados, durante o processo de capacitação espermática ocorre fisiologicamente o aumento na produção de ERO, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (Lewis; Aitken, 2001). No presente estudo, os níveis de AOPP e MDA, marcadores clássicos de dano oxidativo, não apresentaram alterações significativas, sugerindo ausência de acúmulo detectável de dano oxidativo no momento da avaliação. Essa ausência pode estar relacionada à ativação de mecanismos antioxidantes compensatórios, como evidenciado pelo aumento da capacidade antioxidante total (TEAC), especialmente no grupo CHL10, indicando um ajuste adaptativo dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Monageng et al., 2023). Por outro lado, observou-se redução significativa das concentrações de glutationa reduzida (GSH) nos grupos expostos ao CHL. A diminuição dos níveis de GSH pode estar relacionada ao seu consumo para neutralização das ERO, prevenindo danos oxidativos aos tecidos testiculares. Além disso, é importante ressaltar que o mecanismo de toxicidade do CHL envolve a depleção de glutationas e tióis solúveis. Como a GSH é o principal antioxidante não enzimático intracelular, a redução desta proteína sugere que o tecido testicular pode estar mais suscetível a episódios de estresse oxidativo, o que levaria ao comprometimento dos espermatozoides, que são células altamente sensíveis ao estresse oxidativo e incapazes de reparar eficientemente tais lesões (Conrad et al., 2014; Aitken; Drevet, 2020).

Em conjunto, os resultados demonstram que o CHL é capaz de promover depleção de glutationas e tióis solúveis no sistema genital masculino, induzindo desbalanço redox e alterando o perfil antioxidante testicular. A literatura evidencia que o aumento de ERO pode comprometer a comunicação entre sistemas endócrinos, afetar a produção hormonal e contribuir para uma regulação inadequada da espermatogênese, além de prejudicar o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutores acessórios (Darbandi et al., 2018). Os achados do presente estudo estão em consonância com Fu et al. (2024), que demonstraram

que o organoclorado 3-cloro-1,2-propanodiol nas doses 3 mg/kg e 5 mg/kg por peso corporal e induziu alterações no perfil oxidativo em ratos wistar, com redução de antioxidantes como a GSH, alterações hormonais e apoptose de células testiculares. De modo semelhante, Guillante et al. (2024) observaram que o CHL afetou o eixo HHG em *zebrafish*, promovendo desbalanço hormonal. Em relação às citocinas epididimárias, os resultados indicam que a exposição subcrônica ao CHL induz desbalanço entre citocinas mediadoras da inflamação, caracterizada pela supressão de citocinas pró-inflamatórias associada à redução de mediadores imunorreguladores, especialmente nas regiões de cabeça e corpo do epidídimo, sugerindo comprometimento da homeostase imunológica local.

9 CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que, mesmo em baixas doses, o clorotalonil pode atuar como um desregulador endócrino, resultando em desbalanços nas concentrações séricas dos hormônios testosterona e estradiol, e a expressão de receptores hormonais em testículos. Além disso, o composto exerce efeito direto sobre o sistema de defesa antioxidante do testículo, tornando o órgão e os gametas mais suscetíveis ao dano oxidativo. No epidídimo, o clorotalonil afetou a produção de citocinas, o que favorece um ambiente mais vulnerável a infecções e inflamações. Esses achados reforçam a necessidade de reavaliação toxicológica do clorotalonil.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1, 2014.

AGARWAL, A. Impact of inflammation on male fertility. **Frontiers in Bioscience**, v. E3, n. 1, p. 89–95, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Ministério da Saúde. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos** (PARA 2018-2019 e 2022). Brasília, DF: ANVISA, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assun]tos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/apresentacao-para-018-2022.pdf. Acesso em 20 de julho de 2025.

AITKEN, R. J. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v.108, p. 2017–2025, 1995.

AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 111, 27 jan. 2020.

ANTON, F. et al. A comparative study of mast cells and eosinophil leukocytes in the mammalian testis. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 45(4), p. 209–218, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA (ABRASCO). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Disponível em: https://abrasco.org.br/download/dossie-abrasco-um-alerta-sobre-os-impactos-dos-agrotoxicos-na-saude/. Acesso em 20 de julho de 2025.

BARATI, E.; NIKZAD, H.; KARIMIAN, M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 3 ago. 2019.

BORGHT, M. V.; WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clinical Biochemistry**, v. 62, p. 2-10, dez 2018.

BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. *Goodman & Gilman's: as bases farmacológicas da terapêutica*. 14. ed. Porto Alegre: AMGH, 2021.

BRYNIARSKI, K. et al. Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 27–35, 2004.

CANNARELLA, R. et al. Temporal decline of sperm concentration: role of endocrine disruptors. **Endocrine**, 4 out. 2022.

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

CONRAD, M. et al. ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1566–1574, 1 ago. 2014.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 213–227, 5 nov. 2009.

DACHEUX, J. L. et al. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 36–42, maio 2006.

DAMSTRA, T. Potential Effects of Certain Persistent Organic Pollutants and Endocrine Disrupting Chemicals on the Health of Children. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 457–465, jan. 2002.

DARBANDI, M. et al. Reactive oxygen species and male reproductive hormones. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, 11 set. 2018.

DART, D. A. et al. Visualising Androgen Receptor Activity in Male and Female Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71694, 7 ago. 2013.

DE COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2012, p. 1–52, 2012.

DUTTA, D. et al. Testosterone regulates granzyme K expression in rat testes. **Endocrine Regulations**, v. 51, n. 4, p. 193-204, 2017.

DUTTA, S. et al. Oxidative Stress, Testicular Inflammatory Pathways, and Male Reproduction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10043, 17 set. 2021.

EDELSZTEIN, N. Y. et al. AMH Regulation by Steroids in the Mammalian Testis: Underlying Mechanisms and Clinical Implications. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 31 maio 2022.

EPA, U. **Peso da evidência do programa de triagem de disruptores endócrinos**: avaliação dos resultados da triagem de Nível 1 do EDSP para identificar a necessidade de testes de Nível 2. Washington, DC: Escritório de Segurança Química e Prevenção da Poluição, 2011.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–285, abr. 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Summary Report from the 2012 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues**. World Health Organization, 2012.

FRANÇAL. R.; GODINHO, C. L. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (Felis catus). **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1554–1561, 1 maio 2003.

FLICKINGER, C. J. et al. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. **The Anatomical Record**, v. 248, p. 380– 390, 1997.

FOLEY, G.L. Overview of Male Reproductive Pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 29(1), p. 49-63, 2001.

FU, K. et al. 3-chloro-1,2-propanediol induces oxidative stress and promotes testicular damage and infertility in rats through CYP2C9. **Reproductive Toxicology**, v. 128, p. 108633–108633, 27 jun. 2024.

GUARNOTTA, V. et al. Impact of Chemical Endocrine Disruptors and Hormone Modulators on the Endocrine System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5710, 20 maio 2022.

GUILLANTE, T. et al. Chlorothalonil as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*): Impact on the hypothalamus-pituitary-gonad axis and sperm quality. **Chemosphere**, v. 352, p. 141423, 2024.

HAM, J. et al. Cigarette smoke aggravates asthma by inducing memory-like type 3 innate lymphoid cells. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 4 jul. 2022.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology,** v. 155, p. 217–223, jan. 2016.

HAO, Y. et al. Chlorothalonil inhibits mouse ovarian development through endocrine disruption. **Toxicology Letters**, v. 303, p. 38-47, mar. 2019.

HEDGER, M. P. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32(6), p. 625–640, 2011.

HESS, R. A.; COOKE, P. S. Estrogen in the male: a historical perspective†. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 1, p. 27–44, 9 fev. 2018.

Infertility prevalence estimates, 1990–2021. Geneva: World Health Organization; 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto n° 4.074/2002, 2017. Disponível em: http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (Brasil). Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins no Brasil: série histórica 2009-2022. Brasília, DF: IBAMA, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos. Acesso em: 22 julho, 2025..

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer. Agrotóxico. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-

e-no-ambiente/agrotoxico#:~:text=Agrotóxicos%20são%20produtos%20químicos%20sintéticos,2002%3B%20INCA%2C%202021). Acesso em: 22 julho, 2025.

JOSSO, N.; REY, R. A.; PICARD, J.-Y. Anti-Müllerian Hormone: A Valuable Addition to the Toolbox of the Pediatric Endocrinologist. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas.** 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. E-book. p.451. ISBN 9788527739283. Disponível em: https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527739283/. Acesso em: 02 fev. 2026.

KOSKENNIEMI, J. J.; VIRTANEN, H. E.; TOPPARI, J. Testicular growth and development in puberty. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 24, n. 3, p. 215–224, jun. 2017.

KUIRI-HÄNNINEN, T.; SANKILAMPI, U.; DUNKEL, L. Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Infancy: Minipuberty. Hormone Research in **Paediatrics**, v. 82, n. 2, p. 73–80, 2014.

LEVINE, H. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 6, p. 646–659, 25 jul. 2017.

LEWIS, B.; AITKEN, R. J. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. **Journal of Andrology**., v. 22(4), p. 611–622, 2001.

LI, H. et al. Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse spermatogenesis through epigenetic pathways. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, 2020.

LI, L. et al. Hormone Regulation in Testicular Development and Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5805, 1 jan. 2024.

LIN, B. et al. Effects of organochlorine exposure on male reproductive disorders in an electronic waste area of South China. **Environment International**, v. 147, p. 106318, 1 fev. 2021.

LIU, Y. et al. Pesticides, cancer, and oxidative stress: an application of machine learning to NHANES data. **Environmental sciences Europe**, v. 36, n. 1, 8 jan. 2024.

LOPES-FERREIRA, M. et al. Pesticide-Induced Inflammation at a Glance. **Toxics**, v. 11, n. 11, p. 896, 31 out. 2023.

LYMPERI, S.; GIWERCMAN, A. Endocrine disruptors and testicular function. **Metabolism**, v. 86, p. 79–90, set. 2018.

MA, Y. et al. Immunoregulation and male reproductive function: Impacts and mechanistic insights into inflammation. **Andrology**, 21 out. 2024.

MACHADO et al. Chemical Contamination of Water and Sediments in the Pardo River, São Paulo, Brazil. **Procedia Engineering**, v. 162, p. 230–237, 1 jan. 2016.

MARESZ, K. et al. IL-13 induces the expression of the alternative activation marker Ym1 in a subset of testicular macrophages. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, p. 140–148, 2008.

MARTYNIUK, C. J.; MEHINTO, A. C.; DENSLOW, N. D. Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. M**olecular and Cellular Endocrinology**, v. 507, p. 110764, 1 maio 2020.

MAZEN, N. F.; ZIDAN, R. A. Histological study on the effect of aroclor 1254 on the epididymis of adult rats and the role of L-NAME administration. **Ultrastructural Pathology**, v. 41, n. 2, p. 154-167, 2017.

MEACHAM, R. B. et al. Male Infertility. **Journal of Urology**, v. 177, n. 6, p. 2058–2066, jun. 2007.

MIAO, Y. et al. Organochlorine pesticide exposures, metabolic enzyme genetic polymorphisms and semen quality parameters among men attending an infertility clinic. **Chemosphere**, v. 303, n. Pt 1, p. 135010, set. 2022.

MONAGENG, E. et al. A Review on the Impact of Oxidative Stress and Medicinal Plants on Leydig Cells. **Antioxidants**, v. 12, n. 8, p. 1559–1559, 4 ago. 2023.

MOUTARD, L. et al. Steroidogenesis and androgen/estrogen signaling pathways are altered in in vitro matured testicular tissues of prepubertal mice. **eLife**, v. 12, 14 dez. 2023.

NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER. *Illegal, cancelled, and restricted pesticides*. Disponível em: https://npic.orst.edu/reg/restricted.html.

NORTOX: 2,4,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile. Local:Nortox S/A, 2023. **Bula do composto.**

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. [Delayed effects of organochlorine pesticides in man]. **Revista De Saude Publica**, v. 32, n. 4, p. 372–382, ago. 1998.

ODUWOLE, O. O.; PELTOKETO, H.; HUHTANIEMI, I. T. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. 763, 14 dez. 2018.

OLIVEIRA, R. J. et al. Effects of β-glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 111–119, 1 jan. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Chemical safety: pesticides*. Disponível em: https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chemical-safety-pesticides. Acesso em 20 de julho de 2025.

PAUL, K. C. et al. A pesticide and iPSC dopaminergic neuron screen identifies and classifies Parkinson-relevant pesticides. **Nature Communications**, v. 14, p. 2803, 16 maio 2023.

PAWLINA, Wojciech. **Ross Histologia Texto e Atlas - Correlações Com Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2025. E-book. p.894. ISBN 9788527740906. Disponível em: https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527740906/. Acesso em: 02 fev. 2026.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 15 jul. 2014.

REBELO, F. M. et al. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007 **- análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3493–3502, ago. 2011.

RISBRIDGER, G.; TAYLOR, R. Physiology of the Male Accessory Sex StructuresThe Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, p. 1149–1172, 2006.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The Epididymis. In: Knobil E., Neil JD. (Eds.). **The physiology of reproduction. New York: Elsevier**, 4ed, 2015.

ROE, K. An inflammation classification system using cytokine parameters. Scandinavian **Journal of Immunology**, v. 93, n. 2, 18 set. 2020.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 83–83, fev. 1993.

RUSSELL, L. D.; DE FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue and Cell**, v. 27, n. 2, p. 129–147, abr. 1995.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 705–714, 1999.

SETCHELL, B.; BREED, W. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, p. 771–825, 2006.

SIERVO, G. et al. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone. **Toxicology**, v. 330, p. 1–8, 1 abr. 2015.

THOMPSON, Beti et al. Pesticide take-home pathway among children of agricultural workers: study design, methods, and baseline findings. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 45, n. 1, p. 42-53, jan. 2003.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, mar. 1969.

TOSHIMORI, K.; EDDY, EM. M. The Spermatozoon. In: Knobil E., Neil JD. (Eds.). **The physiology of Reproduction. New York: Elsevier**, 4a ed, 99–147, 2015.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. *Endocrine Disruptor Screening Program weight-of-evidence: evaluating results of EDSP Tier 1 screening to identify the need for Tier 2 testing*. Washington, DC: Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, 2011.

VAN SCOY, A. R.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of chlorothalonil. **Rev Environ Contam Toxicol,** v. 232, p. 89-105, 2014.

VINCENT, P.G.; SISLER, H.D. Mechanism of antifungal action of 2,4,5,6 tetrachloroisophthalonitrile. **Physiol Plant**, v. 21, p. 1249–1264, 1968.

WAGNER, H.; CHENG, J. W.; KO, E. Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. **Arab Journal of Urology**, v. 16, n. 1, p. 35–43, mar. 2018.

WANG, C. et al. The classic EDCs, phthalate esters and organochlorines, in relation to abnormal sperm quality: a systematic review with meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19982, 25 jan. 2016.

WANG, G. et al. Tumour extracellular vesicles and particles induce liver metabolic dysfunction. **Nature**, p. 1–9, 24 maio 2023.

WANG, J. et al. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. **Biology Reproductive**, v. 51, p. 551–561, 1994

WANG, Qi et al. Effects and mechanisms of pyrethroids on male reproductive system. **Toxicology**, v. 438, p. 152460, 2020.

WANG, Y. S. et al. Chlorothalonil exposure compromised mouse oocyte in vitro maturation through inducing oxidative stress and activating MAPK pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 273, p. 116100, 2024.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479–1490, 1 abr. 2008.

WHITMORE, R. W. et al. National Home and Garden Pesticide Use Survey. **ACS symposium series**, p. 18–36, 18 fev. 1993.

WIRTZ, S. et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1295–1309, 1 jul. 2017.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, n. 5, p. 1304–1313, 1996.

YEUNG, C.-H.; COOPER, T. G. Acquisition and Development of Sperm Motility Upon Maturation in the Epididymis. **The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice**, p. 417–434, 2002.

YILMAZ, B. et al. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 21, n. 1, p. 127–147, 3 dez. 2019.

ZHANG, H. et al. Monitoring and probabilistic risk assessment of chlorothalonil residues in vegetables from Shandong province (China). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 41-45, 2016.

ZHANG, P. et al. Low dose chlorothalonil impairs mouse spermatogenesis through the intertwining of Estrogen Receptor Pathways with histone and DNA methylation. **Chemosphere**, v. 230, p. 384–395, 1 set. 2019.

ZHU, L. et al. Effect of TSH on aromatase expression of ovarian granulosa cells in obese mice. **Hormones**, v. 23, n. 4, p. 821–829, 13 jun. 2024.

ZOELLER, R. T. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097–4110, set. 2012.

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFTM)

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comissão de Ética no Uso de Animais
R. Conde Prados, nº 191 - Bairro Abadia Uberaba/MG CEP 38025-260
(34) 3700-6802 E-mail: ceua@uftm.edu.br

Uberaba, 04 de setembro de 2023

PARECER Nº	**23/2023/CEUA/PROPPG**
PROCESSO Nº	23085.007727/2023-25
INTERESSADO:	GLAUCIA ELOISA MUNHOZ DE LION SIERVO
ASSUNTO:	**Parecer técnico: Impacto do agrotóxico Clorotalonil sobre aspectos reprodutivos de camundongos machos adultos**

Certificamos que a proposta intitulada **"Impacto do agrotóxico Clorotalonil sobre aspectos reprodutivos de camundongos machos adultos"**, registrada com o **23085.007727/2023-25**, sob a responsabilidade de Gláucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de **01-09-2023.** Após a conclusão dos experimentos pilotos e emissão de capacitação específica, esses comprovantes devem ser inseridos no processo para que sejam validados pela coordenação/secretaria, a fim de que a quantidade restante de animais possa ser liberada.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/10/2023 à 02/10/2026
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	48
Peso/idade	50 dias
Gênero	Machos
Origem	Biotério Central da UFTM

ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES
Coordenador da CEUA

Documento assinado eletronicamente por **ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES**, **Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais**, em 04/09/2023, às 12:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023.