



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Rebeka da Costa Alves

**Efeitos de doses subletais de inseticidas biológicos, administrados durante
prenhez e lactação, sobre aspectos reprodutivos, hepático e renal em filhotes
de ratas Wistar**

RECIFE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Rebeka da Costa Alves

**Efeitos de doses subletais de inseticidas biológicos, administrados durante
prenhez e lactação, sobre aspectos reprodutivos, hepático e renal de filhotes
de ratas Wistar**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biociência Animal da
Universidade Federal Rural de Pernambuco
como pré-requisito para obtenção do grau
de Doutora em Biociência Animal. Área de
concentração de morfofisiologia.**

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

RECIFE

2020

Rebeka da Costa Alves

**Efeitos de doses subletais de inseticidas biológicos, administrados durante
prenhez e lactação, sobre aspectos reprodutivos, hepático e renal de filhotes
de ratas Wistar**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biociência Animal da
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
como pré-requisito para obtenção do grau
de Doutora em Biociência Animal. Área de
concentração de Morfofisiologia.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Dra. Ismaela Maria Ferreira de Melo - PNPd/CAPES/UFRPE

Prof^a. Dra. Ana Janaína Jeanine Martins de Lemos Jordão – UFCG

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus Cristo por ter sido o divino companheiro nessa jornada, por ter sido a força e a coragem que eu não tinha, por ter sido o amigo fiel nas horas difíceis.

À minha Mãe, Marilene Alves, por todo seu amor que estará para sempre em meu coração e em minha memória.

A meu esposo, Anderson Machado, por seu apoio, companheirismo e dedicação a nós.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) que contribuiu para realização deste curso.

À Fundação de Amparo A Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira, pela oportunidade e por todo aprendizado.

Ao professor Valdemiro Amaro da Silva Júnior por sua ajuda e disponibilidade nas análises histopatológicas e pelas contribuições para realização deste trabalho.

À professora Jeanine Lemos por fornecer os cálculos para realização das dosagens dos inseticidas.

Ao professor Jorge Braz Torres, pela concessão dos inseticidas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal - UFRPE, pela contribuição na minha formação profissional.

À Caroline Guimarães, Cintia Giselle, Érique Ricardo e Ismaela Ferreira por terem muito contribuído para a elaboração deste trabalho, sem a ajuda de vocês não sei como teria conseguido.

A todos os amigos do Labemovi: Aline Mariano, Ana Cláudia, Anthony Marcos, Bárbara Brooklyn, Bruno Nascimento, Clovis Lapa, Laís Santos, Maria Vanessa, Marina Baptista, Nane Santos, Nivaldo Bernardo, Paloma Karen, Rodrigo Jonas, Yasmin Santos e Yuri Albuquerque, todos vocês contribuíram de alguma forma e tornaram os dias no laboratório mais divertidos também.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Devido à utilização em larga escala, os inseticidas estão entre os fatores de risco mais importantes para a saúde do homem, animais e meio ambiente. Como alternativa ao uso de inseticidas químicos, os bioinseticidas à base das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* são uma estratégia significativa e muito utilizada contra insetos praga. Porém, apesar destas proteínas serem consideradas seguras para vertebrados, estudos tem apresentado resultados que discordam dessa afirmação. Sendo assim, esta pesquisa se propõe a investigar os possíveis efeitos na morfofisiologia reprodutiva, hepática e renal, em filhotes de ratas que receberam os inseticidas biológicos XenTari® WG e Dipel® durante prenhez e lactação. Foram utilizadas 20 ratas, *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar com 90 dias de idade, acasaladas e divididas nos seguintes grupos: GC – Ratas prenhes; GX – Ratas prenhes que receberam XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*); GD_i – Ratas prenhes que receberam Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*); e GDe – Ratas prenhes que receberam deltametrina (Keshet® 25EC). A administração dos inseticidas foi realizada por gavagem, na dosagem de 1mg/100g/dia (Grupos GX e GD_i), e 2mg/Kg/dia (Grupo GDe), durante toda a gestação e lactação. Os resultados revelaram que a administração dos inseticidas biológicos e sintético reduziu o ganho de peso das matrizes quando comparados ao grupo controle. Os inseticidas biológicos também promoveram redução da prole, do peso, do comprimento, causaram malformação e mortalidade. Houve retardo no período de abertura vaginal, aumento do metaestro em relação as outras fases, redução do estrógeno, progesterona (fêmeas) e testosterona (machos), ovários com numerosos folículos terciários, atresícos e poucos corpos lúteos na prole dos três grupos que receberam inseticidas e, apenas nos grupos XenTari® e Dipel® foi observado alterações histopatológicas nos testículos, com vacuolizações e descamação do epitélio seminífero. A análise quantitativa dos receptores de andrógeno e estrógeno revelou redução significativa para ambos nas gônadas da prole cujas ratas receberam os inseticidas biológicos e a deltametrina e, nestes mesmos grupos, a morfometria testicular revelou redução do diâmetro tubular, da altura do epitélio seminífero e do comprimento total tubular, e nos ovários observou-se menor número de folículos primários, secundários e corpos lúteos, e aumento no número de folículos terciários

e atrésicos. A administração dos inseticidas também reduziu os níveis dos biomarcadores de toxicidade alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina, e os inseticidas biológicos promoveram alterações histopatológicas no fígado, com a presença de congestão de veia porta, centrolobular e nos capilares sinusóides, e no rim presença de congestão cortical e redução do espaço subcapsular. Houve redução significativa de glicogênio no fígado, e a morfometria revelou redução do parênquima lobular e aumento no parênquima não lobular, enquanto no rim observou-se redução do diâmetro e volume do glomérulo e da cápsula de Bowman na prole das ratas tratadas com os inseticidas. Assim, conclui-se que tanto os inseticidas biológicos XenTari® e Dipel®, quanto o inseticida sintético deltametrina, em doses subletais em ratas prenhes, promovem alterações reprodutivas, hepáticas, renais, e no desenvolvimento dos filhotes, que se prolongam até a fase adulta, sendo a maioria desses efeitos ainda mais expressivos nos grupos que receberam os inseticidas biológicos.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, gônadas, inseticida, mamífero, neonatos, toxicidade.

ABSTRACT

Due to their large-scale use, insecticides are among the most important risk factors for the health of man, animals, and the environment. As an alternative to the use of chemical insecticides, bioinsecticides based on the Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* are a significant and widely used strategy against insect pests. However, although these proteins are considered safe for vertebrates, studies have shown results that disagree with this statement. Therefore, this research aims to investigate the possible effects on reproductive, hepatic and renal morphophysiology in puppies of rats that received the biological insecticides XenTari® WG and Dipel® during pregnancy and lactation. Twenty rats, *Rattus norvegicus albinus* of the Wistar strain, 90 days old, mated and divided into the following groups were used: CG - Pregnant rats; GX - Pregnant rats that received XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*); GDi - Pregnant rats that received Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*); and GDe - Pregnant rats that received deltamethrin (Keshet® 25EC). Insecticides were administered by gavage, at a dosage of 1mg/100g/day (Groups GX

and GDi), and 2mg/Kg/day (Group GDe), throughout pregnancy and lactation. The results revealed that the administration of biological and synthetic insecticides reduced the weight gain of the matrices when compared to the control group. Biological insecticides also promoted a reduction in offspring, weight, and length, causing malformation and mortality. There was a delay in the vaginal opening period, an increase in the metestrus about the other phases, a reduction in estrogen, progesterone (females) and testosterone (males), ovaries with numerous tertiary follicles, atresia and few corpus luteum in the offspring of the three groups that received insecticides and, only in the XenTari® and Dipel® groups, histopathological changes in the testicles were observed, with vacuolations and desquamation of the seminiferous epithelium. Quantitative analysis of androgen and estrogen receptors revealed a significant reduction for both offspring gonads whose rats received biological insecticides and deltamethrin, and in these same groups, testicular morphometry revealed a reduction in tubular diameter, height of seminiferous epithelium and tubular total length, and in the ovaries there was a smaller number of primary, secondary and corpus luteum follicles, and an increase in the number of tertiary and atretic follicles. The administration of insecticides also reduced the levels of biomarkers of toxicity alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and creatinine, and the biological insecticides promoted histopathological changes in the liver, with the presence of portal vein, centrilobular and sinusoid capillaries congestion, and in the kidney, presence of cortical congestion and reduction of the subcapsular space. There was a significant reduction in glycogen in the liver, and the morphometry revealed a reduction in the lobular parenchyma and an increase in the non-lobular parenchyma, while in the kidney there was a reduction in the diameter and volume of the glomerulus and Bowman's capsule in the offspring of the rats treated with the insecticides. Thus, it is concluded that both the biological insecticides XenTari® and Dipel®, as well as the synthetic insecticide deltamethrin, in sublethal doses in pregnant rats, promote reproductive, hepatic and renal changes, and in the development of the puppies, being which last until the adult phase, most of these effects were even more expressive in the groups that received biological insecticides.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, gonads, insecticide, mammal, neonates, toxicity.

SUMÁRIO

Preâmbulo

RESUMO	V
ABSTRACT	VI

Capítulos

I	1. INTRODUÇÃO.....	14
	2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
	2.1. Inseticidas.....	16
	2.2. Inseticidas sintéticos.....	17
	2.2.1. Toxicidade em mamíferos.....	18
	2.3. Inseticidas Biológicos.....	20
	2.3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
	2.3.1.1. Toxicidade de <i>B. thuringiensis</i> em mamíferos.....	23
	2.3.1.2. <i>B. thuringiensis</i> e Reprodução.....	25
	3. OBJETIVOS.....	26
	4. REFERÊNCIAS.....	27
II	Bioatividade do <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> e var. <i>Kurstaki</i> administrado durante a prenhez e lactação e seu reflexo sobre aspectos macroscópicos e reprodutivos da prole.....	33
	RESUMO.....	33

	ABSTRACT.....	34
	INTRODUÇÃO.....	35
	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
	RESULTADOS.....	41
	DISCUSSÃO.....	43
	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	47
III	Alterações renais e hepáticas na prole de ratas que receberam inseticidas biológicos durante prenhez e lactação.....	71
	RESUMO.....	71
	ABSTRACT.....	72
	INTRODUÇÃO.....	73
	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
	RESULTADOS.....	78
	DISCUSSÃO.....	79
	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II	Pg.
Tabela 1: Percentual de mortalidade da prole das ratas dos grupos experimentais.....	56
Tabela 2: Médias dos dados morfométricos dos testículos da prole das ratas dos grupos experimentais.....	62
Tabela 3: Médias dos dados morfométricos dos ovários da prole das ratas dos grupos experimentais.....	62
 CAPÍTULO III	
Tabela 1: Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos hepático e renal da prole aos 60 e 90 dias de vida.....	88
Tabela 2: Média $\pm$ desvio padrão do percentual do parênquima lobular e não lobular do fígado da prole aos 90 dias de vida.....	94
Tabela 3: Média $\pm$ desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins da prole aos 90 dias de vida.....	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	
Figura 1: Modo de ação de <i>Bacillus thuringiensis</i> em inseto susceptível.....	23
 CAPÍTULO II	
Figura 1: (A) Médias do ganho de peso das matrizes dos grupos experimentais. (B) Médias do número, (C) peso e (D) comprimento dos	

filhotes das matrizes dos grupos experimentais. (E) Malformação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p<0,05$).....	55
Figura 2: Ciclicidade estral após abertura vaginal. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p<0,05$).....	56
Figura 3: Níveis hormonais da prole aos 60 dias de vida, (A) Estrógeno e progesterona, (B) Testosterona; e aos 90 dias de vida, (C) Estrógeno e progesterona, (D) Testosterona. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p<0,05$).....	57
Figura 4: Fotomicrografia dos ovários da prole aos 90 dias de vida. (A) GC; (B) GX; (C) GDi e (D) GDe. Em detalhe folículos atrésicos (setas). H.E.....	58
Figura 5: Fotomicrografia dos testículos da prole aos 90 dias de vida. (A-B) GC; (C-D) GX; (E-F) GDi e (G-H) GDe. ES – epitélio seminífero; seta curta – célula de Sertoli; seta longa – vacuolização do epitélio seminífero; ponta de seta – necrose (núcleo picnotico) e DCe – descamação do epitélio seminífero. Azul de toluidina.....	59
Figura 6: Imunohistoquímica para receptores de estrógeno nos ovários da prole aos 90 dias de vida. (A) GC; (B) GX; (C) GDi e (D) GDe. Em (E) notar redução na quantificação desses receptores. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p<0,05$).....	60
Figura 7: Imunohistoquímica para receptores de andrógenos nos testículos da prole aos 90 dias de vida. (A) GC; (B) GX; (C) GDi e (D) GDe. Em (E) notar redução na quantificação desses receptores. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p<0,05$).....	61

CAPÍTULO III

Figura 1: Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais. (A-B) GC, (C-D) GX, (E-F) GDi e (G-H) GDe. Seta longa – veia centrolobular; Seta curta – cordão de hepatocitos; Ponta de seta – sinusoide; Asteriscos – congestão da veia centrolobular; Seta branca – congestão dos sinusoides. H.E.....	89
Figura 2: Fotomicrografia dos rins da prole dos grupos experimentais. (A-B) GC, (C-D) GX, (E-F) GDi e (G-H) GDe. Gr – glomérulo renal; Seta curta – espaço subcapsular; Seta longa – congestão cortical; Asterisco – atrofia glomerular. H.E.....	90
Figura 3: Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais. (A) GC, (B) GX, (C) GDi e (D) GDe. (E) Quantificação em pixels do glicogênio. Notar redução significativa nos grupos que receberam inseticidas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). PAS.....	91
Figura 4: Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais. (A) GC, (B) GX, (C) GDi e (D) GDe. (E) Quantificação em pixels de fibras colágenas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Picrosirius.....	92
Figura 5: Fotomicrografia dos rins da prole dos grupos experimentais. (A) GC, (B) GX, (C) GDi e (D) - GDe. (E) Quantificação em pixels de fibras colágenas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Picrosirius.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR - Receptor de andrógeno

ER - Receptor de estrógeno

Bt - Bacillus thuringiensis

Cry - Crystal

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

LD50 - Dose Letal mediana

MON - Monsanto

PPM - Partes Por milhão

VIP - Proteínas Inseticidas Vegetativas

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A crescente utilização de agrotóxicos para a produção de alimentos e consequentemente a presença de seus resíduos, têm sido motivo de preocupação na esfera da saúde pública (ANVISA, 2014). O Brasil vem marcando a posição de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo nos últimos 10 anos (BURALLI *et al.*, 2018; CARNEIRO; AUGUSTO, 2015), aumentando a predisposição da população aos impactos ocasionados por eles, além de fatores como a carência de educação básica e a falta de consciência dos seus riscos por parte dos agricultores, que utilizam frequentemente esses compostos tóxicos sem os devidos cuidados (BENDETTI *et al.*, 2014; CARNEIRO; AUGUSTO, 2015; NERILO *et al.*, 2014).

A deltametrina é um inseticida da classe dos piretroides do tipo II que é amplamente utilizado em todo o mundo no controle de pragas, e é de interesse para a ciência médico-veterinária e saúde pública (ANADÓN *et al.*, 2013; ANADÓN; MARTÍNEZ; MARTÍNEZ, 2009). Ela apresenta nível de eficácia mais alto dentre os piretroides, aplicável em vários tipos de pragas (REHMAN *et al.*, 2014), sendo descrita como uma substância extremamente tóxica mesmo em baixas concentrações (MEENA; SINGH, 2014).

Segundo Reys (2001), a deltametrina alterou a função placentária e desregulou os anti-androgênicos. Doses de 4,0mg/Kg de deltametrina, administradas em ratas do primeiro dia de prenhez ao último dia de lactação, causaram redução do peso do testículo, epidídimo e da produção espermática dos filhotes observados na fase adulta (ANDRADE *et al.*, 2002). Também houve efeitos reprodutivos em ratos expostos a doses diárias de 5 mg/kg de deltametrina por 35 dias, que afetou a produção de espermatozoides, prejudicou a libido, diminuiu os níveis de testosterona e inibina B, e comprometeu o desempenho reprodutivo (BEN SLIMA *et al.*, 2017).

Como alternativa ao uso de inseticidas químicos, o controle biológico de pragas tem assumido uma importância crescente (SANTOS *et al.*, 2013). Um exemplo deste tipo de controle é a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). As linhagens de Bt e suas proteínas inseticidas têm sido utilizadas como inseticidas biológicos

comerciais durante 50 anos (BETZ *et al.*, 2000; SANCHIS, 2011). *B. thuringiensis* é uma bactéria aeróbica, Gram-positiva, que durante seu processo de esporulação, produz cristais de proteínas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986), conhecidas como proteínas Cry ou δ -endotoxinas. Essas inclusões cristalinas são inseticidas eficientes que atuam ao atravessar a membrana celular do intestino médio do inseto (GILL *et al.*, 1992). As proteínas Cry são consideradas seguras baseada em três características: São ecologicamente corretas, pois afetam poucas espécies de insetos por seu alto grau de especificidade; geralmente não são tóxicas a mamíferos, são digestíveis e não se bioacumulam nos tecidos gordurosos; sua exposição a humanos e insetos não-alvos são muito baixas (RUBIO-INFANTE; MORENO-FIERROS, 2016).

Nos últimos 40 anos, numerosos estudos de segurança animal foram conduzidos demonstrando que inseticidas à base de *B. thuringiensis* são seguros (RUBIO-INFANTE; MORENO-FIERROS, 2016). Porém, outros estudos evidenciaram efeitos biológicos das proteínas Cry em mamíferos, levantando possíveis preocupações de toxicidade. El-Shamei *et al.* (2012) observaram alterações histopatológicas do fígado, rim, testículos, baço e intestino delgado, em ratos alimentados com milho geneticamente modificado Ajeeb YG (contendo o gene *cry1Ab*). A utilização do inseticida biológico XenTari®, produto formulado à base de *Bt*, produziu alterações qualitativas e quantitativas na interação endométrio-blastocisto e em órgãos da prole de ratas, comprometendo o processo de implantação e o desenvolvimento dos neonatos (LE MOS *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013). Segundo Lemos *et al.* (2013), doses subletais também de XenTari®, administrado por via oral, ocasionaram lesões nos rins, fígado, pulmões e redução da fertilidade de ratas.

De acordo com esses relatos, prova-se que os estudos de segurança com produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*, como também com plantas geneticamente modificadas com seus genes, ainda não são suficientes para provar que as proteínas Cry são inócuas a mamíferos ou vertebrados, fazendo-se necessário mais estudos de toxicidade que envolvam sistemas, órgãos, tecidos e células, não sendo apenas a curto prazo (RUBIO-INFANTE; MORENO-FIERROS, 2016). Pesquisas que demonstrem seus efeitos nas futuras gerações ainda são escassos, sendo assim, o presente trabalho se propõe em testar a hipótese se a

administração dos inseticidas biológicos XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*), em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação materna, pode interferir no desenvolvimento de seus filhotes até a fase adulta, no que se refere aos aspectos reprodutivos, hepático e renal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. INSETICIDAS

Os inseticidas são compostos químicos que quando aplicados direta ou indiretamente sobre os insetos, em determinadas concentrações, levam a sua morte (SOUZA, 1999a). Eles podem ser classificados em inorgânicos, orgânicos naturais, orgânicos sintéticos e biológicos (WARE, 1991). Estes inseticidas utilizados na agricultura podem ser conhecidos também por defensivos agrícolas, agrotóxicos, venenos, pesticidas, agroquímicos, dentre outros, variando de acordo com o interesse dos grupos envolvidos, sendo o termo “agrotóxico” um destaque quanto à toxicidade, demonstrando o risco de sua utilização (WAICHMAN, 2012).

O incentivo para o desenvolvimento dessas substâncias foi a pretensão do homem em aumentar a produção dos alimentos, melhorando assim sua condição de vida (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Estima-se que a população mundial alcance aproximadamente 8,04 bilhões em 2025, devido a isso a produção de alimentos e fibras naturais precisam ser aumentadas, o que exigirá o aumento do uso dos inseticidas (YU, 2008). Essa crescente e constante utilização de inseticidas com o intuito de produzir, gera um alerta para estudos acerca de suas toxicidades. Segundo estudos de monitoração biológica, as exposições a inseticidas na população humana são generalizadas. Essa exposição pode ocorrer por várias vias, como no uso doméstico, à deriva agrícola, e pela dieta devido a resíduos de inseticidas que podem ser encontrados em frutas, vegetais, carnes, peixes, arroz e laticínios contaminados (MNIF *et al.*, 2011).

Os agrotóxicos são prejudiciais para o ambiente e a saúde pública, mesmo com a restrição e proibição em diversos países, em decorrência de sua persistência no meio ambiente (CARLOS *et al.*, 2013). Dados de monitoramento de resíduos de

agrotóxicos em alimentos registraram amostras de culturas contendo resíduos de vários ingredientes ativos, como também a presença de agrotóxicos não autorizados, o que reforça a necessidade de acompanhamento no seu uso, e melhoria na formação dos produtores rurais para poder garantir uma diminuição a exposição a essas substâncias tóxicas (ANVISA, 2014).

2.2. INSETICIDAS SINTÉTICOS

Os inseticidas sintéticos foram introduzidos em 1930 (NUNES; RIBEIRO, 1999), começando a serem utilizados em grande escala na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, com o intuito de proteger os soldados de pragas transmissoras de várias doenças, como a malária e a tripanossomíase (doença-dosono), o que no decorrer do tempo, pesquisas foram realizadas para a formulação de novos inseticidas, resultando em vários agrotóxicos que são utilizados até hoje (BRANCO, 2003). O primeiro produto a demonstrar eficácia na atividade como inseticida foi o diclorodifeniltricloroetano, conhecido como DDT, sintetizado por Muller em 1939 (NUNES; RIBEIRO, 1999). Este foi utilizado pela primeira vez em 1943, para controlar a infestação de piolhos em tropas norte-americanas na Europa, durante a Segunda Guerra Mundial, transmissores da doença tifo exantemático (BRANCO, 2003).

Dentre os inseticidas sintéticos estão os grupos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides que possuem como o modo de ação o sistema nervoso (MOSSA, 2018; YU, 2008), sendo o uso dos organoclorados no Brasil proibido desde 1985, por serem bioacumulativos na cadeia alimentar (CARLOS *et al.*, 2013). Os piretroides tem sido os principais inseticidas utilizados no mundo, por serem menos prejudiciais que os organofosforados e os carbamatos, com o registro de mais de 3500 produtos (EPA, 2011).

Os piretroides, que tem como base as piretrinas, substâncias naturais presentes nas flores de *Chrysanthemum* (SANTOS, 2018). Os piretroides podem ser divididos em dois grupos: Tipo I e II, de acordo com a presença do grupo alfa-ciano, e alterações comportamentais (SAKA *et al.*, 2011). Estes inseticidas geralmente são eficazes contra a maioria das pragas agrícolas, em concentrações surpreendentemente baixas, especialmente os compostos do tipo II (WARE;

WHITACRE, 2004). Devido à presença do radical ciano na configuração cis, a deltametrina e a cipermetrina são os piretroides mais neurotóxicos que os demais (SODERLUND, 2012).

Apesar de não serem totalmente conhecidos os efeitos em humanos, estudos apontam que os sintomas mais comuns são irritação no aparelho respiratório após inalação, cansaço, dor de cabeça, náusea, vômito, irritação ocular e dérmica (SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015a). Seus metabólitos já foram detectados em amostras humanas, sendo estes, relacionados com alterações hormonais, reprodutivas e neurocomportamentais (SAILLENFAIT; NDIAYE; SABATÉ, 2015). Associação entre exposição ocupacional a piretroide e alteração na qualidade do sêmen ou genotoxicidade espermática em termos de danos no DNA, e várias aberrações cromossômicas nos espermatozoides, foram observadas em estudos entre trabalhadores expostos (LIFENG *et al.* 2006; XIA *et al.* 2004).

A deltametrina é um piretroide criado a partir de modificações químicas na estrutura das piretrinas naturais (CASARETT; DOULL, 2008). Seus produtos são um dos inseticidas mais usados e populares no mundo (HMDB, 2016). Apresenta como modo de ação a modulação dos canais de sódio, o que prolonga o tempo de entrada dos íons Na⁺ no interior da célula, promovendo a despolarização da membrana e inibindo o potencial de ação, ocasionando a paralisia e morte do inseto, e em concentrações altas atua sobre o ácido γ -aminobutírico (GABA) inibindo os canais de cloreto (PALMQUIST; SALATAS; FAIRBROTHER, 2012; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). A deltametrina é potencialmente utilizada como formulação agrícola para a proteção de cultivos, com atividade inseticida a várias ordens de insetos, como também empregada para o controle de piolhos, moscas e carrapatos no gado, ovelhas e porcos, como produtos veterinários (DING *et al.*, 2004).

2.2.1. Toxicidade em Mamíferos

Doenças como distúrbios neurológicos, alergias, câncer e distúrbios reprodutivos podem ter relação à exposição a inseticidas (MNIF, 2011). Várias pesquisas já demonstraram efeitos negativos em mamíferos devido a utilização dessas substâncias. Estudos com o inseticida organofosforado dimetoato, e o piretroide β -ciflutrina, demonstraram causar estresse oxidativo e danos no fígado e

nos rins de porquinhos da Índia e na prole de camundongos respectivamente (AL-AWTHAN *et al.*, 2012; SONI *et al.*, 2011). De acordo com Lemos *et al.* (2013), a aplicação por gavagem em três diferentes concentrações (1,0, 2,0 e 4,0 mg/kg) de deltametrina, que não causam sintomas clínicos de intoxicação, em ratas albinas prenhes durante os primeiros 7 dias e durante a gestação completa, afetou a histofisiologia dos rins, fígado e pulmões. Em outro estudo, experimentos realizados com a administração subcutânea em ratos, demonstrou que deltametrina foi considerada hepatotóxica, com alterações histopatológicas no parênquima hepático, nefrotóxica, apresentando atrofia dos glomérulos, além de acarretar danos no DNA (CHARGUI *et al.* 2012).

Foi relatado que piretroides podem dificultar as funções endócrinas nas fêmeas, onde a secreção reduzida de gonadotrofinas, comprometimento do crescimento folicular ou interferência enzimática, podem resultar em efeitos tóxicos adversos nos ovários, e redução da síntese de hormônios esteroides. Vários piretroides já apresentaram potencial estrogênico, como a capacidade da permetrina e cipermetrina em inibir, e da tetrametrina em ampliar, isto porque eles podem mimetizar ou inibir ações dos estrogênios endógenos, atuando como moduladores do sistema endócrino em animais e seres humanos (MARETTOVA; MARETTA; LEGÁTH, 2017). Alterações morfométricas e histopatológicas no ovário foram observadas em ratas tratadas com os piretroides cipermetrina e fenvalerato. (FEI *et al.*, 2010; GREWAL *et al.*, 2010; GUERRA *et al.*, 2011; SANGHA *et al.*, 2013).

Deltametrina também demonstrou vários efeitos sobre órgãos do sistema reprodutor feminino e masculino. Alterações morfométricas e histopatológicas foram observadas nos ovários de ratas que receberam deltametrina nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg p.c., com uma diminuição no número de folículos em desenvolvimento, e no número de corpos lúteos, e aumento no número de folículos atrésicos (ALI; FARZANEH, 2014). De acordo com Chargui *et al.* (2009), tratamentos subcutâneos com deltametrina (2 ppm por 30 dias, 20 ppm por 45 dias e 200 ppm por 60 dias) resultaram numa hipoespermatogênese nos testículos acompanhada por apoptose na luz dos túbulos seminíferos, como também uma desarmonia significativa nos hormônios sexuais, onde houve uma diminuição dos hormônios FSH, LH e testosterona na maior dose testada.

Doses orais de Decis® (fórmula comercial de deltametrina) que não causam sintomas clínicos de intoxicação, em ratas albinas, demonstraram uma redução na fertilidade (LEMOS *et al.*, 2013), e ratas tratadas com a dose de 4,0 mg/kg durante os 7 primeiros dias de gestação, exibiram uma redução significativa no número de sítios de implantação, células do trofoblasto vacuolizadas, citotrofoblastos raros, infiltração de leucócitos acentuada, degeneração da decídua e sangue no lúmen uterino (LEMOS *et al.*, 2011). De acordo com Andrade (2002), ratas expostas à deltametrina durante a gestação e lactação, induziram mudanças sutis no comportamento reprodutivo e fisiologia da prole nos machos, em níveis de dose que não causam toxicidade materna.

2.3. INSETICIDAS BIOLÓGICOS

De acordo com Hawkins e Cornell (1999), controle biológico é a diminuição de uma população de pragas pela utilização de predadores, parasitas ou patógenos. O controle biológico de insetos trata-se de uma técnica antiga, pois desde o século III a.C., os chineses utilizavam formigas predadoras para controlar as pragas nas plantas cítricas. Agricultores na Arábia medieval transportavam colônias de formigas predadoras para controlar formigas fitófagas em palmáceas (CARVALHO, 2006).

Uma série de vantagens é proporcionada utilizando agentes entomopatogênicos como, bactérias, fungos e vírus no controle biológico de pragas. Entre estas vantagens estão a proteção do potencial produtivo da cultura, diminuição do uso de produtos químicos tóxicos, preservação do ambiente, especificidade ao inseto alvo, maior segurança ao homem, e ausência de toxicidade às plantas. Devido a isso, o controle biológico vem se expandindo bastante (HAJEK; EILENBERG, 2018).

Com relação ao emprego de inseticidas microbianos, as bactérias da família Bacillaceae são as que possuem as espécies mais promissoras que causam doenças em insetos, em especial os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, que tem como característica a produção de esporos. No Brasil, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é largamente comercializada para o controle de lagartas em vários cultivos (MENEZES, 2003).

As linhagens de *Bt* e suas proteínas tóxicas a insetos têm sido utilizadas como inseticidas biológicos comerciais durante 50 anos (BETZ *et al.*, 2000; SANCIS, 2011). Produtos à base de *B. thuringiensis* correspondem em cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas (VILASBÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007), e devido as vantagens de efetividade, especificidade e segurança ambiental das proteínas Cry, são também uma alternativa para serem expressas em plantas transgênicas, outro método importante na proteção das culturas (JAMES, 2013; KOCK, 2015).

2.3.1. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, aeróbica, mesófila e quimioheterotrófica (ARANTES *et al.* 2002), podendo ser encontrada naturalmente no solo, plantas, produtos estocados, insetos mortos e vivos (VILLAS-BÔAS *et al.* 1998, SUZUKI *et al.* 2004). Possui forma de bastonete, e é capaz de se movimentar devido à presença de flagelos peritríquios (BOBROWSKI *et al.*, 2003; HABIB; ANDRADE, 1998). Quando em condições ambientais desfavoráveis para seu crescimento, *B. thuringiensis* dá início a esporulação, produzindo um esporo e um corpo paraesporal, que contém uma ou mais proteínas cristalinas inseticidas (FEDERICI; SIEGEL, 2008), denominadas de δ -endotoxinas. São três principais tipos de proteínas inseticidas que são produzidos por *Bt*: as proteínas Cry, proteínas Cyt (Citolíticas), e as Vip, que são toxinas produzidas e secretadas durante o crescimento vegetativo (KOCH *et al.*, 2015).

A diversidade dentre essas classes de proteínas provê atividade contra várias larvas de insetos (CRICKMORE *et al.*, 2020). As proteínas Cry são ativas às ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e até Nematoda; já as proteínas Cyt são ativas a mosquitos, larvas de mosca preta e algumas espécies de besouros (SOBERÓN *et al.*, 2013). As Proteínas VIP apresentam atividade a espécies de coleópteros e lepidópteros. Apesar de todas estas proteínas fornecerem atividade inseticida, as proteínas Cry são consideradas as mais importantes para formulações comerciais de *Bt* (KOCH *et al.*, 2015). Atualmente, mais de 300 holótipos de proteínas Cry foram distinguidos e classificados em 78 grupos (*cry* 1- *cry* 78) nos últimos anos, a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis* (CRICKMORE *et al.*, 2020).

Esta bactéria foi descoberta pelo bacteriologista Ishiwata, em 1901 no Japão, onde ele descobriu que ela era a responsável pela mortalidade das larvas do bicho-da-seda. Já em 1911, o microbiologista alemão Berliner descreveu novamente esta mesma bactéria isolada de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), a traça da farinha, e a chamou *B. thuringiensis*, em homenagem a Thuringia, na Alemanha, onde as lagartas foram coletadas. Em 1915, Berliner observou a presença de inclusões parasporais nas células de *B. thuringiensis*, e em 1953, Hannay sugeriu pela primeira vez que a patogenicidade desta bactéria podia estar associada às inclusões cristalinas formadas nas células durante a esporulação. Em 1968, Angus demonstrou que a hipótese de Hannay era válida (ANGUS, 1968; BERLINER, 1911, 1915; HANNAY, 1953; ISHIWATA, 1901).

Inicialmente, as proteínas Cry encontram-se como protoxinas (inativa), que ao serem ingeridas pela larva suscetível, serão dissolvidas no intestino médio, devido ao meio alcalino, e ativadas proteolicamente por proteases digestivas ali presentes (RUBIO-INFANTE; MORENO-FIERROS, 2016). Depois de ser ativada pelas proteases, a toxina atravessa a matriz peritrófica e liga-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais das células epiteliais do intestino médio. Após ligação com o receptor, este permite a toxina se inserir na membrana e formar poros que interferem no transporte de íons pela membrana das células, causando a lise do epitélio do intestino médio, interrompendo a osmoregularidade das células, e neutralizando o pH do lúmen, o que favorece a germinação dos esporos de *Bt*, finalizando com um quadro de septicemia e morte do inseto (Figura 1) (SCHNEPF *et al.*, 1998). Os receptores de ligação das proteínas Cry incluem a caderina (CADR) e receptores ancorados à membrana de glicosilfosfatidil-inositol (GPI), como aminopeptidase N (APN) ou fosfatase alcalina (ALP) (SOBERÓN *et al.*, 2010).

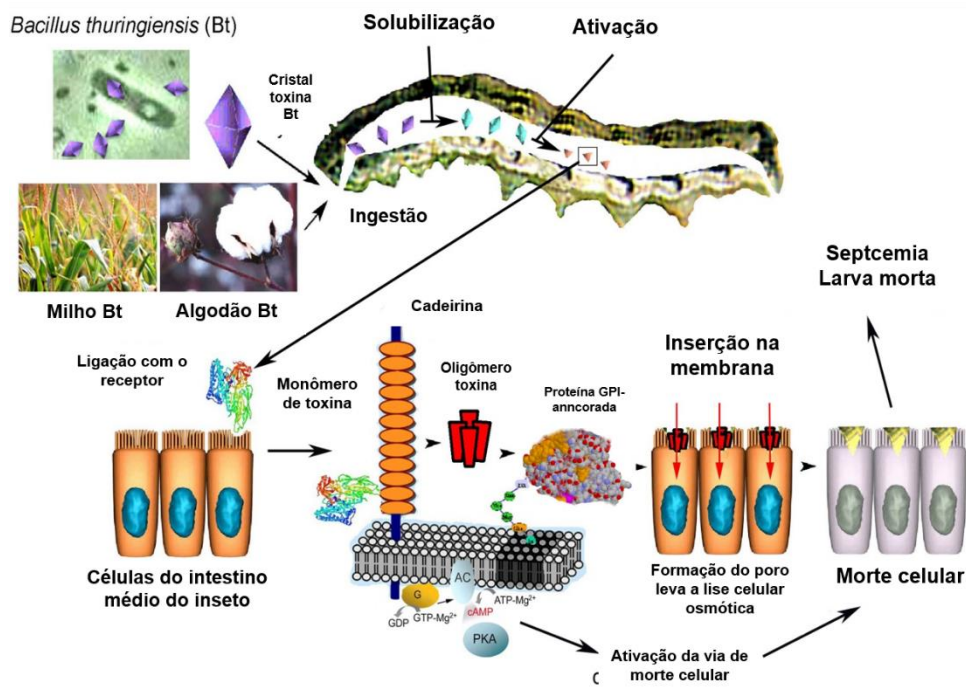


Figura 1: Modo de ação de *Bacillus thuringiensis* em inseto suscetível. Adaptado de JURAT-FUENTES (Acessado em: web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html)

2.3.1.1. Toxicidade de *Bacillus thuringiensis* em Mamíferos

De acordo com McClintock *et al.* (1995), diversos estudos demonstraram que os inseticidas a base de *B. thuringiensis* são considerados seguros em vertebrados em doses milhares de vezes superiores ao que se espera encontrar no ambiente ou em plantas transgênicas. Berlitz *et al.* (2012) analisaram o perfil proteico do conteúdo estomacal e das fezes de camundongos tratados por via oral ou intraperitoneal com suspensão de dois novos isolados de *B. thuringiensis*, Bt 1958-2 e Bt 2014-2, contendo genes que codificam as proteínas Cry 1 e 2, e Cry 3 respectivamente, avaliados em SDS-PAGE 10%, e seus dados indicam que as proteínas de *Bt* são degradadas pelo sistema digestivo dos mamíferos. Essa degradação provavelmente está associada ao pH do estômago do mamífero, já que a germinação e a viabilidade de *Bt* são inibidas num pH ácido (VILAS-BÔAS *et al.*, 1998).

Porém, de acordo com Rubio-infante e Moreno-fierros (2016), as toxinas Cry de *Bt* podem não ser tóxicas a mamíferos, mas não são inócuas, relatando estudos que mostraram efeitos no sistema imunológico, possíveis efeitos alergênicos, e

alguns efeitos fisiológicos que podem se tornar patológicos. Por exemplo, segundo Lemos *et al.* (2013), a aplicação de três diferentes doses subletais (18,5, 185 e 370 mg/100g) de XenTari® (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*), por via oral em ratas albinas prenhes obteve lesões nos rins, fígado e pulmões. Em um outro experimento utilizando milho *Bt* MON 810 e MON 863 (contendo Cry1Ab modificado e Cry3Bb1 modificado, respectivamente) como alimento em ratos por 5 a 14 semanas, demonstrou efeitos tóxicos associados principalmente ao rim e fígado, como também no coração, glândulas supra-renais, baço e sistema hematopoiético (de VENDOMOIS *et al.*, 2009).

Alguns estudos sobre os efeitos de inseticidas derivados de *Bt* comprovaram que suas toxinas são capazes de ativar o sistema imunológico e aumentar as respostas de anticorpos humorais, sugerindo que elas poderiam produzir respostas alérgicas. Muitos dos efeitos fisiológicos causados pela exposição a produtos *Bt* refletem no sistema imunológico, reconhecedor de antígenos estranhos ou prejudiciais (RUBIO-INFANTE; MORENO-FIERROS, 2016), por exemplo: reações alérgicas, imunogenicidade inerente e aumento no nível de respostas de anticorpos (ANDREASSEN *et al.*, 2015; ADEL-PATIENT *et al.*, 2011); resposta imune significativa em ratos alimentados com o milho *Bt*, com alterações nas porcentagens de células B, CD4 + e CD8 +, e aumento dos níveis séricos de citocinas IL-6, IL-13, IL-12p70 e MIP-1 (FINAMORE *et al.*, 2008), ativação de macrófagos em murinos e alta produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo MCP-1, IL-6 e TNF- α induzidas pela protoxina Cry1Ac (MORENO-FIERROS *et al.*, 2013) e também ratos alimentados com arroz *Bt* expressando a proteína Cry1Ab, apresentaram uma alta produção de anticorpos IgG 1 (KROGHSBO *et al.*, 2008).

Os efeitos das proteínas Cry nas células de mamíferos ainda não foram completamente estudados, e suas características fundamentais continuam incertas. Acredita-se que para aumentar os parâmetros de avaliação da toxicidade das proteínas Cry são necessários exames mais abrangentes dos sistemas, órgãos, tecidos e células, e não somente aspectos gerais como sinais vitais, perda de peso e mortalidade (RUBIO-INFANTE; MORENO-FIERROS, 2016).

2.3.1.2. *Bacillus thuringiensis* e Reprodução

Existe uma discussão a respeito das ameaças de genes que são utilizados na preparação de alimentos geneticamente modificados, para a saúde humana, como os genes de *B. thuringiensis* (ARIS; LEBLANC, 2011), uma vez que estes alimentos foram introduzidos extensivamente na cadeia alimentar humana (MAGANA-GOMEZ; de La BARCA, 2009). Num estudo de investigação em mulheres grávidas e não grávidas, foi identificada a presença da toxina Cry1Ab no sangue materno, fetal, e também nas mulheres que não estavam grávidas. A toxina foi detectada e conseguiu atravessar a placenta para o feto (ARIS; LEBLANC, 2011). Este estudo abriu caminhos para o campo da toxicologia reprodutiva, que ainda é muito pouco falada.

Numa outra pesquisa, a aplicação de três doses subletais (18,5, 185 e 370 mg/100g) de XenTari® (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*), por via oral em ratas albinas durante 7 dias da gestação, e durante a gestação completa, reduziu a fertilidade das ratas (LEMOS *et al.*, 2013), como também, na dose mais alta, XenTari® produziu alterações qualitativas e quantitativas na interação endométrio-blastocisto e em órgãos da prole de ratas, comprometendo o processo de implantação e o desenvolvimento dos neonatos (LEMOS *et al.*, 2011).

Para uma gravidez bem-sucedida existe uma troca ideal materno-fetal, onde a placenta realiza seu papel na nutrição, crescimento do embrião, regulação de funções endócrinas e biotransformação de drogas (GUDE *et al.*, 2004; HAGGARTY *et al.*, 2002; SASTRY, 1999). Nesta troca envolve também substâncias de riscos para o feto como os xenobióticos, por exemplo os inseticidas (MYLLYNEN; PASANEN; PELKONEN, 2005). O feto é altamente suscetível aos seus efeitos adversos, pois os agentes ambientais podem interromper os eventos biológicos necessários para garantir seu desenvolvimento e crescimento normal (DIETERT; PIEPENBRINK, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Investigar os efeitos da administração de doses subletais dos bioinseticidas XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*); em ratas prenhes durante a lactação, na morfofisiologia reprodutiva, hepática e renal, de seus filhotes.

3.2. ESPECÍFICOS

- Acompanhar o peso das matrizes durante toda a gestação;
- Acompanhar o período gestacional visando detectar abortos;
- Avaliar o número, tamanho, peso, malformações e mortalidade dos filhotes;
- Avaliar a ciclicidade dos filhotes fêmeas após abertura vaginal;
- Identificar os níveis séricos de estrógeno, progesterona e testosterona nos filhotes com 60 e 90 dias de vida;
- Analisar a histopatologia, morfometria e imunohistoquímica nas gônadas dos filhotes com 90 dias de vida;
- Analisar a histopatologia, histoquímica e morfometria dos rins e fígado dos filhotes com 90 dias de vida;
- Analisar os parâmetros bioquímicos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ASL), ureia e creatinina nos filhotes com 60 e 90 dias de vida.

4. REFERÊNCIAS

- ADEL-PATIENT, K. *et al.* Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2011.
- AL-AWTHAN, Y. S. *et al.* Dimethoate-induced Oxidative Stress and Morphological Changes in the Liver of Guinea Pig and the Protective Effect of Vitamin C and E. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- ALI, P. M.; FARZANEH, R. The effect of vitamin C as antioxidant on the toxic effects due to deltamethrin pesticide on morphometric and histopathological parameters of ovary in the rats. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 11, p. 959–964, 2014.
- ANDRADE, A. J. M. *et al.* Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 310–317, 2002.
- ANDREASSEN, M. Humoral and cellular immune responses in mice after airway administration of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and MON810 cry1Ab-transgenic maize. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, p. 521–537, 2015.
- ANADÓN, A. *et al.* Pyrethrins and synthetic pyretroids: use in veterinary medicine. In: Ramawat K., Mérillon J.M. (eds) **Natural Products**, Springer, Berlin, Heidelberg p 4061-4086, 2013.
- ANADÓN, A.; MARTYNE – LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 7-20, 2009.
- ANGUS, T. A. The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. **World Review of Pest Control**, v. 7, p. 1-26. 1968.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. Relatório de atividades complementar 2012. Brasília, 2014. 33p.
- ARANTES, O. M. N.; VILLAS-BÔAS, L. A.; VILLAS-BÔAS, G. T. *Bacillus thuringiensis* estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, LA.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (eds.), **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul, EDUCS, p. 271-291, 2002, 433p.
- ARIS, A.; LEBLANC, S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 528–533, 2011.
- BENDETTI, D. *et al.* An Evaluation of Occupational Exposures to Pesticides in Brazil. **Occupational Medicine & Health Affairs**, v. 2, n. 4, p. 1-5, 2014.
- BEN SLIMA, A. *et al.* Endocrine disrupting potential and reproductive dysfunction in male mice exposed to deltamethrin. **Human & Experimental Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 218–226, 2017.
- BERLINER, E. Eber die schlafsucht der Mehlmotterraupe. (Ephesis kuehniella Zell.) undihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. **Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie**, v. 2, p. 29-56, 1911.

- BERLITZ, D. L. *et al.* Toxicity intraperitoneal and intragastric route of *Bacillus thuringiensis* and *melia azedarach* in mice. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.4, p.511-517, 2012.
- BETZ, F. C.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 156–173, 2000.
- BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, V. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.
- BRANCO, S. M. **Natureza e agroquímicos**. 2. ed. São Paulo: Moderna, 2003.
- BOBROWSKI, V. L. *et al.* Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, p. 843-850, 2003.
- BURALLI, R. J. *et al.* Respiratory Condition of Family Farmers Exposed to Pesticides in the State of Rio de Janeiro, Brazil **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.15, n. 6, p. 1-14, 2018.
- CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. **Dossiê abrasco: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2015.
- CARLOS, E. A. *et al.* Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography. **Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1217-1227, 2013.
- CARVALHO, R. da S. Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Circular técnico 83, Cruz das Almas 2006.
- CASARETT, L. J.; DOULL, J. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**, 7th ed, 2008.
- CHARGUI, I. *et al.* Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A Molecular Assessment. **Biomedical and environmental sciences**, v. 25, n. 6, p. 672–683, 2012.
- CHARGUI, I. *et al.* Toxic responses to deltamethrin (DM) low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following subcutaneous treatments. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, p. 663-70, 2009.
- CRICKMORE, N. *et al.* ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. 2020. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 01 fev. 2020.
- DE VENDOMOIS, J. S. *et al.* A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 706–726, 2009.
- DIETERT, R. R.; PIEPENBRINK, M. S. The managed immune system: protecting the womb to delay the tomb. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, p. 129–34, 2008.
- DING, Y. *et al.* Determination of deltamethrin and its metabolite 3- phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatografia B: Analytical Technologies Biomed Life Science**, v. 810, p. 221–227, 2004.

- 475 EL-SHAMEI, Z. S. *et al.* Histopathological Changes in Some Organs of Male Rats
476 Fedon Genetically Modified Corn (Ajeeb YG). **Journal of American Science**, v. 8,
477 n.10, p. 684-696. 2012.
- 478 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Pyrethroid Cumulative Risk**
479 **Assessment**. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington, 2011.
- 480 FEDERICI, B. A.; SIEGEL, J. P. "Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* and *Bt*
481 crops used in insect control," in **Food Safety of Proteins in Agricultural**
482 **Biotechnology**, ed. Hammond B.G. (Boca Raton, FL: CRC Press), 2008.
- 483 FEI, J. *et al.* Fenvalerate inhibits the growth of primary cultured rat preantral ovarian
484 follicles. **Toxicology**, v. 267, p. 1–6, 2010.
- 485 FINAMORE A. *et al.* Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize
486 ingestion in weaning and old mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.
487 56, p. 11533–11539, 2008.
- 488 GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus*
489 *thuringiensis* endotoxins. **Annual of Review Entomology**, v. 37, p. 615–636, 1992.
- 490 GREWAL, K. K. *et al.* Toxic impacts of cypermethrin on behavior and histology of
491 certain tissues of albino rats. **Toxicology International**, v. 17, p. 94–98, 2010.
- 492 GUERRA, M., DE TOLEDO, F. C., DE KEMPINAS, G. In utero and lactational
493 exposure to fenvalerate disrupts reproductive function in female rats. **Reproductive**
494 **Toxicology**, v. 32, p. 298–303, 2011.
- 495 GUDE, N. M. *et al.* Growth and function of the normal human placenta. **Thrombosis**
496 **Research**, v. 114, p. 397–407, 2004.
- 497 HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle**
498 **microbiano de insetos**. Ed. ALVES, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 383-446, 1998.
- 499 HAGGARTY, P. *et al.* Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. **Placenta**,
500 v. 23, n. 1, p. 86–92, 2002.
- 501 HAJEK, A. E.; EILEINBERG, J. **Natural Enemies, An Introduction to Biological**
502 **Control**. Second edition, Londres, Cambridge University Press, 2018. 439p.
- 503 HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. **Nature**, v.
504 172, p. 1004, 1953.
- 505 HAWKINS, B. A.; CORNELL, H. V. **Theoretical approaches to biological control**.
506 Cambridge: Cambridge University, 1999. 412p
- 507 HMDB. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Deltamethrin
508 (HMDB0041866). 2016. Disponível em:
509 [http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB31081%5Cnhttp://www.hmdb.ca/metabolites/](http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB31081%5Cnhttp://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB31081#biological_properties)
510 [HMDB31081#biological_properties](http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB31081#biological_properties)
- 511 ISHIWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease). **Danihon Sanshi Kaiho**,
512 v.114, p. 1-5, 1901.
- 513 JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. Ithaca,
514 NY: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA),
515 2013.

- 516 KOCH, M. S. *et al.* The food and environmental safety of *Bt* crops. **Frontiers in Plant**
517 **Science**, v.6, p. 1-22, 2014.
- 518 KROGHSBO S. *et al.* Immunotoxicological studies of genetically modified rice
519 expressing PHA-E lectin or *Bt* toxin in Wistar rats. **Toxicology**, v. 245, p. 24–34,
520 2008.
- 521 LEMOS, A. J .J. M. *et al.* Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp.
522 *Aizawai* and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino
523 rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 489–495, 2013.
- 524 LEMOS, A. J. J. M. *et al.* Response of blastocyst–endometrium interactions in albino
525 rats to sublethal doses of biological and synthetic insecticide, **Food and Chemical**
526 **Toxicology**, v.49, p. 2541-2547, 2011.
- 527 LIFENG, T. *et al.* Effects of fenvalerate exposure on semen quality among
528 occupational workers. **Contraception**, v. 73, p. 92–96, 2006.
- 529 MAGANA-GOMEZ, J. A.; DE LA BARCA, A. M. Risk assessment of genetically
530 modified crops for nutrition and health. **Nutrition Reviews**, v. 67, p. 1–16, 2009.
- 531 MARETTOVA, E.; MARETTA, M.; LEGÁTH, J. Effect of pyrethroids on female
532 genital system. Review. **Animal Reproduction Science**, v. 184, p. 132-138, 2017.
- 533 MCCLINTOCK, J. T.; SCHAFFER, C. R.; SJOBLAD, R. D. A comparative review of
534 the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*- based pesticides. **Pesticide**
535 **Science**, v. 45, p. 95–105, 1995.
- 536 MEENA, S.; SINGH, N. P. 2014. Ultrastructural changes in female reproductive
537 organ of *Chrotogonus trachypterus* Blanchard induced by deltamethrin. **Journal of**
538 **Agriculture and Veterinary Sciences**, v.7, p. 1–6.
- 539 MENEZES, E.L.A. **Controle biológico de Pragas: Princípios e Estratégias de**
540 **Aplicação em Ecossistemas Agrícolas**. Embrapa Agrobiologia. Documentos 164,
541 2003. 44p.
- 542 MNIF, W. *et al.* Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. **International**
543 **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 6, p. 2265–2303,
544 2011.
- 545 MORENO-FIERROS, L. *et al.* Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes
546 macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1
547 and TNF-alpha cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 1051–106,
548 2013.
- 549 MOSSA, A. T. H.; MOHAFRASH, S. M. M.; CHANDRASEARAN, N. Review Article
550 Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals **BioMed**
551 **Research International**, p. 1-17, 2018.
- 552 MYLLYNEN, P.; PASANEN, M.; PELKONEN, O. Human placenta: a human organ for
553 developmental toxicology research and biomonitoring. **Placenta**, v. 26, p. 361–71,
554 2005.
- 555 NERILO, S. B. *et al.* Pesticide use and cholinesterase inhibition in small-scale
556 agricultural workers in southern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical**
557 **Sciences**, v. 50, p. 783–791, 2014.

- 558 NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. Pesticidas: Uso, Legislação e Controle. **Pesticidas:**
559 **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.9, p.31-44, 1999.
- 560 PALMQUIST, K.; SALATAS, J.; FAIRBROTHER, A. Pyrethroid Insecticides: Use,
561 Environmental Fate, and Ecotoxicology. **Insectides - Advances in Integrated Pest**
562 **Management**, p. 251-278, 2012.
- 563 REHMAN, H. *et al.* Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to
564 deltamethrin. **Journal of Entomology and Zoology Study**, v.2, n. 5, p. 01–06,
565 2014.
- 566 REYS, L. L. Toxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **Revista a**
567 **Faculdade de Medicina de Lisboa**, Grupo de Medicina Preventiva e Ciências
568 Sociais. Série III, v.6, n.4, p. 213-225, 2001.
- 569 RUBIO-INFANTE, N; MORENO-FIERROS, L. An overview of the safety and
570 biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals **Journal of Applied**
571 **Toxicology**, v. 36, p. 630-648, 2016.
- 572 SASTRY, B. V. Techniques to study human placental transport. **Advanced Drug**
573 **Delivery Reviews**, v. 38, p. 17–39, 1999.
- 574 SAILLENFAIT, A. M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. P. Pyrethroids: Exposure and health
575 effects – An update. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**,
576 v. 218, n. 3, p. 281–292, 2015a.
- 577 SAILLENFAIT, A. M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. P. Pyrethroids: Exposure and health
578 effects - An update. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**,
579 v. 218, n. 3, p. 281–292, 2015.
- 580 SAKA, W. A. *et al.* Effect of pyrethroid exposure on haematological and haemostatic
581 profiles in rats. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 14, p. 1024–1027, 2011.
- 582 SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of
583 the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable**
584 **Development**, v. 31, p. 217–231, 2011.
- 585 SANGHA, G. K.; KAUR, K.; KHER, K. S. Cypermethrin induced pathological and
586 biochemical changes in reproductive organs of female rats. **Journal of**
587 **Environmental Biology**, v. 34, p. 99–105, 2013.
- 588 SANTOS, M. A. T. DOS; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão
589 geral. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, p.
590 339–349, 2007.
- 591 SANTOS, H. M. P. *et al.* Histopathology of organs from neonate offspring born to
592 female rats exposed to sublethal doses of biological and synthetic insecticides.
593 **International Journal of Morphology**, v. 31, n. 1, p. 246-253, 2013.
- 594 SANTOS, J. C. **Investigação da ação disruptora da deltametrina sobre a tireoide**
595 **e função hipofisária de ratos (Gerações F1 e F2)**. 2018. 81f. Dissertação
596 (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
597 Cascavel – PR.
- 598 SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.
599 **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775-806, 1998.

- 600 SOBERÓN, M.; LÓPEZ-DÍAZ, J. A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus*
 601 *thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms.
 602 **Peptides**, v. 41, p. 87–93, 2013.
- 603 SOBERÓN, M. *et al.* Pore formation by Cry toxins. **Advances in Experimental**
 604 **Medicine and Biology**, v. 667, p. 127–142, 2010.
- 605 SODERLUND, D. M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity:
 606 recent advances. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 165-181, 2012.
- 607 SONI, I. *et al.* Perinatal toxicity of cyfluthrin in mice: Developmental and behavioral
 608 effects. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 1096–1105, 2011.
- 609 SOUSA, N. J. Introdução a la entomología. In: Seminário "Possibilidades del
 610 controle biológicos en plantaciones forestales de Colombia", 1999, Bogotá. **Anais...**
 611 Bogotá: CONIF-MINANBIENTE-BIRF, 1999a.
- 612 SUZUKI, M. T.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. Fate of *Bacillus thuringiensis*
 613 strains in different insect larvae. **Canadian of Journal Microbiology**, v. 50, p. 973-
 614 975, 2004.
- 615 VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy
 616 of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal**
 617 **of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 673-687, 2007.
- 618 VILLAS-BÔAS, G. F. L. T. *et al.* *Bacillus thuringiensis* conjugation under
 619 environmental conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 369-374, 1998.
- 620 WAICHMAN, A. V. A. problemática do uso de agrotóxicos no Brasil: a necessidade
 621 de construção de uma visão compartilhada por todos os atores sociais. **Revista**
 622 **Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 42–47, 2012.
- 623 WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **The pesticide book**, 6 ed., Willoughby, OH, USA:
 624 MeisterPro Information Resources, 2004.
- 625 WARE, G. W. **Fundamentals of pesticides: a self instruction guide**. 3.ed.
 626 California: Thomson Publications Fresno, 1991. 307p.
- 627 WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. E. The molecular biology of the parasporal crystal
 628 body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p.
 629 549–576, 1986.
- 630 XIA Y. *et al.* Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory
 631 workers exposed to fenvalerate. **Toxicology**, v. 203, p. 49–60, 2004.
- 632 YU, S. J. **The Toxicology and Biochemistry of Insecticides**. 1. ed. Boca Raton:
 633 CRC Press, 2008. 296p.

CAPÍTULO II

Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* e var. *Kurstaki* administrado durante a prenhez e lactação e seu reflexo sobre aspectos reprodutivos da prole adulta.

Rebeka da Costa Alves^{1*}, Carolline Guimarães D’assunção¹, Érique Ricardo Alves¹, Yuri Mateus Lima de Albuquerque¹, Valdemiro Amaro da Silva Júnior¹, Valéria Wanderley-Teixeira¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Autor correspondente: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brasil. CEP.: 52171-900. Tel. +55 81 33206389, E-mail: rebekabio89@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar se a administração de inseticidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* pode interferir no desenvolvimento reprodutivo de filhotes na fase adulta. Utilizaram-se 20 ratas, com 90 dias de idade, divididas em quatro grupos: GC – Ratas prenhes, GX – Ratas prenhes que receberam XenTari[®], GDi – Ratas prenhes que receberam Dipel[®] e GDe – Ratas prenhes que receberam deltametrina. Os inseticidas foram administrados por gavagem na dosagem de 1mg/100g/dia (GX e GDi), e 2mg/Kg/dia (GDe) durante a gestação e lactação. A administração dos inseticidas reduziu o ganho de peso das matrizes. Os inseticidas biológicos promoveram redução da prole, do peso, do comprimento, promoveram malformação e mortalidade. Houve retardo no período de abertura vaginal, aumento do metaestro em relação às outras fases, redução do estrógeno, progesterona (fêmeas) e testosterona (machos), ovários com numerosos folículos terciários, atresícos, e

poucos corpos lúteos na prole dos três grupos que receberam inseticidas e, apenas nos grupos XenTari® e Dipel®, foi observado alterações histopatológicas nos testículos, com vacuolizações e descamação do epitélio seminífero. A análise quantitativa dos receptores de andrógeno e estrógeno revelou redução significativa para ambos nas gônadas da prole, cujas ratas receberam os inseticidas biológicos e a deltametrina, e, nestes mesmos grupos, a morfometria testicular revelou redução do diâmetro tubular, da altura do epitélio seminífero e do comprimento total tubular, e nas fêmeas observou-se menor número de folículos primários, secundários e corpos lúteos, e aumento no número de folículos terciários e folículos atrésicos. Assim, conclui-se que os inseticidas biológicos XenTari® e Dipel® em doses subletais em ratas prenhes promovem alterações reprodutivas na prole semelhantemente ao inseticida deltametrina, que se prolongam até a fase adulta.

Palavras-chave: *Bt*, hormônios, inseticidas, prole, reprodução.

ABSTRACT

This study aimed to test whether the administration of *B. thuringiensis*-based biological insecticides can interfere with the reproductive development of puppies in adulthood. Twenty 90-day-old rats were used, divided into four groups: GC - Pregnant rats; GX - XenTari® treated pregnant rats; GDi - Dipel® treated pregnant rats and GDe - Deltamethrin treated pregnant rats. The insecticides were administered by gavage at a dosage of 1mg/100g/day (GX and GDi), and 2mg/kg/day (GDe) during pregnancy and lactation. The administration of insecticide reduced the weight gain of the matrices. Biological insecticides reduced offspring, weight, and length, promoted malformation and mortality. There was a delay in vaginal opening in females, increased metestrus compared to other phases, reduced estrogen, progesterone (females) and testosterone (males), ovaries with numerous tertiary follicles, atresias, few corpus luteum in the offspring of the three groups that received insecticides and,

only in the XenTari[®] and Dipel[®] groups, histopathological changes in the testicles were observed, with vacuolations and desquamation of the seminiferous epithelium. Quantitative analysis of androgen and estrogen receptors revealed a significant reduction for both in offspring gonads whose rats received biological insecticides and deltamethrin, and in these same groups, testicular morphometry revealed a reduction in tubular diameter, height of seminiferous epithelium and tubular total length, and in the females there was a smaller number of primary, secondary and corpus luteum follicles, and an increase in the number of tertiary and atretic follicles. Thus, it is concluded that the biological insecticides XenTari[®] and Dipel[®] in sublethal doses in pregnant rats promotes reproductive changes in the offspring similar to the insecticide deltamethrin, which extends into adulthood.

Keywords: *Bt*, hormones, insecticides, offspring, reproduction.

1. Introdução

O Brasil é o maior mercado consumidor de agrotóxico do mundo, e vem marcando esta posição desde os últimos 10 anos (Carneiro e Augusto 2015; Buralli et al. 2018), o que aumenta a predisposição da população e do meio ambiente aos impactos ocasionados por eles. O monitoramento do uso dos agrotóxicos no país apresenta fragilidades, alimentos contendo resíduos de agrotóxico em quantidades superiores às recomendadas por lei são encontrados no mercado, além da população que é vulnerável, recorrente dos problemas econômicos e sociais (Gerage et al. 2017).

A exposição a agrotóxicos é perigosa ao ser humano, tanto pelo consumo de alimentos como pela atividade ocupacional, aumentando os riscos de câncer, defeitos no desenvolvimento ou problemas neurológicos (Alavanja et al. 2004; Hanke e Jurewicz, 2004). Além disso, a exposição pré-natal a alguns inseticidas, como por exemplo a deltametrina,

pode induzir malformações, afetar o crescimento ou promover distúrbios comportamentais (Viel et al. 2015; Wagner-Schuman et al. 2015; Ben Slima et al. 2017; Viel et al. 2017).

Devido ao impacto dos agrotóxicos, soluções alternativas mais seguras e não tóxicas para os seres humanos e o meio ambiente foram propostas. Uma dessas são os inseticidas biológicos (Mnif et al. 2011), à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), cujas linhagens e proteínas inseticidas (*Cry*) têm sido utilizadas comercialmente (Betz et al. 2000; Sanchis 2011), por serem considerados não contaminantes ao meio ambiente e não causarem efeitos para a saúde humana (Rubio-Infante e Moreno-Fierros 2016).

Após ingestão pelo inseto, as proteínas *Cry* são solubilizadas e ativadas no intestino médio e, após ligação a receptores, causam lise nas células do epitélio do intestino. Como resultado, os insetos param de se alimentar e, finalmente, morrem (Höfte e Whiteley 1989; Ibrahim et al. 2010). Existem 13 produtos formulados à base de *Bt*, dentre estes podemos mencionar as formulações comerciais Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*) e XenTari® WG (*B. thuringiensis*, subsp. *Aizawai*) (AGROFIT 2020). No entanto, de acordo com Moreno-Fierros et al. (2000), Vázquez-Padrón et al. (2000) e Shaban et al. (2003), as toxinas *Bt* podem causar respostas imunes sistêmicas e estresse oxidativo em vários locais, como o sistema reprodutor, após aplicação oral, intraperitoneal e retal.

Segundo Lemos et al. (2011, 2013), a utilização do inseticida biológico XenTari® administrado por via oral, na dose subletal de 20 mg de toxina protéica/100g produziu mudanças qualitativas e quantitativas na interação endométrio-blastocisto em ratas, comprometendo o processo de implantação. Dos Santos et al. (2013) mostraram que XenTari® e Deltametrina, em concentrações que não causam sinais clínicos de toxicidade materna, administrados durante a prenhez em ratas, promoveram alterações semelhantes na histofisiologia nas gônadas dos recém-nascidos. As evidências dos efeitos nocivos das toxinas *Bt* sobre as gônadas da prole de ratas levam a uma preocupação sobre a atividade reprodutiva

desses animais na vida adulta. Assim, a presente pesquisa testou a hipótese de que a administração dos inseticidas Dipel® e XenTari® durante a gestação e lactação, em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação materna, pode interferir na histofisiologia reprodutiva da prole na fase adulta.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

2.1. Animais

Foram utilizadas 20 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando aproximadamente $200\text{g} \pm 20\text{g}$, procedentes do Biotério do mesmo Departamento. Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, com a licença 50/2017. Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial que estabelecem um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas. Após um período de adaptação, foram colhidos esfregaços vaginais para determinação do ciclo estral. As ratas que apresentarem três ciclos estrais regulares foram acasaladas e distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos, constituídos por cinco animais cada: Grupo Controle (GC) - Ratas prenhes que receberam placebo; Grupo Xentari (GX) - Ratas prenhes que receberam 1 mg de XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*)/100g; Grupo Dipel (GDi) - Ratas prenhes que receberam 1 mg de Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*)/100g; Grupo Deltametrina (GDe) - Ratas prenhes que receberam 2 mg de Deltametrina (Keshet® 25EC)/Kg (controle positivo).

2.2. Acasalamento dos Animais e Diagnóstico da Prenhez

As fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para duas fêmeas, sempre no início da noite. Na manhã seguinte, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença de espermatozoides nos esfregaços corados pelo método Shorr-Harris, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional.

2.3. Administração dos inseticidas

Os inseticidas foram administrados diariamente durante toda a prenhez e lactação, por via oral (gavagem), a partir da confirmação do acasalamento, de acordo com a metodologia modificada de Shaban et al. (2003), para os inseticidas biológicos (XenTari® e Dipel®), e de Andrade et al. (2002), para o inseticida sintético (Deltametrina). As ratas foram pesadas diariamente em balança analítica, a partir da confirmação do acasalamento, até o dia do nascimento dos filhotes, para observação do peso corpóreo e o estabelecimento das dosagens dos inseticidas. As ratas do grupo controle receberam 1 mL de água destilada pela mesma via.

2.4. Análise macroscópica dos neonatos

Para análise morfológica dos neonatos, estes foram acompanhados desde o nascimento até a fase adulta, os quais foram contados, pesados em balança analítica, medidos desde a cabeça a ponta da cauda com o auxílio de um paquímetro, e observados alguma malformação presente na cabeça, tronco ou membros. Os filhotes fêmeas também foram acompanhadas para identificação da abertura vaginal. Confirmada esta abertura, foi realizada a determinação da ciclicidade por 4 semanas, através de esfregaços vaginais.

2.5. Dosagens hormonais

Após o nascimento da prole, os filhotes, ao atingirem as idades de 60 e 90 dias, de todos os grupos experimentais, foram imobilizados em contensor e o sangue coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G). Após centrifugação refrigerada, o soro foi acondicionado em microtubos e congelados a -20 °C até o momento das dosagens (Teixeira et al. 2004). Os níveis séricos de estrógeno, progesterona e testosterona foram dosados utilizando-se o método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de KIT's comerciais. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

2.6. Análise histopatológica e imunohistoquímica dos testículos e ovários da prole

Ao completarem 90 dias de idade, os animais foram anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg) por via intramuscular, para remoção dos órgãos. Em seguida os animais foram submetidos a eutanásia por meio do aprofundamento anestésico. As fêmeas foram eutanasiadas sempre na fase de estro. Os órgãos coletados foram pesados e em seguida fixados em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente os órgãos foram processados para inclusão em parafina (ovários) e historesina (testículos), e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.) e azul de toluidina para análise de rotina histopatológica.

Secções dos ovários e testículos (5 µm) de todos os grupos foram usadas para detecção por imunohistoquímica dos receptores de andrógeno (AR - mouse monoclonal IgG, sc - 7305, Santa Cruz Biotechnology, 1:50) e estrógeno (ER α - mouse monoclonal IgG, sc - 8002, Santa Cruz Biotechnology, 1:50). Inicialmente, as secções foram desparafinizadas com xilol e hidratadas com etanol. Os cortes foram incubados com os respectivos anticorpos overnight, e posteriormente foram incubados com streptavidina-peroxidase, sendo então revelados com substrato cromógeno 3, 3'diaminobenzidina (DAB) em marrom e contra-coradas com

Hematoxilina de Harris. A quantificação em pixels da marcação foi realizada utilizando o programa GIMP 2.8.

2.7. Análise morfométrica e índice organossomático dos testículos e ovários da prole com 90 dias de vida

Para determinar a porcentagem dos componentes estruturais dos ovários, as lâminas foram observadas em uma objetiva de 40x, contendo no interior um retículo de WEIBEL com 100 pontos. Foram utilizadas três lâminas por grupo, nas quais foram contados os pontos que incidiram sobre os folículos, corpos lúteos e estroma ovariano. Foram determinados cinco campos por lâmina, sendo contados 500 pontos por animal (Santos et al. 2004). Estimou-se também a população folicular (PF) por meio da fórmula descrita por Lucci et al. (1999), $PF = n^{\circ} \text{ de folículos} \times n^{\circ} \text{ de cortes obtidos} \times \text{espessura dos cortes} / n^{\circ} \text{ de cortes observados} \times \text{média do diâmetro dos núcleos dos ovócitos}$.

A média de duas medidas perpendiculares da camada externa das células da granulosa e do ovócito foi utilizada como medida do diâmetro dos folículos e ovócitos, respectivamente. As medidas foram realizadas apenas em folículos com núcleo do ovócito visível utilizando o programa Image J calibrado em micrometros.

Para morfometria testicular foram obtidas fotomicrografias das lâminas histológicas com auxílio de uma câmera de vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, onde o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero foram medidos utilizando o software Image J. Trinta túbulos seminíferos redondos ou quase redondos foram medidos para cada animal ($n = 3$ por grupo). O comprimento total dos túbulos seminíferos (em metros) por g de testículo foi obtido pela fórmula: $TL = VST / \pi R^2$, onde TL = comprimento do túbulo seminífero; VST = volume do túbulo seminífero e $R = \text{diâmetro do túbulo seminífero} / 2$ (Monteiro et al. 2012; Penitente Filho et al. 2014).

Os ovários e testículos foram pesados com auxílio de balança analítica e o índice organossomático foi calculado pela razão entre o peso de cada órgão e o peso corpóreo de cada animal (Zhang et al. 2014), para detectar aumento ou atrofia das gônadas (Van Dyk et al. 2007) utilizando a seguinte formula: $IO = PO / PC \times 100$, onde IO = Índice organossomático; PO = Peso do órgão; PC = peso corporal.

2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa computacional GraphPad Prism 5, onde os dados foram avaliados por meio de testes paramétricos de Anova One-way com post-hoc de Tukey ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ganho de peso das matrizes

O tratamento com os inseticidas reduziu consideravelmente o ganho de peso das matrizes no final da gestação em relação as do grupo controle (Figura 1A).

3.2. Número, pesos, comprimento, malformações e mortalidade da prole

Os inseticidas biológicos promoveram redução da prole em relação ao controle e ao inseticida deltametrina, que não diferiram entre si (Figura 1B). Houve redução significativa no peso da prole das matrizes que receberam os inseticidas XenTari® e Dipel® em relação à prole das matrizes do grupo controle. Não houve diferenças significativas no peso da prole das matrizes que receberam a Deltametrina em relação ao controle e os inseticidas biológicos (Figura 1C). Com relação ao comprimento, todos os filhotes das matrizes que receberam os inseticidas apresentaram redução significativa em relação aos filhotes das matrizes do grupo controle. A menor média foi observada na prole do grupo Dipel® diferindo ainda da prole dos

grupos XenTari® e Deltametrina, que não diferiram entre si (Figura 1D). Na prole das matrizes dos grupos controle e deltametrina não foi observado malformações ou mortalidade. Entretanto, na prole das matrizes tratadas com XenTari® e Dipel® verificou-se malformações em alguns filhotes, caracterizadas pela falta de patas e cauda (Figura 1E), além de alta mortalidade alguns dias após nascimento (Tabela 1).

3.4. Abertura vaginal e Ciclicidade estral

Ocorreu um retardo no período de abertura vaginal nas fêmeas cujas matrizes receberam os inseticidas XenTari® (47 dias), Dipel® (50 dias) e Deltametrina (47 dias) em relação às fêmeas do grupo controle (38 dias). A análise da ciclicidade estral dessas fêmeas revelou que o tratamento com inseticidas promoveu redução no percentual das fases de proestro, estro e diestro, e aumento da fase de metaestro quando comparadas ao controle (Figura 2).

3.5. Dosagens hormonais

A análise dos níveis hormonais mostrou redução significativa do estrógeno, progesterona e testosterona tanto aos 60 (Figuras 3A e 3B) quanto aos 90 dias de vida (Figuras 3C e 3D) na prole das fêmeas que foram tratadas com inseticidas.

3.6. Análise histopatológica e imunohistoquímica

A análise histopatológica dos ovários das ratas da prole do grupo controle apresentou região cortical com a presença de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento e vários corpos lúteos. Na região medular, tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado. Nos tratamentos com inseticidas os ovários apresentaram numerosos folículos terciários e atresícos, além de poucos corpos lúteos (Figura 4).

A análise dos testículos dos ratos do grupo controle apresentou estrutura normal, com vários túbulos seminíferos, formados por um epitélio germinativo bem característico, com a presença de células de Sertoli. Porém, o tratamento com os bioinseticidas XenTari® e Dipel® promoveram algumas vacuolizações nas células do epitélio seminífero, necrose, demonstrando início de degeneração (morte celular), e descamação das células espermáticas. Já no tratamento com inseticida deltametrina não houve alterações histopatológicas nos testículos dos ratos (Figura 5).

Houve marcação positiva para os receptores de estrógeno (ovários) e andrógenos (testículos), entretanto, a análise quantitativa desses receptores revelou redução significativa, para ambos receptores, nas gônadas da prole cujas ratas receberam inseticidas em relação as do controle (Figuras 6 e 7).

3.7. Índice organossomático e Análise morfométrica

Houve redução do peso corporal, dos testículos e do índice organossomático na prole das fêmeas que receberam inseticidas em relação às do grupo controle. A morfometria testicular revelou nesses animais, redução do diâmetro tubular, da altura do epitélio seminífero e do comprimento total tubular (Tabela 2). Nas fêmeas da prole também evidenciaram-se redução do peso corporal, dos ovários e do índice organossomático cujas matrizes receberam inseticidas em relação ao controle. Na análise morfométrica dos ovários observou-se menor número de folículos primários, secundários e corpos lúteos. Por outro lado, houve aumento no número de folículos terciários e folículos atresícos (Tabela 3).

4. Discussão

A administração dos inseticidas biológicos promoveu uma redução do número da prole, resultado semelhante também foi observado por Lemos (2013), em ratas administradas com

XenTari® e deltametrina. Além disto, os bioinseticidas também interferiram no ganho de peso e no tamanho dos filhotes. Alterações no peso corporal como também dos órgãos são bons critérios para se estudar a toxicidade do xenobiótico nos mamíferos, pois, alterações atípicas podem indicar disfunção orgânica, processo de desintoxicação e toxicidade (Mossa et al. 2018).

As doses subletais de XenTari® e Dipel® interferiram na gestação das matrizes, gerando malformações e um grande número de mortalidade dos filhotes, mostrando-se mais agressivos que o inseticida sintético. Já foram relatados vários efeitos de malformações fetal no cérebro, genital, óssea, e nos membros, associados à exposição de inseticidas (Elmazoudy 2011; Hass et al. 2012; Dallaqua et al. 2013; Shalaby et al. 2013). Para Ogata et al. (1999), as malformações nos embriões podem ser explicadas por ocorrer uma destruição tóxica das células que formariam os tecidos futuros.

As fêmeas tratadas com inseticidas apresentaram atraso na abertura vaginal quando comparados ao grupo GC, que pode ser explicado por uma possível atividade antiestrogênica causada por esses inseticidas. Segundo Romano et al. (2008) o atraso do início da puberdade de ratos Wistar que foram expostos ao herbicida glifosato-Roundup foi causado por uma disfunção endócrina no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante a maturação sexual. De Barros et al. (2016) relataram também que a exposição perinatal ao inseticida fipronil causou atraso na abertura vaginal, atribuído também a disfunção do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

A redução dos níveis de estrógeno e progesterona nas fêmeas foi observado tanto nos grupos tratados com inseticidas biológicos quanto nos tratados com o inseticida deltametrina. Estudos já relataram o potencial estrogênico de inseticidas piretroides, mimetizando ou inibindo a ação deste hormônio, funcionando como modulador endócrino devido ligação direta ao receptor de estrógeno (Marettova et al. 2017). Isso poderia explicar os resultados

deste trabalho, devido os inseticidas, tanto biológicos como o sintético, terem influenciado nos resultados das dosagens hormonais de estrógeno e progesterona, reduzindo significativamente estes níveis, acarretando num aumento da fase metaestro, e diminuição das outras fases do ciclo estral.

Nos filhotes machos foi observado redução na dosagem de testosterona também em todos os grupos tratados. Resultado semelhante foi observado em ratos tratados com deltametrina, relatando o sistema hormonal como um alvo distinto para deltametrina, relacionado a efeitos em LH e FSH (Issam et al. 2009). Dessa forma, sugere-se que XenTari® e Dipel® apresentam atividade antiestrogênica e antiandrogênica, confirmando os relatos de que as toxinas de *B. thuringiensis* causam alterações nos hormônios sexuais (Moreno-Fierros et al. 2002; Schroder et al. 2007) semelhante ao inseticida sintético.

Os ovários das ratas dos grupos GX, GDi e GDe apresentaram aumento no número de folículos atresícos, e diminuição de corpos lúteos. Esses dados correspondem com os dos autores Ali e Farzaneh (2014), que também observaram alterações histopatológicas do ovário de ratas tratadas com deltametrina, causando aumento do número de folículos atresícos, e diminuindo o número de corpos lúteos, demonstrando que o inseticida afetou a ovulação. Dos Santos (2013) também observou um aumento no número de folículos atresícos nos ovários de filhotes expostos durante a gestação aos inseticidas XenTari® e deltametrina, sendo este resultado relacionado a um estresse oxidativo, que está associado na regressão do corpo lúteo e atresia folicular. O resultado da análise dos testículos dos ratos nos grupos GX e GDi apresentou alterações no epitélio germinativo, resultado semelhante observado num estudo com a administração do inseticida cipermetrina em ratos, revelando alterações degenerativas graves nos túbulos seminíferos, vacuolização dos espermátócitos primários e perda de células germinativas, atribuindo este resultado a diminuição dos níveis de testosterona e a estresse oxidativo (Wang et al. 2009). Também já foi observado necrose, vacuolização e descamação

das células germinativas dos testículos de ratos que foram alimentados com milho transgênico contendo o gene de *B. thuringiensis* que produz a proteína Cry 1Ab (El-Shamei et al. 2012).

Os receptores de estrógeno e andrógeno apresentaram-se reduzidos nos grupos tratados com inseticidas, quando comparados ao grupo controle. Já é constatado que os disruptores endócrinos químicos ligam-se a receptores de estrógeno e andrógeno podendo ativá-los, imitando a ação do hormônio, ou não ativá-los, em ação antagonista, bloqueando o receptor e inibindo sua ação (Tabb e Blumberg 2006; Mnif et al. 2011). Vários inseticidas já foram identificados por interagirem com esses receptores causando inibição ou outros distúrbios hormonais (Tamura et al. 2001; Cocco 2002; Tamura et al. 2003; Kang et al. 2004; Lemaire et al. 2004; Okubo et al. 2004). Dessa forma, este resultado confirma que os bioinseticidas são desreguladores endócrinos, atuação antes só identificada em inseticidas sintéticos.

Com relação ao peso das gônadas, os valores dos testículos foram relativamente baixos em todos os grupos tratados, resultado semelhante ao de Andrade (2002) onde filhotes foram expostos a 4,0 mg/kg/dia de deltametrina durante a gestação e lactação. Os valores dos pesos dos ovários também foram reduzidos nos grupos com inseticidas. Ratas administradas oralmente com o inseticida cipermetrina por 4 semanas também apresentaram diminuição significativa no peso dos ovários, muito provável por alterações hormonais (Sangha et al. 2013).

Em relação aos dados morfométricos, sabe-se que a medida do diâmetro tubular indica atividade espermatogênica e função testicular (De Assis-Neto et al. 2003; França e Godinho 2003), sendo assim, a diminuição nas medidas morfométricas dos túbulos seminíferos observada neste trabalho pode estar relacionada com uma redução do epitélio germinativo e consequentemente de sua atividade. O aumento de folículos atrésicos, diminuição no número de folículos primários e secundários, e de corpos lúteos, tem sido relatado em ratas expostas ao inseticida (Grewal et al. 2010; Sangha et al. 2013; Ali e Farzaneh 2014). O aumento do

número de folículos terciários pode ser caracterizado como cistos foliculares devido à redução dos níveis de estrógeno. Esses resultados confirmam a existência de uma provável interferência na atividade hormonal causada pela toxicidade dos bioinseticidas.

5. Conclusão

Apesar de afirmações de que bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* não são tóxicos para humanos e vertebrados, com base nestes achados conclui-se que os inseticidas biológicos XenTari® WG e Dipel® em doses subletais em ratas prenhes promovem alterações reprodutivas na prole, semelhantemente ao inseticida deltametrina, que se prolongam até a fase adulta. Porém, mais estudos são necessários para determinar os mecanismos que estão afetando as funções reprodutivas.

6. Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio da agência financiadora Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), sem a qual este estudo não teria sido possível.

7. Conflito de interesses

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesses.

8. Referências

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. 2020. [accessed 15/01/2020]. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons/
- Alavanja, M, Hoppin, JA, Kamel, F. 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. Annu Rev Public Health. 25, 155–197.

- 1006 Andrade, AJM, Araújo, S, Santana, GM, Ohi, M, Dalsenter, PR. 2002. Reproductive effects
1007 of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. Regul
1008 Toxicol Pharmacol. 36, 310–317.
- 1009 Ali, PM., Farzaneh, R. 2014. The effect of vitamin C as antioxidant on the toxic effects due to
1010 deltamethrin pesticide on morphometric and histopathological parameters of ovary in the rats.
1011 Biosci Biotechnol Res Asia. 11, 959-964.
- 1012 Ben Slima, A, Chtourou, Y, Barkallah, M, Fetoui, H, Boudawara, T, Gdoura, R. 2017.
1013 Endocrine disrupting potential and reproductive dysfunction in male mice exposed to
1014 deltamethrin. Human Exp Toxicol. 36 (3), 218–226.
- 1015 Betz, FC, Hammond, BG, Fuchs, RL. 2000 Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-
1016 Protected Plants to Control Insect Pests, Regulatory Toxicol Pharmacol. 32, 156–173.
- 1017 Buralli, RJ, Ribeiro, H, Mauad, T, Amato-Lourenço, L., Salge, JM, Diaz-Quijano, FA, Leão,
1018 RS, Marques, RC, Silva, DS, Guimarães, JRD. 2018. Respiratory Condition of Family
1019 Farmers Exposed to Pesticides in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Int. J. Environ Res
1020 Public Health. 15 (6), 1-14.
- 1021 Carneiro, FF, Augusto, LG. 2015. Dossiê abrasco: Um Alerta Sobre Os Impactos dos
1022 Agrotóxicos na Saúde; EPSJV: Rio de Janeiro, Brazil,
- 1023 Cocco, P. 2002. On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence
1024 linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health
1025 effects. Cad Saúde Pública. 18, 379-402.
- 1026 Dallaqua, B, Saito, FH, Rodrigues, T, Calderon, IMP, Rudge, MVC, Volpato, GT,
1027 Damasceno, DC. 2013. Azadirachta indica treatment on the congenital malformations of
1028 fetuses from rats. J Ethnopharmacol. 150, 1109–1113.

- 1029 De Assis-Neto, AC, de Melo, MIV, de Carvalho, MAM, Miglino, MA, de Oliveira, MF.
1030 2003. Análise histométrica do desenvolvimento testicular de cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas
1031 em cativeiros. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 40, 202-208.
- 1032 De Barros, AL, Rosa, JL, Cavariani, MM, Borges, CS, Villela e Silva, P, Bae, JH, Anselmo-
1033 Franci, JA, Cristina Arena, A. 2016. In utero and lactational exposure to fipronil in female
1034 rats: Pregnancy outcomes and sexual development. *J Toxicol Environ Health.* 79 (6), 266–
1035 273.
- 1036 Dos Santos, PHM, Teixeira, WV, Teixeira, CAA, Da Silva, R., Lemos, MAJJ, Neto, L CCJ,
1037 Ferreira, MCG. 2013. Histopathology of organs from neonate offspring born to female rats
1038 exposed to sublethal doses of biological and synthetic insecticides. *Int J Morphol.* 31, 246-
1039 253.
- 1040 Elmazoudy, RH, Attia, AA, Abdelgawad, HS. 2011. Evaluation of Developmental Toxicity
1041 Induced by Anticholinesterase Insecticide, Diazinon in Female Rats. *Birth Defects Res B.* 92,
1042 534–542.
- 1043 El-Shamei, ZS, Gab-Alla, AA, Shatta, AA, Moussa, EA, Rayan, AM. 2012. Histopathological
1044 Changes in Some Organs of Male Rats Fed on Genetically Modified Corn (Ajeeb YG). *J Am*
1045 *Sci.* 8 (10), 684-696.
- 1046 França, LR, Godinho, CC. 2003. Testis morphometry seminiferous ephitelium cycle lenght
1047 and daily sperm production in domestic cats. *Biol Reprod.* 68, 1554-1561.
- 1048 Gerage, JM, Meira, APG, Silva, MV. 2017 Food and nutrition security: pesticide residues in
1049 food. *Nutrire.* 42(1) 42-50.
- 1050 Grewal, KK, Sandhu, GS, Kaur, R, Brar, RS, Sandhu, HS. 2010. Toxic impacts of
1051 cypermethrin on behavior and histology of certain tissues of albino rats. *Toxicol Int.* 17, 94–
1052 98.

- 1053 Hanke, W, Jurewicz, J. 2004. The risk of adverse reproductive and developmental disorders
1054 due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. Int
1055 J Occup Med Environ Health. 17, (2), 223–243.
- 1056 Hass, U, Boberg, J, Christiansen, S, Jacobsen, PR, Vinggaard, AM, Taxvig, C, Poulsen, ME,
1057 Hermann, SS, Jensen, BH, Petersen, A, et al. 2012. Adverse effects on sexual development in
1058 rat offspring after low dose exposure a mixture of endocrine disrupting pesticides. Reprod
1059 Toxicol. 34, 261-274.
- 1060 Höfte, H, Whiteley, HR. 1989. “Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*,”
1061 Microbiol Rev. 53 (2), 242–255.
- 1062 Ibrahim, MA, Griko, N, Junker, M, Bulla, LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and
1063 proteomics perspective. Bioeng Bugs. 1(1), 31–50.
- 1064 Issam, C, Samir, H, Zohra, H, Monia, Z, Hassen, BC. 2009. Toxic responses to deltamethrin
1065 (DM) low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following
1066 subcutaneous treatments. J Toxicol Sci. 3(6), 663-670.
- 1067 Kang, HG, Jeong, SH, Co, JH, Kim, DG, Park, JM, Cho, MHH. 2004. Chlproprifos-methyl
1068 shows anti-androgenic activity without estrogenic activity in rats. Toxicology. 199, 219-230.
- 1069 Lemaire, G, Terouanne, B, Mauvais, P, Michel, S, Rahmani, R. 2004. Effect of
1070 organochlorine pesticides on human androgen receptor activation *in vitro*. Toxicol Appl
1071 Pharm. 196, 235-246.
- 1072 Lemos, AJJM, Siqueira, HA, Wanderley-Teixeira, V, Maia, FC, Teixeira, ÁA, Silva, EJ,
1073 Oliveira, JV. 2013. Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* and
1074 deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. Exp Toxicol
1075 Pathol. 65, 489–495.

- 1076 Lemos, AJJM, Wanderley-Teixeira, V, Teixeira, ÁAC, Fernanda das Chagas, AS, Oliveira,
 1077 JV, Siqueira, HÁA. 2011. Response of blastocyst–endometrium interactions in albino rats to
 1078 sublethal doses of biological and synthetic insecticide. *Food Chem Toxicol.* 49, 2541-2547.
- 1079 Lucci, CM, Amorim, CA, Rodrigues, APR, Figueiredo, JR, Bão, SN, Silva, JRV, Gonçalves,
 1080 PBD. 1999. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from
 1081 caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci.* 56, 223-236.
- 1082 Marettova, E, Maretta, M, Legáth, J. 2017. Effect of pyrethroids on female genital system.
 1083 Review. *Anim Reprod Sci.* 184, 132-138.
- 1084 Mnif, W, Hassine, AIH, Bouaziz, A, Bartegi, A, Thomas, O, Roig, B. 2011. Effect of
 1085 endocrine disruptor pesticides: A review. *Int J Environ Res Public Health.* 8, (6). 2265–2303.
- 1086 Monteiro, JC, Matta, SLP, Predes, FS, Paula, TAR. 2012. Testicular Morphology of Adult
 1087 Wistar Rats Treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Leaf Infusion. *Braz Arch Biol*
 1088 *Techn.* 55, (1), 101-105.
- 1089 Moreno-Fierros, L, Ordóñez, PI, Morales, PM. 2002. Slight influence of the estrous cycle
 1090 stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and
 1091 intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. *Life*
 1092 *Sci.* 71, 2667–2680.
- 1093 Moreno-Fierros, L, García, N, Gutiérrez, R, López-Revilla, R, Vázquez-Padrón, RI. 2000.
 1094 Intranasal rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry 1Ac from *Bacillus*
 1095 *thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune
 1096 response in Balb/c mice. *Microbes Infect.* 2, 885-890.
- 1097 Mossa, AH, Mohafrash, SMM, Chandrasekaran, N. 2018. Safety of Natural Insecticides:
 1098 Toxic Effects on Experimental Animals. *Biomed Res Int.* 2018, 1-17.
- 1099 Ogata, A. Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Ogawa, H., Yasuda, K., Aoki, N. 1999.
 1100 Teratogenicity of thujaplicin in ICR mice. *Food Chem Toxicol.* 37, 1097–1104.

- 1101 Okubo, T, Yokoyama, Y, Kano, K, Soya, Y, Kano, I. 2004. Estimation of estrogenic and
1102 antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay. Arch
1103 Environ Com Tox. 46, 445-453.
- 1104 Penitente Filho, JM, Neves, JGS, Matta, SLP, Torres, CAA, Chaya, AY, Paula, TAR. 2014.
1105 Morphometric evaluation of the spermatogenic process of adults wistar rats exposed to the
1106 2,4diclorophenoxyiacetic acid associated to picloram (Tordon 2,4-D ® 64/240 BR) Acta Vet
1107 Bras. 8, (1), 47-53.
- 1108 Romano, RM, Romano, MA, Moura, MO, de Oliveira, CA. 2008. A exposição ao glifosato-
1109 Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. Braz J Vet Res Anim Sci. 45
1110 (6), 481-487.
- 1111 Rubio-Infante, N, Moreno-Fierros, L. 2016. An overview of the safety and biological effects
1112 of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals J Appl Toxicol. 36, 630-648.
- 1113 Sanchis, V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: his- tory of the
1114 biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. Agron Sustain Dev. 31, 217–231.
- 1115 Sangha, GK, Kamalpreet, K, Khera, KS. 2013. Cypermethrin induced pathological and
1116 biochemical changes in reproductive Organs of female rats. J Environ Biol. 34, 99-105.
- 1117 Santos, KRP, Teixeira, AAC, Silva-Neto, EJD, Teixeira, VW, Cunha, FMD. 2004.
1118 Morphometric analysis of the development of the ovarian follicles in pinealectomized rats. J
1119 Morphol. 22 (2), 109-112.
- 1120 Schroder, M, Poulsen, M, Wilcks, A, Kroghsbo, S, Miller, A, Frenzel, T, Danier, J, Rychlik,
1121 M, Emami, K, Gatehouse, A, et al. 2007. A 90-day safety study of genetically modified rice
1122 expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. Food Chem Toxicol.
1123 45, 339–349.

- 1124 Shaban, NZ, Helmy, MH, El-Kersh, MA, Mahmoud, BF. 2003. Effects of *Bacillus*
 1125 *thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats given
 1126 alpha-tocopherol or acetylsalicylate. *Comp Biochem Physiol.* 135, 405–414.
- 1127 Shalaby, MA, Abo-El-Sooud, K, Hamoda, AA. 2013. Assessment of Toxicity of Chlorpyrifos
 1128 Insecticide on Fetuses and Suckling Pups of Rats, *Insight Ecology.* 2 (1), 1-7.
- 1129 Tabb, MM, Blumberg, B. 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals.
 1130 *Mol Endocrinol.* 20, 475-482.
- 1131 Tamura, H., Yoshikawa, H, Gaido, KW, Ross, SM, DeLisle, RK, Welsh, WJ, Richard, AM.
 1132 2003. Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen
 1133 receptor. *Environ Health Perspect.* 111, 545-552.
- 1134 Tamura, H, Maness, SC, Reischmann, K., Dorman, DC, Gray, LE, Gaido, KW. 2001.
 1135 Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion. *Toxicol Sci.*
 1136 60, 56–62.
- 1137 Teixeira, AAC, Simões, MJ, Wanderley-Teixeira, V, Soares Jr, JM. 2004. Evaluation of the
 1138 implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int J*
 1139 *Morphol.* 22 (3), 189-194.
- 1140 Van Dyk, JC, Pieterse, GM, Van Vuren, JH. 2007. Histological changes in the liver of
 1141 *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotox Environ*
 1142 *Safe.* 66 (3), 432-40.
- 1143 Vázquez-Padrón. RI, Moreno-Fierros, L, Neri-Bazan, L, Martinez-Gil, AF, De-la-Riva, GA,
 1144 Lopez-Revilla, R. 2000. Characterization of the mucosal and systemic immune response
 1145 induced by Cry 1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol*
 1146 *Res.* 33, 147-155.
- 1147 Viel, JF, Warembourg, C, Le Maner-Idrissi, G, Lacroix, A, Limon, G, Rouget, F, Monfort, C,
 1148 Durand, G, Cordier, S, Chevrier, C. 2015. Pyrethroid insecticide exposure and cognitive

- 1149 developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. *Environ Int.* 82,
1150 69–75.
- 1151 Viel, JF, Rouget, F, Warembourg, C, Monfort, C, Limon, G, Cordier, S, Chevrier, C. 2017.
1152 Behavioural disorders in 6- year-old children and pyrethroid insecticide exposure: the
1153 PELAGIE mother–child cohort. *Occup Environ Med.* 74, 275–281.
- 1154 Wagner-Schuman, M, Richardson, JR, Auinger, P, Braun, JM, Lanphear BP, Epstein, JN,
1155 Yolton, K, Froehlich, TE. 2015. Association of pyrethroid pesticide exposure with attention-
1156 deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of U.S. children. *Environ*
1157 *Health.* 14, 44–52.
- 1158 Wang, XZ, Liu, SS, Sun, Y, Wu, JY, Zhou, YL, Zhang, JH. 2009. Beta-cypermethrin impairs
1159 reproductive function in male mice by inducing oxidative stress. *Theriogenology.* 72, 599–
1160 611.
- 1161 Zhang, Z, Zhou, B, Wang, H, Wang, F, Song, Y, Liu, S, Xi, S. 2014. Maize Purple Plant
1162 Pigment Protects Against Fluoride-Induced Oxidative Damage of Liver and Kidney in Rats.
1163 *Int J Environ Res Public Health.* 11(1), 1020-1033.

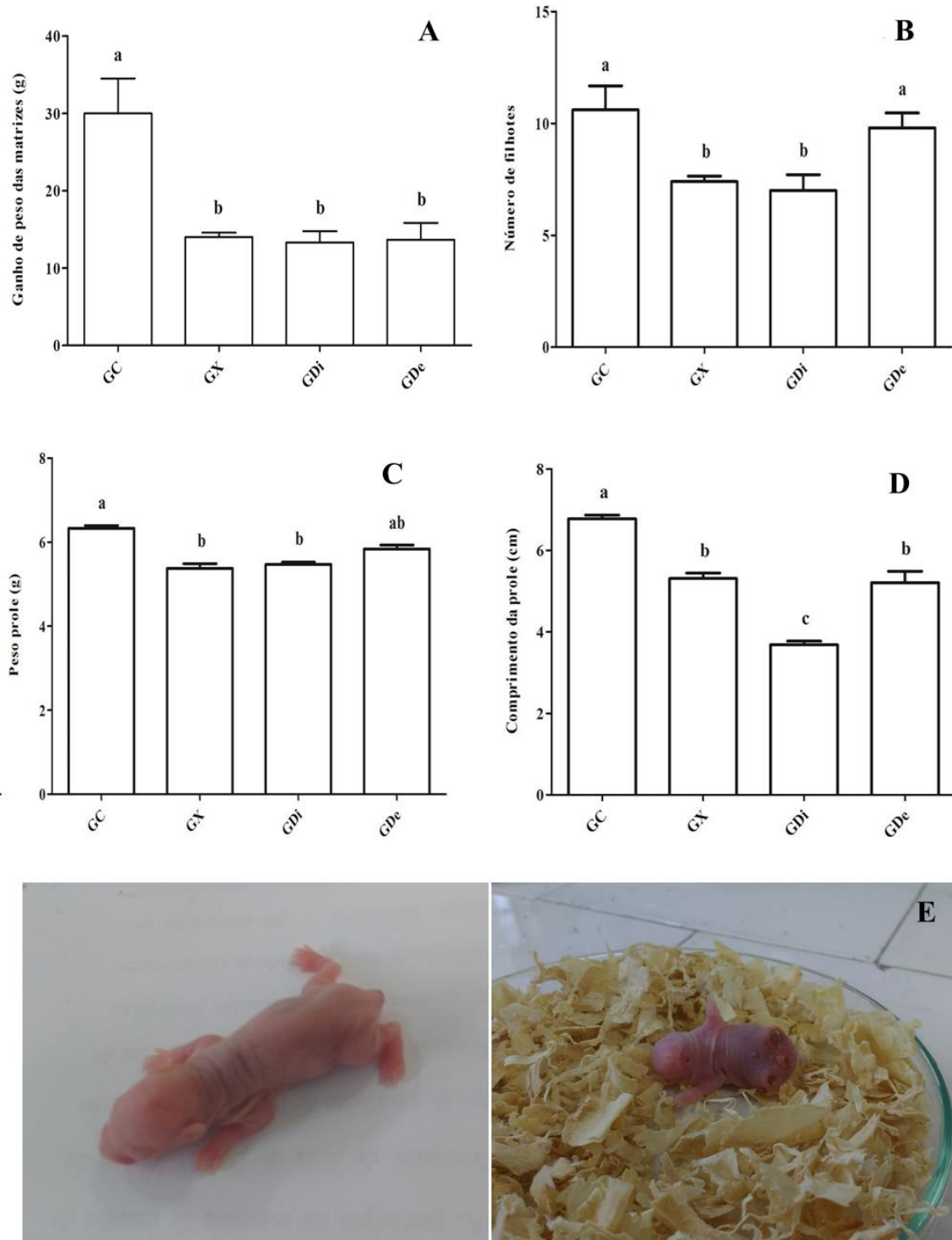
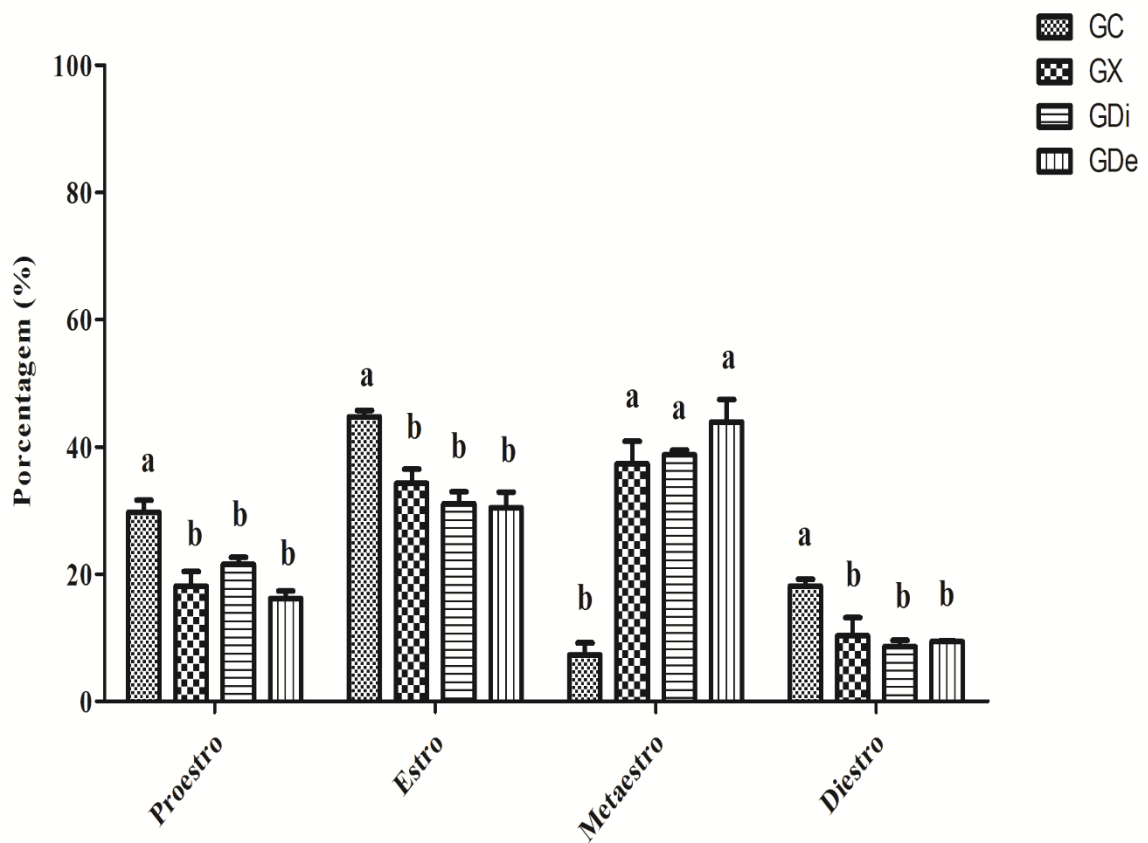


Figura 1: (A) Médias do ganho de peso das matrizes dos grupos experimentais. (B) Médias do número, (C) peso e (D) comprimento dos filhotes das matrizes dos grupos experimentais. (E) Malformação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 1. Percentual de mortalidade da prole das ratas dos grupos experimentais.

	GC	GX	GDi	GDe
Número de filhotes	53	37	35	49
Mortalidade	0	7	6	0
Percentual (%)	0,00	18,92	17,14	0,00

**Figura 2:** Ciclicidade estral após abertura vaginal. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

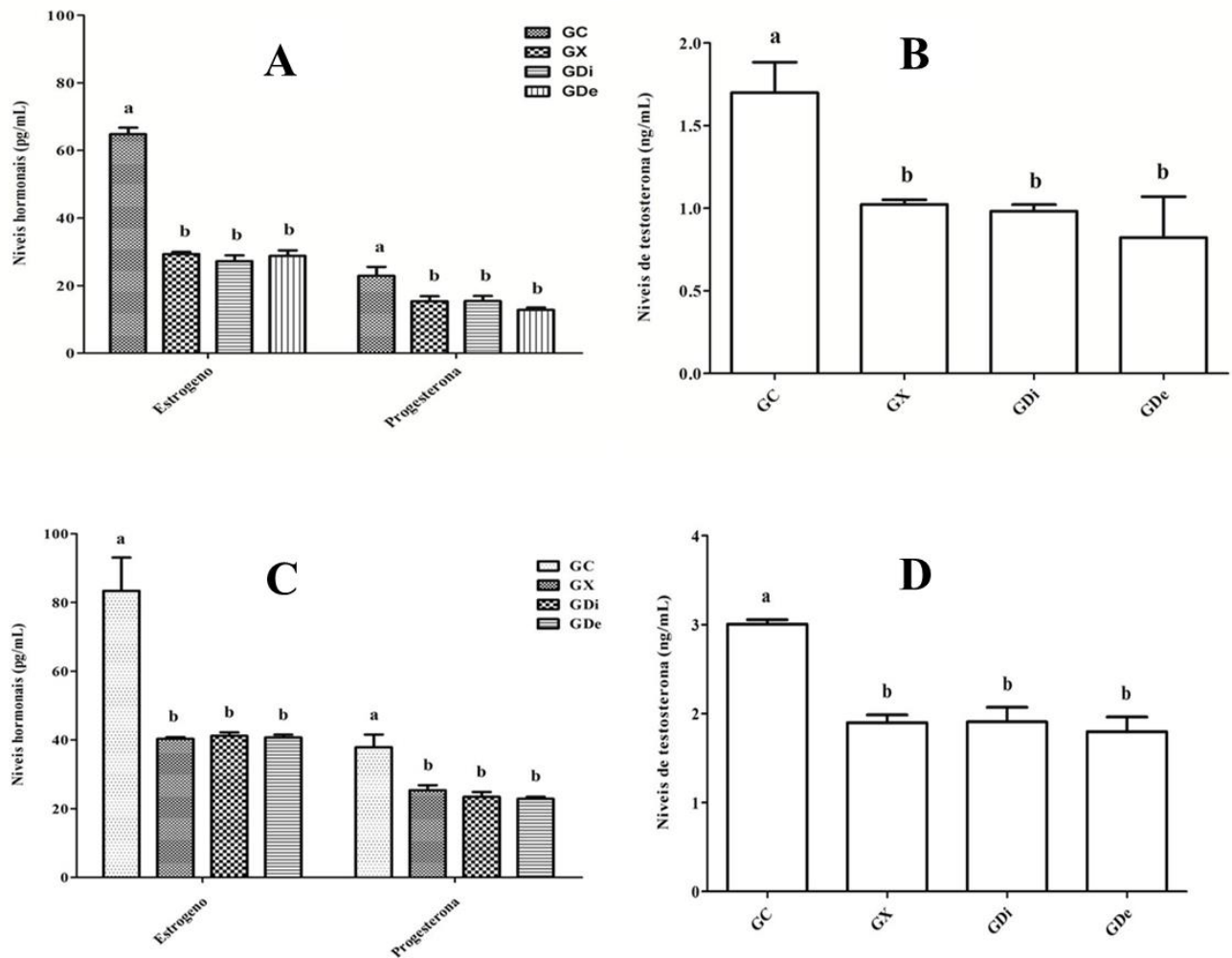


Figura 3: Níveis hormonais da prole aos 60 dias de vida, (A) Estrógeno e progesterona, (B) Testosterona; e aos 90 dias de vida, (C) Estrógeno e progesterona, (D) Testosterona. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

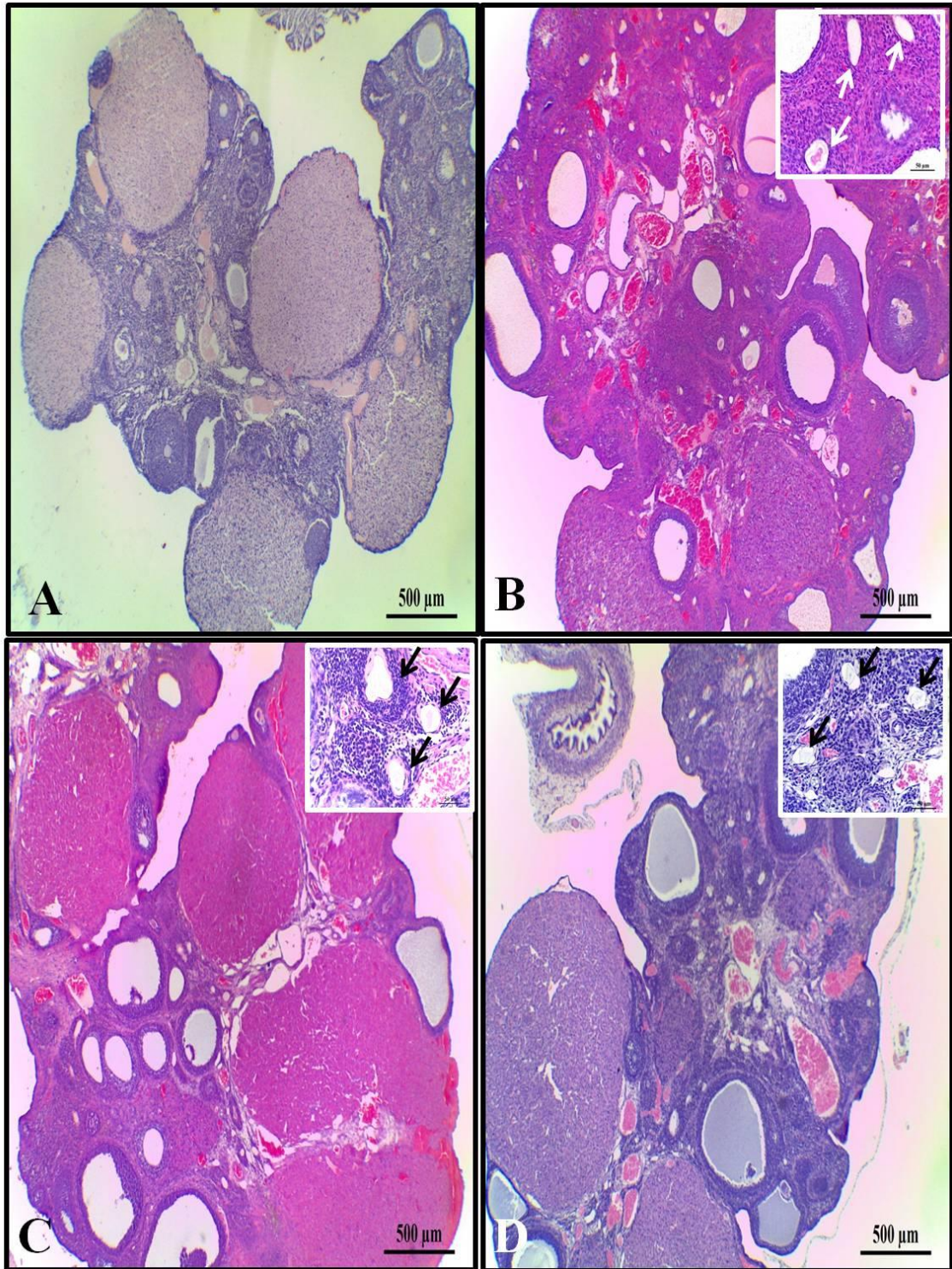


Figura 4: Fotomicrografia dos ovários da prole aos 90 dias de vida. (A) GC; (B) GX; (C) GDi e (D) GDe. Em detalhe folículos atrésicos (setas). H.E.

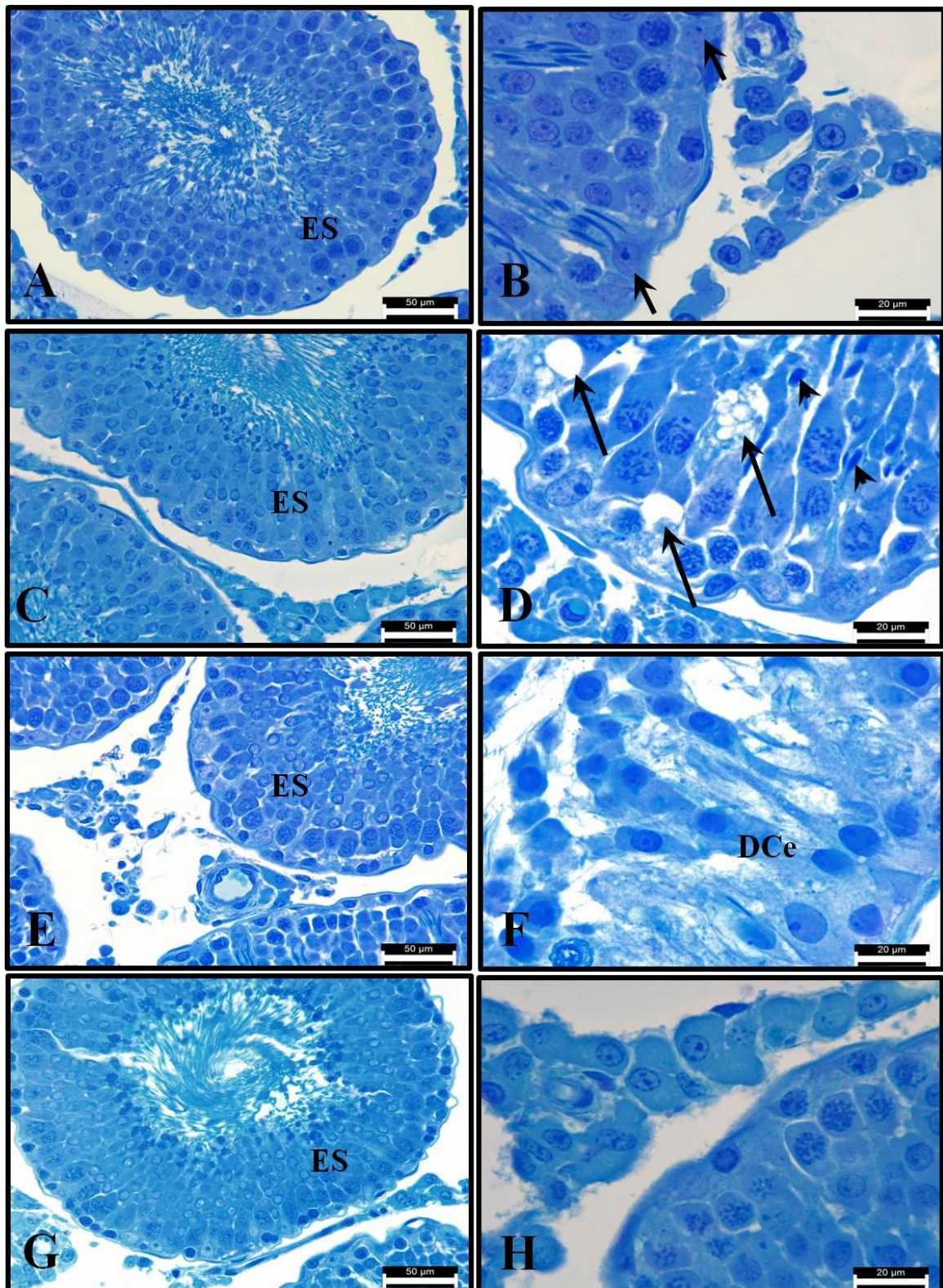


Figura 5: Fotomicrografia dos testículos da prole aos 90 dias de vida. (A-B) GC; (C-D) GX; (E-F) GDi e (G-H) GDe. ES – epitélio seminífero; seta curta – célula de Sertoli; seta longa – vacuolização do epitélio seminífero; ponta de seta – necrose (núcleo picnotico) e DCe – descamação do epitélio seminífero. Azul de toluidina.

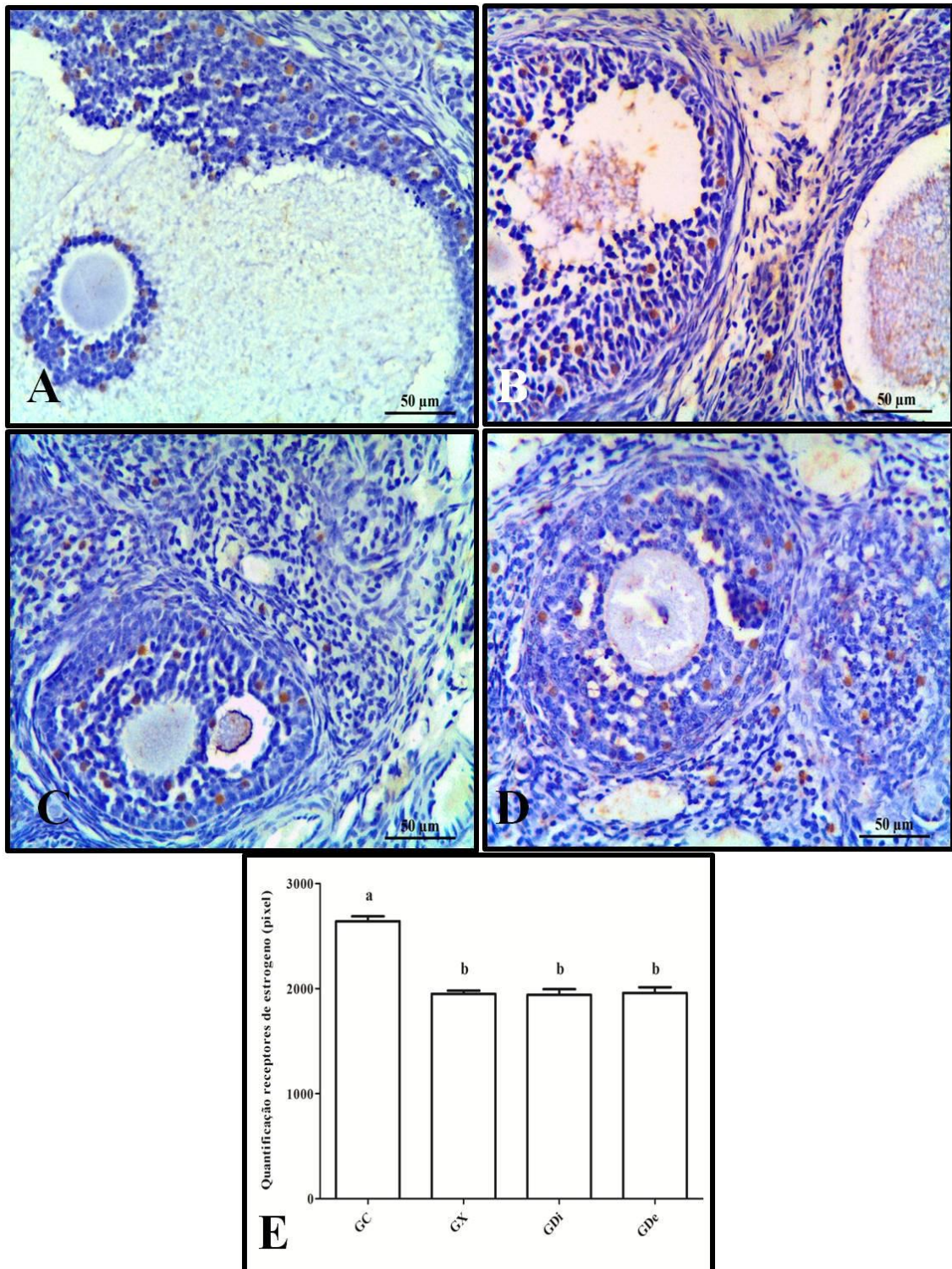


Figura 6: Imunohistoquímica para receptores de estrógeno nos ovários da prole aos 90 dias de vida. (A) GC; (B) GX; (C) GDi e (D) GDe. Em (E) notar redução na quantificação desses receptores. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

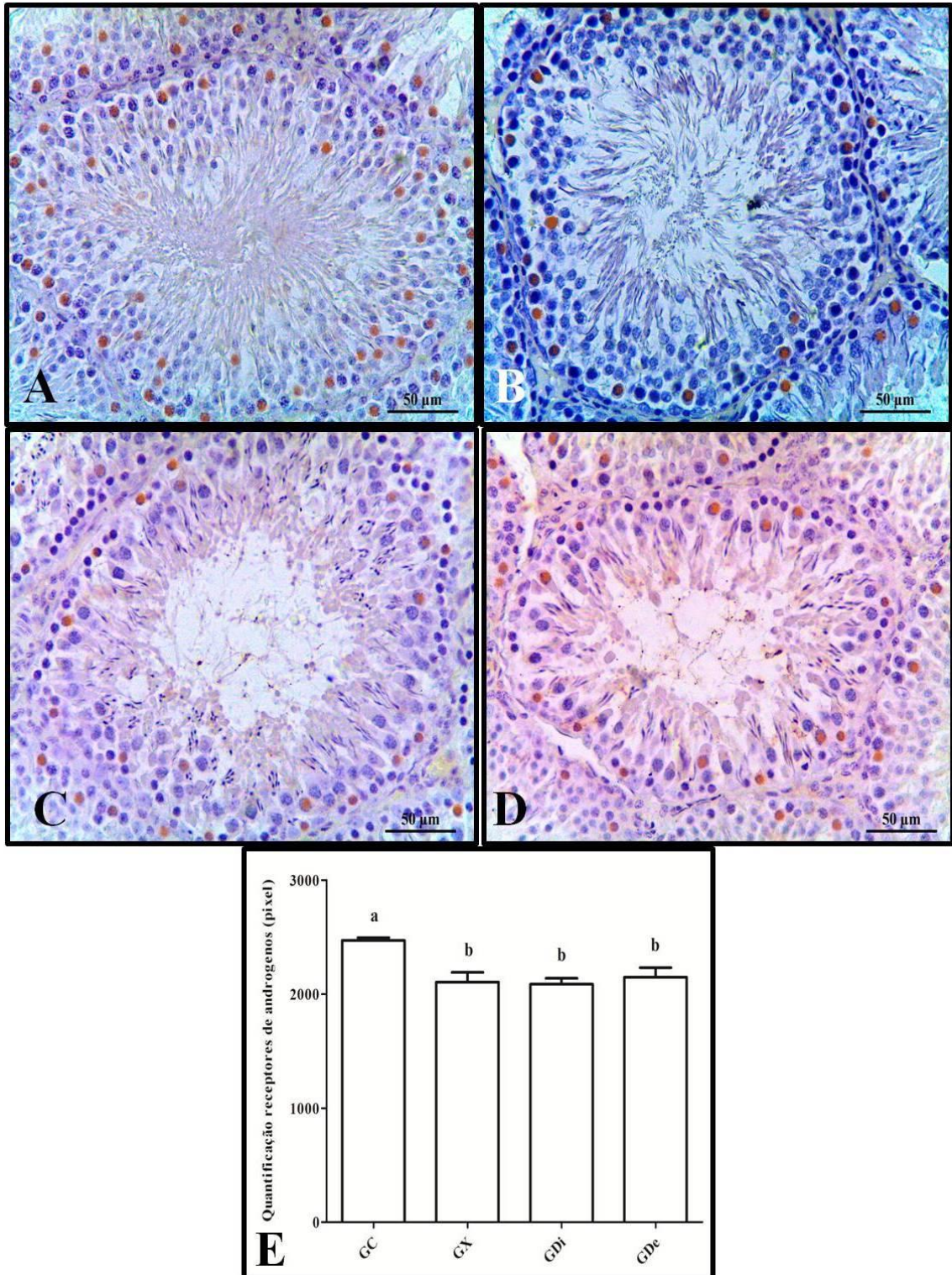


Figura 7: Imunohistoquímica para receptores de andrógenos nos testículos da prole aos 90 dias de vida. (A) GC; (B) GX; (C) GDi e (D) GDe. Em (E) notar redução na quantificação desses receptores. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. *Médias dos dados morfométricos dos testículos da prole das ratas dos grupos experimentais

	GC	GX	GDi	GDe
Peso corporal (g)	292,60 ± 8,18a	222,00 ± 10,27b	236,54 ± 9,59b	253,01 ± 8,36b
Peso dos testículos (g)	1,51 ± 0,09a	1,29 ± 0,04b	1,23 ± 0,10b	1,25 ± 0,08b
Índice organossomatico (%)	0,86 ± 0,03a	0,48 ± 0,04b	0,43 ± 0,08b	0,52 ± 0,06b
Diâmetro tubular (µm)	324,73 ± 4,75a	305,09 ± 2,66b	297,25 ± 5,24b	298,89 ± 5,40b
Altura do epitélio (µm)	118,83 ± 2,94a	100,97 ± 2,50b	103,50 ± 4,20b	105,34 ± 5,61b
Comprimento total tubular (m)	14,74 ± 0,71a	10,73 ± 0,98b	10,65 ± 1,79b	10,44 ± 0,87b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). * valores correspondem a média dos testículos direito e esquerdo.

Tabela 3. *Médias dos dados morfométricos dos ovários da prole das ratas dos grupos experimentais

	GC	GX	GDi	GDe
Peso corporal (g)	286,63 ± 13,30a	222,04 ± 10,27b	235,10 ± 13,49b	233,59 ± 8,24b
Peso dos ovários (g)	0,08 ± 0,01a	0,04 ± 0,01b	0,03 ± 0,02b	0,04 ± 0,01b
Índice organossomatico (%)	0,07 ± 0,01a	0,02 ± 0,02b	0,03 ± 0,01b	0,03 ± 0,02b
Folículo primário	8,00 ± 1,58a	4,60 ± 1,14b	3,40 ± 0,50b	3,80 ± 0,83b
Folículo secundário	11,60 ± 0,51a	6,40 ± 1,14b	5,60 ± 0,43b	6,20 ± 1,48 b
Folículo terciário	4,07 ± 4,07b	33,33 ± 2,60a	37,80 ± 3,46a	37,40 ± 2,49a
Corpo lúteo	14,67 ± 2,10a	7,67 ± 1,70b	5,93 ± 3,04b	6,33 ± 1,67b
Folículo atresico	1,80 ± 0,44b	3,80 ± 0,37a	4,00 ± 1,22a	4,40 ± 1,14a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). * valores correspondem a média dos ovários direito e esquerdo.

03/02/2020

ScholarOne Manuscripts



Biotechnic & Histochemistry

[Home](#)[Author](#)[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Biotechnic & Histochemistry

Manuscript ID

TBIH-2020-0031

Title

Bioactivity of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* and var. *Kurstaki* administered during pregnancy and lactation and its reflection on the reproductive aspects of adult offspring.

Authors

Alves, Rebeka

D'assunção, Caroline

Alves, Erique

de Albuquerque, Yuri Mateus Lima

da Silva Júnior, Valdemiro

Wanderley Teixeira, Valéria

Teixeira, Álvaro

Date Submitted

03-Feb-2020

[Author Dashboard](#)

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements.

AUTHORSERVICES

Supporting Taylor & Francis authors

For general guidance on every stage of the publication process, please visit our [Author Services website](#).

EDITINGSERVICES

Supporting Taylor & Francis authors

For editing support, including translation and language polishing, explore our [Editing Services website](#)

SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

Contents

- [About the Journal](#)
- [Peer Review and Ethics](#)
- [Preparing Your Paper](#)
- [Style Guidelines](#)
- [Formatting and Templates](#)
- [References](#)
- [Editing Services](#)
- [Checklist](#)
- [Using Third-Party Material](#)
- [Submitting Your Paper](#)
- [Data Sharing Policy](#)
- [Publication Charges](#)
- [Copyright Options](#)
- [Complying with Funding Agencies](#)
- [Open Access](#)
- [My Authored Works](#)
- [Reprints](#)

About the Journal

Biotechnic & Histochemistry is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Biotechnic & Histochemistry accepts the following types of article:

- Research articles
- Review articles
- Book reviews
- Invited editorials
- Letters to the Editor

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

Research articles

- Should be written with the following elements in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)
- Should contain an unstructured abstract of 400 words.
- Should contain between 1 and 15 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
- Research articles submitted to *Biotechnic & Histochemistry* must report original research; all manuscripts will be reviewed by expert referees.

Review articles

- Should be written with the following elements in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)
- Should contain between 1 and 15 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.

Book reviews

- Should be written with the following elements in the following order:

Invited editorials

- Should be written with the following elements in the following order:

Letters to the Editor

- Should be written with the following elements in the following order:

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where “a quotation is ‘within’ a quotation”. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word format. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

Keywords should be in alphabetical order. Manuscripts must be typed double spaced, including footnotes, references, legends etc. Allow top, bottom, and side margins of 1 inch. Captions should be typed, double-spaced, on a separate sheet. All original figures should be clearly marked with the number, author’s name, and top edge indicated.

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper.

An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).
3. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
4. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
5. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
6. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
7. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
8. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

9. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
10. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in ScholarOne. Please read the guidelines above and then submit your paper in [the relevant Author Centre](#), where you will find user guides and a helpdesk.

Please note that *Biotechnic & Histochemistry* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Biotechnic & Histochemistry* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have

selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements.](#)

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).

Queries

Should you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).

CAPÍTULO III

Alterações renais e hepáticas na prole de ratas que receberam inseticidas biológicos durante
prenhez e lactação.

Rebeka da Costa Alves^{1*}, Cintia Giselle Martins Ferreira¹, Marina Gomes Pessoa Baptista¹,
Ismaela Maria Ferreira de Melo¹, Valéria Wanderley-Teixeira¹, Álvaro Aguiar Coelho
Teixeira¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife, Pernambuco, Brasil.

*E-mail: rebekabio89@gmail.com

RESUMO

Inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* têm sido considerados seguros, sendo uma alternativa à utilização dos inseticidas sintéticos. Porém, estudos demonstraram efeitos das toxinas Cry de *Bt* em vários órgãos, comprometendo as suas funções. O objetivo deste trabalho foi testar se a administração de inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* em ratas prenhes pode promover alterações histopatológicas no fígado e rins, bem como nos níveis dos biomarcadores de toxicidade, de seus filhotes na fase adulta. Utilizou-se 20 ratas, com 90 dias de idade, divididas em quatro grupos: GC – Ratas prenhes, GX – Ratas prenhes que receberam XenTari[®], GDi – Ratas prenhes que receberam Dipel[®] e GDe – Ratas prenhes que receberam deltametrina. Os inseticidas foram administrados por gavagem na dosagem de 1mg/100g/dia (GX e GDi), e 2mg/Kg/dia (GDe) durante a gestação e lactação. Nos animais dos grupos cujas matrizes receberam os inseticidas, houve redução nos níveis dos biomarcadores de toxicidade alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase

(AST), ureia e creatinina, com relação ao grupo controle. Os inseticidas biológicos promoveram alterações histopatológicas no fígado, com a presença de congestão de veia porta, centrolobular e nos capilares sinusoides, e no rim presença de congestão cortical e redução do espaço subcapsular. A avaliação histoquímica no fígado demonstrou redução significativa de glicogênio nos grupos que receberam inseticidas quando comparados ao grupo controle, enquanto que para fibras colágenas tanto no fígado como nos rins, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. A morfometria do fígado revelou redução significativa do parênquima lobular e aumento no parênquima não lobular, e no rim observou-se redução do diâmetro e volume do glomérulo e da cápsula de Bowman dos animais cujas matrizes receberam tanto os inseticidas biológicos como o sintético. Assim, conclui-se que os inseticidas biológicos XenTari® e Dipel® em doses subletais em ratas prenhes promovem alterações no fígado e rim da prole semelhantemente ao inseticida deltametrina, que se prolongam até a fase adulta.

Palavras - Chave: Bioquímica, fígado, inseticidas, prole, proteína Cry, rim.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis insecticides have been considered safe, being an alternative to the use of synthetic insecticides. However, studies have shown the effects of *Bt* Cry toxins on various organs, compromising their functions. The objective of this work was to test whether the administration of biological insecticides based on *B. thuringiensis* in pregnant rats can promote histopathological changes in the liver and kidneys, as well as in the levels of toxicity biomarkers, of their puppies in adulthood. Twenty rats, 90 days old, were used, divided into four groups: GC - Pregnant rats, GX - Pregnant rats that received XenTari®, GDi - Pregnant rats that received Dipel® and GDe - Pregnant rats that received deltamethrin. Insecticides were administered by gavage at a dosage of 1mg/100g/day (GX and GDi), and 2mg/Kg/day

(GDe) during pregnancy and lactation. In the animals of the groups whose matrices received the insecticides, there was a reduction in the levels of the biomarkers of toxicity alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and creatinine, about the control group. The biological insecticides promoted histopathological changes in the liver, with the presence of portal vein, centrilobular and sinusoidal capillaries congestion, and in the kidney, presence of cortical congestion and reduction of the subcapsular space. Histochemical evaluation in the liver demonstrated a significant reduction in glycogen in the groups that received insecticides when compared to the control group, whereas for collagen fibers in both the liver and the kidneys, no differences were observed between the experimental groups. The morphometry of the liver revealed a significant reduction in the lobular parenchyma and an increase in the non-lobular parenchyma, and in the kidney, there was a reduction in the diameter and volume of the glomerulus and Bowman's capsule of the animals whose matrices received both biological and synthetic insecticides. Thus, it is concluded that the biological insecticides XenTari[®] and Dipel[®] in sublethal doses in pregnant rats promote changes in the liver and kidney of the offspring similar to the insecticide deltamethrin, which extend into adulthood.

Keywords: Biochemistry, Cry protein, insecticides, kidney, liver, offspring.

1. Introdução

Os inseticidas têm se mostrado como um dos principais perigos ao meio ambiente, seres humanos e animais que devido sua característica persistente, tem sido encontrado nos alimentos e concentrados na cadeia alimentar (Mnif et al., 2011; Ahmad, 2012). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a população brasileira se encontra exposta a resíduos de inseticidas (ANVISA, 2015), sendo sua presença também já verificada no leite materno e na urina (Santos, 2018).

A deltametrina é um inseticida piretroide do tipo II considerado como um dos mais potentes, utilizado em todo o mundo (Wolansky et al., 2006). Estudos demonstraram que deltametrina foi capaz de afetar a histofisiologia dos rins, fígado e pulmões de ratos (Chargui et al., 2012; Lemos et al., 2013). Como alternativa ao uso deste inseticida, a utilização de inseticidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis*, XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*), tem crescido bastante por ser uma alternativa ao uso dos inseticidas sintéticos (Mnif et al., 2011), sendo considerado seguro aos seres humanos e ao meio ambiente (Mossa et al., 2018).

Apesar dos inseticidas à base de *B. thuringiensis* serem considerados seguros, estudos evidenciaram possíveis efeitos biológicos de suas toxinas no fígado e rins de mamíferos. A administração de 370 mg/100g de XenTari® a ratas prenhes, correspondente a dose de 20 mg/100 g da toxina Cry, alterou parâmetros fisiológicos e histopatológicos hepáticos, e promoveu degeneração nos túbulos renais e glomerulonefrite proliferativa no rim (Lemos et al., 2013). O bioinseticida Dipel® induziu estresse oxidativo e peroxidação lipídica, além de danificar as membranas celulares dos hepatócitos em ratos, levando a uma reação inflamatória (Shaban et al., 2003; Kitada et al., 2006; Dos Santos et al., 2013; Mezzomo et al., 2013).

Alguns estudos têm mostrado que a administração de inseticidas sintéticos e biológicos em ratas durante a gestação e lactação promove efeitos tóxicos nos neonatos interferindo nos níveis dos biomarcadores e na histopatologia hepática e renal (Eissa; Zidan, 2010; Dos Santos et al., 2013; El- Gendy et al., 2015; Fahim et al., 2015; Magdy et al., 2016). Entretanto, não se tem relato se essas alterações persistem até a fase adulta da prole, uma vez que as avaliações foram realizadas logo após o nascimento. Assim, a presente pesquisa avaliou se a administração de doses subletais dos inseticidas biológicos, XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*) em ratas durante prenhez e lactação

pode promover, na prole, alterações histopatológicas no fígado e rim, e nos níveis dos biomarcadores de toxicidade que perdurem até a fase adulta.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

2.1. Animais

Foram utilizadas 20 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando aproximadamente $200\text{g} \pm 20\text{g}$, procedentes do Biotério do mesmo Departamento. Este experimento foi aprovado pelo CEUA, com a licença 50/2017. Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas. Após um período de adaptação, foram colhidos esfregaços vaginais para determinação do ciclo estral. As ratas que apresentarem três ciclos estrais regulares foram acasaladas e distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos, constituídos por 5 animais cada: Grupo Controle (GC) - Ratas prenhes que receberam placebo; Grupo Xentari (GX) - Ratas prenhes que receberam 1 mg de XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*)/100g; Grupo Dipel (GDi) - Ratas prenhes que receberam 1 mg de Dipel® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*)/100g; Grupo Deltametrina (GDe) - Ratas prenhes que receberam 2 mg de Deltametrina (Keshet® 25EC)/Kg (controle positivo).

2.2. Acasalamento dos Animais e Diagnóstico da Prenhez

As fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para duas fêmeas, sempre no início da noite. Na manhã seguinte, foram realizados exames colpocitológicos para a

confirmação do acasalamento, tomando-se com parâmetro a presença de espermatozoides nos esfregaços corados pelo método Shorr-Harris, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional.

2.3. Administração dos inseticidas

Os inseticidas foram administrados diariamente durante toda a prenhez e lactação, por via oral (gavagem), a partir da confirmação do acasalamento, de acordo com a metodologia modificada de Shaban et al. (2003), para os inseticidas biológicos (XenTari® e Dipel®), e de Andrade et al. (2002), para o inseticida sintético (Deltametrina). As ratas foram pesadas diariamente em balança analítica, a partir da confirmação do acasalamento, até o dia do nascimento dos filhotes, a fim de estabelecer as dosagens dos inseticidas. As ratas do grupo controle receberam 1 mL de água destilada pela mesma via.

2.4. Dosagens bioquímicas

Após o nascimento da prole, os filhotes, ao atingirem as idades de 60 e 90 dias, em todos os grupos experimentais, foram imobilizados em contensor e o sangue coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G). Após centrifugação refrigerada, o soro foi acondicionado em microtubos (eppendorfs) e congelados a -20°C até o momento das dosagens (Teixeira et al., 2004). Foram avaliados os níveis séricos de indicadores específicos de lesão hepática e renal como as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina, utilizando kits reagentes, conforme especificações do fabricante.

2.5. Análise Histopatológica e histoquímica do fígado e rim

Ao completarem 90 dias de idade, os animais foram anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular para remoção dos órgãos. Em seguida esses animais foram submetidos a eutanásia por meio do aprofundamento anestésico. Os órgãos coletados foram pesados e em seguida fixados em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente os órgãos foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.) para análise de rotina histopatológica, além de coloração por PAS e Picrosirius. A quantificação em pixels dos grânulos de glicogênio e das fibras colágenas foi realizada utilizando o programa GIMP 2.8.

2.6. Análise morfométrica

O estudo morfométrico do fígado dos filhotes foi realizado através da observação das lâminas em uma objetiva de 40x, utilizando um retículo de WEIBEL com 100 pontos, acoplado à ocular do microscópio, onde foram contados 5 campos por lâmina, segundo a metodologia descrita por Engelman et al. (2001), sendo quantificado o parênquima lobular (hepatócitos, sinusoides, espaços de Disse e ductos biliares) e não lobular (espaços portais, veia centrolobular e ramos da veia hepática).

Para os rins, também se utilizou cinco lâminas de cada grupo, sendo analisados dez glomérulos em cada lâmina. As medidas foram restritas aos glomérulos que demonstraram, num único corte os pólos vascular e urinário. Essa disposição indica a secção coincidente com a região equatorial do glomérulo. Esses glomérulos, assim selecionados ao acaso, foram utilizados para as mensurações. A captura da imagem foi efetuada por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através de aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao programa Optimas® 6.2 para Windows. Para a obtenção da área glomerular o cursor foi posicionado na

área central deste, estabelecendo-se, a partir daí uma linha circular externa, coincidente com os limites do tufo glomerular. Foi utilizada a mesma metodologia para a mensuração da cápsula de Bowman (Akaoka et al., 1994; Danielewicz; Agroska-Danilewicz, 1998). O volume glomerular e da cápsula de Bowman, foram calculados de acordo com os critérios preconizados por Pagtalunan et al. (2000). Para essa estimativa, foi utilizada a equação $4/3\pi r^3$, destinada ao cálculo do volume da esfera, na qual “r” representa o raio.

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa computacional GraphicPad Prism 5, onde os dados foram avaliados por meio de testes paramétricos de Anova One-way com post-hoc de Tukey ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Dosagens bioquímicas

Os níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bem como para as dosagens de ureia e creatinina, tanto aos 60 como 90 dias, apresentaram aumento significativo nos tratamentos com os inseticidas biológicos e sintético em relação ao controle. No entanto, o aumento dos indicadores renal foi mais expressivo com a deltametrina, que diferiu também dos inseticidas biológicos (Tabela 1).

3.2. Análise histopatológica e histoquímica

A análise histopatológica do fígado do grupo controle apresentou parênquima hepático sem alterações com cordões de hepatócitos organizados margeando a veia centrolobular, entremeados por capilares sinusoides. No tratamento com inseticidas biológicos verificou-se a

presença de congestão de veia porta, centrolobular e nos capilares sinusoides. Já a deltametrina promoveu apenas congestão da veia centrolobular (Figura 1).

Os rins dos animais do grupo controle demonstraram estar bem preservados, com os glomérulos e espaço subcapsular bem definidos, além de túbulos contorcidos proximais e distais com características normais, sem nenhuma alteração. Já nos rins do tratamento com inseticidas biológicos foram observadas a presença de congestão cortical e redução do espaço subcapsular. No tratamento com a deltametrina além da congestão cortical verificou atrofia glomerular (Figura 2).

A avaliação histoquímica para glicogênio no fígado, demonstrou redução significativa nos animais dos grupos tratados com inseticidas em relação ao controle (Figura 3). Já na avaliação histoquímica para fibras colágenas tanto no fígado como nos rins, não foi observada diferenças entre os grupos experimentais (Figuras 4 e 5).

3.3. Análise morfométrica

A morfometria do fígado revelou redução significativa do parênquima lobular e aumento no parênquima não lobular no fígado dos animais tratados com os inseticidas. Na análise morfométrica dos rins observou-se redução do diâmetro e volume do glomérulo, além do diâmetro e volume da cápsula de Bowman nos animais tratados com os inseticidas (Tabelas 2 e 3).

4. Discussão

Os níveis dos biomarcadores de toxicidade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), apresentaram alterações na prole dos grupos cujas matrizes receberam os inseticidas biológicos e o sintético, demonstrado por um aumento significativo comparado ao grupo controle. Os níveis destas enzimas são relacionados com

alterações patológicas dos hepatócitos, como lesões ou destruição dessas células (Motta, 2000), podendo assim concluir que seu aumento está relacionado com possíveis danos hepáticos causados pelos inseticidas, observado já aos 60 dias de vida. Resultados semelhantes foram observados por Chargui et al. (2012) e Orlu (2014) em ratos que receberam 0,3 mg/kg e 25 mg/kg de deltametrina respectivamente, apresentando aumento notável nas atividades das enzimas ALT e AST, atribuindo este resultado como sinal de lesão que conduz a uma disfunção do fígado.

Com relação a ureia e a creatinina, também foi observado aumento destes níveis, sendo este mais efetivo no tratamento com a deltametrina. O aumento dos níveis de ureia pode ser um indicador de desidratação, disfunção renal e hepática (Calixto-Lima; Reis, 2012), e a elevação dos níveis séricos de creatinina é uma característica de deterioração da função renal, devido redução na taxa de filtração glomerular e disfunção do néfron (Wadei et al., 2006; Lemos et al., 2013). El-Naggar et al. (2017), observaram aumento significativo do nível de ureia no tratamento com 35 e 350 mg/kg de espinosade em ratos por 4 semanas, como também Schroder et al. (2007) obtiveram concentração de ureia significativamente maior no plasma de ratos alimentados com o arroz transgênico KMD1 que contém a proteína Cry1Ab.

A análise histopatológica do fígado dos grupos GX e GD_i demonstrou a presença de congestão de veia porta, centrolobular e nos capilares sinusoides. Semelhantemente, Mossa et al. (2011) relatou a presença destas congestões hepáticas em ratos tratados com dose subletal de uma mistura de 4 inseticidas (Diazinon, Clorpirifos, Malation e Profenofos). El-Shamei et al. (2012) também observaram a presença de congestão dos sinusoides hepáticos em ratos alimentados com milho transgênico contendo a proteína Cry1Ab. Nos rins dos grupos de tratamento com inseticidas biológicos foram observadas a presença de congestão cortical e redução do espaço subcapsular, característico da presença de glomerulonefrite membranoproliferativa. Esse achado coincide com o de Lemos (2013), que também observou

a presença de glomerulonefrite proliferativa membranosa nos rins de ratas que receberam 20 mg/100g de XenTari®, como reflexo do efeito das toxinas no sistema imune através da proliferação das células mesangiais e sua infiltração no tecido, levando a redução do espaço de Bowman, o que interfere no processo de filtração glomerular.

Quanto à análise histoquímica para glicogênio no fígado, sua redução significativa pode ser um indicativo de maior gasto de energia devido ao estresse causado pelos inseticidas (Yousef et al., 2006). O fígado exerce um importante papel no equilíbrio entre a captação e armazenamento da glicose via glicogênese, e liberação de glicose via glicogenólise (Hers, 1990; Nordlie et al., 1999; Abdollahi et al., 2003b, 2003d), sendo este um alvo de toxicidade dos inseticidas biológicos XenTari® e Dipel®, pois o animal precisa gastar mais energia para superar o estresse tóxico que está sofrendo, e eliminar o inseticida do corpo (Begum; Vijayaraghavan, 1999).

Com relação aos dados morfométricos dos fígados dos animais tratados com os inseticidas, estes apresentaram redução significativa do parênquima lobular e aumento no parênquima não lobular no fígado, mostrando-se coerente ao resultado histopatológico que, devido a congestão hepática levou a dilatação das veias centrolobulares, aumentando o parênquima não lobular. Na análise morfométrica dos rins, a redução do diâmetro e volume do glomérulo e da cápsula de Bowman observada nos animais dos grupos tratados com os inseticidas também foi relatada por Kilic; Akay (2008) num estudo de três gerações de ratos alimentados com milho geneticamente modificado *Bt*, caracterizado como uma atrofia glomerular, refletindo uma diminuição da função renal devido redução na taxa de filtração glomerular, que também foi comprovada nos resultados bioquímico e histopatológico.

O fígado e o rim como os principais órgãos de desintoxicação enfrentam exposição máxima aos xenobióticos e seus metabólitos, sendo alvo das espécies reativas de oxigênio (Mossa, 2011), uma vez que já foi relatado que os inseticidas químicos geram radicais livres,

induzindo ao estresse oxidativo (Koner et al., 1998; Ray; Banerjee, 1998; Ahmed et al., 2000), sendo este como um dos mecanismos mais importantes de toxicidade do fígado devido a inseticidas (Videla et al., 1990). De acordo com Shaban et al. (2003), o inseticida Dipel® pode alterar o comportamento de defesa das células hepáticas, estimula a peroxidação lipídica através da formação de radicais livres, induzindo a um estresse oxidativo e reações inflamatórias. O aumento da peroxidação lipídica reflete na vulnerabilidade do organismo ao funcionamento do seu sistema imunológico (Rehman et al., 2006). Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho justificam-se por um possível estresse oxidativo, devido a um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, causado pelas toxinas Cry de *Bt*, levando às disfunções hepática e renal.

5. Conclusão

Embora estudos tenham demonstrado que os inseticidas *Bt* são seguros a organismos não-alvos, de acordo com estes achados, conclui-se que a exposição de doses subletais dos inseticidas biológicos XenTari® WG e Dipel® em ratas prenhes pode causar efeitos hepáticos e renais na prole, semelhantemente ao inseticida deltametrina, que se prolongam até a fase adulta. Considerando que a população se encontra exposta a essas toxinas, é altamente recomendado que mais estudos sejam realizados para melhor elucidar os mecanismos utilizados por elas, uma vez que seus efeitos diretos em células de mamíferos ainda não foram completamente estudados.

6. Referências

Abdollahi M.; Chan T. S.; Subrahmanyam V.; O'Brien P. J. Effects of phosphodiesterase 3,4,5 inhibitors on hepatocyte cAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and

- 1460 susceptibility to a mitochondrial toxin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v. 252, p. 205–
1461 211, 2003b.
- 1462 Abdollahi M.; Soleimani F.; Kangarlou A. S. Review on blood glucose variations and
1463 affecting parameters. *Middle East Pharmacy*. v. 11, p. 6 – 10, 2003d.
- 1464 Ahmad L.; Khan A.; Khan M. Pyrethroid-induced reproductive toxicopathology in non-target
1465 species. *Pakistan Veterinary Journal*. v. 32, p. 1–9, 2012.
- 1466 Ahmed R. S.; Seth V.; Pasha S. T.; Banerjee B. D. Influence of dietary ginger (*zingiber*
1467 *officinales rosc*) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food and Chemical*
1468 *Toxicology*. v. 38, p. 443–450, 2000.
- 1469 Akaoka K.; White R. H. R.; Raafat F. Human glomerular growth during childhood: a
1470 morphometric study. *The Journal of Pathology*. v. 173, n. 3, p. 261-268, 1994.
- 1471 Andrade A. J. M.; Araújo S.; Santana G. M.; Ohi M.; Dalsenter P. R. Reproductive effects of
1472 deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regulatory*
1473 *Toxicology and Pharmacology*. v. 36, p. 310–317, 2002.
- 1474 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de análise de resíduos de
1475 agrotóxicos em alimentos (PARA). Relatório de atividades de 2013-2015. Brasília, 2019.
1476 Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 set. 2019.
- 1477 Begum G.; Vijayaraghavan, S. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide
1478 Rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environmental*
1479 *Research*. v. 80, p. 80– 83, 1999.
- 1480 Calixto-Lima L.; Reis N. T. Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica.
1481 Rio de Janeiro: Rubio, 2012.
- 1482 Chargui I.; Grissa I.; Bensassi F.; Hrira M. Y.; Haouem S.; Haouas Z.; Bencheikh H.
1483 Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of

- 1484 Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A Molecular Assessment.
1485 Biomedical and Environmental Science. v. 25 n.6, p. 672–683, 2012.
- 1486 Danileicz M.; Wagoska-Danilewicz M. Diffuse idiopathic mesangial proliferative
1487 glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. Medical Science Monitor. v.
1488 4, n. 6, p. 955-959, 1998.
- 1489 Dos Santos P. H. M.; Teixeira W. V.; Teixeira C. A. A.; Da Silva R.; Lemos M. A. J. J.; Neto
1490 L. C. C. J.; Ferreira M. C. G. Histopathology of organs from neonate offspring born to female
1491 rats exposed to sublethal doses of biological and synthetic insecticides. International Journal
1492 of Morphology. v. 31, p. 246-253, 2013.
- 1493 Eissa F.; Zidan N. Haematological, biochemical and histopathological alterations induced by
1494 abamectin and *Bacillus thuringiensis* in male albino rats. Acta Biologica Hungarica. v. 61, n.
1495 1, p. 33–44, 2010.
- 1496 El-Gendy K. S.; Aly N. M.; Mahmoud F. H.; AbdAllah D. M.; El-Sebae A. K. H.
1497 Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Mice Induced by Abamectin and Ameliorating Effect of
1498 Quercetin. Asian Journal of Agricultural and Food Sciences. v. 3, p. 651–666, 2015.
- 1499 El-Naggar A. S.; Eltantawi H.; Ibrahim M. A.; Alm-Eldeen A. Assessment of the toxicity of
1500 sub-chronic low and high doses of the bio-insecticide spinosad on the liver, kidney and the
1501 cerebellum in male albino mice. Brazilian Archives of Biology and Technology. v. 60,
1502 e17160179, 2017.
- 1503 El-Shamei Z. S.; Gab-Alla A. A.; Shatta, A. A.; Moussa E. A.; Rayan A. M.
1504 Histopathological Changes in Some Organs of Male Rats Fed on Genetically Modified Corn
1505 (Ajeeb YG). The Journal of American Science. v. 8, n. 10, p. 684-696, 2012.
- 1506 Engelman M. F. B.; Neto J. G.; Andrade C. H. V.; Hernandez R.; Goulart L. B. N. T. Estudo
1507 morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológica de tiroxina. Arquivos
1508 Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. v. 45, n. 2, p. 173-179, 2001.

- 1509 Fahim H. I.; Ahmed O. M.; Boules, M. W.; Ahmed H. Y. Nephrotoxic effects of abamectin
1510 and Calotropis procera latex and leaf extract in male albino rats. The American Journal of
1511 Medicine and Medical Sciences. v. 6, n. 3, p. 73–86, 2016.
- 1512 Hers H. G. Mechanisms of blood glucose homeostasis. Journal of Inherited Metabolic
1513 Disease. v. 13, p. 395–410, 1990.
- 1514 Kilic A.; Akay M. T. A. Three generation study with genetically modified *Bt* corn in rats:
1515 biochemical and histopathological investigation. Food and Chemical Toxicology. v. 46, p.
1516 1164–1170, 2008.
- 1517 Kitada S.; Abe Y.; Shimada H.; Kusaka Y.; Matsuo Y.; Katayama H.; Okumara S.; Akao T.;
1518 Mizukki E.; Kuge O.; Sasaguri Y.; Ohba M.; Ito A. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-
1519 tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. The Journal of Biological Chemistry. v. 281,
1520 n. 36, p. 26350–26360, 2006.
- 1521 Koner B. C.; Banerjee B. D.; Ray A. Organochlorine pesticides induced oxidative stress and
1522 immune suppression in rats. Indian. Journal of Experimental Biology. v. 36, p. 395–398,
1523 1998.
- 1524 Lemos A. J. J. M.; Siqueira H. Á.; Wanderley-Teixeira V.; Maia F. C.; Teixeira Á. A.; Silva
1525 E. J.; Oliveira J. V. Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* and
1526 deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. Experimental
1527 and Toxicology Pathology. v. 65, p. 489–495, 2013.
- 1528 Magdy B. W.; Mohamed F. E.; Amin A. S.; Rana S. S. Ameliorative effect of antioxidants
1529 (vitamins C and E) against abamectin toxicity in liver, kidney and testis of male albino rats.
1530 Journal of Basic & Applied Zoology, v. 77, p. 69–82, 2016.
- 1531 Mezzomo B. P.; Miranda A. L.; Freire I. D. S.; Barbosa L. C. P.; Lacava Z. G. M.
1532 Hematotoxicity of *Bacillus thuringiensis* as spore-crystal strains, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac or

- 1533 Cry2Aa in Swiss albino mice. *Journal of Hematology and Thrombosis Diseases*. v. 1, p. 104,
1534 2013.
- 1535 Mnif W.; Hassine A. I. H.; Bouaziz A.; Bartegi A.; Thomas O.; Roig B. Effect of endocrine
1536 disruptor pesticides: A review. *International Journal of Environmental Research and Public*
1537 *Health*. v. 8, n. 6, p. 2265–2303, 2011.
- 1538 Mossa A. T.; Refaie A. A.; Ramadan A. Effect of exposure to mixture of four
1539 organophosphate insecticides. *Research Journal Environmental Toxicology*. v. 5, p. 323-335,
1540 2011.
- 1541 Mossa A. H.; Mohafrash S. M. M.; Chandrasekaran N. Safety of Natural Insecticides: Toxic
1542 Effects on Experimental Animals. *BioMed research international*. p. 1-17, 2018.
- 1543 Motta V. T. *Bioquímica clínica: princípios e interpretações*. 7. ed. Médica Massau, 2000.
- 1544 Nordlie R. C.; Foster J. D.; Lange A. J. Regulation of glucose production by the liver. *Annual*
1545 *Review of Nutrition*. v. 19, p. 379–406, 1999.
- 1546 Orlu E. E. Deltamethrin-induced alterations in sperm morphology and spermatogenesis
1547 impairment in adult sprague-dawley rats. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering*
1548 *and Technology*. v. 7, n. 11, p. 2324-2331, 2014.
- 1549 Ray A.; Banerjee B. D. Stress, free radicals and the immune response: modulation by drugs.
1550 *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. v. 358, n. 1, p. 739–744, 1998.
- 1551 Rehman H.; Ali M.; Atif F.; Kaur M.; Bhatia K.; Raisuddin S. The modulatory effect of
1552 deltamethrin on antioxidants in mice. *Clinica Chimica Acta*. v. 369, n. 1, p. 61–65, 2006.
- 1553 Santos J. C. *Investigação da ação disruptora da deltametrina sobre a tireoide e função*
1554 *hipofisária de ratos (gerações f1 e f2)*. 2018. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências
1555 *Farmacêutica*) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – PR
- 1556 Shaban N. Z.; Helmyb M. H.; El-Kersha M. A. R.; Mahmouda B. F. Effects of *Bacillus*
1557 *thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats given

- 1558 alpha-tocopherol or acetylsalicylate. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 135, p.
1559 405–414, 2003.
- 1560 Teixeira A. A. C.; Simões M. J.; Wanderley-Teixeira V.; Soares Jr J. M. Evaluation of the
1561 implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats.
1562 *International journal of morphology*. v. 22, n. 3, p. 189-194, 2004.
- 1563 Videla L. A.; Barros S. B. M.; Junqueira V. B. C. Lindane-induced liver oxidative stress. *Free*
1564 *Radical Biology Medicine*. v. 9, p. 169–179, 1990.
- 1565 Wolansky M. J.; Gennings C.; Crofton K. M. Relative potencies for acute effects of
1566 pyrethroids on motor function in rats. *Toxicological Sciences*. v. 9, p. 271-277, 2006.
- 1567 Wadei H. M.; Mai M. L.; Ahsan N.; Gonwa T. A. Hepatorenal syndrome: pathophysiology
1568 and management. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. v. 1, n. 5, p. 1066-
1569 1079, 2006.
- 1570 Yousef M. I.; Awad T. I.; Mohamed E. H. Deltamethrin-induced oxidative damage and
1571 biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology*. v. 227, n. 3, p.
1572 240-247, 2006.

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos hepático e renal da prole aos 60 e 90 dias de vida.

Grupos	GC	GX	GDi	GDe	P
60 dias					
AST (UI/L)	104,34 $\pm$ 1,52b	145,78 $\pm$ 3,78a	155,76 $\pm$ 6,65a	144,38 $\pm$ 6,96a	0,0143
ALT (UI/L)	32,33 $\pm$ 3,51b	64,67 $\pm$ 3,78a	65,67 $\pm$ 4,93a	66,67 $\pm$ 4,93a	0,0032
Ureia (mg/dL)	34,00 $\pm$ 1,00b	54,16 $\pm$ 2,86c	55,33 $\pm$ 4,04c	123,75 $\pm$ 5,03a	0,0117
Creatinina (mg/dL)	0,25 $\pm$ 0,04b	0,51 $\pm$ 0,01c	0,59 $\pm$ 0,02c	0,74 $\pm$ 0,05a	0,0111
90 dias					
AST (UI/L)	114,00 $\pm$ 5,56b	171,04 $\pm$ 4,35a	161,32 $\pm$ 9,60a	167,63 $\pm$ 4,16a	0,0219
ALT (UI/L)	32,00 $\pm$ 2,64b	56,67 $\pm$ 3,51a	59,33 $\pm$ 6,42a	61,65 $\pm$ 2,08a	0,0414
Ureia (mg/dL)	36,11 $\pm$ 4,35b	85,00 $\pm$ 3,60c	117,31 $\pm$ 1,52c	120,55 $\pm$ 9,52a	0,0344
Creatinina (mg/dL)	0,21 $\pm$ 0,02b	0,52 $\pm$ 0,01c	0,57 $\pm$ 0,08c	0,73 $\pm$ 0,03a	0,0002

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

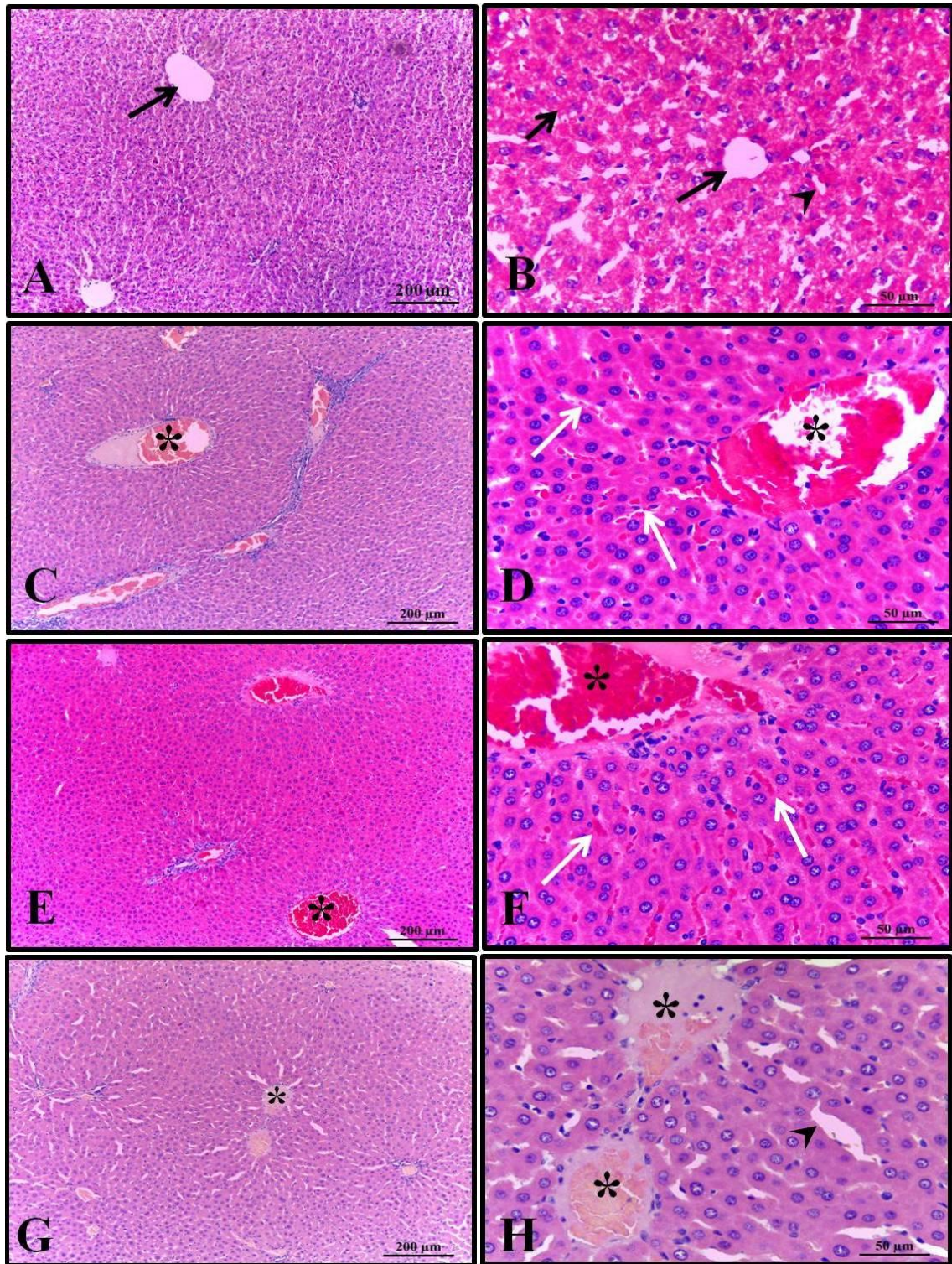


Figura 1: Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais. (A-B) GC, (C-D) GX, (E-F) GDi e (G-H) GDe. Seta longa – veia centrolobular; Seta curta – cordão de hepatocitos; Ponta de seta – sinusóide; Asteriscos – congestão da veia centrolobular; Seta branca – congestão dos sinusóides. H.E.

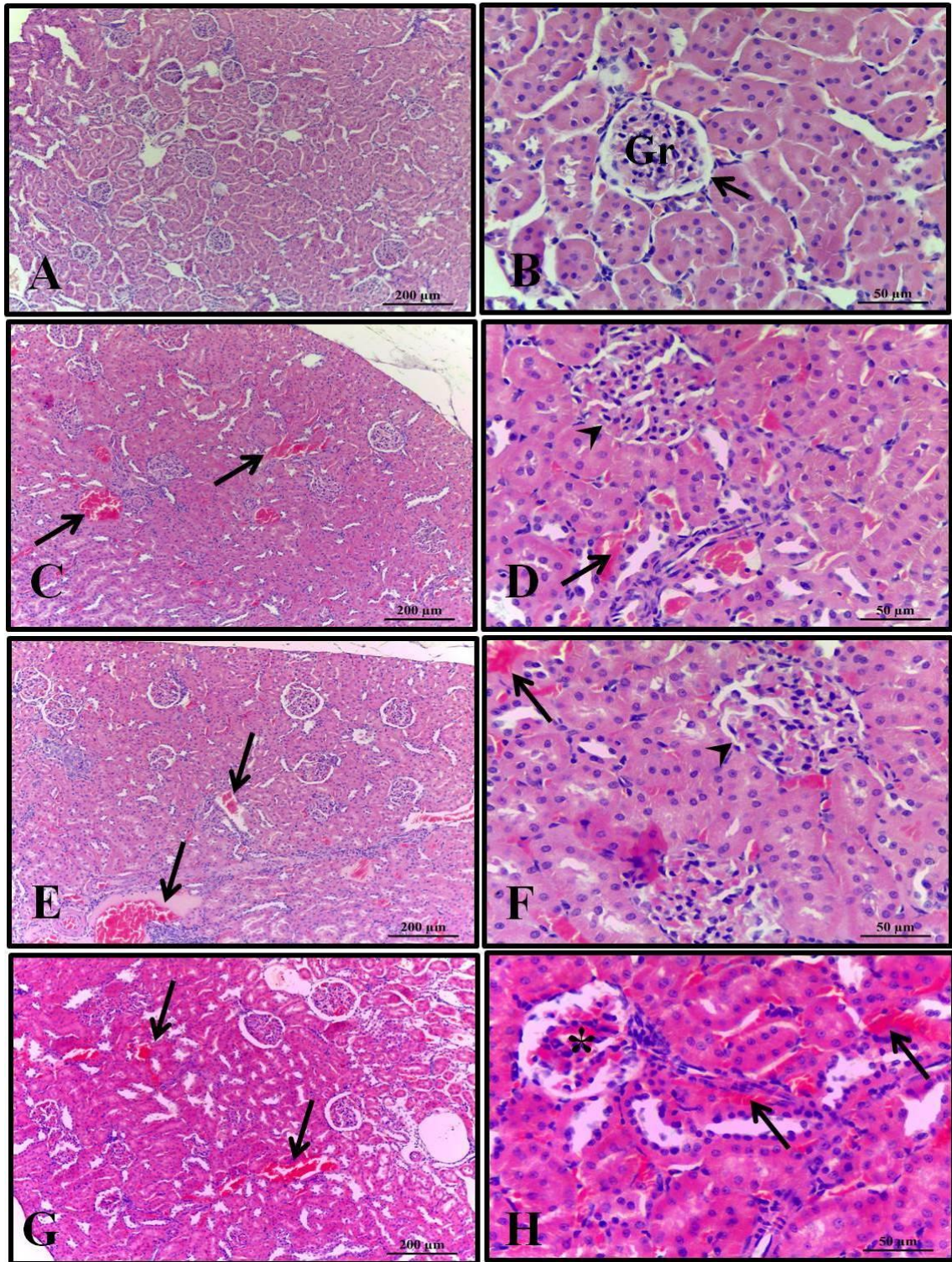


Figura 2: Fotomicrografia dos rins da prole dos grupos experimentais. (A-B) GC, (C-D) GX, (E-F) GDi e (G-H) GDe. Gr – glomérulo renal; Seta curta – espaço subcapsular; Seta longa – congestão cortical; Asterisco – atrofia glomerular. H.E.

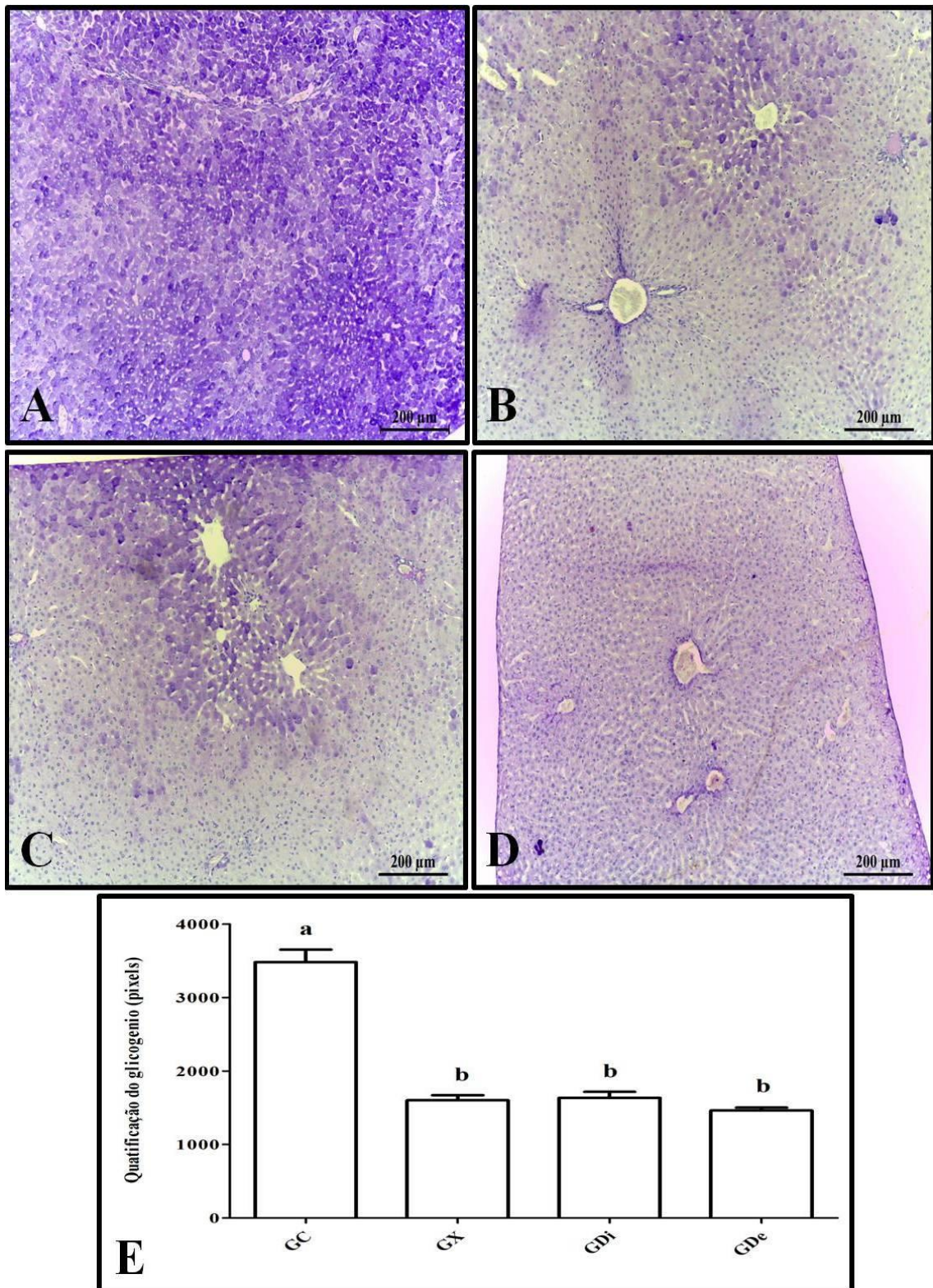


Figura 3: Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais. (A) GC, (B) GX, (C) GDi e (D) GDe. (E) Quantificação em pixels do glicogênio. Notar redução significativa nos grupos que receberam inseticidas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). PAS.

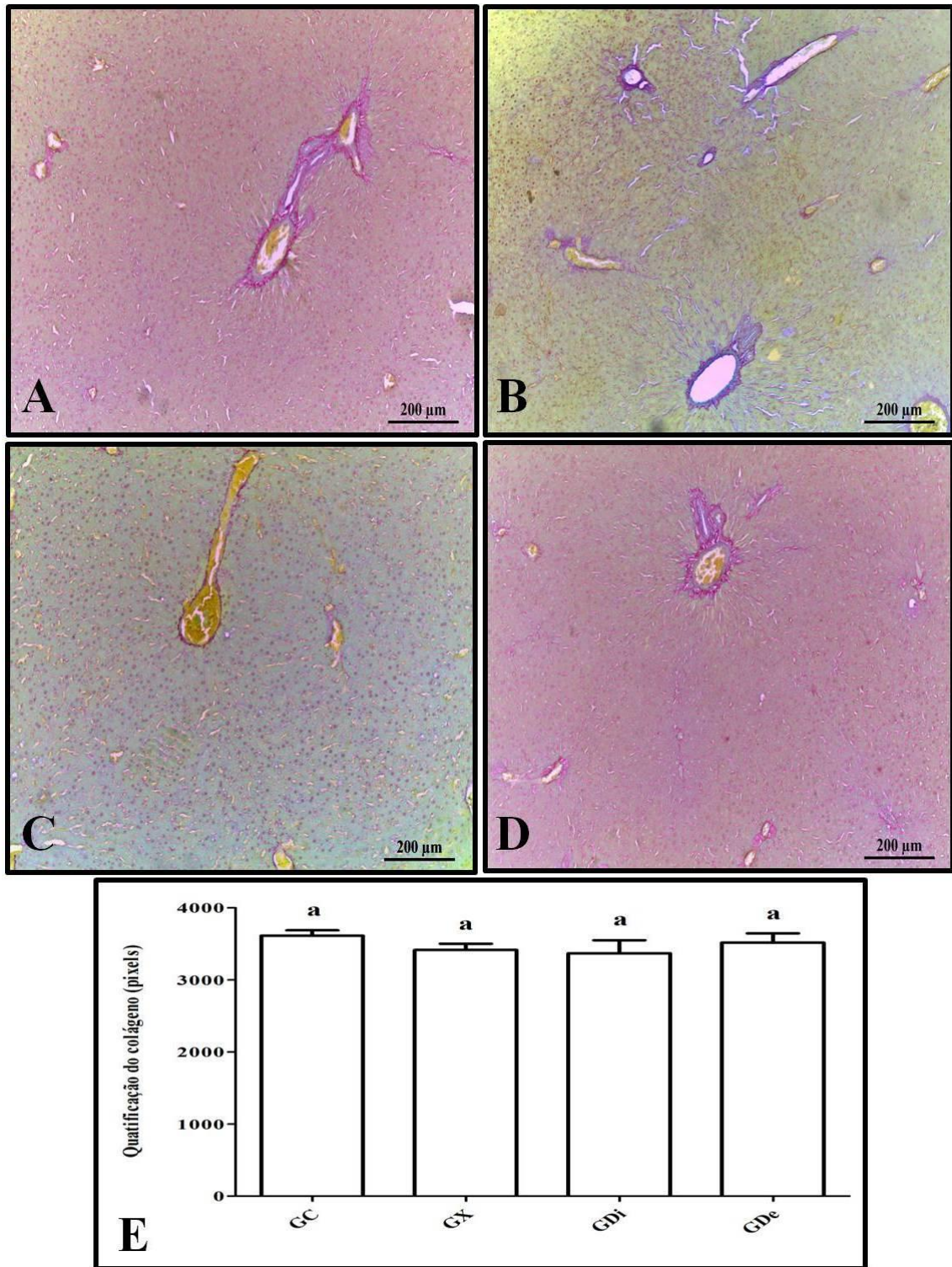


Figura 4: Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais. (A) GC, (B) GX, (C) GDi e (D) GDe. (E) Quantificação em pixels de fibras colágenas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Picrosirius.

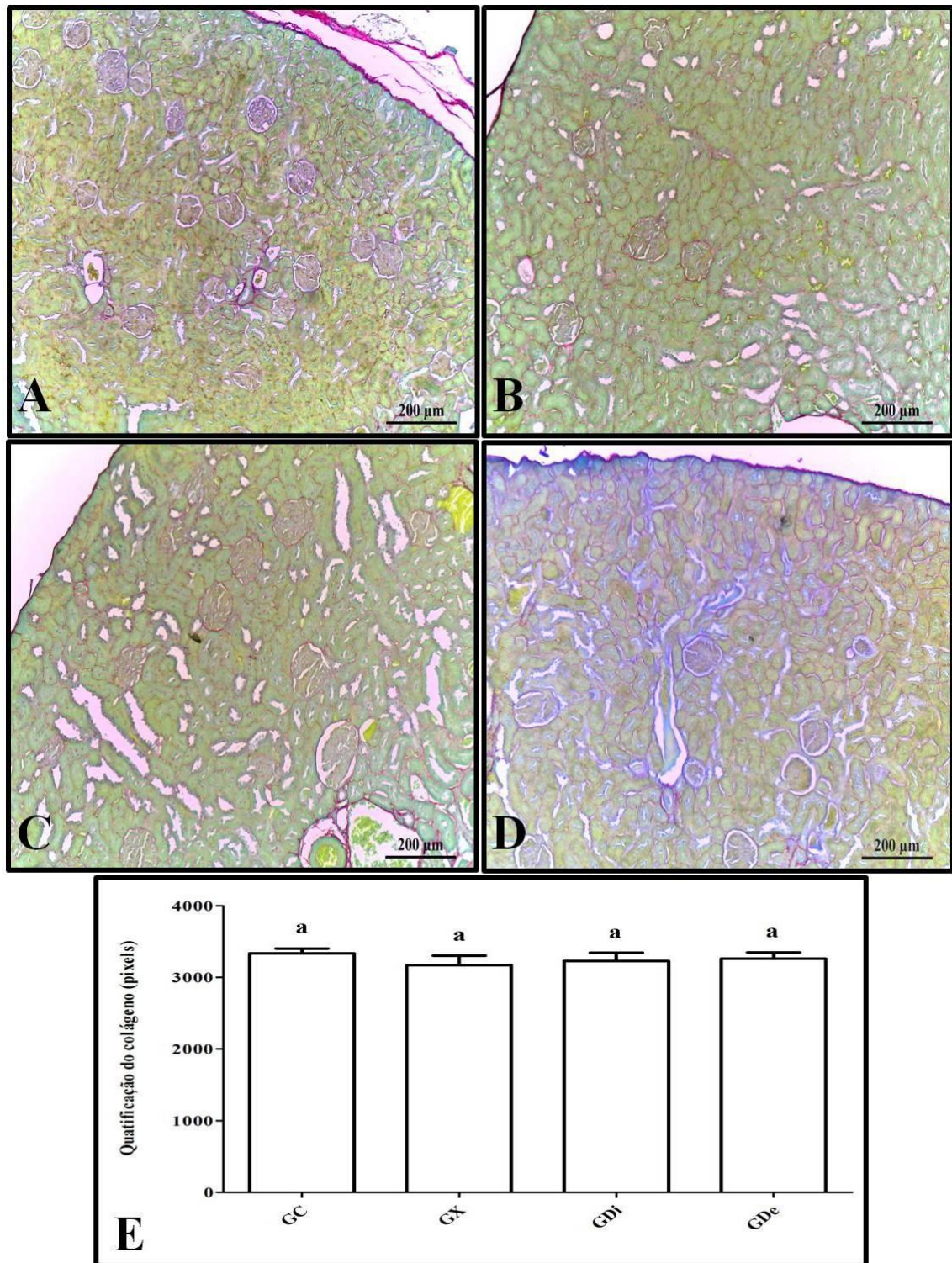


Figura 5: Fotomicrografia dos rins da prole dos grupos experimentais. (A) GC, (B) GX, (C) GDi e (D) - GDe. (E) Quantificação em pixels de fibras colágenas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Picrosirius.

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do percentual do parênquima lobular e não lobular do fígado da prole aos 90 dias de vida.

Grupos	GC	GX	GDi	GDe	P
Parênquima Lobular	78,11 $\pm$ 1,12a	56,87 $\pm$ 3,12b	59,25 $\pm$ 1,44b	52,57 $\pm$ 3,76b	0,0333
Parênquima Não Lobular	21,890 $\pm$ 2,43b	43,13 $\pm$ 2,09a	40,75 $\pm$ 2,16a	47,43 $\pm$ 5,17a	0,0432

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins da prole aos 90 dias de vida.

Grupos	GC	GX	GDi	GDe	P
DG (μm)	60,19 $\pm$ 3,87a	48,73 $\pm$ 2,09b	46,22 $\pm$ 5,94b	43,15 $\pm$ 2,04b	0,0104
VG (μm^3)	1732,09 $\pm$ 140,13a	1022,21 $\pm$ 111,20b	1103,00 $\pm$ 163,33b	1046,45 $\pm$ 96,91b	0,0067
DCB (μm)	85,16 $\pm$ 8,14a	61,26 $\pm$ 7,98b	58,77 $\pm$ 5,08b	62,28 $\pm$ 7,15b	0,0128
VCB (μm^3)	26391,20 $\pm$ 301,88a	14673,54 $\pm$ 171,81b	14599,09 $\pm$ 292,45b	13987,37 $\pm$ 266,76b	0,0305

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p < 0,05$).