

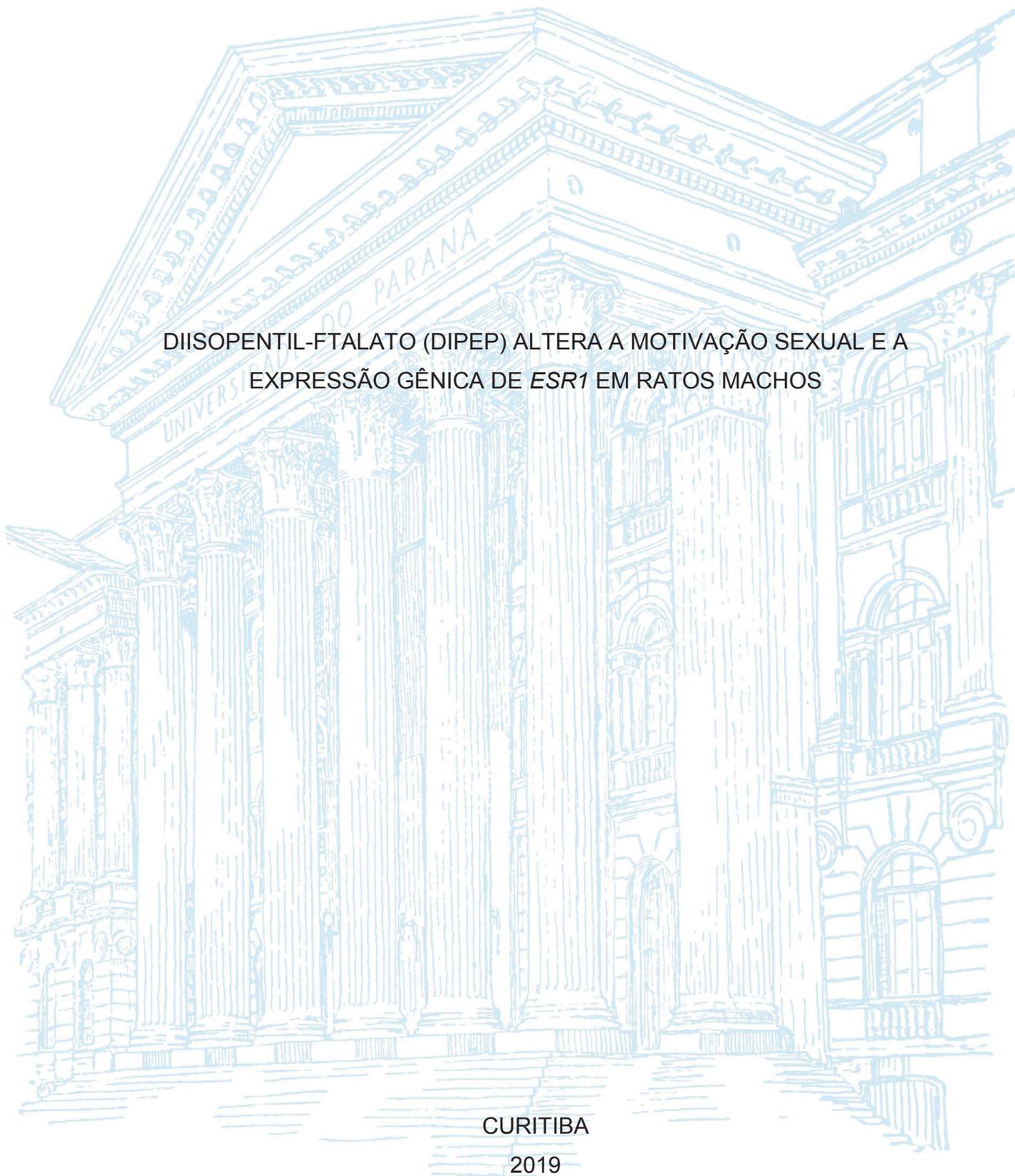
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA NEUBERT DA SILVA

DIISOPENTIL-FTALATO (DIPEP) ALTERA A MOTIVAÇÃO SEXUAL E A
EXPRESSIONE GÊNICA DE *ESR1* EM RATOS MACHOS

CURITIBA

2019



GABRIELA NEUBERT DA SILVA

DIISOPENTIL-FTALATO (DIPEP) ALTERA A MOTIVAÇÃO SEXUAL E A
EXPRESSÃO GÊNICA DE *ESR1* EM RATOS MACHOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof Dr Paulo Roberto Dalsenter
Coorientador: Prof Dr Anderson Joel Martino
Andrade

CURITIBA

2019

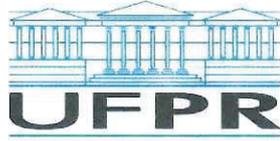
Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Silva, Gabriela Neubert da
Diisopentil-ftalato (DiPeP) altera a motivação sexual e a expressão
gênica de *Esr1* em ratos machos. / Gabriela Neubert da Silva. – Curitiba,
2019.
75 p.: il.

Orientador: Paulo Roberto Dalsenter
Coorientador: Anderson Joel Martino Andrade
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Diferenciação sexual 2. Desreguladores endócrinos 3. Hormônios
4. Comportamento – Avaliação I. Título II. Dalsenter, Paulo Roberto III.
Andrade, Anderson Joel Martino IV. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.74



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELA NEUBERT DA SILVA** intitulada: **Diosopentil-ftalato (DiPEP) altera a motivação sexual e expressão gênica de Esr1 em ratos machos**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Maio de 2019.

PAULO ROBERTO DALSENTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ROBERTO ANDREATINI
Avaliador Interno (UFPR)

BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer meus orientadores, o prof. Paulo Roberto Dalsenter e o prof. Anderson Joel Martino Andrade, pela paciência e por toda ajuda que forneceram, muitas vezes até durante os finais de semana.

Gostaria de agradecer as minhas colegas e amigas de laboratório Marcella, Sara, Heloísa, Giovanna e Nicole por me ajudarem tanto em algumas etapas do experimento, quanto pelo apoio emocional, principalmente a Tatiana, que dividiu o peso e a responsabilidade desse trabalho comigo!

Agradeço imensamente meus pais, que me deram todo apoio, suporte e amor necessários para que eu conseguisse finalizar essa dissertação com êxito e com saúde mental. É um privilégio imenso ser filha de vocês!

Quero agradecer algumas amigas que mesmo não participando diretamente da minha vida acadêmica foram cruciais para que eu passasse por essa etapa com mais leveza e descontração. Obrigada pelas saídas e pelo ombro amigo, gurias!

Agradeço aos professores do terceiro andar da Farmacologia que permitiram que eu utilizasse diversos de seus equipamentos, principalmente o Prof. Roberto Andreatini e a sua aluna, Camila Pasquini: Obrigada pelas ideias propostas e pela orientação em muitas etapas.

Agradeço a prof. Renata Romano, que me acolheu em Guarapuava e que possibilitou toda a análise de PCR realizada nesse trabalho.

À Capes e ao CNPq, pelo financiamento.

Um muito obrigado a todos que contribuíram direta e indiretamente com a realização desse trabalho. Sem vocês, nada disso seria possível!

“Valeu a pena? Tudo vale a pena.

Se a alma não é pequena.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Diversos estudos vêm demonstrando uma queda acentuada da fertilidade masculina ocidental, sendo uma das justificativas a exposição ambiental a substâncias desreguladoras endócrinas, as quais alteram a homeostase hormonal do organismo. Dentre essas substâncias estão os ftalatos, químicos utilizados principalmente como plastificantes, os quais possuem atividade antiandrogênica, causando diversos prejuízos no sistema reprodutor masculino, principalmente no período de desenvolvimento. Além da testosterona ser crucial para a masculinização da gônada indiferenciada, ela atravessa a barreira hematoencefálica e exerce ação direta (via receptores androgênicos) ou indireta (via receptores estrogênicos – por meio de sua aromatização) no cérebro em desenvolvimento, masculinizando determinadas estruturas. Essas estruturas, sexualmente dimórficas, são responsáveis por regular comportamentos que são dimórficos entre os sexos. Em um estudo piloto do nosso laboratório foram encontrados metabólitos do diisopentil-ftalato (DiPeP) em urinas de todas as gestantes curitibanas avaliadas (n=50), indicando uma intensa exposição ao mesmo durante o período de desenvolvimento. Além disso, nesse estudo, também foi demonstrado que o DiPeP reduz a produção de testosterona fetal em ratos com maior eficiência do que outro ftalato já conhecido. Entretanto, não existem estudos sobre os efeitos do DiPeP no comportamento e no cérebro. Portanto, o intuito desse trabalho foi avaliar os efeitos da exposição ao DiPeP durante a gestação e lactação no cérebro e no comportamento da progênie masculina. Para isso, ratas Wistar prenhas foram tratadas com óleo de canola ou com DiPeP (1, 10, 100 e 300 mg/kg/dia) do 10º dia de gestação ao final da lactação. Na sequência, foram avaliados comportamentos sexualmente dimórficos hormônio-dependentes dos machos da ninhada, como o labirinto em cruz elevado, o *play behavior*, a preferência ao parceiro, as vocalizações ultrassônicas em presença de uma fêmea em estro e o comportamento sexual. Nos dias pós-natais 60-65 e 145-160 os cérebros dos animais foram retirados para a posterior quantificação da expressão gênica da enzima aromatase no hipotálamo e dos receptores androgênicos (*Ar*), estrogênicos α (*Esr1*) e β (*Esr2*) na hipófise e no hipotálamo. Foi observada uma perda da preferência por fêmeas receptivas no teste de preferência a parceiro em machos tratados com DiPeP 1 e 10 mg/kg. Nos machos tratados com DiPeP 1 mg/kg houve ainda um aumento nas latências de monta e de penetração no comportamento sexual. Não foram encontradas alterações nos outros comportamentos avaliados. Ainda, houve uma redução na expressão hipofisária de *Esr1* em todos os grupos tratados no dia pós-natal 60-65, sendo essa redução mantida no PND 145-160 apenas nos machos tratados com DiPeP 100 mg/kg. No hipotálamo, a principal estrutura responsável pelos comportamentos relacionados à cópula, foi encontrado uma redução de *Esr1* em relação a idade dos animais. Não houve alteração na expressão da enzima aromatase e de nenhum outro receptor esteroidal no hipotálamo. Esses resultados indicam que o DiPeP reduz a motivação sexual dos machos além de alterar a expressão hipofisária e hipotalâmica de *Esr1*.

Palavras-chave: Diferenciação sexual. Dimorfismo sexual cerebral. Comportamento. Hormônios. Desreguladores endócrinos. Ftalato. DiPeP.

ABSTRACT

Many studies have demonstrated a decrease in occidental male fertility and a possible explanation for this is the environmental exposure to endocrine disruptors, which are substances that alters the hormonal homeostasis of the organism. A group of chemicals that belongs to this classification is phthalates, plasticizers that have antiandrogenic activity, leading to an impairment in the male reproductive tract, mostly if exposure occurs during the development period. Beyond testosterone been crucial to the masculinization of the bipotential gonad, it crosses the blood-brain barrier and act directly (by androgen receptors) or indirectly (by estrogen receptor – to it aromatization) in the developmental brain, promoting the masculinization of some structures. These structures, which are sexually dimorphic, are responsible for sexually dimorphic behaviors. In a pilot study of our laboratory, metabolites of diisopentyl phthalate (DiPeP) was found in urines of pregnant women of Curitiba, which mean that are a widespread exposure to it during the development period. Moreover, in our study, it was demonstrated that DiPeP decreases the fetal testosterone production in rats in a lower dose than another known phthalate. However, there are no studies about DiPeP effects on behavior and the brain. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effects of DiPeP exposure during gestation and lactation on the brain and on behaviors of male offsprings. Wistar pregnant rats were treated with canola oil or DiPeP (1, 10, 100 e 300 mg/kg/day) between gestation day 10 and post-natal day 21. Hormonal-dependent sexually dimorphic behaviors were performed, as elevated plus maze task, play behavior, partner preference, ultrasonic vocalizations in the presence of a receptive female and sexual behavior. In post-natal days 60-65 and 145-160 the animal brains were removed to lately genic expression quantification of hypothalamic aromatase enzyme and of pituitary and hypothalamic androgenic receptor (*Ar*), estrogenic receptors α (*Esr1*) and β (*Esr2*). A loss of receptive female preference in partner preference test was found in males treated with DiPeP 1 and 10 mg/kg. Moreover, males treated with DiPeP 1 mg/kg had an increase of mount and penetration latencies in sexual behavior. No alterations in the other behaviors evaluated were found. In addition, a decrease in pituitary *Esr1* expression was found in all treated groups in earlier period evaluated, however, it only persisted in DiPeP 100 mg/kg group. In the hypothalamus, the main structure responsible for behaviors related to mate, a reduction of *Esr1* expression was found in relation to age. There was no alteration in expression of aromatase and neither of another steroidal receptor in the hypothalamus. These results suggest that DiPeP reduces male sexual motivation and alters de pituitary and hypothalamic expression of *Esr1*.

Key-words: Sexual diferentiation. Cerebral sexual dimorphism. Behavior. Hormones. Endocrine disruptors. Phthalate. Diisopentyl phthalate (DiPeP).

LISTA DE SIGLAS

AGD – distância ano genital
AMH - hormônio antimülleriano
AR – receptor androgênico
Ar – expressão gênica do receptor androgênico
ARC - núcleo arqueado do hipotálamo
AVPV - núcleo anteroventral periventricular
BNST - *bed nucleus of stria terminalis*
cDNA - DNA complementar
DBP – di-butil-ftalato
DDT – diclorodifeniltricloroetano
DEHP - 2-etilhexil-ftalato
DES - dietilestilbestrol
DHT – diidrotestosterona
DINP – diisononilo-ftalato
DiPeP – diisopentil-ftalato
DnBP – di-n-butil-ftalato
DnPP - di-n-pentil-ftalato
ER – receptor estrogênico
Esr1 – expressão gênica do receptor estrogênico α
Esr2 – expressão gênica do receptor estrogênico β
GD – dia gestacional
HPG - hipotálamo-hipófise-gônada
Insl 3 - hormônio semelhante à insulina 3
MPOA - área medial pré-óptica
POA - área pré-óptica do hipotálamo
PND – dia pós-natal
PSAI - Inventário de Atividades Pré-Escolares
RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real a partir da transcrição reversa
SDN-POA - núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica
US EPA - *US Environmental Protection Agency*
VHM - núcleo ventromedial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. <i>Desreguladores endócrinos</i>	14
2.2. <i>Ftalatos</i>	16
2.3. <i>Diferenciação sexual</i>	19
2.4. <i>Diferenciação sexual cerebral</i>	21
3. OBJETIVOS	26
3.1. <i>Objetivos Específicos</i>	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. <i>Animais</i>	28
4.2. <i>Drogas e doses</i>	29
4.3. <i>Acasalamento</i>	29
4.4. <i>Tratamento</i>	29
4.5. <i>Dados maternos</i>	30
4.6. <i>Separação dos filhotes e puberdade</i>	30
4.7. <i>Labirinto em cruz elevado</i>	30
4.8. <i>Play behavior</i>	31
4.9. <i>Vocalização ultrassônica na presença de uma fêmea receptiva</i>	32
4.10. <i>Preferência a parceiro</i>	34
4.11. <i>Comportamento sexual</i>	35
4.12. <i>Castração das ratas e indução do estro</i>	36
4.13. <i>Expressão gênica de aromatase no hipotálamo e de AR e ER no hipotálamo e na hipófise</i> 37	
4.13.1. <i>Extração do RNA total</i>	37
4.13.2. <i>Reação de transcrição reversa</i>	38
4.13.3. <i>Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real</i>	38
4.14. <i>Análise estatística</i>	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. <i>Dados maternos</i>	39
5.2. <i>Labirinto em cruz elevado</i>	39
5.3. <i>Play behavior</i>	41

5.4.	<i>Vocalização ultrassônica</i>	42
5.5.	<i>Preferência a parceiro</i>	43
5.6.	<i>Comportamento sexual</i>	43
5.7.	<i>Expressão gênica de aromatase no hipotálamo e de AR e ER no hipotálamo e na hipófise</i>	45
6.	DISCUSSÃO	50
7.	CONCLUSÃO	58
8.	REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

Estudos têm apontado uma queda significativa na saúde reprodutiva masculina em diversos países (COALE e WATKINS, 1986; AUGER *et al*, 1995; GUEST e MCDONALD, 2002). Em uma metanálise recente, constatou-se uma redução de mais de 50% na contagem espermática de homens ocidentais entre os anos de 1973 e 2011 (LEVINE *et al*, 2017). A diminuição da contagem espermática frequentemente vem acompanhada de outros prejuízos, como baixos níveis de testosterona, criptorquidismo (não descida dos testículos ao saco escrotal), hipospádias (desenvolvimento incompleto da uretra até a glândula do pênis) e/ou câncer testicular. Essa gama de sinais clínicos caracteriza a síndrome de disgenesia testicular, a qual pode ocorrer de uma maneira mais branda à mais acentuada (SKAKKEBAEK, 2003). Essa síndrome tem se tornado cada vez mais comum, sendo que uma hipótese plausível para esse acontecimento é a influência ambiental, principalmente durante o período fetal (SKAKKEBAEK *et al*, 2016).

As substâncias presentes no meio ambiente são inúmeras, desde agrotóxicos, como herbicidas, fungicidas e inseticidas, a resquícios de medicamentos, plastificantes, entre outros. Algumas dessas substâncias são classificadas como desreguladores endócrinos, pois tem a capacidade de interferir na produção, no armazenamento, na liberação, no transporte, no metabolismo, no sítio de ligação ou na eliminação de hormônios (US EPA, 1997), o que ocasiona um desequilíbrio hormonal, acarretando em efeitos adversos em um organismo intacto ou em seus descendentes (OMS, 2012).

A exposição a desreguladores endócrinos, portanto, pode causar diversos prejuízos à saúde de um organismo, uma vez que hormônios são essenciais para a manutenção de diversas funções fisiológicas. Entretanto, o período mais sensível à ação dessas substâncias é o desenvolvimento fetal (KAVLOCK *et al*, 1996). Isso ocorre por dois motivos. O primeiro é devido aos mecanismos de detoxificação ainda inexistentes em um ser em desenvolvimento, o que impede com que o organismo tente neutralizar esses tóxicos. O segundo é porque existem etapas do desenvolvimento fetal que são determinadas por hormônios. Uma delas é a

diferenciação sexual, a qual é determinada pela ação da testosterona e do hormônio antimülleriano (AMH)/inibina advindos do testículo fetal. A presença desses hormônios fará com que haja a diferenciação para a genitália masculina, condizente com o sexo genético do feto. A ausência hormonal, por outro lado, irá ocasionar a diferenciação sexual feminina (BERNE, 2004; CONTANZO, 2011). Entretanto, a genitália não é o único órgão sensível aos hormônios sexuais. O cérebro em desenvolvimento também possui receptores hormonais, respondendo à ação desses. A testosterona do testículo fetal consegue atravessar a barreira hematoencefálica e pode atuar diretamente, através de receptores androgênicos, ou pode ser transformada pela enzima aromatase a estradiol, o qual irá promover sua ação através de receptores estrogênicos. Em ambos os casos haverá a masculinização de determinadas regiões cerebrais, o que irá acarretar em um dimorfismo cerebral entre os sexos (GARCIA-FALGUERAS *et al*, 2005; ROSELLI, 2007; ARNOLD e MCCARTHY, 2016). Essas estruturas sexualmente dimórficas, por sua vez, são responsáveis por regular comportamentos que são dimórficos entre os sexos, como o comportamento sexual e comportamentos relacionados à agressividade e à ansiedade (ARENDASH e GORSKI, 1983; HINES *et al*, 1992; COOKE *et al*, 2003).

Conclui-se, assim, que o ambiente hormonal intrauterino é determinante para o desenvolvimento sexual, além de ocasionar um “imprinting” no cérebro que será importante para o desenvolvimento de comportamentos futuros. Qualquer substância que possa desregular esse ambiente hormonal, portanto, pode comprometer essas variáveis. Assim, há a necessidade em se estudar os efeitos da exposição a desreguladores endócrinos durante períodos críticos, como o desenvolvimento fetal, uma vez que essa exposição ocorre diariamente por diversos meios e pode acarretar em uma modificação na diferenciação sexual e no futuro do feto.

Dentre os desreguladores endócrinos mais encontrados mundialmente estão os ftalatos, substâncias utilizadas como plastificantes e aditivos de cosméticos, sendo encontrados em uma gama de produtos industrializados. Os ftalatos possuem atividade antiandrogênica, agindo diretamente em células testiculares, ocasionando uma redução na produção de testosterona (MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010). A exposição desses químicos durante o desenvolvimento, portanto, pode ocasionar diversos dos problemas mencionados anteriormente. Em um estudo piloto do nosso laboratório, no qual foram medidos metabólitos de alguns desreguladores

endócrinos nas urinas de gestantes curitibanas, foram encontrados metabólitos do diisopentil-ftalato (DiPeP), um dos muitos ftalatos produzidos pela indústria química, em todas as amostras analisadas (BERTONCELLO SOUZA *et al*, 2018). Esse ftalato, cuja exposição foi relatada apenas no Brasil (ROCHA *et al*, 2017), é sintetizado a partir do álcool isoamil, um subproduto da produção de etanol através da cana de açúcar (PETROM, 2016). Nunca foi mencionado em estudos de biomonitoramento de outros países e, portanto, pouco se sabe sobre seus possíveis efeitos tóxicos. Entretanto, foi demonstrado, pelo nosso laboratório, que esse ftalato tem a capacidade de reduzir a testosterona fetal de uma maneira mais eficaz do que o di-n-butil-ftalato (DnBP), outro ftalato já conhecido (BERTONCELLO SOUZA *et al*, 2018). Percebe-se, desse modo, que há uma grande exposição de gestantes curitibanas a diversos desreguladores endócrinos, inclusive ao DiPeP, um ftalato cujo potencial androgênico é elevado. Porém não há estudos acerca das consequências dessa exposição para o feto. O objetivo dessa pesquisa, portanto, foi avaliar os efeitos da exposição a roedores ao DiPeP durante a gestação e lactação sobre a expressão gênica de receptores hormonais na hipófise e no hipotálamo, bem como no comportamento sexualmente dimórfico da progênie masculina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Desreguladores endócrinos*

Existem substâncias que possuem atividade endócrina, podendo interferir na produção, no armazenamento, na liberação, no transporte, no metabolismo, no sítio de ligação ou na eliminação de hormônios (KAVLOCK *et al*, 1996). Essas, chamadas de desreguladores endócrinos, interferem na homeostase principalmente dos eixos hipotálamo-hipófise-gônadas e hipotálamo-hipófise-adrenal, levando a um desequilíbrio hormonal, ocasionando efeitos adversos em um organismo intacto ou em sua progênie (OMS, 2012).

Os hormônios são importantes para diversas funções fisiológicas, entre elas o desenvolvimento embrionário e a atividade reprodutiva (BOARETO *et al*, 2009). Ainda, há evidências de que algumas patologias, como o câncer de mama e o de testículo, sofrem grande influência hormonal, sendo resultados de um desbalanço hormonal (KOIFMAN e PAUMGARTTEN, 2002). Ou seja, níveis hormonais adequados são

essenciais para o bom funcionamento do organismo. Percebe-se, assim, que a exposição a substâncias que desregulam o sistema endócrino pode levar a alterações fisiológicas, podendo acarretar em uma condição anormal ou patológica.

Os desreguladores endócrinos começaram a ser estudados na década de 50, quando se descobriu que o praguicida organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT), até então utilizado indiscriminadamente, possuía atividade estrogênica. Correlacionou-se essa atividade hormonal a alterações no sistema reprodutivo de galos, muito mais resistentes ao organoclorado se comparado aos mamíferos (BURLINGTON e LINDEMAN, 1950). Nos anos subsequentes muitas substâncias foram estudadas, culminando na publicação do livro *Primavera Silenciosa (Silent Spring)*, em 1962. Nesse trabalho, Rachel Carson aborda os riscos do uso de praguicidas organoclorados tanto para os humanos quanto para o ecossistema (CARSON, 1962). Na década de 70 descobriu-se que o estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), usado desde 1940 para prevenir abortos espontâneos, causava má formação no sistema reprodutor, infertilidade e adenocarcinoma vaginal nas jovens que foram expostas durante a gestação (HERBST *et al*, 1971). Colborn e colaboradores (1997) publicaram uma revisão contendo evidências científicas correlacionando a exposição a substâncias químicas com problemas no sistema endócrino, originando o livro *Nosso Futuro Roubado (Our Stolen Future)*. No ano seguinte foi estabelecido pela *US Environmental Protection Agency (US EPA)* que substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino, tanto em humanos quanto em outros animais, deveriam ser investigadas (EDSTAC, 1998). Anos se passaram e cada vez mais foram atribuídas atividades hormonais a substâncias de diversas classes, como pesticidas (herbicidas, fungicidas e inseticidas), plastificantes, surfactantes e até mesmo determinados medicamentos. Cerca de 800 produtos químicos que são produzidos hoje são conhecidos ou suspeitos por serem desreguladores endócrinos. Apesar de haver órgãos regulatórios que fiscalizam e proíbem a utilização de várias dessas substâncias, essas vem sendo rapidamente substituídas por outras substâncias cujas estruturas químicas são muito similares, muitas vezes causando os mesmos efeitos nocivos à população (BARRETT e PATISAUL, 2017).

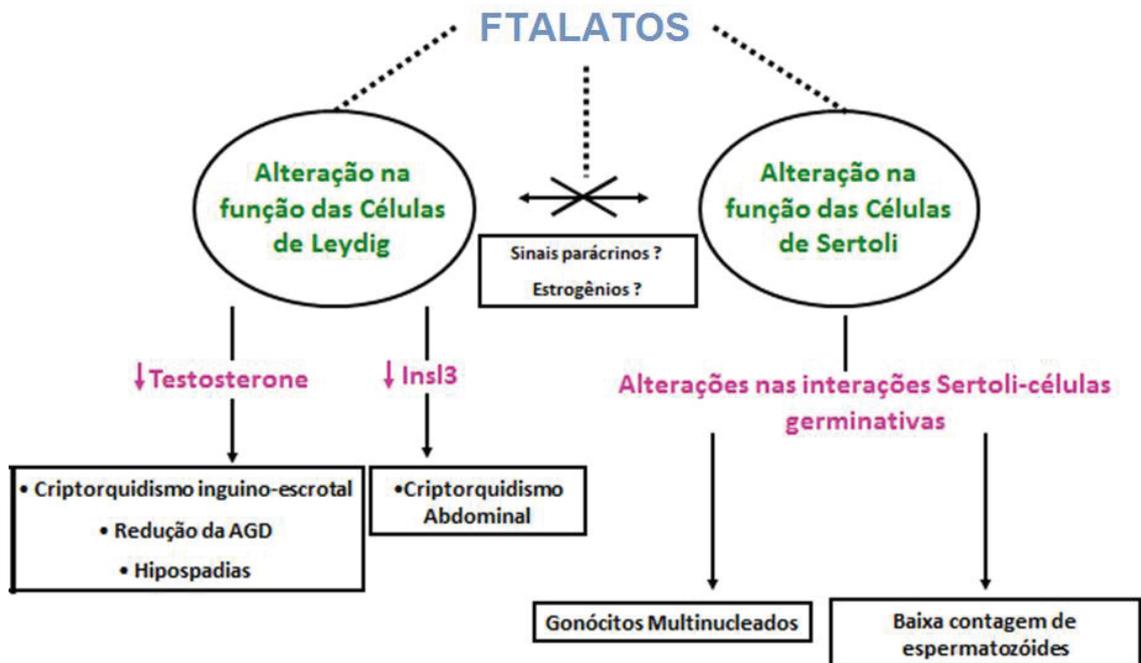
2.2. Ftalatos

Dentre os desreguladores endócrinos estão os ftalatos, químicos utilizados como aditivo na forma de plastificante ou agente amaciador de PVC. Podem ser encontrados em cosméticos, em produtos de higiene pessoal, em utensílios médicos, em revestimentos de comprimidos farmacêuticos, como o omeprazol, em embalagens de alimentos e em mamadeiras e brinquedos, aumentando suas flexibilidades e durabilidades (EJAREDAR *et al*, 2015). O nível de exposição a esse desregulador endócrino é alto, uma vez que esses químicos não se ligam covalentemente à matriz polimérica, sofrendo lixiviação (MODOVNIK *et al*, 2014). Portanto, sua exposição ocorre por meio da ingestão, da respiração, do toque na pele e até mesmo da transfusão de sangue (COLBORN *et al*, 1997). Ainda, são moléculas lipofílicas, podendo facilmente atravessar a barreira placentária, além de serem eliminadas pelo leite materno, favorecendo a exposição de fetos e recém-nascidos (EJAREDAR *et al*, 2015), os quais são extremamente sensíveis por ainda não possuírem mecanismos de detoxificação.

Os ftalatos considerados desreguladores endócrinos apresentam de 3 a 8 carbonos na porção linear da cadeia lateral, possuindo uma atividade antiandrogênica. O mais potente deles é o DnPP, o qual apresenta 5 carbonos na cadeia lateral (FURR *et al*, 2014). Essa ação antiandrogênica, entretanto, não se dá por meio do antagonismo de receptores androgênicos, como usualmente ocorre. Essas substâncias atuam diretamente nas células de Leydig e de Sertoli, desregulando-as (MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010). Essa desregulação parece se dar pela hiperplasia ou por grandes agregados das células de Leydig, o que ocasiona um déficit de testosterona (FOSTER, 2006) e de hormônio semelhante à insulina 3 (insl 3) (FURR *et al*, 2014). A redução da testosterona durante a janela de masculinização ocasionará um prejuízo na diferenciação dos ductos de Wolff em canais deferentes, vesículas seminais e próstata. Ainda, haverá uma baixa conversão de testosterona à diidrotestosterona (DHT), acarretando em um prejuízo na masculinização da próstata e da genitália externa, bem como a redução da apoptose dos mamilos (processo que impediria a retenção dos mamilos nos machos) e um crescimento inadequado do períneo (FOSTER, 2006). Já o déficit de insl 3 está relacionado com a não descida dos testículos (criptorquidismo). Os ftalatos também parecem reduzir a expressão de cerca de 30 genes no testículo fetal, alguns

envolvidos no processo de síntese e transporte de hormônios esteroidais (GRAY JR *et al*, 2015), reduzindo ainda mais a testosterona. Além disso, há evidências de que os ftalatos também desregulam a maturação das células de Sertoli, prejudicando o processo de maturação das células germinativas, gerando uma diminuição na contagem espermática (FISHER *et al*, 2003). Todas essas alterações podem ser vistas no esquema da FIGURA 1.

FIGURA 1 – MECANISMO DE AÇÃO DOS FTALATOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS



Os ftalatos são desreguladores endócrinos antiandrogênicos, atuando diretamente nas células do testículo fetal (e não como antagonistas de AR), reduzindo a produção de testosterona, de Insl3 e alterando as interações das células de Sertoli, causando diversos sinais clínicos conhecidos como síndrome dos ftalatos em roedores.

FONTE: adaptado de Sharpe (2001)

Esses efeitos tóxicos, entretanto, não são causados pelos ftalatos em si, mas sim pelos seus metabólitos monoésteres ativos. Além disso, apesar de possuírem uma baixa toxicidade, estudos mostram que o sistema reprodutivo é altamente sensível aos ftalatos (MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010). A exposição pré-natal de ftalatos causa malformações no sistema reprodutivo de ratos, como a redução da distância anogenital (AGD - medida entre a genitália e o ânus, normalmente maior em machos do que em fêmeas), hipospádias (malformação na qual a uretra não se desenvolve até a glândula do pênis), desenvolvimento incompleto dos testículos e/ou

criptorquidismo (SAILLENFAIT *et al*, 2009). Ainda, pode haver malformações em outros órgãos reprodutivos masculinos, como epidídimo, canais deferentes, vesícula seminal e próstata, além de mamilos retidos (presentes normalmente apenas em fêmeas) (FOSTER, 2006). Essa gama de sinais clínicos caracteriza a síndrome dos ftalatos. Como mencionado anteriormente, esses parâmetros são dependentes de androgênios (testosterona e DHT) e a exposição a substâncias antiandrogênicas os alteram, servindo, então, como biomarcadores de androgenicidade. Os sinais clínicos mais sensíveis são a redução da AGD e os mamilos retidos (FOSTER, 2006). A exposição pós-natal a esses químicos também causa alterações no testículo, como a diminuição de seu peso, atrofia dos túbulos seminíferos e degeneração das células germinativas (DOSTAL *et al*, 1988; GRAY e GANGOLLI, 1986).

Apesar das doses utilizadas em estudos animais serem cerca de 3 a 4 vezes maiores das doses em que os humanos estão usualmente expostos, o efeito acumulativo da exposição diária a diversos desreguladores endócrinos é uma preocupação (MARTINO-ANDRADE *et al*, 2009). Um estudo realizado em humanos correlacionou a exposição pré-natal a ftalatos à diminuição da AGD em recém-nascidos do sexo masculino, além de prejuízo da descida dos testículos (SWAN *et al*, 2005). Esse estudo, assim como outros (DUTY *et al*, 2003; MARTINO-ANDRADE *et al*, 2016), corrobora com os resultados obtidos em roedores. Percebe-se, assim, que a síndrome dos ftalatos que acomete os animais é muito semelhante à síndrome de disgenesia testicular em humanos, a qual é caracterizada pela baixa qualidade do sêmen, câncer testicular, criptorquidismo e hipospádias (SKAKKEBAEK, 2003). Apesar de não haver nenhum estudo mostrando uma relação de causa e consequência, devido a essa semelhança, juntamente com os achados em humanos, questiona-se se essa síndrome em humanos pode ser ocasionada pela exposição a ftalatos durante a vida intrauterina, em períodos críticos do desenvolvimento sexual.

Além dos danos causados no desenvolvimento sexual, estudos em animais e em humanos apontam para uma possível alteração comportamental ocasionada pela exposição a ftalatos durante períodos críticos do desenvolvimento. A exposição durante a gestação e lactação ao 2-etilhexil-ftalato (DEHP) prejudicou o comportamento sexual de ratos, representado pelo aumento na latência da primeira monta e uma maior necessidade de penetrações até a ejaculação (DALSENTER *et al*, 2006). A exposição pré- e pós-natal ao DnBP e ao diisononilo-ftalato (DINP) também ocasionou prejuízos no comportamento sexual de ratos, além de alterações

na expressão de genes hipotalâmicos regulados por esteroides que são importantes para a diferenciação sexual cerebral (LEE *et al*, 2006). Outro comportamento que parece ser afetado pela exposição perinatal ao DEHP é o tipo ansioso, medido pelo labirinto em cruz elevado. Ratos expostos a esse ftalato demonstraram um aumento no comportamento tipo ansioso durante o período de maturação sexual, demonstrado pela redução do tempo gasto nos braços abertos e um aumento do tempo gasto nos braços fechados (CARBONE *et al*, 2013). Swan e colaboradores (2010) também encontraram uma modificação no comportamento de brincadeira, um comportamento sexualmente dimórfico, em meninos expostos a ftalatos durante a gestação. Esses obtiveram uma pontuação baixa no PSAI (Inventário de Atividades Pré-Escolares), o qual leva em consideração o tipo de brinquedo e as atividades nas quais a criança mais tem contato, além das características da criança, indicando um comportamento de brincadeira mais feminilizado.

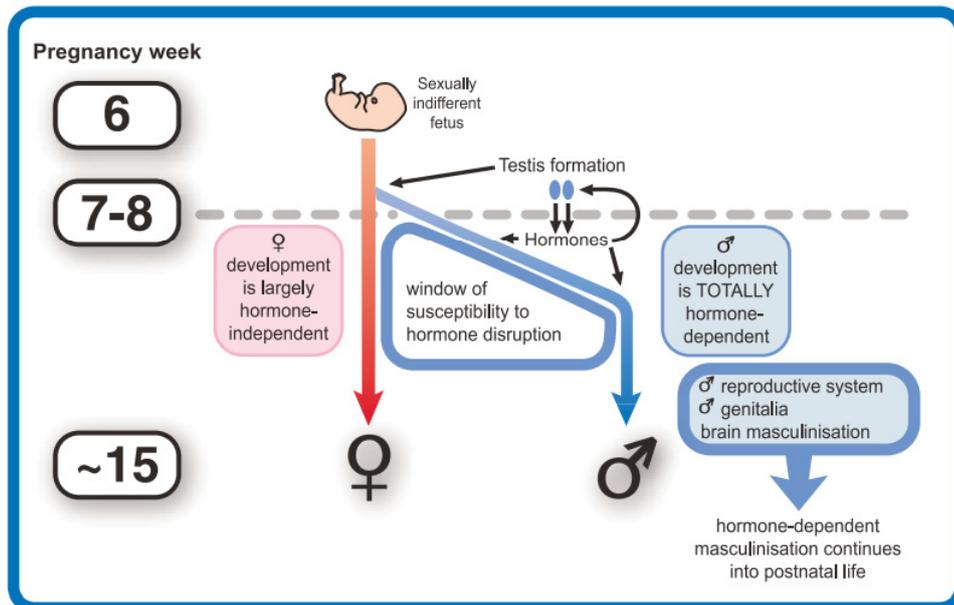
Pode-se perceber, com isso, que a exposição a ftalatos durante janelas críticas do desenvolvimento sexual e cerebral pode ocasionar prejuízos no desenvolvimento sexual masculino, bem como alterações na diferenciação de regiões cerebrais sexualmente dimórficas, as quais são responsáveis por comportamentos sexualmente dimórficos.

2.3. *Diferenciação sexual*

Um dos períodos críticos do desenvolvimento fetal é a determinação e a diferenciação sexual. Esse período, que se inicia aproximadamente na 5^a semana intrauterina, se estende até a 15^a semana em humanos, e é constituído por três etapas importantes: o sexo genético, o sexo gonadal e o sexo fenotípico. O primeiro é determinado pelos cromossomos sexuais (XX em mulheres e XY em homens), definido pelo espermatozoide na hora da fecundação (CONSTANZO, 2011). O cromossomo Y é essencial para a determinação da gônada masculina uma vez que contém o gene SRY, o qual transcreve o fator determinante testicular (TDF) (BERNE, 2004). Existem mais genes envolvidos na diferenciação sexual (como por exemplo o SOX9 e o WT1) e apesar do gene SRY ser importante, ele não é suficiente para a formação do sexo masculino. Além disso, a formação da gônada feminina depende dos dois cromossomos X e da ausência do cromossomo Y, portanto, não é somente a ausência do cromossomo Y e, por conseguinte, do gene SRY que originará a

gônada feminina. A segunda etapa é definida pela presença das gônadas feminina, o ovário, ou masculina, o testículo. Por volta das cinco primeiras semanas intrauterinas essas gônadas são bipotenciais, isto é, indiferenciadas. No sexo genético masculino as gônadas se diferenciam entre a 6ª e 7ª semana intrauterina, por meio de estímulos gênicos como mencionado anteriormente. Já a gônada feminina se diferencia a partir da 9ª semana (CONSTANZO, 2011). A partir desse período começa a produção de hormônios pela gônada masculina, a qual irá determinar o sexo fenotípico masculino, caracterizado pela próstata, vesículas seminais, canal deferente, epidídimo, escroto e pênis. A testosterona, produzida pelas células de Leydig, promove o crescimento e a diferenciação dos ductos de Wolff em epidídimo, canal deferente, vesícula seminal e ductos ejaculatórios. Ainda, essa testosterona pode ser transformada pela enzima 5 α -redutase em seu metabólito mais potente, a DHT, a qual irá masculinizar a próstata e a genitália externa (SHARPE, 2006). Já o AMH, oriundo das células de Sertoli, promove a atrofia dos ductos de Müller, os quais dariam origem ao trato genital feminino (BERNE, 2004; CONTANZO, 2011). Esses hormônios também controlam a descida testicular, a qual ocorre em duas fases: a fase transabdominal, na qual os testículos descem até o abdômen inferior por meio da ação do AMH (PIMENTA, 1999) e do Insl 3 (BAY e ANDERSSON, 2011) entre a 8ª e a 15ª semana, e a fase inguinoescrotal, dependente de androgênios, que consiste na descida do testículo até o escroto entre a 28ª e a 35ª semana intrauterina (PIMENTA, 1999). A produção de testosterona começa por volta da 7ª semana intrauterina, como mencionado anteriormente, tendo seu pico por volta da 12ª-14ª semana intrauterina, sendo esse período importante conhecido como janela de masculinização (ZAMBRANO *et al*, 2014). Diferentemente, as gônadas femininas, permanecem quiescentes até a adolescência. A ausência de hormônios sexuais (tanto femininos quanto masculinos) irá determinar as características físicas do trato genital interno e da genitália externa, ou seja, tuba uterina, útero, clitóris, grandes e pequenos lábios e vagina, garantindo o fenótipo feminino (CONSTANZO, 2011). Assim, o programa inicial de todos os fetos é feminino. É somente na presença de hormônios que esse programa é alterado, havendo a diferenciação sexual masculina (SHARPE, 2006). Todo esse processo está demonstrado na FIGURA 2.

FIGURA 2 – DIFERENÇA ENTRE OS DESENVOLVIMENTOS SEXUAIS MASCULINOS E FEMININOS EM HUMANOS



A partir da 7ª, 8ª semana intrauterina o testículo fetal começa a produzir testosterona, hormônio responsável pela masculinização do sexo fenotípico. Já nos fetos femininos, os ovários não produzem hormônios no período fetal, sendo sua diferenciação fenotípica independente de hormônios.

FONTE: Sharpe (2006)

É importante ressaltar que o sexo gonadal não determinará, necessariamente, o sexo fenotípico. Se um feto com gônada feminina for exposto, durante a janela de masculinização, a altos níveis de androgênios, por exemplo, seu sexo fenotípico pode se tornar masculino (CONSTANZO, 2011). O mesmo pode ocorrer com o sexo gonadal masculino, se esse feto for insensível a androgênios, ou seja, se seus receptores hormonais não respondem à presença do hormônio. Apesar das altas concentrações de testosterona circulantes, sua identidade permanecerá feminina (BERNE, 2004). Portanto, um ambiente hormonal adequado durante a diferenciação sexual, bem como o correto funcionamento dos receptores hormonais, é essencial para um desenvolvimento sexual adequado.

2.4. Diferenciação sexual cerebral

Além da diferenciação sexual, outro período determinante para o feto é o desenvolvimento cerebral. O cérebro é responsável por regular diversas funções importantes no organismo, entre elas o comportamento sexual. Ainda, esse órgão também é sensível a hormônios sexuais. Uma vez que existem diferenças no

ambiente hormonal entre os fetos masculinos e femininos, o desenvolvimento de determinadas regiões cerebrais se dá de maneira diversa entre os sexos, originando dimorfismos sexuais cerebrais. Esse dimorfismo está presente principalmente no tamanho de determinados núcleos, no número de receptores (principalmente os receptores hormonais) e enzimas presentes em determinadas regiões, e no tipo celular e no número de sinapses encontradas em áreas específicas do cérebro. Em sua maioria, os dimorfismos sexuais cerebrais refletem a diferença comportamental observada entre machos e fêmeas.

Dentre as regiões cerebrais sexualmente dimórficas está o núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica (SDN-POA), situado no hipotálamo. Essa região, em roedores, é cerca de 5 vezes maior em machos se comparado a fêmeas (GORSKI *et al*, 1980). Isso se deve à ação da testosterona em períodos críticos (JACOBSON *et al*, 1981; HANDA *et al*, 1985), a qual protege as células do SDN-POA de machos da apoptose (DODSON e GORSKI, 1993; DAVIS *et al*, 1996). Diversos estudos sugerem que a masculinização do SDN-POA pela testosterona se deve à sua ação indireta, ou seja, via aromatização à estradiol (GORSKI, 1986; HOUTSMULLER *et al*, 1994; ARAI *et al*, 1996). Assim, o estradiol, proveniente da aromatização da testosterona testicular fetal, causa um aumento da expressão (*up-regulation*) da proteína anti apoptótica Bcl-2 e uma redução da expressão (*down-regulation*) da proteína pró apoptótica Bax. Ou seja, em machos, haverá a prevenção da apoptose dos neurônios do SDN-POA. Por outro lado, a falta de testosterona no ambiente uterino de fêmeas e, conseqüentemente, a não aromatização à estradiol, garantirá a apoptose dos neurônios, ocasionando a redução desse núcleo em fêmeas (TSUKAHARA *et al*, 2006; TSUKAHARA *et al*, 2008; TSUKAHARA, 2009).

Além disso, o SDN-POA, juntamente com outros núcleos hipotalâmicos próximos (ARENDASH e GORSKI, 1983), é responsável pelo comportamento sexual masculino, sendo seu tamanho diretamente relacionado com a atividade sexual de machos (ANDERSON *et al*, 1985; HOUTSMULLER *et al*, 1994; RHEES *et al*, 1999). Ainda, esse núcleo está relacionado com a preferência de machos por fêmeas em estro em detrimento de outros machos ativos (HOUTSMULLER *et al*, 1994).

Outros núcleos hipotalâmicos, também relacionados com o comportamento e motivação sexuais são dimórficos entre os sexos, como a área medial pré-óptica (MPOA) (GORSKI *et al*, 1978), o núcleo anteroventral periventricular (AVPV) (RHEES

et al, 1999), o núcleo ventromedial (VMH) (FORGER *et al*, 2016), entre outros. Outras estruturas cerebrais além do hipotálamo também apresentam dimorfismos sexuais, como a amígdala, responsável pela ansiedade e agressividade (HINES *et al*, 1992; LEDOUX, 1998; COOKE *et al*, 1999; SCHWARZ *et al*, 2012) e o *locus coeruleus*, o qual controla principalmente respostas relacionadas ao estresse (PINOS *et al*, 2001; SAMUELS e SZABADI, 2008; GARCIA-FALGUERAS *et al*, 2005; BANGASSER *et al*, 2011).

Como mencionado, os dimorfismos sexuais também se dão na quantidade de receptores em determinadas regiões cerebrais, como o hipotálamo, principalmente nos receptores estrogênicos (ER) α e β e no receptor androgênico (AR). A diferença sexual na quantidade de ER α já se faz presente no período neonatal, com fêmeas exibindo maior quantidade desse receptor no VMH, na MPOA e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (YOKOSUKA *et al*, 1997). O ER α é regulado pelo estrogênio, sendo que este reduz a expressão de *Esr1*, reduzindo a quantidade de ER α (SIMERLY e YOUNG, 1991; LAUBER *et al*, 1991). Entretanto, mesmo após a castração de machos e fêmeas adultos, fêmeas ainda possuem maior expressão gênica de *Esr1* do que machos nas regiões já mencionadas (LAUBER *et al*, 1991), mostrando uma diferença entre os sexos na expressão gênica constitutiva desse receptor. Ainda, uma vez que o período crítico de diferenciação sexual cerebral cessa, não há como alterar os dimorfismos encontrados entre os sexos. Todos esses achados corroboram com a importância da aromatização para a diferenciação sexual cerebral, uma vez que machos possuem maior quantidade de testosterona circulante, a qual se transformará em estradiol pela enzima aromatase em determinadas regiões cerebrais, fazendo a *dow-regulation* do ER α . Ainda, esse receptor é importante para uma regulação normal do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG) em fêmeas (RISSMAN *et al*, 1997), além de estar intimamente ligado com a agressividade e com a parte consumatória do comportamento sexual de ratos machos (OGAWA *et al* 1997; OGAWA *et al*, 1998). A possível região cerebral responsável pelo ER α desempenhar sua função no comportamento sexual de machos é a MPOA, uma vez que a quantidade de ER α encontra-se reduzida na MPOA de machos que não apresentam comportamento copulatório na presença de fêmeas receptivas, se comparado com machos que exibem esse comportamento (PORTILLO *et al*, 2006). Entretanto, em um estudo mais recente, demonstrou-se que o ER α da VMH também é crucial para a parte consumatória da cópula, bem como a parte apetitiva também (LEE *et al*, 2014).

O ER β , ao contrário do ER α , não é necessário para a manifestação do comportamento sexual em machos (OGAWA *et al*, 1999). Sua expressão gênica e quantidade é maior em fêmeas adultas se comparado a machos no AVPV, sendo importante para a regulação do LH pelo estrógeno em fêmeas (ORIKASA *et al*, 2002). A expressão gênica de ER β em roedores é detectável no hipotálamo e na POA de ambos os sexos desde o GD 15, entretanto em machos essa expressão é elevada até o PND 15, o que não ocorre com as fêmeas (KAROLCZAK e BEYER, 1998). Além disso, ER β exerce um papel modulatório na expressão de ER α (TEMPLE *et al*, 2001). Diversos estudos sugerem um papel importante do ER β em machos durante a adolescência, principalmente como mecanismo de defeminização, enquanto que o ER α é importante para a masculinização (KUDWA *et al*, 2006).

Quanto ao AR, machos possuem maior número desse receptor do que fêmeas em diversas regiões cerebrais, como no AVPV, no ARC, no VMH, no *bed nucleus of stria terminalis* (BNST) (BROCK *et al*, 2015), na área pré-óptica do hipotálamo (POA) e na amígdala (SHAH *et al*, 2004). Ainda, o AR nessas últimas 3 regiões desempenha um papel importante durante a cópula, sendo observado o aumento da sua atividade após a apresentação de uma fêmea em estro e o consequente comportamento sexual (SHAH *et al*, 2004). A diferença na expressão de AR no AVPV e ARC pode ser observada em roedores já no PND 5, e na MPOA, no PND 25 (BROCK *et al*, 2015). De um modo geral, machos possuem maior expressão gênica de AR no cérebro desde o GD 16 (YOUNG e CHANG, 1998), período crítico na diferenciação sexual. Essa diferença na quantidade de AR observada entre os sexos parece se dever justamente devido à alta circulação de testosterona no organismo dos machos, o que não ocorre nas fêmeas. Ou seja, androgênios regulam a expressão de AR, promovendo um aumento de sua expressão (*up-regulation*) (LU *et al*, 1998; BROCK *et al*, 2015). Portanto, o dimorfismo de AR entre os sexos, os quais são responsáveis pela diferença em alguns comportamentos de machos e fêmeas, corrobora com a ideia de que a ação direta da testosterona (via AR) é necessária para a completa masculinização do cérebro.

Como já mencionado, a enzima aromatase, responsável pela conversão da testosterona à estradiol, também é sexualmente dimórfica. Sua atividade é elevada em diversos núcleos hipotalâmicos e amigdaloides (ROSELLI e RESKI, 1987), os quais são, em sua maioria, dimórficos entre os sexos. Sua atividade, assim como o

AR, é regulada pela testosterona e seus metabólitos em regiões cruciais para a diferenciação sexual e comportamental, como o hipotálamo e a MPOA (ROSELLI, *et al*, 1984; ROSELLI, 1991; SHAY *et al*, 2018). Ao contrário, em outras regiões como o córtex cerebral e o hipocampo, a atividade da aromatase é independente de hormônios gonadais (SHAY *et al*, 2018). Essa diferença em sua regulação em diferentes áreas cerebrais reforça a hipótese de que a atividade dessa enzima é crucial para a diferenciação sexual comportamental. De fato, foi demonstrado que a atividade da aromatase no período neonatal é crucial para o desenvolvimento de determinadas regiões cerebrais, bem como para o futuro comportamento sexual de machos (HOUTSMULLER *et al*, 1994). Mesmo após a gonadectomia de roedores e o posterior tratamento com a mesma quantidade de testosterona, machos e fêmeas adultos exibem diferença nos níveis de aromatase no BNST, no VHM, no AVPV, na MPOA e no hipotálamo anterior (ROSELLI, 1991). De um modo geral, a atividade da aromatase é cerca de 3 vezes maior no hipotálamo de machos adultos do que de fêmeas (ROSELLI e RESKI, 1987). Essa diferença se faz presente desde o período fetal (HUTCHISON *et al*, 1995), período crítico no desenvolvimento cerebral. Além da atividade da enzima, sua expressão gênica também é dimórfica entre os sexos em diferentes regiões cerebrais: na amígdala, machos adultos possuem níveis de mRNA de aromatase 52% maiores do que em fêmeas. Essa expressão gênica de aromatase na amígdala é aumentada em ambos os sexos por hormônios gonadais. Já no BNST e na POA, machos adultos possuem 224% e 165% mais mRNA de aromatase do que fêmeas, respectivamente. Entretanto, ao contrário do que foi observado na amígdala, nessas duas regiões cerebrais a regulação da expressão gênica é vista apenas em machos, sendo que machos castrados possuem níveis de mRNA de aromatase similares às fêmeas (TABATADZE *et al*, 2014). Dimorfismos sexuais na expressão gênica dessa enzima também são encontrados no VHM, e na MPOA, sendo maior em machos (WAGNER e MORRELL, 1996). Essa diferença entre machos e fêmeas na expressão gênica de aromatase pode ser observada em períodos críticos do desenvolvimento também, como no PND 2 no BNST, no SDN-POA (machos > fêmeas) e na MPOA (fêmeas > machos), entretanto varia muito ao longo dos dias e da região (LAUBER *et al*, 1997).

Portanto, constata-se que a diferença entre os sexos observada em alguns comportamentos, a qual é decorrente do dimorfismo sexual cerebral, é devida a uma combinação entre a ação da testosterona e do estradiol, principalmente no período

fetal: A testosterona atravessa a barreira hematoencefálica e, em determinadas regiões cerebrais, principalmente as dimórficas (como o hipotálamo e o sistema límbico), encontram a enzima aromatase, que faz sua conversão a estradiol (NAFTOLIN *et al*, 1971; ROSELLI, 2007). O estradiol, por sua vez, atua no cérebro em desenvolvimento, via ER, masculinizando-o (ARNOLD e MCCARTHY, 2016). Apesar disso, a ação da testosterona via AR também é necessária em determinadas regiões cerebrais para que haja um desenvolvimento adequado e uma futura masculinização comportamental (SATO *et al*, 2004; GARCIA-FALGUERAS *et al*, 2005). A ação conjunta do estradiol e da testosterona no período pré-natal garante os efeitos organizacionais, isto é, permite tanto o mecanismo de masculinização (desenvolvimento de comportamentos sexuais tipicamente masculinos) como o de defeminização (supressão de comportamentos tipicamente femininos). Isso, juntamente com a produção adequada de testosterona durante o início da fase adulta (efeito ativacional), reforçará essa circuitaria cerebral, garantindo que os machos desenvolvam um comportamento sexualmente masculino quando adultos. Nas fêmeas, por outro lado, além de não haver a produção de testosterona, o estradiol produzido pela placenta se liga a uma proteína produzida pelo fígado do feto, a α -fetoproteína, a qual protegerá seu cérebro da masculinização. Isso, combinado com a produção adequada de estrógeno no início da fase adulta, garantirá comportamentos sexuais tipicamente femininos (BAKKER e BAUM, 2013).

Deste modo, o sexo gonadal, o qual é determinado logo nos primeiros meses de gestação, é independente do sexo cerebral, um dos últimos órgãos a ser formado (SWAAB e GARCIA-FALGUERAS, 2009). Assim, há uma janela crítica na qual os hormônios atuam, promovendo a masculinização ou feminização. Uma vez que esse período se encerra, não há mais como promover os efeitos organizacionais permanentes. Ainda, essa janela é distinta entre as diferentes regiões cerebrais e os órgãos sexuais (ARNOLD e MCCARTHY, 2016).

3. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi investigar os possíveis efeitos da exposição ao DiPeP durante a gestação e lactação sobre o cérebro e sobre o comportamento de

ratos machos, tendo em vista que esse ftalato tem a capacidade de inibir a produção de testosterona fetal.

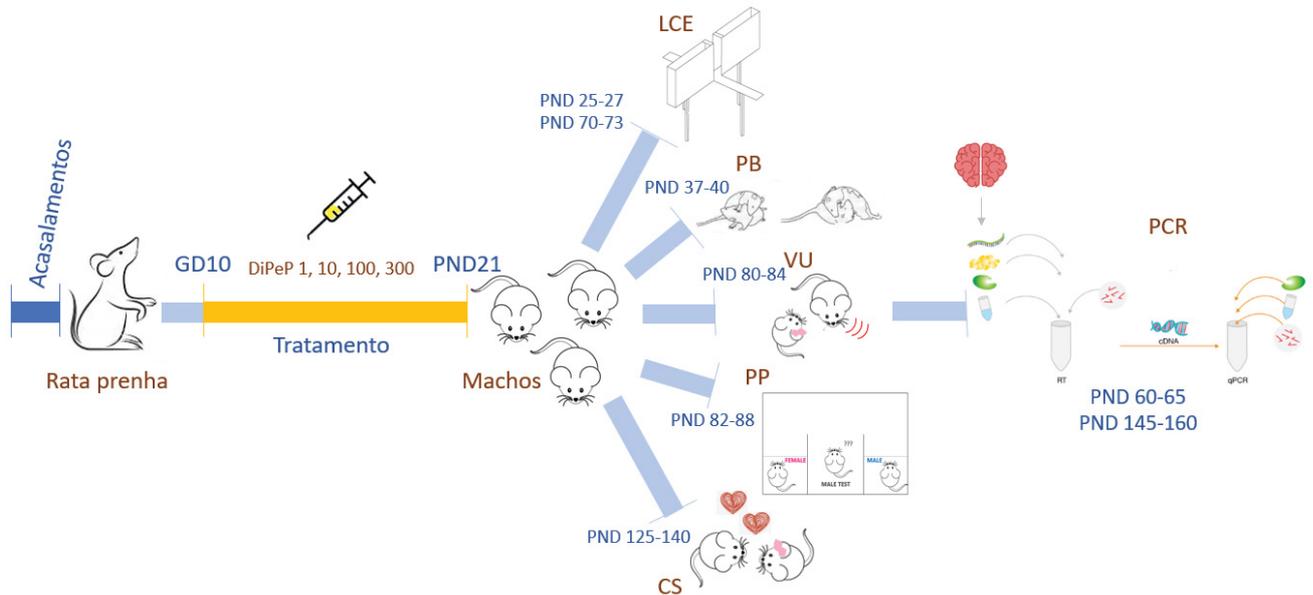
3.1. *Objetivos Específicos*

- ✓ Avaliar se a exposição ao DiPeP nos períodos críticos do desenvolvimento fetal afeta comportamentos sexualmente dimórficos hormônio dependentes da progênie masculina, entre eles o labirinto em cruz elevado, o *play behavior*, as vocalizações ultrassônicas sob a presença de uma fêmea receptiva, a preferência ao parceiro e, por último, o comportamento sexual;
- ✓ Investigar se o DiPeP altera a expressão dos receptores estrogênicos α (*Esr1*) e β (*Esr2*) e do receptor androgênico (*Ar*) no hipotálamo e na hipófise, bem como da enzima aromatase no hipotálamo de machos adultos expostos durante períodos críticos do desenvolvimento fetal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os principais eventos realizados neste projeto estão representados na FIGURA 3, os quais serão descritos mais criteriosamente a seguir.

FIGURA 3 – ESQUEMA COM OS PRINCIPAIS EVENTOS DO PROJETO



Primeiro foram realizados acasalamentos para a obtenção de ratas prenhas. Essas ratas foram divididas entre grupo controle e grupos tratados com DiPeP nas doses de 1, 10, 100 e 300 mg/kg/dia. O tratamento de seu entre o GD 10 e o PND 21. Dois ratos machos por ninhada passaram por uma bateria de testes comportamentais hormônio dependentes e em dois períodos diversos (PND 60-65 e PND 145-160) foram eutanasiados e os cérebros foram retirados para a análise da expressão gênica de receptores hormonais e enzima aromatase. GD = dia gestacional; PND = dia pós-natal; LCE = labirinto em cruz elevado; PB = play behavior; VU = vocalizações ultrassônicas; PP = preferência a parceiro; CS = comportamento sexual.

FONTE: O autor (2019)

4.1. Animais

Ratos Wistar provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos em caixas moradias de polipropileno (414 x 344 x 168 mm) em salas com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), obedecendo a um ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração à vontade. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sendo aprovados sob o número 1024.

4.2. *Drogas e doses*

Baseado em resultados do experimento piloto, no qual a menor dose de DiPeP (150 mg/kg/dia) foi capaz de reduzir a produção de testosterona testicular fetal (BERTONCELLO SOUZA *et al*, 2018), e também com base nas doses do estudo de Hannas e colaboradores (2011) com o isômero do DiPeP, o DnPP, foram escolhidas as seguintes doses de DiPeP para esse estudo: 1, 10, 100 e 300 mg/kg/dia. O DiPeP foi diluído em óleo de canola e no grupo controle foi administrado somente óleo de canola (SIGMA). Todas as administrações ocorreram no período da manhã por meio de gavagem.

4.3. *Acasalamento*

Para a obtenção de fêmeas prenhas, três fêmeas nulíparas foram colocadas juntamente com um macho em uma caixa de polipropileno (414 x 344 x 168 mm), no período escuro do ciclo (3 horas antes das luzes acenderem). Após essas 3 horas, lavados vaginais foram realizados em cada fêmea, com o intuito de avaliar a presença de espermatozoides. O lavado vaginal consiste em uma lavagem da vagina da rata com 50 μ L de salina, sendo esse líquido avaliado em microscopia óptica, com aumento de 200x. Foram consideradas prenhas as ratas cujos esfregaços vaginais identificavam-se a presença de espermatozoides. Essas foram separadas randomicamente nos cinco grupos (controle e DiPeP nas doses de 1, 10, 100 e 300 mg/kg/dia). Os acasalamentos foram repetidos até a obtenção de 60 prenhas, isto é, 12 fêmeas por grupo.

4.4. *Tratamento*

O dia em que foram encontrados os espermatozoides no lavado vaginal foi considerado o dia de gestação (GD) 0. Foram mantidas cinco fêmeas prenhas por caixa (uma de cada grupo de tratamento) até o GD 18. Nesse dia, as prenhas foram separadas individualmente e no GD 21 (dia provável do parto) suas caixas foram analisadas duas vezes ao dia (manhã e final da tarde) para averiguar o nascimento dos filhotes. O dia do parto foi designado como o dia pós-natal (PND) 1. Assim, se os filhotes nasceram realmente no GD 21, esse dia também foi considerado o PND 1. O

período de tratamento da progenitora iniciou-se no GD 10 e estendeu-se até o PND 21, dia do desmame. Esse período foi escolhido pois abrange o período de determinação e diferenciação sexual do rato, bem como o período de desenvolvimento cerebral e a consequente diferenciação sexual cerebral, que continua após o nascimento.

4.5. *Dados maternos*

O peso da genitora foi registrado diariamente, do GD 1 até o PND 21, dia no qual a eutanásia das genitoras foi realizada. A eutanásia se deu pela overdose do anestésico isoflurano (Biochimico). O fígado, o baço, os rins e as adrenais foram retirados e pesados com o intuito de avaliar possíveis efeitos tóxicos. Além disso, o útero também foi removido para análise do número de implantes e possíveis perdas pós-implantes, objetivando analisar a toxicidade materna. Também foi contabilizado o número de filhotes nascidos (tamanho da ninhada), a proporção de filhotes nascidos vivos (índice de nascimento), e a sobrevivência durante a lactação (índices de viabilidade e desmame) (US EPA, 1991).

4.6. *Separação dos filhotes e puberdade*

No PND 21 os filhotes foram desmamados e separados das genitoras. Nesse dia eles também foram separados por sexo, divididos em 4 animais por caixa, sendo que cada dupla pertencia a mesma ninhada (ou seja, em cada caixa havia 2 irmãos).

Os testes comportamentais foram realizados apenas com 2 machos por ninhada de cada grupo. As fêmeas utilizadas nos testes foram apenas as do grupo controle, no mesmo padrão (2 fêmeas por ninhada), como maneira de comparação entre comportamentos tipicamente masculinos e femininos, uma vez que a substância a ser estudada é conhecida por seu papel antiandrogênico.

4.7. *Labirinto em cruz elevado*

O aparato desse teste nada mais é do que um labirinto em forma de cruz, no qual dois braços são fechados (50 cm x 10 cm x 40 cm) e os outros dois são abertos (50 cm x 10 cm), com 50 cm de altura (PELLOW *et al*, 1985), como demonstrado na

FIGURA 4. Esse teste foi realizado entre os PND 25 e 27, e posteriormente, com os irmãos, durante os PND 70 e 73, durante o ciclo claro, no período da manhã. Os machos de todos os grupos e as fêmeas do grupo controle foram colocados no meio do labirinto com a face voltada para o braço aberto, e foram filmados por 5 minutos, nos quais foram computados o número de entradas no braço fechado e o tempo em que eles passaram no braço aberto. As fêmeas controles utilizadas estavam em estro natural, sendo esse verificado através de lavados vaginais.

FIGURA 4 – APARATO DO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



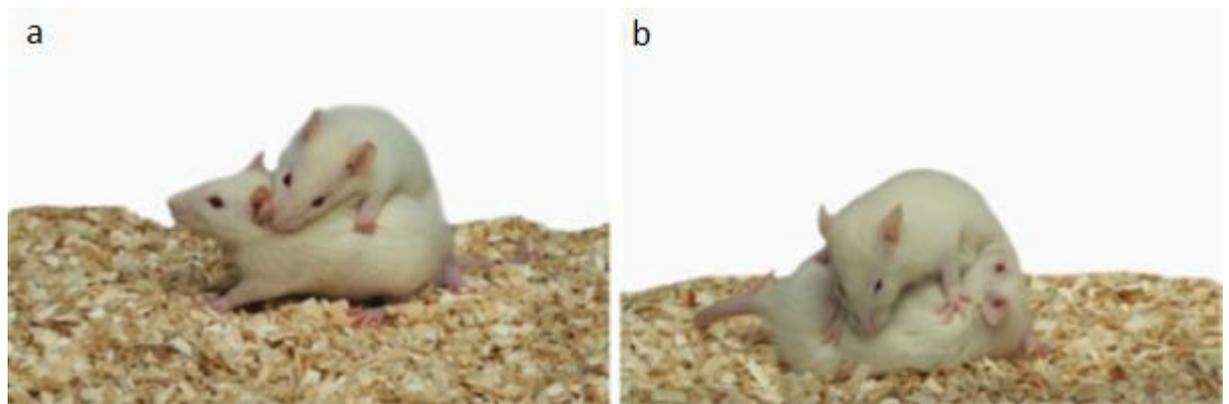
FONTE: O autor (2019)

4.8. *Play behavior*

Ratos machos foram testados entre os PND 37 e 40, dias nos quais observa-se um pico de testosterona (efeito ativacional). O teste consistiu em colocar dois irmãos na caixa teste (caixa de acrílico 31cm x 31cm x 32cm), durante a fase clara do

ciclo, em uma sala com iluminação controlada (luz vermelha de 25W), onde o comportamento de brincadeira foi filmado por 10 minutos e posteriormente avaliado por pessoas treinadas (PANKSEPP, 1981). Esses comportamentos consistiam em um rato friccionar o pescoço do outro (*pouncing*) e o outro rato rotacionar seu corpo, ficando com a face dorsal voltada para o chão, embaixo do primeiro animal (*pinning*), como demonstrado na FIGURA 5. Nos dois dias que antecederam o teste, houve a habituação dos animais na caixa de teste por 30 minutos, com seus respectivos pares. Um dia antes do teste, após a habituação, os animais foram colocados individualmente em caixas (isolamento social), para que no dia do teste os animais estivessem estimulados a brincar (BLAKE e MCCOY, 2015).

FIGURA 5 – *PLAY BEHAVIOR* OBSERVADO EM RATOS ENTRE OS PND 28 E 40.
a) *POUNCING*; b) *PINNING*



FONTE: Vanderschuten e Trezza (2013)

4.9. *Vocalização ultrassônica na presença de uma fêmea receptiva*

Entre os PND 80 e 84, durante a fase clara do ciclo, ratos machos de todos os grupos foram colocados, um a um, em uma sala com iluminação controlada, dentro de uma caixa de acrílico (31cm x 31cm x 32cm) contendo um microfone apropriado para captura de vocalização ultrassônica, o UltraSoundGate Condenser Microphone CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany), o qual era posicionado a 45 cm do chão. A fêmea receptiva (estro natural verificado por meio de lavados vaginais) foi colocada no lado oposto do microfone, sendo seu espaço limitado por uma divisória feita de grades, permitindo a troca de odores entre macho e fêmea (FIGURA 6). O

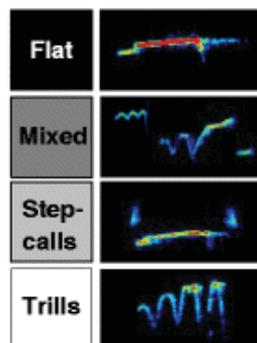
microfone captou frequências entre 15-180 kHz, as quais foram gravadas pelo programa Avisoft RECORDER (versão 2.95; Avisoft Bioacoustics) por 5 minutos. As vocalizações foram analisadas posteriormente por meio de um espectrograma gerado pelo software Avisoft SASLab Pro (version 4.34; Avisoft Bioacoustics) (PORTFORS, 2007), sendo subdivididas em: flat, mixed, step-calls e trills, como mostrado na FIGURA 7 (PEREIRA *et al*, 2014).

FIGURA 6 – VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA DO MACHO CAPTADA PELO MICROFONE NA PRESENÇA DE UMA FÊMEA EM ESTRO (GRADE)



FONTE: O autor (2019)

FIGURA 7- SUBTIPOS DE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS



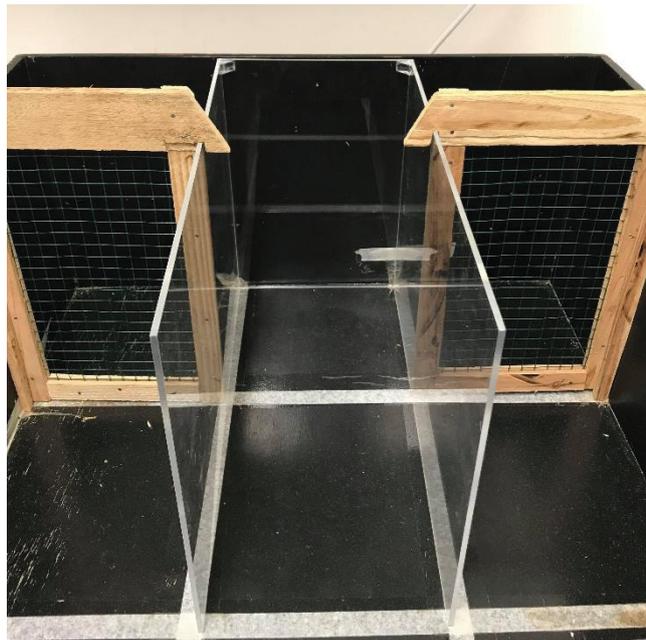
FONTE: Pereira *et al* (2014)

4.10. *Preferência a parceiro*

O teste de preferência a parceiro foi realizado entre os PND 82 e 88, o qual ocorreu no período da manhã, durante a fase clara do ciclo. O aparato consistia em uma caixa contendo três compartimentos abertos (60cm x 30 cm x 40 cm), permitindo que o animal teste se movimentasse livremente de um compartimento para outro. Após a habituação do macho teste no aparato por 5 minutos, uma fêmea receptiva (estro natural verificado por meio de lavados vaginais) e um macho foram introduzidos aleatoriamente nos dois compartimentos laterais, ficando cercados por uma grade, restringindo-os em seus respectivos compartimentos e, ao mesmo tempo, permitindo uma certa interação (visão, olfato, audição) com o macho teste (FIGURA 8). O macho teste foi, então, introduzido no compartimento central e foi filmado por 10 minutos, nos quais foram contabilizados o tempo gasto na área feminina e masculina (adaptado de HOUTSMÜLLER *et al*, 1994). A preferência do macho teste se deu pela porcentagem do tempo gasto no compartimento masculino e feminino, o qual foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{tempo gasto em um compartimento}}{(\text{tempo gasto no compartimento feminino} + \text{tempo gasto no compartimento masculino}) \times 100}$$

FIGURA 8 – APARATO DO TESTE DE PREFERÊNCIA A PARCEIRO



FONTE: O autor (2019)

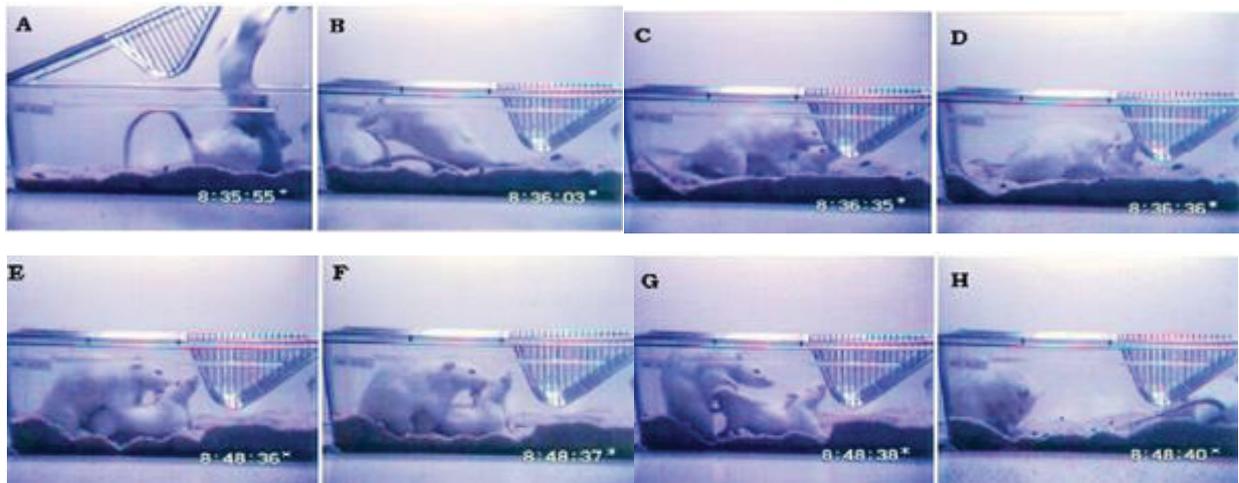
4.11. *Comportamento sexual*

Esse teste foi realizado entre os PND 125 e 140, durante a fase escura do ciclo, entre as 11:00 e 17:00 horas (animais foram habituados durante uma semana com o novo ciclo claro/escuro). O macho teste foi habituado durante 5 minutos em uma caixa transparente de polipropileno (414mm x 344mm x 245mm), em uma sala com iluminação controlada (luz vermelha de 25W). Posteriormente, uma fêmea em estro induzido foi introduzida na caixa, sendo o acasalamento filmado por 30 minutos. Os parâmetros reprodutivos avaliados foram:

- Latência de monta (seg): tempo transcorrido entre a introdução da fêmea na caixa e a primeira monta (com ou sem penetração);
- Latência de penetração (seg): tempo transcorrido entre a introdução da fêmea na caixa de filmagem e a primeira penetração;
- Latência de ejaculação (min): tempo transcorrido entre a primeira penetração e a ejaculação;
- Latência pós-ejaculação (min): tempo transcorrido entre a ejaculação e a primeira penetração após a ejaculação;
- Número de penetrações até a primeira ejaculação;
- Número total de penetrações;
- Número de ejaculações.

Fêmeas que não apresentaram receptividade sexual (lordose e vibração das orelhas) dentro de 5 minutos após sua introdução na caixa com o macho foram consideradas sexualmente inativas, sendo essas imediatamente substituídas. Após o término da filmagem, a fêmea foi retirada da caixa e foi realizado esfregaço vaginal para a detecção de espermatozoides e a confirmação de ejaculação (AGMO, 1997).

FIGURA 9 – COMPORTAMENTO SEXUAL



A) Introdução da fêmea na caixa; B) primeira monta; C-D) primeira monta com penetração; E) monta com penetração; F-G) ejaculação; H) limpeza do pênis.

Fonte: Dalsenter (1996)

4.12. *Castração das ratas e indução do estro*

Para a avaliação do comportamento sexual dos machos controles e tratados foram utilizadas fêmeas adultas receptivas por meio da indução do estro, como já mencionado, sendo essas previamente ovariectomizadas (castradas). A ovariectomia foi realizada aproximadamente 15 dias antes do início dos testes sexuais, para que houvesse uma recuperação pós-cirúrgica adequada. A cirurgia consistiu na tricotomia, na assepsia, e na incisão (aproximadamente 3 cm) da pele e da musculatura abdominal entre o bordo superior da coxa e a última costela, a cerca de 1 cm lateralmente à linha mediana. O ovário foi identificado em meio a uma massa de gordura e sua remoção se deu pela ligadura da extremidade da tuba uterina, seguido do corte entre a ligadura e o ovário. A tuba uterina foi, então, reposicionada dentro da cavidade abdominal, finalizando o procedimento com suturas no músculo e, em seguida, na pele. Todo esse procedimento foi repetido contralateralmente, para a retirada do segundo ovário. Posteriormente foi realizada nova assepsia e a rata foi mantida sob uma manta térmica com o intuito de minimizar os efeitos hipotérmicos provocados pelo anestésico. As ratas castradas receberam, logo após a cirurgia, antibiótico (Gentamax, Marcolab) na dose de 40 mg/kg via-subcutânea. O analgésico (Ibuprotrat, Natulab) foi administrado pela mesma via logo antes à realização do

procedimento, na dose de 20 mg/kg, sendo a administração repetida posteriormente por mais 2 vezes. Para a anestesia, foi utilizada xilazina (Syntec) na dose de 4 mg/kg e cetamina (Syntec) na dose de 80 mg/kg.

A indução do estro nas fêmeas, para que se desse o comportamento sexual, começou cerca de 52 horas antes do teste, com a administração subcutânea no dorso de 17 α -etinilestradiol (Sigma, E- 4876) na concentração de 500 μ g/mL/rata. A progesterona (Sigma, P0130) foi administrada pela mesma via e local, na concentração de 5 mg/mL/rata, 4 horas antes do acasalamento. Ambos os hormônios foram dissolvidos em óleo de canola (Sigma) e o volume de administração foi de 0,2 mL/rata (adaptado de AGMO, 1997).

4.13. *Expressão gênica de aromatase no hipotálamo e de AR e ER no hipotálamo e na hipófise*

4.13.1. *Extração do RNA total*

Nos PND 60 a 65 e PND 145 a 160 os animais receberam uma overdose do anestésico isoflurano (Biochimico) e foram decapitados para a retirada do cérebro. Após a eutanásia, foi realizada a dissecação do hipotálamo e da hipófise no restante dos cérebros, sendo as estruturas rapidamente mergulhadas em nitrogênio líquido, para o posterior armazenamento a -80° C. Posteriormente, as estruturas foram pulverizadas individualmente em gral e pistilo de porcelana com nitrogênio líquido. O RNA total das amostras foi extraído pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987), por meio da utilização do reagente TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, USA), utilizando-se as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi estimada pela densidade óptica da solução, utilizando-se um espectrofotômetro (KASVI Modelo K23-002). Para a avaliação da pureza do RNA utilizou-se a relação de absorbância A260/A280, a qual foi considerada adequada no intervalo de 1,9 a 2,1. Ainda, a integridade das amostras de RNA total foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2 % em tampão TBE, por meio da visualização das bandas ribossômicas 34 18S e 28S coradas pelo brometo de etídeo (OLIVEIRA *et al*, 2017).

4.13.2. *Reação de transcrição reversa*

Após a confirmação da pureza e da integridade do RNA, foi realizada a transcrição reversa com o auxílio do kit GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Com a obtenção do DNA complementar (cDNA), pôde-se realizar a quantificação da expressão gênica por meio de PCR em tempo real. Os primers utilizados foram confeccionados segundo OLIVEIRA *et al* (2017).

4.13.3. *Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real*

A expressão dos genes foi avaliada pelo método de PCR quantitativo em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR). Esse procedimento foi utilizado com o objetivo de estimar a quantidade relativa dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) dos genes a serem estudados e comparar os níveis de mRNA de todas as amostras com a expressão do gene constitutivo, Rpl19 ou Ppia, em triplicata. O ensaio foi realizado por meio do uso do kit Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG (Life Technologies, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação foi realizada através do equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore). A partir dos cDNA foram realizadas curvas de ciclos de amplificação para cada primer. As condições de amplificação foram padronizadas para cada gene. Ao final das reações, os valores médios de cycle threshold (Ct) foram automaticamente determinados pelo StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems). As amostras foram normalizadas pelos seus controles correspondentes, conforme o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como previamente descrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), usando a proteína ribossomal L19 (*Rpl19*) como gene de referência.

4.14. *Análise estatística*

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett ou, alternativamente, pelo teste de Kruskal-Wallis, sempre que os

dados não se ajustassem às condições paramétricas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados utilizando o programa Graphpad Prism® e o programa Microsoft Office Excel®.

5. RESULTADOS

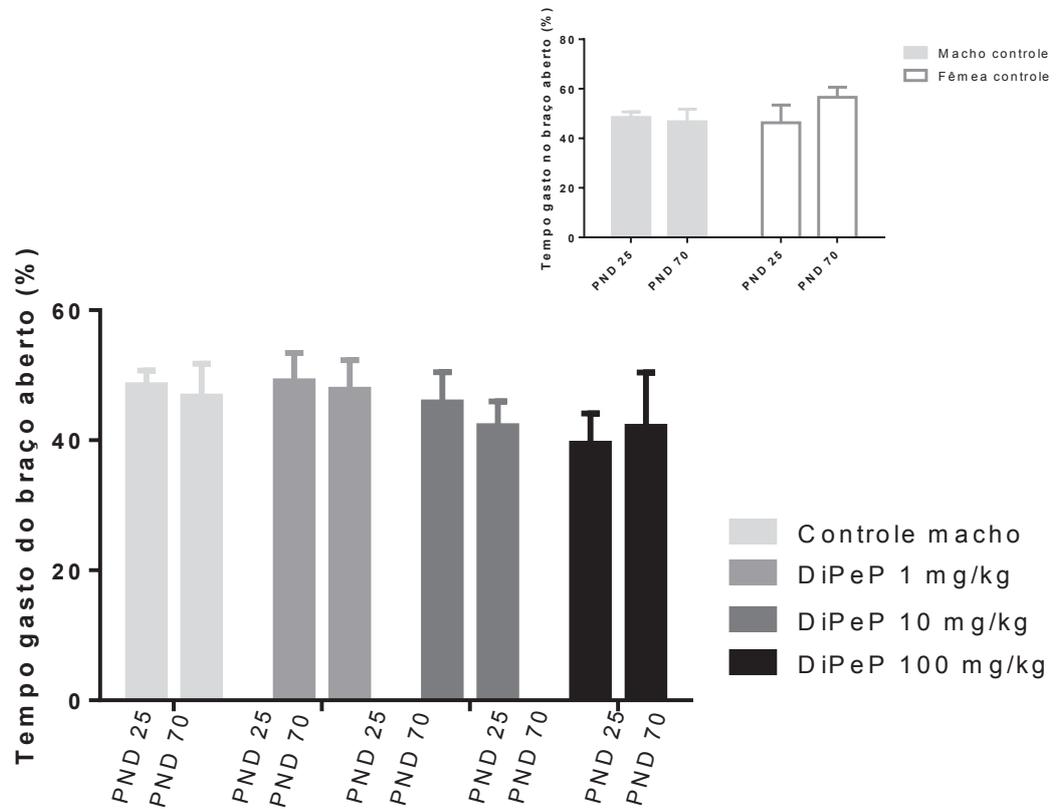
5.1. *Dados maternos*

Foi observada uma perda de peso materna significativa entre os GD 19 e 21 no grupo tratado com DiPeP 300 mg/kg. Essa redução de peso foi acompanhada de sangramento vaginal, indicando a presença de aborto. Ainda, o número de ninhadas com filhotes nascidos vivos também foi reduzido nessa mesma dose, indicando toxicidade fetal e materna. Em todos os outros parâmetros avaliados, como o peso de órgãos maternos e o índice de viabilidade e desmame, não foram encontradas diferenças significativas dos grupos tratados em relação ao grupo controle (CURI, 2019). Devido a essa toxicidade fetal observada no grupo DiPeP 300, o que acarretou na redução do n, esse grupo foi excluído das análises comportamentais. Portanto, para a análise comportamental e cerebral, apenas 4 grupos experimentais foram levados em conta: o grupo controle e os grupos tratados com DiPeP nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg/dia.

5.2. *Labirinto em cruz elevado*

Não houve diferença estatística na porcentagem do tempo gasto no braço aberto entre o grupo controle e os grupos tratados com DiPeP no teste de labirinto em cruz elevado. Ainda, não houve diferença estatística nesse mesmo parâmetro, que mede a ansiedade do animal, entre os diferentes períodos avaliados (FIGURA 10).

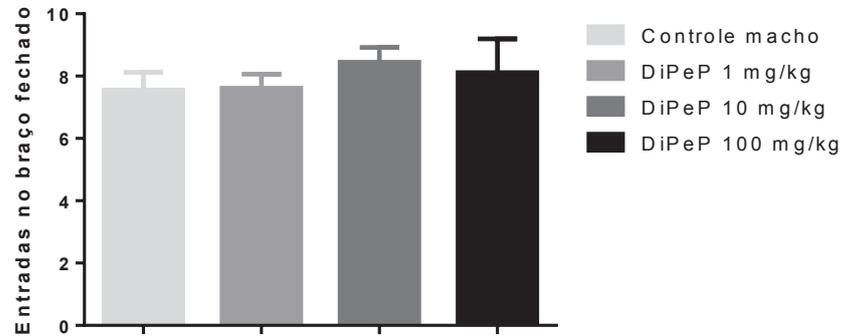
FIGURA 10 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NO TEMPO GASTO NO BRAÇO ABERTO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO EM 5 MINUTOS DE FILMAGEM.



Os valores estão expressos em média \pm EPM ($n = 7-9$; ANOVA de duas vias seguido de Dunnett).

Também não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos tratados com DiPeP no número de entradas no braço fechado no labirinto em cruz elevado realizado no PND 70-73. Esse parâmetro foi contabilizado com o intuito de avaliar a atividade locomotora (FIGURA 11).

FIGURA 11 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NO NÚMERO DE ESTRADAS NO BRAÇO FECHADO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO REALIZADO NOS PND 70 A 73 EM 5 MINUTOS DE FILMAGEM.

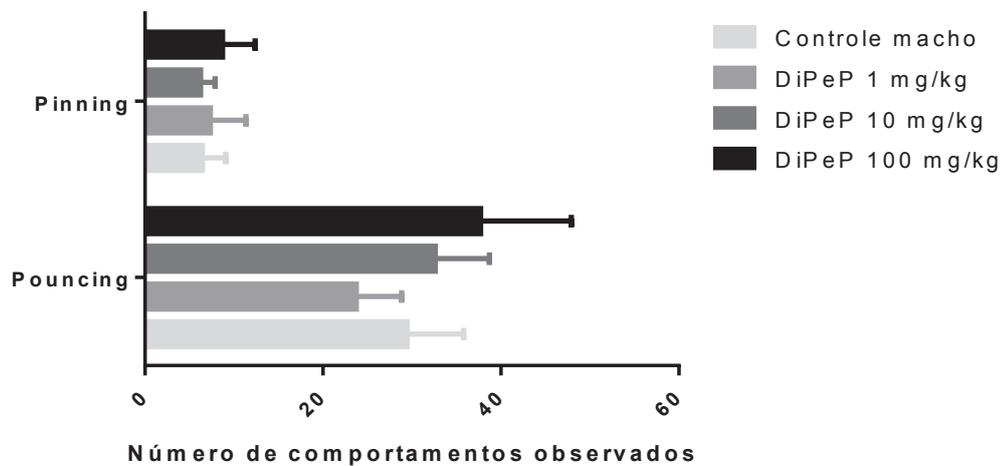


Os valores estão expressos em média \pm EPM ($n = 7-9$; ANOVA de uma via seguido de Dunnett).

5.3. *Play behavior*

Também não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos tratados com DiPeP no comportamento de *pouncing* e de *pinning* no teste de *play behavior*, como apresentado na FIGURA 12.

FIGURA 12 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP EM 10 MINUTOS DO TESTE DE *PLAY BEHAVIOR*.

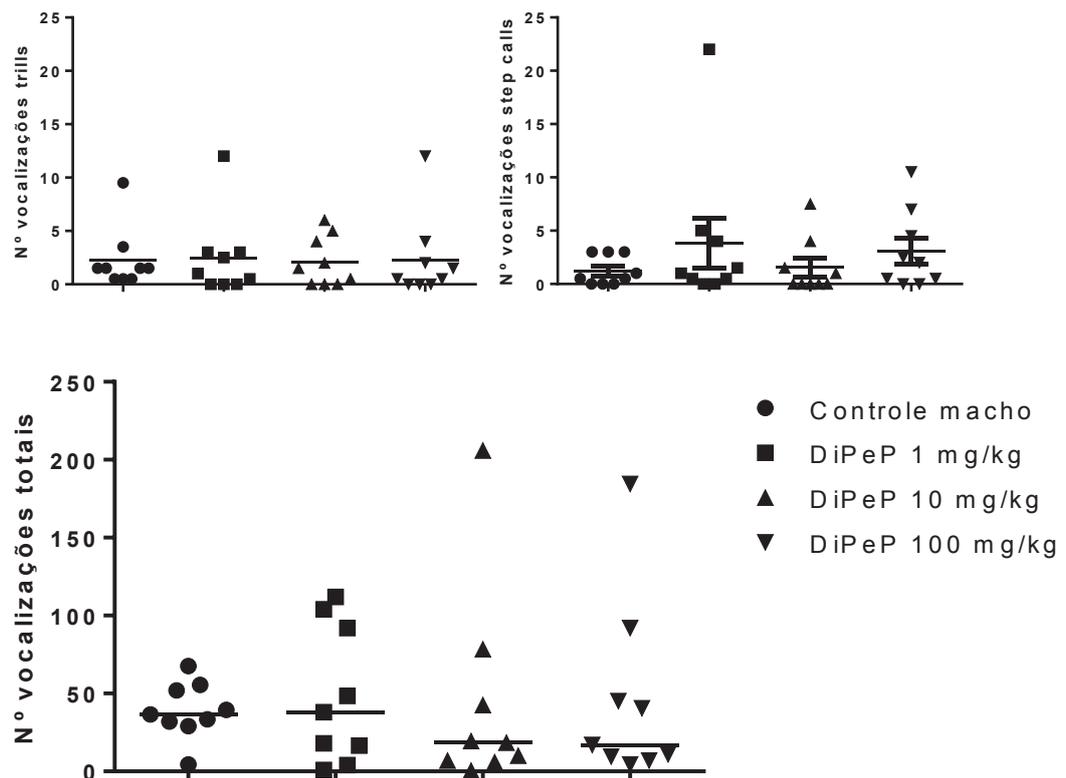


Os valores estão expressos em média \pm EPM ($n = 7-9$; Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

5.4. Vocalização ultrassônica

Nesse teste, no qual foram gravadas vocalizações ultrassônicas dos machos na presença de uma fêmea receptiva, não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com DiPeP no número de vocalizações totais, como apresentado na FIGURA 13. Foi realizada análise dos diferentes tipos de vocalização em separado, dando enfoque nas de subtipo trills e step-calls por serem positivamente correlacionadas com a cópula, entretanto também não foi encontrada diferença estatística.

FIGURA 13 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NO NÚMERO DE VOCALIZAÇÕES TOTAIS E NO NÚMERO DE VOCALIZAÇÕES TIPO TRILLS E STEP CALLS, GRAVADAS POR 5 MINUTOS, EMITIDAS PELO MACHO NA PRESENÇA DE UMA FÊMEA RECEPTIVA.

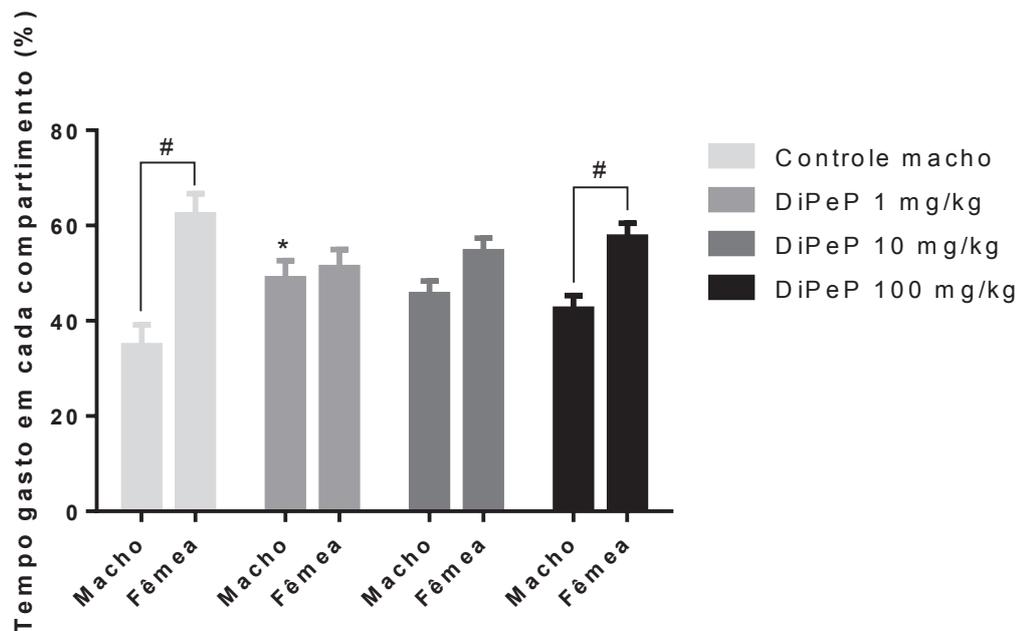


Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 9; Kruskal-Wallis/Dunn).

5.5. Preferência a parceiro

Na FIGURA 14 está representado o tempo em que cada grupo passou no compartimento masculino e feminino. Foi observada diferenças no tempo gasto entre os compartimentos nos grupos controle e tratado com DiPeP 100 mg/kg, ou seja, os machos desses grupos passaram maior tempo no compartimento feminino. Entretanto, essa diferença não foi observada nos grupos tratados com a dose de 1 e 10 mg/kg. Ainda, machos expostos ao DiPeP 1 mg/kg passaram mais tempo no compartimento masculino se comparado com machos controles.

FIGURA 14 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP EM 10 MINUTOS DO TESTE DE PREFERÊNCIA A PARCEIRO.



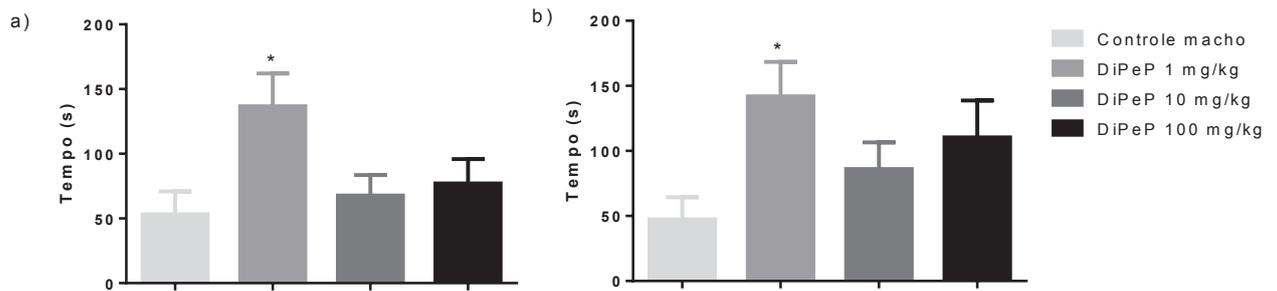
Os valores estão expressos em média \pm EPM ($n = 8-9$; * $p < 0,05$ quando significativamente comparado com o controle; # $p < 0,05$ quando significativamente comparado dentro do mesmo grupo; ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni).

5.6. Comportamento sexual

Os resultados do comportamento sexual estão demonstrados na FIGURA 15 e na Tabela 1. Houve um aumento significativo da latência de monta e da latência de penetração dos machos tratados com DiPeP 1 mg/kg (FIGURA 15), parâmetros considerados como apetitivos, ou pré-copulatórios. Entretanto, nos outros parâmetros

avaliados nesse teste, considerados como consumatórios, não houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados com DiPeP (TABELA 1).

FIGURA 15 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP EM 30 MINUTOS DE COMPORTAMENTO SEXUAL NA A) LATÊNCIA DE MONTA E NA B) LATÊNCIA DE PENETRAÇÃO.



Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 9; * p < 0,05, Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

TABELA 1. EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NO COMPORTAMENTO SEXUAL

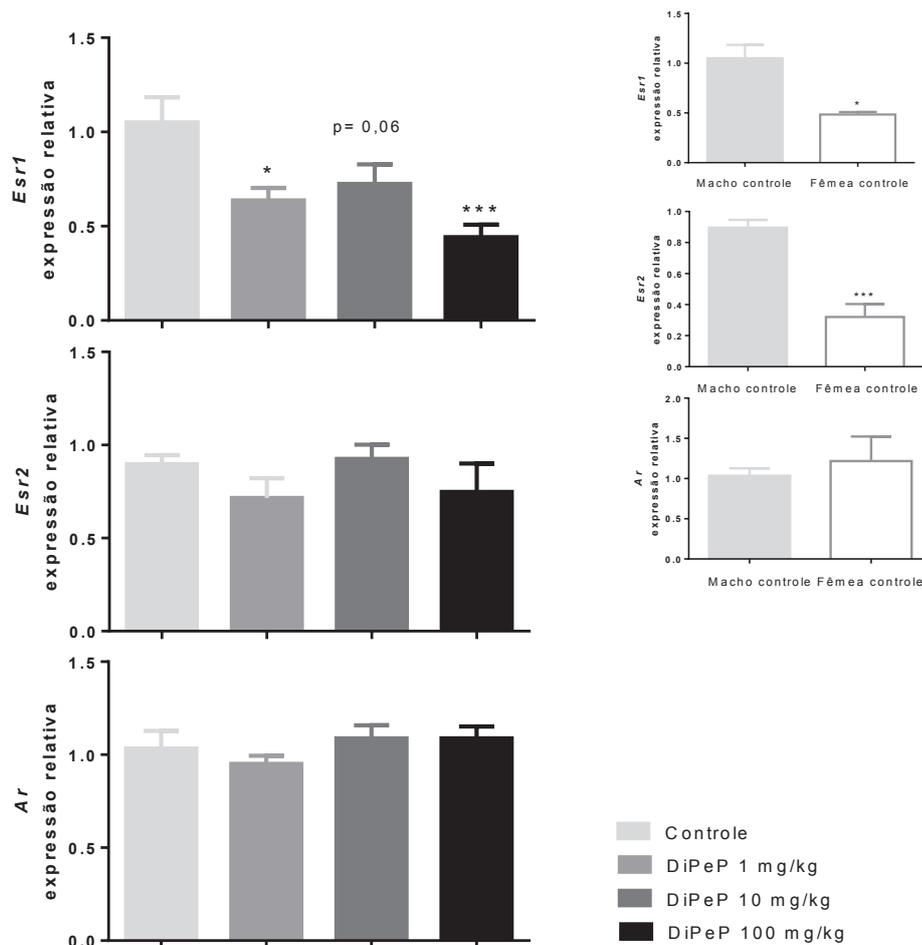
Variáveis	DiPeP (mg/kg/dia)			
	0	1	10	100
Latência de ejaculação (min)	13,38 \pm 0,91	17,00 \pm 2,97	15,28 \pm 1,84	15,47 \pm 1,66
Latência pós-ejaculação (min)	4,22 \pm 0,13	3,83 \pm 0,45	4,24 \pm 0,15	4,28 \pm 0,24
Número de penetrações até a primeira ejaculação	26,71 \pm 1,82	25,29 \pm 4,25	28,38 \pm 3,97	27,00 \pm 2,37
Número total de penetrações	40,78 \pm 3,28	35,56 \pm 3,74	40,44 \pm 3,45	37,33 \pm 4,71
Número de ejaculações	1,78 \pm 0,40	1,67 \pm 0,41	1,56 \pm 0,34	1,89 \pm 0,31

Os animais foram filmados por 30 minutos. Valores expressos em média \pm EPM (n = 5-8; ANOVA de uma via seguido de Dunnett).

5.7. Expressão gênica de aromatase no hipotálamo e de AR e ER no hipotálamo e na hipófise

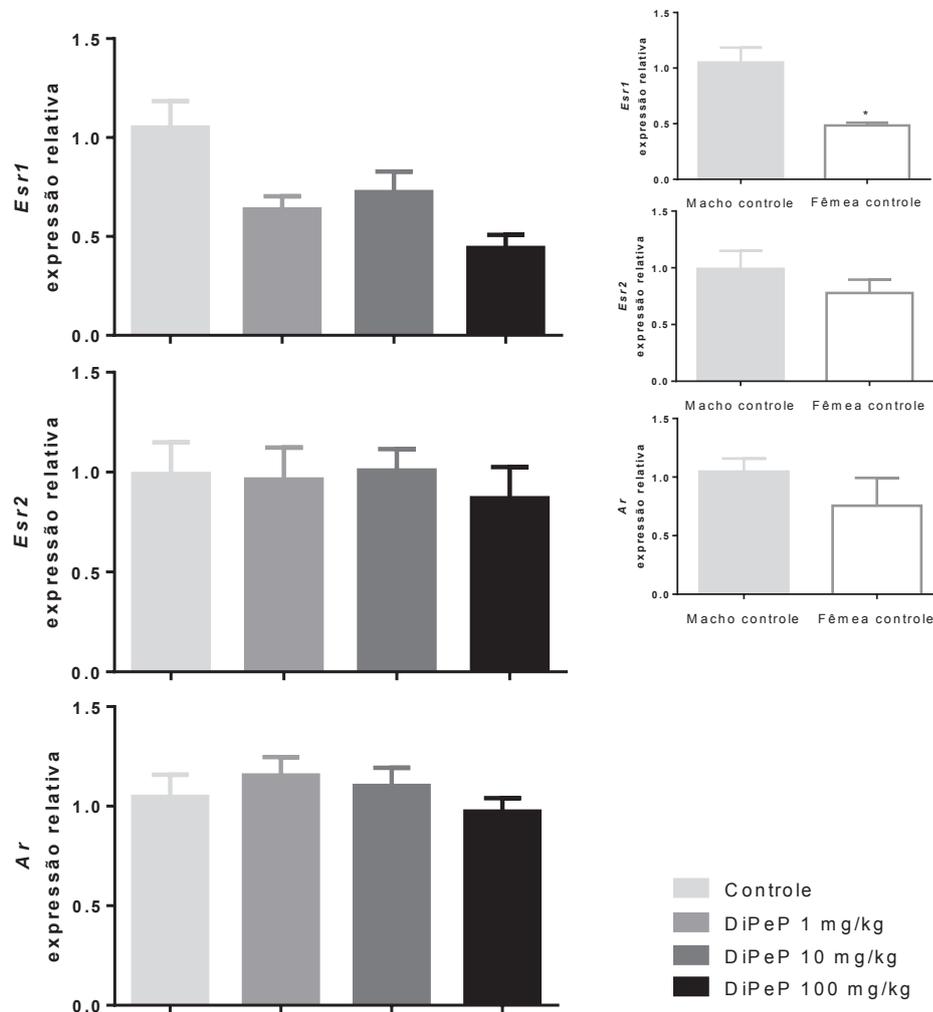
No PND 60-65, houve uma redução significativa na expressão hipofisária de *Esr1* de todos os machos tratados se comparado com o controle (FIGURA 16). No hipotálamo, não foi observado diferença significativa na expressão gênica de nenhum receptor (FIGURA 17). Dimorfismos sexuais foram encontrados apenas quanto à expressão gênica de receptores estrogênicos (α e β) na hipófise (FIGURA 16) e de receptor estrogênico α no hipotálamo (FIGURA 17).

FIGURA 16 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NA EXPRESSÃO GÊNICA DE *ESR1*, *ESR2* E *AR* NA HIPÓFISE DOS ANIMAIS COM PND 60-65.



Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 4-8; * p < 0,05, *** p < 0,001; ANOVA de uma via seguido de Dunnett).

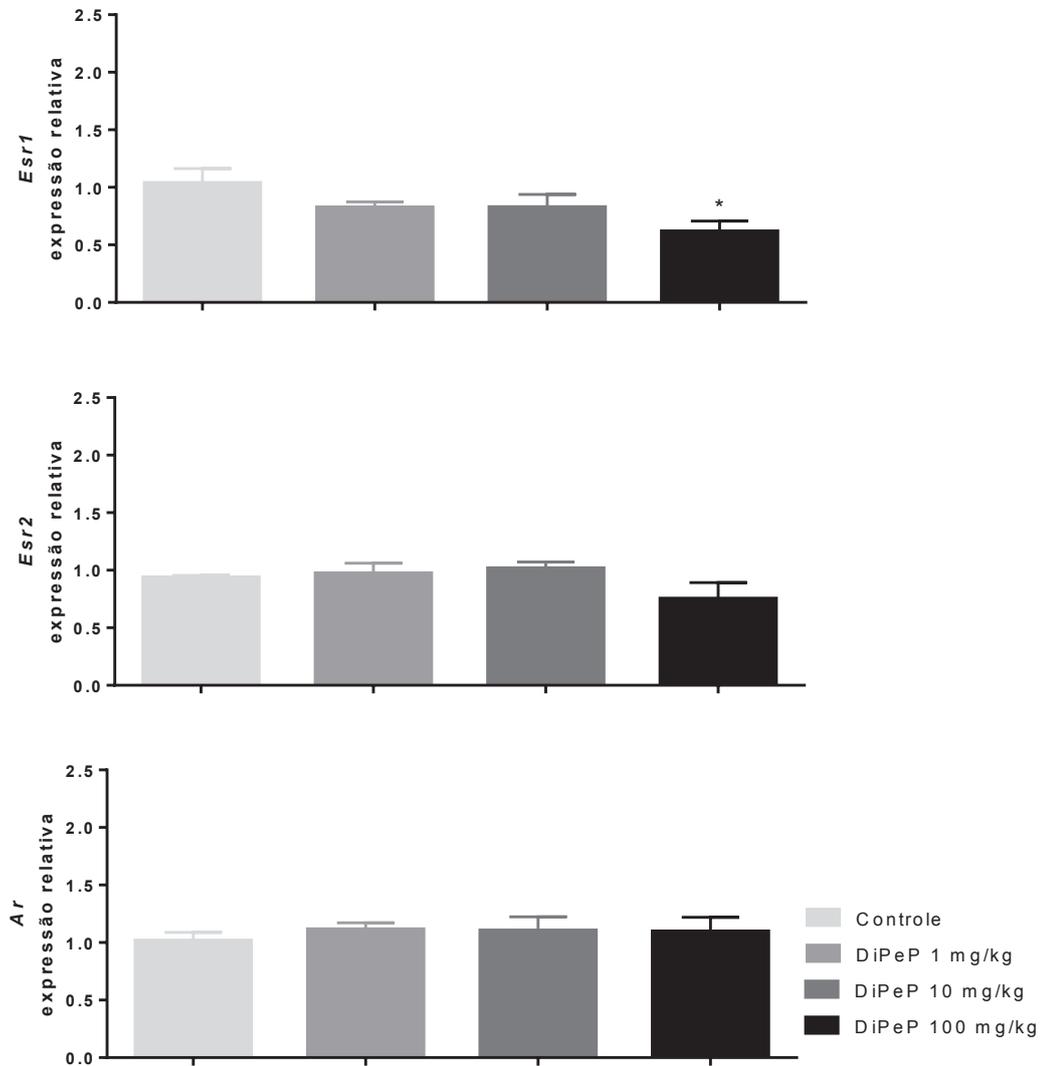
FIGURA 17 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NA EXPRESSÃO GÊNICA DE *ESR1*, *ESR2* E *AR* NO HIPOTÁLAMO DOS ANIMAIS COM PND 60-65.



Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 4-8; * p < 0,05; ANOVA de uma via seguido de Dunnett).

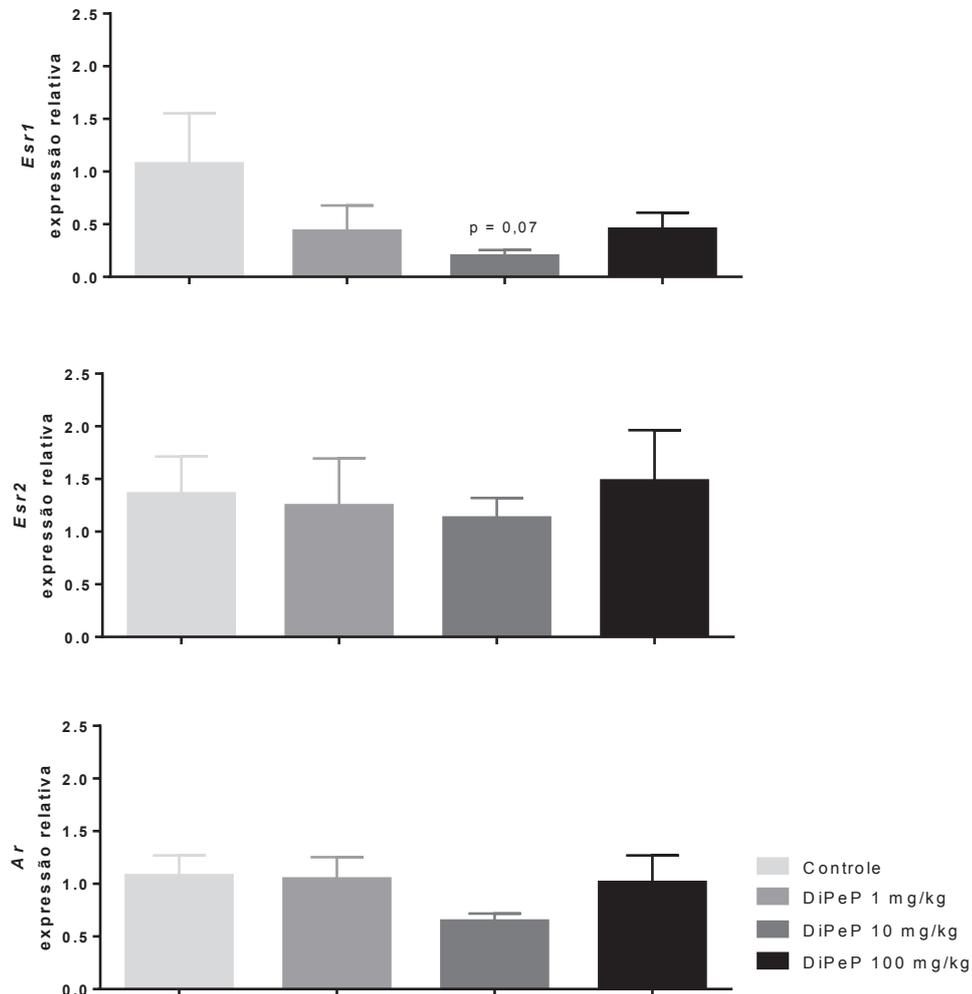
No PND 145-160, a redução na expressão hipofisária de *Esr1* continuou apenas no grupo tratado com DiPeP 100 mg/kg (FIGURA 18). No hipotálamo, foi observada uma tendência a redução na expressão gênica de *Esr1* no grupo tratado com DiPeP 10mg/kg (FIGURA 19).

FIGURA 18 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NA EXPRESSÃO GÊNICA DE *ESR1*, *ESR2* E *AR* NA HIPÓFISE DOS ANIMAIS COM PND 145-160.



Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 5-6; * p < 0,05; ANOVA de uma via seguido de Dunnett).

FIGURA 19 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NA EXPRESSÃO GÊNICA DE *ESR1*, *ESR2* E *AR* NO HIPOTÁLAMO DOS ANIMAIS COM PND 145-160.

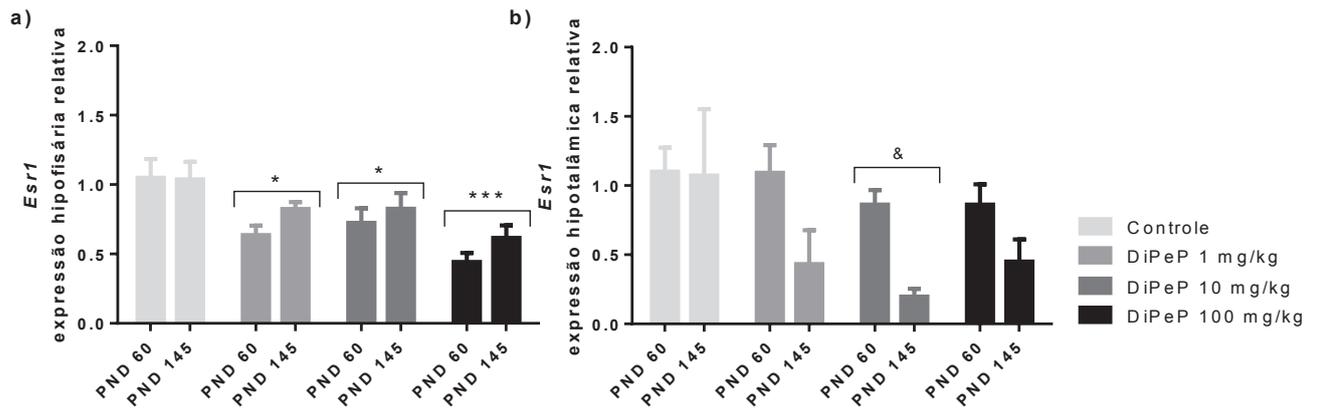


Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 5-6; * p < 0,05; ANOVA de uma via seguido de Dunnett).

Quando comparados a expressão gênica hipofisária e hipotalâmica do *Esr1* (único gene com expressão alterada nos grupos tratados) nos PND 60-65 e PND 145-160, observou-se uma redução da expressão hipofisária em todos os grupos tratados quando comparados com o controle independentemente da idade (p < 0,001), porém sem interação entre idade e tratamento (FIGURA 20a). Já no hipotálamo, houve efeito significativo na idade (p < 0,004), com redução da expressão de *Esr1* nos animais mais velhos, efeito borderline no tratamento (p = 0,06), com redução de *Esr1* nos animais

tratados com DiPeP 10 mg/kg se comparado com animais controles, porém não houve interação significativa entre tratamento e idade (FIGURA 20b).

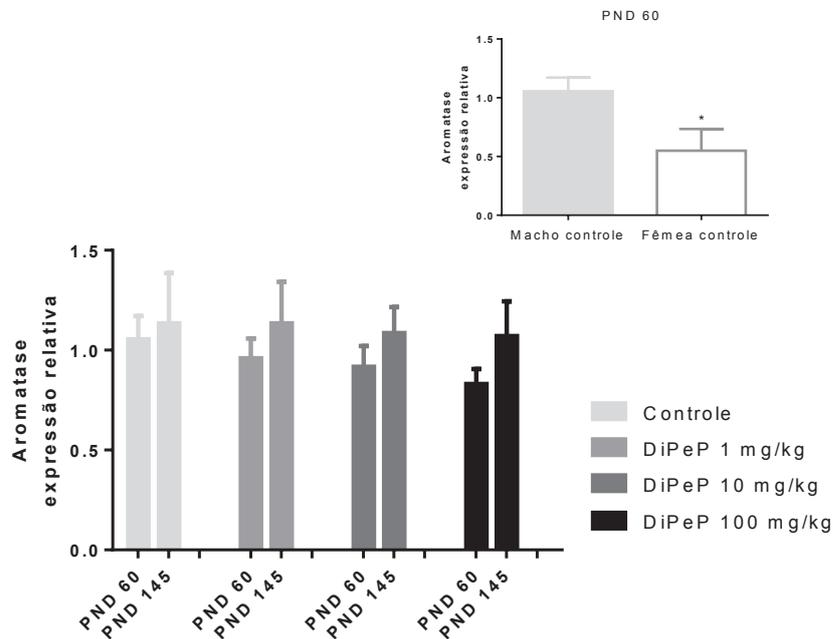
FIGURA 20 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NA EXPRESSÃO GÊNICA HIPOFISÁRIA (A) E HIPOTALÂMICA (B) DE *ESR1* DOS ANIMAIS COM PND 60-65 E 145-160.



Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 4-8; * p < 0,05; *** p < 0,001 [fator tratamento p < 0,001]; & p = 0,03 [fator tratamento p = 0,06]; ANOVA de duas vias seguido de Dunnett).

A expressão gênica da enzima aromatase não se alterou no PND 60-65 e nem no PND 145-160. Também não houve alteração na expressão de aromatase quando realizado a comparação entre os dois períodos avaliados. Entretanto, foi encontrado um dimorfismo sexual em sua expressão no PND 60-65, sendo maior em machos do que em fêmeas (FIGURA 21).

FIGURA 21 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIPEP NA EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA AROMATASE NO HIPOTÁLAMO DOS ANIMAIS COM PND 60-65 E 145-160.



Os valores estão expressos em média \pm EPM (n = 4-8; * p < 0,05; ANOVA de duas vias seguido de Dunnet).

6. DISCUSSÃO

O ambiente hormonal intrauterino é crucial para um desenvolvimento fetal adequado. Ainda, necessita-se de uma quantidade adequada de receptores hormonais, os quais responderão a esse ambiente hormonal intrauterino, além da enzima aromatase, a qual fará a conversão de testosterona a estradiol, garantindo a masculinização de determinadas áreas. Entretanto, com a industrialização de diversos produtos, gestantes estão constantemente expostas a diversas substâncias, algumas delas capazes de modificar os níveis hormonais. Em um estudo realizado pelo nosso laboratório, no qual urinas de 50 gestantes foram testadas a fim de se avaliar o nível de exposição a alguns desreguladores endócrinos, foram encontrados metabólitos do DiPeP em todas as amostras (BERTONCELLO SOUZA *et al*, 2018). A exposição a esse ftalato, sintetizado a partir de um subproduto da produção de etanol através da cana de açúcar (PETROM, 2016), foi relatada apenas na população brasileira (ROCHA *et al*, 2017). Apesar do uso do DiPeP ter sido proibido no Brasil em produtos de higiene pessoal e em cosméticos (ANVISA, 2016), o mesmo pode ter outras

aplicabilidades, como na indústria alimentícia, por exemplo. A European Chemicals Agency (ECHA) classificou esse ftalato como perigoso, possuindo alta toxicidade reprodutiva (ECHA, 2015). Hellwig e colaboradores (1997) avaliaram a toxicidade materna e fetal de 5 ftalatos administrados entre os GD 6 e 15, e o DiPeP, na dose de 1000 mg/kg, apresentou uma taxa de reabsorção fetal de 100%, demonstrando uma toxicidade fetal maior do que a do DEHP. Além disso, o DiPeP é um isômero do DnPP, cujo potencial antiandrogênico é elevado, sendo o mais potente inibidor da testosterona fetal (HANNAS *et al*, 2011). Ainda, foi demonstrado pelo nosso laboratório que o DiPeP reduz a testosterona fetal de ratos de uma maneira mais eficaz que o DnBP (BERTONCELLO SOUZA *et al*, 2018). Tendo em vista essa gama de evidências, o intuito desse estudo foi avaliar as possíveis consequências da exposição ao DiPeP em ratos durante a gestação e lactação, períodos do desenvolvimento hormônio-dependentes, no cérebro e no comportamento da progênie masculina.

Foram avaliados testes comportamentais que são expressos de forma diversa entre os sexos, tanto os relacionados com a cópula e com a motivação sexual, como a mensuração das vocalizações ultrassônicas perante uma fêmea em estro, a preferência a parceiro e o próprio comportamento sexual, como os não relacionados à cópula, como o labirinto em cruz elevado e o *play behavior*. A exposição ao DiPeP em períodos críticos do desenvolvimento parece alterar comportamentos masculinos relacionados somente à cópula, como a preferência ao parceiro e o comportamento sexual. Nesse estudo foi observado uma perda da preferência por fêmeas receptivas no teste de preferência a parceiro em ratos machos expostos ao DiPeP na dose de 1 e 10 mg/kg/dia, sendo essa preferência mantida nos machos controles e tratados com DiPeP 100 mg/kg. Ainda, os animais tratados com a menor dose permaneceram mais tempo explorando o compartimento masculino se comparado com o controle. Nessa mesma dose, houve também um aumento significativo nas latências de monta e de penetração no teste de comportamento sexual, parâmetros que caracterizam a fase pré-copulatória. Todos esses parâmetros alterados avaliam a fase apetitiva do comportamento sexual, ou seja, a fase que antecede a cópula propriamente dita, estando diretamente relacionados com a motivação sexual do rato. Portanto, esses resultados encontrados sugerem que o DiPeP pode afetar a motivação do macho em procurar ou interagir com fêmeas receptivas. Essa preferência do macho por uma fêmea receptiva, assim como o comportamento sexual masculino, são dependentes

da aromatização da testosterona à estradiol (DAVIDSON e ALINSSON, 1969; SÖDERSTEN, 1973), principalmente em períodos críticos do desenvolvimento, no qual algumas estruturas cerebrais estão sendo diferenciadas sexualmente devido à ação de hormônios e outros sinais (BRAND *et al*, 1991; HOUTSMÜLLER *et al*, 1994). Essas alterações encontradas em comportamentos relacionados à cópula já foram observadas em diversos estudos, os quais demonstraram que a exposição a certos ftalatos, tanto na fase adulta (CAPELA *et al*, 2018), quanto no desenvolvimento (DALSENER *et al*, 2006; LEE *et al*, 2006), altera o comportamento sexual de machos. Um ponto interessante a se ressaltar é o fato da alteração na motivação sexual ser encontrada apenas na exposição à dose de 1 e 10 mg/kg/dia, caracterizando uma curva dose-resposta não monotônica. Esse tipo de resposta bifásica é comumente relatado com desreguladores endócrinos e, portanto, já foi descrita em outros estudos com ftalatos em efeitos reprodutivos (DO *et al*, 2012), bem como em efeitos cerebrais e comportamentais (MARTINO-ANDRADE *et al*, 2006; LEE *et al*, 2006; CAPELA *et al*, 2018). O mecanismo de ação responsável por essa curva dose-resposta não monotônica ainda é desconhecido, entretanto, pode estar relacionado com mecanismos de ação dos ftalatos independentes dos usualmente descritos, relacionados com sua ação antiandrogênica, uma vez que efeitos antiandrogênicos do DiPeP foram observados somente na dose de 300 mg/kg (CURI, 2019).

As vocalizações ultrassônicas emitidas pelos machos adultos na presença de uma fêmea receptiva foram contabilizadas com o intuito de complementar os testes comportamentais relacionados à cópula, uma vez que na fase pré-copulatória vocalizações de alta frequência (50-kHz) estão muito relacionadas com o estado motivacional do macho, além de atrair as fêmeas para o acasalamento (THOMAS *et al*, 1981; POMERANTZ *et al*, 1983; DOMBRET *et al*, 2017). Não foi encontrada diferença estatística no número de vocalizações de alta frequência totais dos grupos tratados em relação ao grupo controle. As vocalizações também foram analisadas pelas subdivisões já citadas, dando ênfase às vocalizações do tipo trills e step calls, também chamadas vocalizações de frequência modulada, as quais foram positivamente correlacionadas com comportamentos apetitivos, como a cópula (BURGDORF *et al*, 2008). Ainda que a exposição ao DiPeP em algumas doses causou uma perda de preferência por fêmeas em estro e um aumento nas latências de monta e de penetração, não houve alteração significativa no número de

vocalizações emitidas em presença da fêmea em estro em nenhum grupo tratado. Os resultados de estudos que relacionam a exposição a ftalatos com vocalizações ultrassônicas são diversos, sendo que alguns demonstram uma redução na vocalização (DOMBRET *et al*, 2017) e outros, um aumento na vocalização (CAPELA *et al*, 2018). É importante ressaltar que alguns ftalatos atuam de uma maneira antiandrogênica, alterando a quantidade de AR, e outros acabam atuando de uma maneira mais estrogênica, alterando principalmente a quantidade de ER α . A exposição de ftalatos com ações diferentes em combinação pode gerar diferenças no comportamento e na expressão gênica (CAPELA *et al*, 2019).

Apesar da exposição ao DiPeP ter causado alterações em alguns aspectos relacionados ao comportamento sexual, não houve nenhuma alteração em comportamentos não relacionados à cópula, como o labirinto em cruz elevado e o *play behavior*. O labirinto em cruz elevado foi realizado tanto com o intuito de medir a atividade locomotora, garantindo que os animais testes não teriam nenhum prejuízo locomotor que pudesse interferir no resultado de outros testes comportamentais, quanto para avaliar o nível de ansiedade dos animais. A atividade locomotora foi avaliada pelo número de entradas no braço fechado (CAROBREZ *et al*, 2015), parâmetro no qual não foi observado nenhuma diferença estatística do grupo controle para os grupos tratados, demonstrando que a exposição ao DiPeP não causou prejuízos locomotores. Já a ansiedade do animal foi mensurada pelo tempo gasto no braço aberto, uma vez que o mesmo é desprotegido, aversivo, e o animal só permanece nesse braço se estiver mais curioso do que ansioso (CAROBREZ *et al*, 2015). Apesar de alguns estudos com ftalatos demonstrarem que a exposição em períodos críticos pode reduzir o tempo gasto no braço aberto, caracterizando uma resposta ansiogênica (CARBONE *et al*, 2013; XU *et al*, 2015), nesse estudo não houve diferença estatística nesse parâmetro do grupo controle para os grupos tratados com DiPeP. Portanto, a exposição ao DiPeP em períodos críticos do desenvolvimento fetal parece não promover comportamento tipo-ansioso nos machos. Ainda, esse teste foi realizado em dois períodos diferentes, com diferentes irmãos: no PND 25 a 27, período em que os animais ainda não atingiram à puberdade, e, portanto, os efeitos ativacionais dos hormônios sexuais ainda não se fizeram presentes e algumas estruturas cerebrais ainda estão se diferenciando; e no PND 70 a 73, período em que os animais já são adultos e, com isso, pode-se avaliar a combinação dos efeitos

organizacionais e ativacionais dos hormônios sexuais, sendo que todas as estruturas cerebrais já estão totalmente diferenciadas (ZIMMERBERG e FARLEY, 1993). Apesar disso, não foi observada diferença estatística no tempo gasto no braço aberto, principal parâmetro que avalia a ansiedade do animal, entre os dois períodos avaliados. Ainda, alguns estudos demonstram que há diferença entre fêmeas e machos nesse parâmetro, sendo que as fêmeas passam mais tempo no braço aberto do que os machos (PELLOW *et al*, 1985; JOHNSTON e FILE, 1991; ZIMMERBERG e FARLEY, 1993). Esse dimorfismo sexual parece estar relacionado com os efeitos ativacionais e organizacionais de hormônios femininos (ZIMMERBERG e FARLEY, 1993), como o estradiol. Entretanto, nesse estudo não foi encontrada diferença estatística entre os machos e fêmeas controle no tempo gasto no braço aberto. Uma possível justificativa para essa divergência de resultados é que o dimorfismo sexual ocorre principalmente com fêmeas em pró-estro (MARCONDES *et al*, 2001) e, para esse estudo, foram utilizadas fêmeas em estro. Além disso, esse dimorfismo sexual não é observado em qualquer período da vida (IMHOF *et al*, 1993) e alguns estudos falham em mostra-lo (CARBONE *et al*, 2013).

O *play behavior* é um teste dependente do efeito organizacional e ativacional da testosterona e, por isso, ocorre de uma maneira mais intensa em ratos machos durante a infância (VANDERSCHUTEN e TREZZA, 2013). Foi realizado entre os PND 37 e 40 justamente devido ao pico da produção de testosterona pelos machos, com o intuito de avaliar os possíveis efeitos da redução da testosterona fetal causada pelo DiPeP reportada em um estudo do laboratório (BERTONCELLO SOUZA *et al*, 2018). Entretanto, diferentemente do esperado, não houve diferença estatística nos dois comportamentos de brincadeiras avaliados (*pouncing* e *pinning*) entre o grupo controle e os grupos tratados. Esses resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Hotchkiss *et al* (2003), no qual o fungicida antiandrogênico vinclozolin reduziu o comportamento de *pinning*. É importante ressaltar, porém, que o vinclozolin atua bloqueando diretamente o receptor androgênico, mecanismo de ação similar à flutamida. Inclusive, resultados de redução do *play behavior* também foi encontrado com a flutamida (CASTO *et al* 2003). Por outro lado, os ftalatos possuem mecanismo de ação diverso, atuando nas células de Leydig e de Sertoli do testículo. Portanto, apesar de ambas as substâncias serem antiandrogênicas, elas atuam com potências diferentes (MYLCHREEST *et al*, 1999), sendo o vinclozolin o mais potente. Ou seja,

o vinclozolin e a flutamida causam efeitos antiandrogênicos como hipospádias, criptorquidismo, retenção do mamilo e redução da AGD em uma dose menor do que os ftalatos. Isso pode explicar a diferença nos resultados do *play behavior* encontrados com o vinclozolin, a flutamida e o DiPeP. Além disso, o único estudo que avaliou os efeitos da exposição a ftalatos no play behavior foi realizado em humanos (SWAN *et al*, 2010). Nesse estudo, foi encontrado uma relação entre a exposição a ftalatos durante a gestação e um comportamento de brincadeira mais feminilizado em crianças do sexo masculino. Como já mencionado, as doses utilizadas em estudos animais são cerca de 3 a 4 vezes maiores do que as doses em que os humanos são expostos. Entretanto, estudos epidemiológicos vêm mostrando associações entre a exposição a ftalatos, principalmente em períodos críticos do desenvolvimento, com efeitos antiandrogênicos no sistema reprodutivo (DUTY *et al*, 2003; SWAN *et al*, 2005; MARTINO-ANDRADE *et al*, 2016). Tudo isso indica que os humanos podem ser mais sensíveis à exposição a ftalatos do que os roedores e, além disso, são expostos a uma mistura de desreguladores endócrinos que podem atuar de maneira sinérgica, potencializando os efeitos tóxicos. Isso pode explicar a diferença nos resultados encontrados nos estudos epidemiológicos e nos testes comportamentais em animais.

Para complementar os resultados dos testes comportamentais, também foram avaliadas as expressões gênicas de receptores hormonais esteroidais sexuais (na hipófise e no hipotálamo) e da enzima aromatase (no hipotálamo), uma vez que essa expressão se dá de forma diversa entre os sexos e esses receptores são, muitas vezes, responsáveis pelas diferenças encontradas no comportamento. A análise da expressão gênica foi realizada em dois períodos: no PND 60-65 e no PND 145-160. O intuito foi avaliar se houve diferença na expressão gênica dos receptores hormonais em um período logo após o aparecimento da puberdade nos machos, relativamente próximo do período de exposição, e depois do animal atingir a maturidade sexual, período bem distante do qual se deu a exposição. No PND 60-65, constatou-se uma redução significativa da expressão de *Esr1* na hipófise de machos tratados com todas as doses de DiPeP se comparado com os machos controle. Já no PND 145-160, essa redução permaneceu apenas nos machos tratados com DiPeP 100 mg/kg. Quando comparado os dois períodos avaliados, todos os grupos tratados com DiPeP tiveram uma redução na expressão hipofisária de *Esr1* independentemente da idade. Já foi demonstrado que os ftalatos têm a capacidade de interagir com receptores estrogênicos (SOHONI e SUMPTER, 1998; SINGH e LI, 2012), possuindo, portanto,

tanto atividade antiandrogênica, quanto estrogênica. Além disso, o DEHP parece ser capaz de reprimir a expressão ovariana de *Esr1* em camundongos em até três gerações após a exposição ter ocorrido (KAWANO *et al*, 2014). Como já mencionado, o ER α é regulado pelo estrogênio, sendo que este reduz a expressão de *Esr1*, reduzindo a quantidade de ER α (SIMERLY e YOUNG, 1991; LAUBER *et al*, 1991). Ratos machos que são estrogenizados no período neonatal possuem uma redução na expressão de *Esr1* na hipófise (TENA-SEMPERE *et al*, 2001), semelhantemente aos resultados obtidos nesse estudo. Entretanto, essa redução da expressão gênica de *Esr1* na hipófise, causada pela exposição ao estrógeno em períodos críticos, vem acompanhada de um aumento da mesma no hipotálamo (TENA-SEMPERE *et al*, 2001), o que diverge dos resultados encontrados. No hipotálamo, estrutura responsável pela maior parte dos comportamentos que são dimórficos entre os sexos, principalmente os relacionados à cópula, não foram encontradas diferenças na expressão *Esr1* no PND 60-65. No PND 145-160, entretanto, observou-se uma redução borderline ($p = 0,07$) da expressão hipotalâmica de *Esr1* nos machos tratados com DiPeP 10 mg/kg. Quando comparados os dois períodos avaliados, observou-se uma redução da expressão hipotalâmica significativa nos animais mais velhos, com níveis consideravelmente mais baixos em animais tratados com DiPeP (mesmo que não significativo). Ou seja, após um longo período em que cessou a exposição (PND 145-160), há uma redução significativa na expressão hipotalâmica de *Esr1*.

Além disso, houve uma redução na motivação sexual de machos expostos a 1 e 10 mg/kg de DiPeP. Muitos estudos apontam a importância do ER α em comportamentos agressivos e na fase consumatória do comportamento sexual (OGAWA *et al*, 1997; OGAWA *et al*, 1998). ER α localizados na MPOA parecem ser cruciais para o comportamento sexual de machos (PORTILLO *et al*, 2006). Recentemente demonstrou-se que esse mesmo receptor, especificadamente os localizados no VHM, também é importante para a fase apetitiva do comportamento sexual de machos, relacionada à motivação sexual (LEE *et al*, 2014). Portanto, a redução da expressão de *Esr1* observada nos machos tratados com DiPeP pode explicar os resultados comportamentais encontrados. Diversos estudos demonstram o potencial de determinados desreguladores endócrinos, inclusive ftalatos, em afetar roedores mesmo depois de um longo período em que se encerrou exposição, podendo inclusive afetar futuras gerações (ANWAY *et al*, 2005; DOYLE *et al*, 2013; KAWANO *et al*, 2014; QUINNIES *et al*, 2015). Esses efeitos transgeracionais normalmente estão

relacionados com mecanismos epigenéticos, sendo que já foi demonstrado a capacidade de alguns ftalatos em desmetilar o promotor do gene *Ers1* em células humanas do câncer de mama (MCF7), alterando assim, sua expressão gênica (CHAN KANG e MU LEE, 2005).

Quando avaliada a expressão de *Esr1*, *Esr2*, *Ar* e aromatase nos PND 60-65, observou-se apenas dimorfismos na expressão dos ER α (*Esr1*) e β (*Esr2*) na hipófise, sendo menor em fêmeas do que em machos controle. No hipotálamo, estrutura importante para a regulação comportamental, a expressão da enzima aromatase se deu de forma dimórfica, sendo menor em fêmeas, corroborando com outros estudos (WAGNER e MORRELL, 1996; LAUBER *et al*, 1997). A expressão hipotalâmica do ER α (*Esr1*) foi menor nas fêmeas do que nos machos controles, indo de encontro aos achados de outros estudos (SIMERLY e YOUNG, 1991; LAUBER *et al*, 1991). Ainda, a expressão hipotalâmica dos outros receptores hormonais estudados não foi dimórfica. Contudo, é importante ressaltar que apenas os receptores de algumas regiões hipotalâmicas específicas são dimórficos e responsáveis pela apresentação do comportamento sexual. Nesse estudo, foi avaliada a expressão gênica do hipotálamo como um todo, não havendo distinção de núcleos. Além disso, a expressão gênica, analisada pelos níveis de mRNA, nem sempre condiz com a quantidade de receptores presentes em um tecido, uma vez que existem diversos processos regulatórios entre essas duas etapas.

Todos esses resultados sugerem que a exposição ao DiPeP pode alterar a preferência por fêmeas receptivas e a motivação sexual dos machos. Os comportamentos relacionados à cópula parecem ser mais sensíveis que outros comportamentos, sugerindo que determinadas áreas cerebrais possam ser mais sensíveis à ação desse ftalato, principalmente as áreas relacionadas com a parte apetitiva do comportamento sexual. Além disso, a fim de tentar se confirmar se realmente é o ER α o responsável pelas alterações comportamentais, a análise da expressão gênica e/ou imuno-histoquímica deve ser realizada nesses núcleos hipotalâmicos em particular. Como mencionado, foi encontrada uma curva dose-resposta não monotônica em relação ao comportamento. Para futuros estudos, seria interessante a utilização de doses menores, com a possibilidade de se encontrar efeitos mais significativos, uma vez que diversos estudos mostram efeitos comportamentais dos ftalatos em doses baixas (LEE *et al*, 2006; DOMBRET *et al*, 2017; CAPELA *et al*, 2018; CAPELA *et al*, 2019). O presente estudo, um dos únicos

realizados com o DiPeP, foi o primeiro estudo comportamental acerca desse ftalato, sendo, portanto, importante como ponto de partida para futuros estudos sobre essa substância.

7. CONCLUSÃO

O objetivo desse trabalho foi investigar as possíveis alterações da exposição em roedores ao DiPeP durante a gestação e lactação sobre a expressão gênica de receptores hormonais e enzima que são dimórficos entre os sexos e responsáveis por determinados comportamentos, bem como sobre o comportamento da progênie masculina. A exposição ao DiPeP em períodos críticos do desenvolvimento alterou somente comportamentos relacionados à motivação sexual. Ainda, o DiPeP também foi capaz de reduzir a expressão hipofisária e hipotalâmica de *Esr1*. Com base nesses achados, pode-se concluir que regiões cerebrais responsáveis pela fase apetitiva do comportamento sexual parecem ser mais sensíveis à exposição ao DiPeP em períodos críticos do que outras. Ainda, essas alterações comportamentais podem estar relacionadas com as alterações na expressão de *Esr1* na hipófise e no hipotálamo causadas pelo DiPeP.

8. REFERÊNCIAS

AGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Research Protocols** **1**, v.1, n. 2, p. 203–209, 1997.

ANDERSON, D. K.; RHEES, R. W.; FLEMING, D. E. Effects of prenatal stress on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) of the rat brain. **Brain Research**, n. 332 v. 1, p. 113-118, 1985.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução no 83**. Regulamento técnico mercosul sobre lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2859796/RDC_83_2016_.pdf/940b7b9d-9806-429e-ae11-f8ea0a375bd3>. Acesso em: 10 jul. 2017.

ANWAY, M. D.; CUPP, A. S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. **Science**, v. 308, n. 5727, p. 1466–1469, 2005.

ARAI, Y., SEKINE, Y., MURAKAMI, S. Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. **Neuroscience Research**, v. 25, n. 4, p. 403–407, 1996.

ARENDASH, G. W.; GORSKI, R. A. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 10, n. 1, p. 147-154, 1983.

ARNOLD, A. P.; MCCARTHY, M. M. Sexual Differentiation of the Brain and Behavior: A Primer. **Neuroscience in the 21st Century**, p. 1-30, 2016.

AUGER, J.; KUNSTMANN, J. M.; CZYGLIK, F.; JOUANNET, P. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 281-285, 1995.

BAKKER, J.; BAUM, M. J. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2008.

BANGASSER, D. A.; ZHANG, X.; GARACHH, V.; HANHAUSER, E.; VALENTINO, R. J. Sexual dimorphism in locus coeruleus dendritic morphology: a structural basis for sex differences in emotional arousal. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 3, p. 342-351, 2011.

BAY, K.; ANDERSSON, A.M. Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders. **International Journal of Andrology**, v.34, n. 2, p. 97-109, 2011.

BARRETT, E. S.; PATISAUL, H. B. Endocrine disrupting chemicals and behavior: Re-evaluating the science at a critical turning point. **Hormones and Behavior**, v. 96, p. A1-A6, 2017.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERTONCELLO SOUZA, M.; PASSONI, M. T.; PÄLMKEC, C.; MEYERA, K. B.; VENTURELLIA, A. C.; ARAÚJO, G.; CASTILHOS, B. S.; MORAIS, R. N.; DALSENTER, P. R.; SWAN, S. H.; KOCHC, H. M.; MARTINO-ANDRADEA, A. J. Unexpected, ubiquitous exposure of pregnant Brazilian women to diisopentyl phthalate, one of the most potent antiandrogenic phthalates. **Environment International**, v. 119, p. 447–454, 2018.

BLAKE, B. E.; MCCOY, K. A. Hormonal programming of rat social play behavior: Standardized techniques will aid synthesis and translation to human health. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 184-197, 2015.

BLIZARD, D. A.; LIPPMAN, H. R.; CHEN, J. J. Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. **Physiology & Behavior**, v. 14, n. 5, p. 601-608, 1975.

BOARETO, A. C.; MULLER, J. C.; DALSENTER, P. R. Endocrine disrupting chemicals on the animal reproduction. In: DAHNOF L T. **Animal reproduction: new research developments**. New York: Nova Science Publishers Inc, 2009.

BRAND, T.; KROONEN, J.; MOS, J.; SLOB, A.K. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. **Hormones and Behavior**, v. 25, n. 3, p. 323-341, 1991.

BROCK, O.; DE MEES, C.; BAKKER, J. Hypothalamic Expression of Oestrogen Receptor α and Androgen Receptor is Sex-, Age- and Region-Dependent in Mice. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 27, n. 4, p. 264-276, 2015.

BURGDORF, J.; KROES, R. A.; MOSKAL, J. R.; PFAUS, J. G.; BRUDZYNSKI, S. M.; PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. **Journal of Comparative Psychology**, v. 122, n. 4, p. 357-367, 2008.

BURLINGTON, H.; LINDEMAN, V. Effect of ddt on testes and secondary characters of white leghorn cockerels **Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine**, v. 74, p. 48-51, 1950.

CAPELA, D.; DOMBRET, C.; POISSENOT, K.; POIGNANT, M.; MALBERT-COLAS, A.; FRANCESCHINI, I.; KELLER, M.; MHAOUTY-KODJA, S. Adult male mice exposure to nonylphenol alters courtship vocalizations and mating. **Scientific Reports**. v. 8, n. 1, a. 2988, 2018.

CAPELA, D.; POISSENOT, K.; DOMBRET, C.; KELLER, M.; FRANCESCHINI, I.; MHAOUTY-KODJA, S. Effects of combined exposure of adult male mice to di-(2-ethylexyl) phthalate and nonylphenol on behavioral and neuroendocrine responses. **Chemosphere**. 2019.

CARBONE, S.; PONZO, O. J.; N.GOBETTO, N.; SAMANIEGO, Y. A.; REYNOSO, R.; SCACCHI, P.; MOGUILEVSKY, J.A.; CUTRERA, R. Antiandrogenic effect of perinatal

exposure to the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate increases anxiety-like behavior in male rats during sexual maturation. **Hormones and Behavior**, v.63, n.5, p. 692-699, 2013.

CAROBREZ, A. P.; KINCHESKI, G. C.; BERTOGLIO, L. J. Elevated plus maze. In: **Encyclopedia of Psychopharmacology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 603-606, 2015.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**, São Paulo: Edições Melhoramentos, 1964.

CASTO, J. M.; WARD, O. B.; BARTKE, A. Play, copulation, anatomy, and testosterone in gonadally intact male rats prenatally exposed to flutamide. **Physiology & Behavior**, v. 79 n. 4-5, p. 633-41, 2003.

CHAN KANG, S.; MU LEE, B. DNA Methylation of Estrogen Receptor α Gene by Phthalates. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 68, n. 23-24, p. 1995–2003, 2005.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

COALE, A.J.; WATKINS, S.C. **The decline of fertility in Europe**, New Jersey: Princeton University Press, 1986.

CONSTANZO, L S. **Fisiologia**. 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

COOKE, B. M.; TABIBNIA, G.; BREEDLOVE, S. M. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 13, p. 7538-7540, 1999.

COOKE, B. M.; BREEDLOVE, S. M.; JORDAN, C. L. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 2, p. 336-346, 2003.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O nosso futuro roubado**, Porto Alegre: LPM, 1997.

CURI, T. Z. **Efeitos da exposição in utero e lactacional ao diisopentil ftalato (DiPeP) sobre o sistema reprodutor de ratos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 34-44, 2019.

DALSENTER, P. R. **Reproduktionstoxikologische und toxikokinetische Untersuchungen an männlichen Ratten, die gegenüber γ -Hecachlorcyclohexan (Lindan) während der Laktationsperiode exponiert waren.** Tese (Doutorado em Toxicologia) – Universidade Freien. Berlin, p. 42-43, 1996.

DALSENTER, P. R.; SANTANA, G. M.; GRANDE, S. W.; MARTINO-ANDRADE, A. J.; ARAÚJO, S. L. Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. **Human & Experimental Toxicology**, v.25, n. 6, p. 297 – 303, 2006.

DAVIDSON, J. M., ALLINSON, P. A. Effects of Estrogen on the Sexual Behavior of Male Rats. **Endocrinology**, v. 84, n. 6, p. 1365–1372, 1969.

DAVIS, E. C.; POPPER, P.; GORSKI, R. A. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. **Brain Research**, v. 734, n. 1, p. 10-18, 1996.

DO, R. P.; STAHLHUT, R. W.; PONZI, D.; VOM SAAL, F. S.; TAYLOR, J. A. Non-monotonic dose effects of in utero exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular and serum testosterone and anogenital distance in male mouse fetuses. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 614-621, 2012.

DODSON, R. E.; GORSKI, R. A. Testosterone propionate administration prevents the loss of neurons within the central part of the medial peroptic nucleus. **Journal of Neurobiology**, v. 24, n. 1, p. 80 - 88, 1993.

DOMBRET, C.; CAPELA, D.; POISSENOT, K.; PARMENTIER, C.; BERGSTEN E.; PIONNEAU, C.; CHARDONNET, S.; HARDIN-POUZET, H.; GRANGE-MESSENT, V.; KELLER, M.; FRANCESCHINI, I.; MHAOUTY-KODJA, S. Neural Mechanisms Underlying the Disruption of Male Courtship Behavior by Adult Exposure to Di(2-ethylhexyl) Phthalate in Mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 9, p. 097001, 2017.

DOSTAL, L. A.; CHAPIN, R. E.; STEFANSKI, S. A.; HARRIS, M. W.; SCHWETZ, B. A. Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di (2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 95, n. 1, p. 104-121, 1988.

DOYLE, T. J.; BOWMAN, J. L.; WINDELL, V. L.; MCLEAN, D. J.; KIM, K. H. Transgenerational Effects of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate on Testicular Germ Cell Associations and Spermatogonial Stem Cells in Mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 5, p. 1-15, 2013.

DUTY, S. M.; SILVA, M. J.; BARR, D. B.; BROCK, J. W.; RYAN, L.; CHEN, Z.; HAUSER, R. Phthalate exposure and human semen parameters. **Epidemiology**, v. 14, n. 3, p. 269-277, 2003.

European Chemical Agency (ECHA). **Summary of Classification and Labelling**, 2015. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/47421>>. Acesso em: 11 jul. 17.

Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC). **Final Report**, 1998. Disponível em: <<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final>>. Acesso em: 05/09/2017.

EJAREDAR, M.; NYANZA, E. C.; TEN EYCKE, K.; DEWEY, D. Phthalate exposure and childrens neurodevelopment: a systematic review. **Environmental research**, v. 142, p. 51-60, 2015.

FISHER, J. S.; MACPHERSON, S.; MARCHETTI, N.; SHARPE, R. M. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. **Human Reproduction**, v. 18, n. 7, p. 1383-1394, 2003.

FORGER, N. G.; STRAHAN, J. A.; CASTILLO-RUIZ, A. Cellular and molecular mechanisms of sexual differentiation in the mammalian nervous system. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 40, p. 67-86, 2016.

FOSTER, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 140-147, 2006.

FURR, J. R.; LAMBRIGHT, C. S.; WILSON, V. S.; FOSTER, P. M.; GRAY JR, L. E. A short-term in vivo screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation. **Toxicological Sciences**, v. 140, n. 2, p. 403-424, 2014.

GARCIA-FALGUERAS, A.; PINOS, H.; COLLADO, P.; PASARO, E.; FERNANDEZ, R.; JORDAN, C. L.; SEGOVIA, S.; GUILLAMON, A. The role of the androgen receptor in CNS masculinization. **Brain Research**, v. 1035, n. 1, p. 13-23, 2005.

GORSKI, R. A.; GORDON, J. H.; SHRYNE, J. E.; SOUTHAM, A. M. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. **Brain Research**, v. 148, n. 2, p. 333-346, 1978.

GORSKI, R. A.; HARLAN, R. E.; JACOBSON, C. D.; SHRYNE, J. E.; SOUTHAM, A. M. "Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 193, n. 2, p. 529-539, 1980.

GORSKI, R. A. Sexual differentiation of the brain: a model for drug-induced alterations of the reproductive system. **Environmental Health Perspectives**, n. 70, p. 163 - 175, 1986.

GUEST, R.S.; MCDONALD, I.M. Would a decrease in fertility be a threat to living standards in Australia?. **The Australia Economic Review**, v. 34, n. 1, p. 29-44, 2002.

GRAY, T. J.; GANGOLLI, S. D. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. **Environmental Health Perspectives**, v. 65, p. 229, 1986.

GRAY JR, L. E.; OSTBY, J.; FURR, J.; PRICE, M.; VEERAMACHANENI, D. R.; PARKS, L. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 2, p. 350-365, 2000.

GRAY JR, L. E.; FURR, J.; TATUM-GIBBS, K. R.; LAMBRIGHT, C.; SAMPSON, H.; HANNAS, B. R.; FOSTER, P. M. Establishing the Biological Relevance of Dipentyl Phthalate Reductions in Fetal Rat Testosterone Production and Plasma and Testis Testosterone Levels. **Toxicological Sciences**, v. 149, n. 1, p. 178-191, 2015.

HANDA, R. J.; CORBIER, P.; SHRYNE, J. E.; SCHOONMAKER, J. N.; GORSKI, R. A. Differential Effects of the Perinatal Steroid Environment on Three Sexually Dimorphic Parameters of the Rat Brain, **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 4, p. 855–864, 1985.

HANNAS, B. R.; FURR, J.; LAMBRIGHT, C. S.; WILSON, V. S.; FOSTER, P. M. D.; GRAY JR, L. E. Dipentyl Phthalate Dosing during Sexual Differentiation Disrupts Fetal Testis Function and Postnatal Development of the Male Sprague-Dawley Rat with Greater Relative Potency than Other Phthalates. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p. 184–193, 2011.

HELLWIG, J.; FREUDENBERGER, H.; JÄCKH, R. Differential prenatal toxicity of branched phthalate esters in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 501-512, 1997.

HERBST A. L.; ULFELDER, H. POSKANZER, D.C. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal dietilstilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **New England Journal of Medicine** v. 284, n. 15, p. 878-881, 1971.

HINES, M.; ALLEN, L. S.; GORSKI, R. A. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. **Brain Research**, v. 579, n. 2, p. 321-326, 1992.

HOTCHKISS, A. K.; OSTBY, J. S.; VANDENBURGH, J. G.; GRAY JR, L. E. Androgens and environmental antiandrogens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. Suppl 3, p. 435, 2003.

HOUTSMULLER, E. J., BRAND, T., DE JONGE, F. H., JOOSTEN, R. N. J. M. A., VAN DE POLL, N. E., SLOB, A. K. SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 3, p. 535–541, 1994.

HUTCHISON, J. B.; BEYER, C.; HUTCHISON, R. E.; WOZNIAK, A. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53 n.1-6, p. 307-313, 1995.

IMHOF, J. T.; COELHO, Z. M., SCHMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural Brain Research** v. 56, n. 2, p. 177-180, 1993.

JACOBSON, C. D.; CSERNUS, V. J.; SHRYNE, J. E.; GORSKI, R. A. The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. **The Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 10, p. 1142-1147, 1981.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 2, p. 245-250, 1991.

KAROLCZAK, M.; BEYER, C. Developmental sex differences in estrogen receptor- β mRNA expression in the mouse hypothalamus/preoptic region. **Neuroendocrinology**, v. 68, n. 4, p. 229-234, 1998.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; MILLER, R. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. **Environmental health perspectives**, v. 104 n. Suppl 4, p. 715-740, 1996.

KAWANO, M., QIN, X.-Y., YOSHIDA, M., FUKUDA, T., NANSAI, H., HAYASHI, Y., SONE, H. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian ESR1 expression in female mice. **Toxicology Letters**, v. 228, n. 3, p. 235–240, 2014.

KOIFMAN, S.; PAUMGARTTEN, F. J. R. O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 354-55, 2002.

KUDWA, A. E.; MICHPOULOS, V.; GATEWOOD, J. D.; RISSMAN, E. F. Roles of estrogen receptors α and β in differentiation of mouse sexual behavior. **Neuroscience**, v. 138, n. 3, p. 921-928, 2006.

LAUBER, A. H.; MOBBS, C. V.; MURAMATSU, M.; PFAFF, D. W. Estrogen Receptor Messenger RNA Expression in Rat Hypothalamus as a Function of Genetic Sex and Estrogen Dose, **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3180–3186, 1991.

LAUBER, M. E.; SARASIN, A.; LICHTENSTEIGER, W. Transient sex differences of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing rat brain. **Neuroendocrinology**, v. 66, n. 3, p. 173-180, 1997.

LEDOUX, Joseph. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1229-1238, 1998.

LEE, H. C.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. Effects of perinatal exposure to phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n.3, p. 343–352, 2006.

LEE, H., KIM, D. W., REMEDIOS, R., ANTHONY, T. E., CHANG, A., MADISEN, L., ANDERSON, D. J. Scalable control of mounting and attack by *Esr1*+ neurons in the ventromedial hypothalamus. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 627–632, 2014.

LEVINE, H. JØRGENSEN, N.; MARTINO-ANDRADE, A.; MENDIOLA, J.; WEKSLER-DERRI, D.; MINDLIS, I.; SWAN, S. H. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, p. 1-14, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, S-F.; MCKENNA, S. E.; COLOGER-CLIFFORD, A.; NAU, E. A.; SIMON, N. G. Androgen Receptor in Mouse Brain: Sex Differences and Similarities in Autoregulation, **Endocrinology**, v. 139, n. 4, p. 1594–1601, 1998.

MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K.J.; MELO, L.L.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4-5, p.435-440, 2001.

MARTINO-ANDRADE, A. J., GRANDE, S. W., TALSNESS, C. E., GROTE, K., CHAHOUD, I. A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. **Toxicology**, v. 227, n. 3, p. 185–192, 2006.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; MORAIS, R. N.; BOTELHO, G. G. K.; MULLER, G.; GRANDE, S. W.; CARPENTIERI, G. B.; LEÃO, G. M. C.; DALSENER, P. R. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 704-12, 2009.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 1, p. 148-157, 2010.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; LIU, F.; SATHYANARAYANA, S.; BARRETT, E. S.; REDMON, J. B.; NGUYEN, R. H. N.; SWAN, S. H. Timing of prenatal phthalate exposure in relation to genital endpoints in male newborns. **Andrology**, v. 4, n. 4, p. 585-593, 2016.

MIODOVNIK, A.; EDWARDS, A.; BELLINGER, D. C.; HAUSER, R. Developmental neurotoxicity of ortho-phthalate diesters: review of human and experimental evidence. **Neurotoxicology**, v. 41, p. 112-122, 2014.

MIZUKAMI, S.; NISHIZUKA, M.; ARAI, Y. Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. **Experimental Neurology**, v. 79, n. 2, p. 569-575, 1983.

MYLCHREEST, E., CATTLEY, R. C., FOSTER, P. M. D. Male Reproductive Tract Malformations in Rats Following Gestational and Lactational Exposure to Di(n-butyl) Phthalate: An Antiandrogenic Mechanism? **Toxicological Sciences**, v. 43, n. 1, p. 47-60, 1998.

MYLCHREEST, E., SAR, M., CATTLEY, R. C., & FOSTER, P. M. D. Disruption of Androgen-Regulated Male Reproductive Development by Di(n-Butyl) Phthalate during Late Gestation in Rats Is Different from Flutamide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 156, n. 2, p. 81-95, 1999.

NAFTOLIN, F.; RYAN, K. J.; PETRO, Z. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 33, n. 2, p. 368-370, 1971.

OGAWA, S., LUBAHN, D. B., KORACH, K. S., PFAFF, D. W. Behavioral Effects of Estrogen Receptor Gene Disruption in Male Mice. **PNAS**, v. 94, n. 4, p. 1476-1481, 1997.

OGAWA, S., WASHBURN, T. F., TAYLOR, J., LUBAHN, D. B., KORACH, K. S., PFAFF, D. W. Modifications of Testosterone-Dependent Behaviors by Estrogen Receptor- α Gene Disruption in Male Mice. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 5058-5069, 1998.

OGAWA, S.; CHAN, J.; CHESTER, A. E.; GUSTAFSSON, J. Å.; KORACH, K. S.; PFAFF, D. W. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor β gene-deficient (β ERKO) male and female mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 22, p. 12887-12892, 1999.

OLIVEIRA, I. M.; ROMANO, R. M.; DE CAMPOS, P.; CAVALLIN, M. D.; OLIVEIRA, C. A.; ROMANO, M. A. Delayed onset of puberty in male offspring from bisphenol A-treated dams is followed by the modulation of gene expression in the hypothalamic–pituitary–testis axis in adulthood. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 12, p. 2496, 2017.

Organização Mundial da Saúde (OMS), **State of the science of endocrine disruptors chemicals, 2012**. Geneva, Suíça, 2012.

ORIKASA, C., KONDO, Y., HAYASHI, S., MCEWEN, B. S., & SAKUMA, Y. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor β in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 3306-3311, 2002.

PANKSEPP, J. The ontogeny of play in rats. **Developmental psychobiology**, v. 14, n. 4, p. 327-332, 1981.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, M.; ANDREATINI, R.; SCHWARTING, R. K. W.; BRENES, J. C. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? **Psychopharmacology**, v. 231, p. 231: 2567, 2014.

PETROM 2016. Disponível em: <<http://petrom.net.br/produtos/diap/>> Acesso em 01 set. 2017.

PIMENTA, A. *et al.* Cryptorchidism. The clinical implications. **Acta médica portuguesa**, v. 12, n. 1-3, p. 131-6, 1999.

PINOS, H.; COLLADO, P.; RODRIGUEZ-ZAFRA, M.; RODRIGUEZ, C.; SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 73–78, 2001.

POMERANTZ, S. M.; NUNEZ, A. A.; JAY BEAN, N. Female behavior is affected by male ultrasonic vocalizations in house mice. **Physiology & Behavior**, v. 31, n. 1, p. 91–96, 1983.

PORTFORS, C. V. Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rats and Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 28-34, 2007.

PORTILLO, W.; DIAZ, N. F.; CABRERA, E. A.; FERNANDEZ-GUASTI, A.; PAREDES, R. G. "Comparative Analysis of Immunoreactive Cells for Androgen Receptors and Oestrogen Receptor α in Copulating and Non-Copulating Male Rats." **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 168-176, 2006.

QUINNIES, K. M.; DOYLE, T. J.; KIM, K. H.; RISSMAN, E. F. Transgenerational Effects of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Stress Hormones and Behavior. **Endocrinology**, v. 156, n. 9, p. 3077–3083, 2015.

RHEES, R.W.; AL-SALEH, H.N.; KINGHORN, E.W.; FLEMING, D.E.; LEPHART, E.D. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 50, p. 193-199, 1999.

RISSMAN, E. F.; WERSINGER, S. R.; TAYLOR, J. A.; LUBAHN, D. B. Estrogen Receptor Function as Revealed by Knockout Studies: Neuroendocrine and Behavioral Aspects. **Hormones and Behavior**, v. 31, n. 3, p. 232–243, 1997.

ROCHA, B. A., ASIMAKOPOULOS, A. G., BARBOSA, F., KANNAN, K. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 152–162, 2017.

ROSELLI, E. C.; ELLINWOOD, E. W.; RESKO, J. A. Regulation of Brain Aromatase Activity in Rats, **Endocrinology**, v. 128, n. 3, p. 1310–1316, 1991.

ROSELLI, E. C. Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected regions of the rat brain. **Endocrinology**, v. 114, n. 1, p. 192–200, 1984.

ROSELLI, E. C.; RESKI, J. A. The distribution and regulation of aromatase activity in the central nervous system. **Steroids**, v. 50, n. 4–6, p. 495-508, 1987.

ROSELLI, E. C. Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 106, n. 1, p. 143-150, 2007.

SAILLENFAIT, A. M.; SABATÉ, J. P.; GALLISSOT, F. Effects of in utero exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 468-476, 2009.

SAMUELS, E. R.; SZABADI, E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part II: physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 3, p. 254-285, 2008.

SATO, T.; TAKAHIRO MATSUMOTO, T.; HIROTAKA KAWANO, H.; TOMOYUKI WATANABE, T.; UEMATSU, Y.; SEKINE, K.; FUKUDA, T.; AIHARA, K.; KRUST, A.; TAKASHI YAMADA, T.; NAKAMICHI, Y.; YAMAMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; YOSHIMURA, K.;

YOSHIZAWA, T.; METZGER, D.; P.; KATO, S. Brain masculinization requires androgen receptor function. **PNAS**, v. 101, n. 6, p.1673–1678, 2004.

SCHWARZ, J. M.; SHOLAR, P. W.; BILBO, S. D. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 6, p. 948-963, 2012.

SHARPE, R. M. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. **Toxicology Letters**, v. 120, p. 221-232, 2001.

SHARPE, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 91-110, 2006.

SHAH, N. M.; PISAPIA, D. J.; MANIATIS, S.; MENDELSON, M. M.; NEMES, A.; AXEL, R. Visualizing Sexual Dimorphism in the Brain. **Neuron**, v. 43, n. 3, p. 313–319, 2004.

SHAY, D. A.; VIEIRA-POTTER, V. J.; ROSENFELD, C. S. Sexually Dimorphic Effects of Aromatase on Neurobehavioral Responses. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 2018. Article 374.

SIMERLY, R. B.; YOUNG, B. J. Regulation of Estrogen Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Rat Hypothalamus by Sex Steroid Hormones, **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 3, p. 424–432, 1991.

SINGH, S.; LI, S. S.L. Bisphenol A and phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects. **Gene**, v. 494, n. 1, p. 85–91, 2012.

SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 60, n. Suppl. 3, p. 49-49, 2003.

SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; LOUIS, G. M. B.; TOPPARI, J.; ANDERSSON, A. M.; EISENBERG, M. L.; ZIEBE, S. Male reproductive disorders and fertility

trends: influences of environment and genetic susceptibility. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 55-97, 2016.

SÖDERSTEN, P. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 4, n. 3, p. 247-256, 1973.

SOHONI, P.; SUMPTER, J. P. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. **Journal of Endocrinology**, v. 158, n. 3, p.327-340, 1998.

SWAAB, D F.; GARCIA-FALGUERAS, A. Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. **Functional neurology**, v. 24, n. 1, p. 17, 2009.

SWAN, S. H.; MAIN, K. M.; LIU, F.; STEWART, S. L.; KRUSE, R. L.; CALAFAT, A. M.; MAO, C. S.; REDMON, J. B.; TERNAND, C. L.; SULLIVAN, S.; TEAGUE, J. L. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 8, p. 1056-61, 2005.

SWAN, S. H.; LIU, F.; HINES, M.; KRUSE, R. L.; WANG, C.; REDMON, J. B.; SPARKS, A.; WEISS, B. Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 2, p. 259-69, 2010.

TABATADZE, N.; SATO, S. M.; WOOLLEY, C. S. Quantitative Analysis of Long-Form Aromatase mRNA in the Male and Female Rat Brain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, e100628, 2014.

TEMPLE, J. L.; FUGGER, H. N.; LI, X.; SHETTY, S. J.; GUSTAFSSON, J-A.; RISSMAN, E.F. Estrogen Receptor β Regulates Sexually Dimorphic Neural Responses to Estradiol. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 510–513, 2001.

TENA-SEMPERE, M.; GONZÁLEZ, L. C.; PINILLA, L.; HUHTANIEMI, I.; AGUILAR, E. Neonatal Imprinting and Regulation of Estrogen Receptor Alpha and Beta mRNA Expression by Estrogen in the Pituitary and Hypothalamus of the Male Rat. **Neuroendocrinology**, v. 73, n. 1, p. 12–25, 2001.

THOMAS, D. A.; TALALAS, L.; BARFIELD, R. J. Effect of devocalization of the male on mating behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 95, n. 4, p. 630–637, 1981.

TSUKAHARA, S., KAKEYAMA, M., TOYOFUKU, Y. Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 13, p. 1411–1419., 2006.

TSUKAHARA, S., HOJO, R., KURODA, Y., FUJIMAKI, H. Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats. **Neuroscience Letters**, v. 432, n. 1, p. 58–63, 2008.

TSUKAHARA, S. Sex Differences and the Roles of Sex Steroids in Apoptosis of Sexually Dimorphic Nuclei of the Preoptic Area in Postnatal Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 370–376, 2009.

US Environmental Protection Agency (U.S. EPA). **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment**, v. 56, n. 234, p. 63798-63826, 1991.

U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). **Exposure Factors Handbook (1997, Final Report)** Washington, DC, 1997. Disponível em: <EPA/600/P-95/002F a-c.>. Acesso em: 20 fev. 2018.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; TREZZA, V. What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. In: **The Neurobiology of Childhood**. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 189-212.

XU, X.; YANG, Y.; WANG, R.; WANG, Y.; RUAN, Q.; LU, Y. Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate affects anxiety-and depression-like behaviors in mice. **Chemosphere**, v. 124, p. 22-31, 2015.

WAGNER, C. K.; MORRELL, J. I. Distribution and steroid hormone regulation of aromatase mRNA expression in the forebrain of adult male and female rats: A cellular-level analysis using in situ hybridization. **Journal of Comparative Neurology**, v. 370, n. 1, p. 71-84, 1996.

YOKOSUKA, M.; OKAMURA, H.; HAYASHI, S. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor- α immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 389, n. 1, p. 81-93, 1997.

YOUNG, W. J.; CHANG, C. Ontogeny and Autoregulation of Androgen Receptor mRNA Expression in the Nervous System. **Endocrine**, v. 9, n. 1, p. 79–88, 1998.

ZIMMERBERG, B., FARLEY, M. J. Sex differences in anxiety behavior in rats: Role of gonadal hormones. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 6, p. 1119–1124, 1993.

ZOMBRANO, E.; GUZMÁN, C.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; DURAND-CARBAJAL, M.; NATHANIELSZ, P. W. Fetal programming of sexual development and reproductive function. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 382, p. 538–549, 2014.