

**Giuliana Gelbcke Kasecker Botelho**

**EFEITOS REPRODUTIVOS E ENDÓCRINOS DO DI(2-ETILEXIL)FTALATO  
(DEHP) ISOLADO E ASSOCIADO A ANTIOXIDANTES EM RATOS WISTAR**

**Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do título de Doutor em  
Farmacologia, pelo Curso de Pós-Graduação  
em Farmacologia do Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter**

**Curitiba – PR**

**2009**

Dedico este trabalho ao meu marido Renato e à minha filha Helena  
que souberam compreender as minhas ausências  
e participaram ativamente das minhas realizações.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter** pela confiança nas minhas idéias e pelo apoio e orientação durante todo o trabalho;

Aos meus colegas de pós-graduação que me proporcionaram ótimos momentos, em especial às minhas amigas **Aedra C. Búfalo, Juliane Muller, Ana Claudia Boareto, Amanda Pereira, Stéfani Rossi, Adriana Christoff, Munisa Golin e Luciana Pauka** que me auxiliaram na realização dos experimentos e tornaram meus dias mais leves e agradáveis;

Ao **Prof. Dr. Anderson J. Martino-Andrade** e à **Prof. Dra. Rosana N. de Moraes** pela participação na orientação e na execução de várias etapas deste trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia e do Biotério pela amizade e auxílio técnico;

Aos meus amigos **Marcos Vinícius Tranquilim, Ricardo Coelho Lehmkuhl, Zara Bortolini e Karen Regina Lemos** que souberam estar presentes, mesmo à distância e me ajudaram a cuidar da minha família;

Ao meu pai **Antonio**, às minhas mães **Dil e Nena** e aos meus irmãos **Vanessa e Luciano** pelo apoio e incentivo;

Ao meu marido **Renato** pelo companheirismo e dedicação incondicionais;

À minha filha **Helena** que tornou esta fase da minha vida imensamente mais feliz e emocionante.

Se as coisas são inatingíveis...ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!

(Mário Quintana)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE SIGLAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Efeitos ambientais e legislação.....</i>	4
1.2 <i>Ftalatos e DEHP: exposição e toxicidade.....</i>	8
1.3 <i>Estresse oxidativo e ftalatos: efeitos sobre o sistema endócrino e a fertilidade.....</i>	13
1.4 <i>Antioxidantes.....</i>	16
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Objetivos gerais.....</i>	19
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	19
2.2.1 <i>Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono.....</i>	19
2.2.2 <i>Experimento DEHP e antioxidantes.....</i>	19
2.2.3 <i>Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal.....</i>	20
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 <i>Substâncias e reagentes utilizados.....</i>	21
3.2 <i>Protocolos experimentais.....</i>	21
3.2.1 <i>Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono.....</i>	21
3.2.2 <i>Experimento DEHP e antioxidantes.....</i>	23
3.2.3 <i>Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal.....</i>	27
3.3 <i>Análises laboratoriais.....</i>	29

3.3.1	<i>Histologia e imuno-histoquímica testiculares</i> .....	29
3.3.2	<i>Dosagem de testosterona</i> .....	31
3.3.3	<i>Dosagem de colesterol</i> .....	34
3.3.4	<i>Dosagem de tiroxina (T4)</i> .....	34
3.3.5	<i>Indicadores de estresse oxidativo</i> .....	35
3.4	<i>Análise estatística</i> .....	37
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<i>Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono</i> .....	38
4.2	<i>Experimento DEHP e antioxidantes</i> .....	44
4.2.1	<i>Dados da gestação</i> .....	44
4.2.2	<i>Dados das fêmeas</i> .....	45
4.2.3	<i>Dados dos descendentes machos no 2º dia pós-natal (pnd 2)</i> .....	46
4.3	<i>Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal</i> .....	55
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
5.1	<i>Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono</i> .....	65
5.2	<i>Experimento DEHP e antioxidantes</i> .....	68
5.3	<i>Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal</i> .....	73
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Propriedades físico-químicas do DEHP .....	2
Figura 2	Estrutura química da vitamina C .....	17
Figura 3	Estrutura química do resveratrol .....	18
Figura 4	Referências anatômicas (indicadas pelas setas) para a mensuração da distância anogenital, definida como a distância entre o centro do ânus e o centro da prega genital.....	26
Figura 5	Paquímetro digital utilizado para a mensuração da distância anogenital dos machos (pnd 2) ( <b>A</b> ) e mensuração da distância anogenital sendo realizada ( <b>B</b> ).....	26
Figura 6	Posição dos testículos nos machos (pnd 2).....	26
Figura 7	Avaliação da ocorrência de separação prepucial através da retração do prepúcio e exposição da glândula. Separação prepucial incompleta ( <b>A</b> ) e completa ( <b>B</b> ).....	29
Figura 8	Fotomicrografia de corte histológico do testículo de um animal (pnd 2) cuja progenitora foi exposta ao DEHP na dose de 500 mg/kg/dia, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Notar a presença de gonócitos multinucleados (indicados pelas setas) nas cordas seminíferas. Coloração HE. Aumento de 400x .....	30
Figura 9	Massa corporal média (g) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. ....	38
Figura 10	Valores dos pesos do fígado em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. ....	39
Figura 11	Valores dos pesos dos rins em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol.....	39
Figura 12	Valores dos pesos dos testículos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de	



	Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol.....	40
Figura 13	Valores dos pesos dos epidídimos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol.....	40
Figura 14	Valores dos pesos da próstata em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol.....	41
Figura 15	Valores dos pesos da vesícula seminal em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol.....	41
Figura 16	Atividade específica da GST hepática de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol.....	42
Figura 17	Atividade específica da GST testicular de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol.....	43
Figura 18	Atividade sequestradora do radical livre DPPH pelo resveratrol. Como controle negativo, foi utilizado o diluente, Tampão Tris, representado por C. Como controle positivo, foi utilizado o ácido ascórbico, representado no gráfico como AA. ....	44
Figura 19	Valores do peso do fígado em relação ao peso corporal (g/g %) de fêmeas de ratos Wistar submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação.....	46
Figura 20	Valores de massa corporal (g) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação.....	47

- Figura 21 Valores de distância anogenital (mm) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação ..... 48
- Figura 22 Valores do peso do encéfalo em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação ..... 48
- Figura 23 Valores do peso do fígado em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação ..... 49
- Figura 24 Ocorrência de gonócitos multinucleados nas secções avaliadas de cordas seminíferas de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação.. 50
- Figura 25 Fotomicrografias representando secções testiculares dos diferentes grupos experimentais submetidas à análise imuno-histoquímica. As regiões de coloração castanha correspondem às áreas imunomarcadas para a proteína StAR. Aumento de 400 X ..... 51
- Figura 26 Níveis intratesticulares de testosterona de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação ..... 52
- Figura 27 Atividade específica da catalase no fígado de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação ..... 53
- Figura 28 Atividade específica da GST hepática de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação ..... 54
- Figura 29 Concentração de hidroperóxidos lipídicos no fígado de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com

	DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação .....	55
Figura 30	Valores do peso dos testículos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos .....	56
Figura 31	Fotografia dos testículos de um animal do grupo controle (indicado pela letra C) e um animal do grupo da maior dose de DEHP (750 mg/kg) (indicado como D750). Notar a diferença de tamanho, evidenciando a interferência no desenvolvimento testicular induzida pelo DEHP .....	57
Figura 32	Valores do peso da vesícula seminal em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos .....	57
Figura 33	Valores do peso do músculo elevador anal/bulbocavernoso em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos.....	58
Figura 34	Valores do peso dos epidídimos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos .....	58
Figura 35	Valores médios de dias para a ocorrência de separação prepucial em ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos .....	59
Figura 36	Porcentagem de animais que apresentaram separação prepucial completa. As barras indicam a porcentagem de animais nas diferentes categorias. O número de animais encontra-se dentro das barras..	60
Figura 37	Níveis séricos de colesterol de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos.....	61

Figura 38	Níveis de colesterol no tecido testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos .....	61
Figura 39	Níveis de colesterol total testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos.....	62
Figura 40	Níveis de testosterona sérica de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos.....	63
Figura 41	Níveis de testosterona no tecido testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos .....	63
Figura 42	Níveis de testosterona total testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos .....	64
Figura 43	Níveis de tiroxina (T4 total) sérica de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos.....	64

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Dados referentes à gestação de fêmeas de ratos Wistar submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação ..... 45
Tabela 2	Dados de massa corporal e massa relativa de órgãos (g/g%) de fêmeas de ratos Wistar submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação..... 45
Tabela 3	Dados referentes à massa corporal e peso relativo dos órgãos (g/g%) de ratos Wistar machos expostos ao DEHP em três diferentes doses durante 30 dias consecutivos..... 56

**LISTA DE SIGLAS**

<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASTM</b>	<i>American Society for Testing and Materials</i>
<b>BBP</b>	benzilbutil ftalato
<b>BHT</b>	hidroxitolueno butilado
<b>CAT</b>	catalase
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
<b>DAB</b>	3,3-diaminobenzidina
<b>DAG</b>	distância anogenital
<b>DBP</b>	dibutil ftalato
<b>DEHA</b>	adipato de di-2-etilexil
<b>DEHP</b>	di(2-etilexil)ftalato
<b>DHEA</b>	deidroepiandrosterona
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Immunoassay</i>
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i>
<b>ERMO</b>	Espécies reativas do metabolismo do oxigênio
<b>GMN</b>	gonócitos multinucleados
<b>GSH</b>	glutaciona reduzida
<b>GST</b>	glutaciona-S-transferase
<b>HAM</b>	hormônio anti-Mülleriano
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>InsI3</b>	<i>insulin-like factor 3</i>
<b>LDL</b>	lipoproteína de baixa densidade
<b>LPO</b>	lipoperoxidação
<b>MEHP</b>	mono(etilexil)ftalato
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	receptor ativado por proliferadores de peroxissomas

<b>PVC</b>	policloreto de vinila
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	RNA mensageiro
<b>StAR</b>	proteína regulatória aguda da esteroidogênese
<b>T4</b>	tiroxina
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>2-EH</b>	2-etilexanol

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

<b>%</b>	percentual
<b>®</b>	marca registrada
<b>dL</b>	decilitros
<b>g</b>	gramas
<b>gd</b>	dia de gestação
<b>kg</b>	quilograma
<b>ld</b>	dia de lactação
<b>mg</b>	miligramas
<b>mL</b>	mililitro
<b>n</b>	número de animais por grupo
<b>nm</b>	nanomoles
<b>nº</b>	número
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>p</b>	nível de significância estatística
<b>pg</b>	picogramas
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>pnd</b>	dia pós-natal
<b>r</b>	coeficiente de correlação
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro



## RESUMO

Ftalatos são substâncias químicas empregadas em vários produtos industrializados e são suspeitos de induzir uma série de alterações reprodutivas em animais e humanos. O presente trabalho teve como objetivo o estudo da influência do di-2(etilexil) ftalato (DEHP) no trato reprodutivo masculino em dois períodos distintos, neonatal e pubertal, com ênfase nas implicações do estresse oxidativo e das alterações hormonais no desenvolvimento reprodutivo nestas fases. Desta forma, em um primeiro experimento, fêmeas de ratos Wistar foram expostas, por via oral, ao DEHP (500 mg/kg/dia) isolado e associado a substâncias com propriedades antioxidantes (vitamina C e resveratrol) do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Foram avaliados no segundo dia pós-natal dois descendentes machos de cada ninhada, em relação ao peso corporal, peso relativo do fígado e encéfalo e distância anogenital (DAG). Adicionalmente, os testículos foram removidos e submetidos à dosagem de testosterona, análise histológica e imuno-histoquímica e o fígado à avaliação de indicadores de estresse oxidativo. A vitamina C e o resveratrol isoladamente não afetaram as variáveis reprodutivas e não induziram estresse oxidativo. A exposição das progenitoras ao DEHP isolado e associado a antioxidantes resultou em hepatomegalia nos descendentes, bem como aumentou significativamente a ocorrência de gonócitos multinucleados nas cordas seminíferas dos ratos neonatos. A testosterona e a DAG apresentaram uma tendência à redução nos grupos expostos ao DEHP e a análise imuno-histoquímica qualitativa para proteína StAR não revelou diferenças entre os grupos. A atividade da catalase aumentou apenas nos grupos expostos ao DEHP associado a antioxidantes, enquanto a atividade da GST mostrou-se reduzida em todos os grupos expostos ao DEHP. A lipoperoxidação demonstrou aumento apenas no grupo exposto ao DEHP associado à vitamina C. Numa segunda etapa experimental, ratos Wistar machos de 21 dias receberam, por via oral, DEHP nas doses de 0, 250, 500 e 750 mg/kg/dia durante 30 dias. Ao final do tratamento, observou-se redução no peso relativo dos órgãos dependentes de testosterona, tendência ao atraso na separação prepucial e redução da testosterona sérica com a maior dose de DEHP. A relação entre a dose de DEHP e o colesterol sérico revelou um efeito bifásico. A concentração de colesterol no soro foi reduzida significativamente na dose de 250 mg/kg/dia de DEHP, porém retornou aos valores normais na dose de 750 mg/kg/dia. Os níveis de colesterol no tecido testicular aumentaram com a exposição ao DEHP e os níveis séricos de T4 não foram afetados em nenhuma das doses testadas. Os resultados obtidos a partir destes experimentos indicam que os efeitos distintos do DEHP sobre o colesterol sérico e testicular podem refletir diferentes ações do DEHP na síntese e utilização do colesterol pelas células esteroideogênicas e que a associação do DEHP com substâncias antioxidantes pode não ser benéfica para a preservação da função reprodutiva, podendo, em algumas situações, resultar em uma exacerbação do estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** di (2-etilexil) ftalato; DEHP; estresse oxidativo; vitamina C; resveratrol; colesterol; ratos machos.

## ABSTRACT

Phthalates are chemicals employed in several industrial products and there is a growing body of evidence demonstrating that they induce numerous adverse effects on the reproductive system of animals and humans. This study was carried out to assess the influence of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on male reproductive system at two distinct periods, neonatal and pubertal, emphasizing the implications of oxidative stress and hormonal balance in that developmental phase. In a first step, pregnant Wistar females were exposed by oral route to DEHP (500 mg/kg/day) alone and associated to antioxidants (vitamin C and resveratrol) from gestational day 7<sup>th</sup> to lactational day 2<sup>nd</sup>. Two male pups per litter were randomly selected and necropsied on post natal day 2. The brain and liver were removed and weighed and anogenital distance (DAG) was measured. Additionally, the testicles and liver were removed and submitted to analysis of testosterone levels, histopathology, immunohistochemistry and biomarkers of oxidative stress. Vitamin C and resveratrol alone did not affect the reproductive endpoints and did not induce oxidative stress. Exposure of dams to DEHP alone and associated to antioxidants resulted in hepatomegaly in offspring, and increased significantly the incidence of multinucleated gonocytes in seminiferous cords. Testosterone and DAG presented a trend to decrease on DEHP exposed groups and the qualitative immunohistochemical analysis for StAR protein expression did not reveal any differences between groups. Catalase activity increased only in groups exposed to DEHP associated to antioxidants, though GST activity decreased in all DEHP exposed groups. The levels of hydroperoxides increased only in group exposed to DEHP associated to vitamin C. In a second step, Wistar rats aged 21 days received DEHP by oral route at 0, 250, 500 and 750 mg/kg/day for 30 days and were examined for different reproductive endpoints. At the end of the treatment, significant decreases in relative weight of testosterone-dependent organs, delayed preputial separation and low serum testosterone were observed at the highest DEHP dose. The plot of the relationship between DEHP dose and serum cholesterol revealed a biphasic effect. The concentration of cholesterol in serum was significantly reduced at DEHP 250 mg/kg/day, but then returned to control values at 750 mg/kg/day. Cholesterol levels measured in testicular tissue increased with DEHP treatment. Serum T4 levels were not affected by DEHP at any dose, indicating absence of a link between thyroid hormone status and phthalate effects on cholesterol levels. These results indicate that effect observed in serum and testicular cholesterol levels may reflect distinct effects of DEHP on cholesterol synthesis and usage by steroidogenic cells. Furthermore, the association of DEHP to antioxidants was unable to ameliorate DEHP-induced reproductive changes, and the coadministration of DEHP and these antioxidants might even contribute to an overall increase in oxidative stress.

**Key words:** di(2-ethylhexyl)phthalate; DEHP; oxidative stress; vitamin C; resveratrol; cholesterol; male rats.

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Várias substâncias químicas lançadas no ambiente têm sido enumeradas como causadoras de desequilíbrios orgânicos, agindo particularmente sobre o sistema endócrino dos animais e do homem. Dentre estas substâncias, os poluentes ambientais capazes de provocar desequilíbrios nos níveis de hormônios e, conseqüentemente, de suas funções recebem o nome de desreguladores endócrinos.

Os desreguladores endócrinos causam uma grande variedade de efeitos sobre o sistema endócrino incluindo problemas de desenvolvimento, carcinogenicidade e mutagenicidade (LEE, 2003). Dentre estas substâncias, os ftalatos, aditivos encontrados em inúmeros produtos utilizados no cotidiano tais como plásticos e cosméticos, têm se apresentado como fonte de várias pesquisas no campo da toxicologia ambiental. Como estas substâncias são constantemente liberadas para o ambiente, especialmente a partir dos produtos plásticos, elas estão amplamente distribuídas no ecossistema e têm sido descritas como o poluente ambiental mais abundante produzido pelo homem (LATINI, 2005). O di(2-etilexil) ftalato (DEHP) (figura 1) desperta particular interesse por ser dentre os ftalatos, o mais comumente empregado na indústria dos plásticos produzidos a partir do policloreto de vinila (PVC).

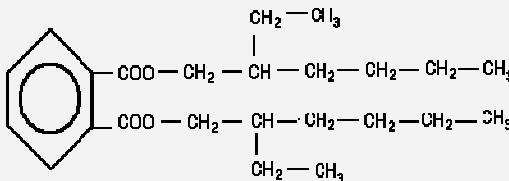
Fórmula	$C_{24}H_{38}O_4$
Sinônimos	Di (2-etilexil) ftalato (DEHP), dioctil ftalato, 1,2-ácido benzenodicarboxílico, bis (2-etilexil) éster
	
Nº de registro-CAS	117-81-7
Peso molecular	390.56
Ponto de fusão	-50°C
Ponto de ebulição	387°C
Solubilidade	45 µg/L em água a 20°C
Densidade	0.99 g/mL

Figura 1. Propriedades físico-químicas do DEHP.

(fonte: JAMES, J. T. e J S CENTER, 2004)

Os estudos a respeito dos ftalatos são numerosos e promissores, porém ainda carecem de muita informação sobre o modo de ação destas substâncias nas diferentes etapas do desenvolvimento dos animais e seres humanos e, principalmente sobre como os efeitos nocivos sobre estes processos podem ser suprimidos ou minimizados.

Dados previamente publicados a respeito da toxicologia dos ftalatos (incluindo o DEHP) indicam baixa toxicidade geral. Entretanto, sob condições apropriadas, o DEHP tem demonstrado apresentar efeitos significativos em uma variedade de sistemas biológicos (PARKS *et al.*, 2000). Disfunções no trato reprodutivo masculino são exemplos clássicos destes efeitos, sendo que a toxicidade testicular do DEHP tem sido reconhecida há muitos anos (GRAY e BUTTERWORTH, 1980). LIU *et al.* (2005) estudaram as bases das alterações testiculares induzidas pela exposição intra-uterina aos ftalatos e relataram que os efeitos do DEHP no trato reprodutivo

masculino se devem, em parte, ao decréscimo na síntese de testosterona resultante da redução na expressão de genes envolvidos no transporte de colesterol e na esteroidogênese. Entretanto, é improvável que apenas a redução da sinalização pelos andrógenos possa explicar toda a gama de efeitos que os ftalatos apresentam sobre os testículos em desenvolvimento.

Existem várias substâncias como a Flutamida que atuam como antiandrogênios clássicos, interferindo na sinalização hormonal e induzindo alterações reprodutivas como o criptorquidismo inguinal, epispadias e redução no peso de glândulas acessórias (FOSTER e HARRIS, 2005). Porém, o DEHP não se encaixa neste grupo de substâncias, uma vez que seus efeitos não podem ser totalmente correlacionados com a sinalização androgênica. Um exemplo disso é a alta incidência de criptorquidismo abdominal e da ocorrência de gonócitos multinucleados nas cordas seminíferas de animais expostos aos ftalatos (McKINNEL *et al.*, 2005; MAHOOD *et al.*, 2007), efeitos que não são observados com a exposição a antiandrogênios clássicos e, portanto não podem ser atribuídos somente a este mecanismo de ação.

Várias pesquisas já demonstraram a interação de tóxicos ambientais com receptores esteróides e consequente interferência no desenvolvimento e função do trato reprodutivo masculino, entretanto a indução de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) e o estresse oxidativo associado também desempenham um papel importante na infertilidade masculina (SARADHA e MATHUR, 2005).

Existem duas abordagens principais no combate aos efeitos dos poluentes ambientais sobre os organismos vivos: o controle das quantidades utilizadas destes contaminantes lançados no meio ambiente ou até mesmo a proibição do uso de

alguns deles quando a exposição não pode ser evitada, e o combate dos efeitos nocivos dos tóxicos com o emprego de outras substâncias. LEE (2003) ressaltou que a quimioprevenção dos efeitos de desregulação endócrina, assim como a empregada no combate ao câncer através da interferência com os mecanismos tóxicos, representa uma abordagem promissora ao problema.

Pesquisas em busca de substâncias que reduzam a formação de radicais livres e a ocorrência de processos oxidativos deletérios ao organismo têm gerado resultados positivos na supressão de eventos inflamatórios, na proteção vascular e no tratamento de neoplasias. Alguns estudos têm se concentrado na quimioprevenção dos efeitos dos ftalatos na reprodução através do uso de vitaminas e outras substâncias com propriedades antioxidantes como a curcumina e kolaviron (ISHIHARA *et al.* 2000; FAROMBI *et al.* 2007). O presente estudo visa à obtenção de informações acerca dos efeitos do DEHP sobre certos aspectos reprodutivos em animais imaturos, bem como avaliar a ação da vitamina C e do resveratrol como antioxidantes nos efeitos do DEHP sobre o trato reprodutivo masculino em desenvolvimento.

### **1.1 Efeitos ambientais e legislação**

REYS (2001), em estudo sobre as implicações ambientais dos desreguladores endócrinos, lembrou a dificuldade da investigação dos mecanismos de ação e da regulamentação do uso destas substâncias. O autor citou como fatores complicantes a grande variação na concentração dos hormônios, em relação ao sexo, à idade e à fase do ciclo em que o indivíduo analisado se encontra; a diferença de potencial entre os hormônios naturais e os sintéticos; e os efeitos sinérgicos ou

antagônicos que podem ocorrer em um organismo. Adicionalmente, o progresso dos conhecimentos científicos no domínio da desregulação endócrina provocada por tóxicos ambientais costuma ser lento devido ao elevado número de tóxicos a estudar e às dificuldades de estabelecer metodologia adequada e padronizada para o respectivo estudo experimental. Pode-se ainda ressaltar que muitos dos efeitos induzidos pela exposição perinatal a desreguladores endócrinos podem se manifestar apenas tardiamente, dificultando, desta forma, o reconhecimento da origem do problema.

O Brasil prevê, em sua Constituição, políticas para o gerenciamento de substâncias tóxicas ou com potencial de causar danos às pessoas e ao meio ambiente. O artigo 225, parágrafo 1 e inciso V da Constituição Brasileira (1988), em seu Capítulo VI, determina: *“Controlar a produção, a comercialização e a aplicação de técnicas, métodos e substâncias que trazem risco à vida em todas as suas formas, à qualidade de vida e ao meio ambiente”*.

O Perfil nacional da gestão de substâncias químicas, segundo o Ministério Brasileiro do Meio Ambiente (2003) demonstra que, no Brasil, apesar da existência e disponibilidade qualitativa e quantitativa de informação referente à gestão de substâncias químicas, esta possui três características principais: mostra-se insuficiente, não apresentando dados para uma grande quantidade de substâncias que circulam e são manipuladas no país; não é sistemática, com lacunas na disponibilidade e na distribuição; é disseminada por muitas instituições, dificultando a sua localização e, em alguns casos, criando duplicações e contradições.

A legislação brasileira em Vigilância Sanitária, através da Resolução nº105/99, regulamenta o uso de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. Entre os plastificantes, conforme a lista positiva de aditivos para

materiais plásticos, estão autorizados os seguintes ftalatos: butila e benzila, dibutila, diciclohexila, dietila, diisodecila, di-2-etilexila (DEHP), dioctila. No caso do DEHP, existe uma condição para seu uso: somente poderá ser usado na proporção de no máximo 3% da matéria plástica (PVC) para que seja possível seu contato com qualquer tipo de alimento, especialmente com alimentos gordurosos, como queijos, carnes gordurosas, entre outros. Entretanto, FREIRE *et al.* (2006) analisaram recentemente a concentração de DEHP e outros plastificantes em amostras de filmes plásticos utilizados para acondicionar alimentos comercialmente disponíveis no Brasil. Nos resultados obtidos, a proporção de DEHP presente nas amostras variou de 15 a 44% do peso total.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou nota técnica afirmando que, segundo a avaliação do IARC – *International Agency for Research on Cancer*, órgão ligado à Organização Mundial da Saúde (OMS), em fevereiro de 2000, o DEHP, assim como o DEHA (adipato de di-2-etilexil) foram classificados como substâncias do grupo 3, (risco cancerígeno para seres humanos não classificável), isto é, risco ainda não evidenciado para seres humanos. No entanto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) relacionou o DEHP e o DEHA ao desenvolvimento de câncer de fígado e problemas de fertilidade em testes com animais (ANVISA, 2000).

GANGI (1999) revelou a presença de DEHP em níveis elevados, em uma amostra de 46 produtos médicos em PVC comercializados em 12 países, inclusive no Brasil. Da mesma forma que em brinquedos, produtos médicos de PVC flexível facilmente liberam o DEHP para os fluidos circunvizinhos. Isto ocorre em dispositivos como bolsas com soluções para uso intravenoso. WEUVE *et al.* (2006) enfatizaram que a estimativa de exposição de crianças ao DEHP a partir de materiais e



componentes utilizados em unidades de terapia intensiva (UTIs) excede a exposição diária típica de um adulto (3-30 µg/kg de peso corporal/dia) por uma ou duas ordens de magnitude, aproximando-se do menor nível onde já se observam efeitos adversos em estudos com animais (14-23 mg/kg de peso corporal/dia). Adicionalmente, a suscetibilidade de neonatos nas UTIs a altas exposições ao DEHP pode ser associada à redução na habilidade de eliminação dos ftalatos.

Muitos países já tomaram medidas preventivas para restringir o uso do DEHP e outros ftalatos em brinquedos de PVC devido a preocupações quanto à exposição de crianças de pouca idade. A indústria de brinquedos americana interrompeu voluntariamente o uso de DEHP em brinquedos que podem ser levados à boca em 1986 (ASTM, 1986). Recentemente, a União Européia proibiu a comercialização de brinquedos contendo DEHP e outros ftalatos considerados tóxicos para o desenvolvimento reprodutivo (EUROPEAN COMMISSION, 2005).

Em sumário executivo do Relatório do Greenpeace sobre substâncias químicas tóxicas na poeira de lares e ambientes de trabalho no Brasil, foi documentada a presença de dez dos doze ftalatos testados em todas as seis amostras de poeira coletadas (quatro de residências e duas de escritórios ou ambientes de trabalho) (COSTNER *et al.*, 2004).

KOCH *et al.* (2003a) avaliaram a exposição ao DEHP de crianças de dois a seis anos de idade em relação a seus pais e professores. O estudo trouxe evidências de maior suscetibilidade das crianças aos ftalatos tóxicos, assim como um aumento significativo do metabolismo oxidativo nas crianças expostas. Os autores, com base nos dados obtidos, ressaltaram a necessidade urgente de maiores pesquisas a respeito da toxicologia dos ftalatos.

## **1.2 Ftalatos e DEHP: exposição e toxicidade**

Diésteres do ácido ftálico, comumente referidos como ftalatos, são amplamente utilizados na indústria e no comércio; sendo encontrados em cosméticos (p.ex. maquiagem, shampoos e sabonetes), plásticos, tintas e algumas formulações de pesticidas (SWAN *et al.*, 2005). Estas substâncias são comumente adicionadas aos produtos industrializados para agregar cor ou fragrância, conferir uma camada ou filme, tornar certos plásticos mais maleáveis ou, no caso de produtos farmacêuticos, para garantir liberação gradativa do princípio ativo (BARR *et al.*, 2003).

KATO *et al.* (2004) citaram que a população em geral está exposta ao DEHP através da água, dos alimentos e do ar, por meio da inalação e da ingestão. Entretanto, as pessoas que são submetidas a tratamentos médicos como transfusões e diálises estão mais expostas ao DEHP do que a população em geral devido ao íntimo contato com equipamentos ou materiais hospitalares plásticos.

O DEHP, após ingerido, é hidrolisado pelas lipases intestinais a MEHP e 2-etilhexanol (2EH), portanto, pouco DEHP livre, quando administrado em doses moderadas, é excretado por qualquer espécie. Após a exposição oral em roedores, a maior parte do DEHP é absorvido na forma de MEHP, seu metabólito ativo, devido à sua rápida hidrólise pelas lipases intestinais (JAMES, J. T. e J S CENTER, 2004). Uma observação chave sobre a absorção do DEHP é que, em primatas, incluindo humanos, uma quantidade muito menor de uma dose oral de DEHP (em miligramas por quilograma de peso corporal) é absorvida e hidrolisada a MEHP do que em roedores (SCHMID e SCHLATTER, 1985; RHODES *et al.*, 1986)

Um vasto número de evidências tem sido apresentado nos últimos anos indicando, consistentemente, vários efeitos adversos de contaminantes ambientais sobre a saúde humana. A diminuição da fertilidade masculina em termos de contagem e qualidade espermática, associada a outras alterações reprodutivas em machos, incluindo malformações congênitas e câncer testicular em humanos e distúrbios similares em animais de vida livre, têm sido correlacionadas à exposição a tóxicos do ambiente (SARADHA e MATHUR., 2005).

Existem vários estudos apontando os efeitos dos ftalatos no sistema reprodutivo masculino, porém seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. A ocorrência de baixo peso dos testículos, evidências histopatológicas de injúria tecidual testicular e de glândulas acessórias, distúrbios na espermatogênese e alterações nos níveis de hormônios sexuais são comuns em pesquisas *in vitro* e *in vivo* com concentrações variadas de diferentes ftalatos (GANGOLLI, 1982; THOMAS *et al.*, 1982; AGARWAL *et al.*, 1986; GRAY e GANGOLLI, 1986; HALLMARK *et al.*, 2007).

Segundo WILSON *et al.* (2004), alguns ftalatos demonstraram capacidade de induzir alterações na diferenciação e no desenvolvimento sexual de ratos através da inativação do gene *insl3* (*insulin-like factor 3*). Durante a diferenciação sexual, o testículo fetal produz três hormônios críticos para que o processo ocorra normalmente. Dois destes, o hormônio anti-Mülleriano (HAM), produzido pelas células de Sertoli e a testosterona, produzida pelas células de Leydig do feto, são utilizados como modelo no estudo de lesões induzidas genética e quimicamente. Nos últimos anos, o fator *insl3*, foi identificado como um terceiro hormônio testicular e parece exercer um papel singular na diferenciação sexual, interferindo no desenvolvimento do gubernáculo e, conseqüentemente, na posição dos testículos.

Uma vez que uma pequena porcentagem destas anomalias pode ser diretamente relacionada a distúrbios genéticos, o aumento da incidência de malformações reprodutivas tem sido atribuído à exposição a poluentes químicos ambientais (WILSON *et al.*, 2004).

Vários estudos têm identificado químicos ambientais que apresentam atividade antiandrogênica através de mecanismos de ação múltiplos. Estudos anteriores ressaltavam a ação dos pesticidas como antagonistas de receptores androgênicos, mas recentemente, tornou-se evidente que este não era o único mecanismo endócrino pelo qual estes compostos afetavam as vias de sinalização androgênicas. A exposição aos ftalatos reduz a expressão de RNAm (RNA mensageiro) de enzimas-chave na esteroidogênese e também do hormônio insl3 nas células de Leydig fetais. Desta forma, tanto tecidos andrógeno-dependentes como tecidos insl3-dependentes são afetados (WILSON *et al.*, 2008).

Existem várias evidências da alteração de desenvolvimento de tecidos dependentes do insl3 e da testosterona induzida pela administração de ftalatos durante o período de diferenciação sexual intra-uterina. Já foi demonstrado que a administração de alguns ftalatos como o DEHP e o DBP a ratas no terço final da gestação, induziu alterações do gene insl3, acarretando lesões no gubernáculo das ninhadas (MYLCHREEST *et al.*, 1999; GRAY *et al.*, 2000). Uma vez que o gubernáculo está envolvido na descida transabdominal do testículo, alterações na expressão do insl3 podem explicar a ocorrência de criptorquidismo abdominal em ratos expostos a ftalatos ativos como o DEHP, o DBP e o BBP.

SWAN *et al.* (2005) acompanharam 134 crianças do sexo masculino com idade média de 16 meses, avaliando a correlação entre a distância ano-genital e a exposição pré-natal a ftalatos. A associação entre o desenvolvimento genital das

crianças e a exposição aos tóxicos, foi positivamente relacionada à síndrome de virilização incompleta induzida por ftalatos, a qual tem sido relatada em roedores.

Estudos que avaliam a exposição aos ftalatos demonstraram que animais machos em desenvolvimento demonstraram-se mais sensíveis à toxicidade testicular que animais sexualmente maduros (STOBERG *et al.*, 1986; DOSTAL *et al.*, 1988). KOCH *et al.* (2003b) também apresentaram evidências da ação dos ftalatos em exposição ambiental sobre vários parâmetros espermáticos humanos.

Todos os ftalatos têm demonstrado baixa toxicidade aguda, porém alguns são suspeitos de apresentarem efeitos crônicos. Alguns dos efeitos antiandrogênicos dos ftalatos como a redução da distância anogenital (DAG), retenção de mamilos, hipospadias, criptorquidismo, agenesia epididimária e baixas contagens espermáticas têm sua provável origem na redução da produção de testosterona observada nos machos no final da gestação (PARKS *et al.*, 2000; SHIROTA *et al.*, 2005; BORCH *et al.*, 2006). LAHOUSSE *et al.* (2006) encontraram indícios sugerindo que o mecanismo inicial de injúria testicular fetal e pós-natal induzido pelos ftalatos é similar, uma vez que têm como alvo os mesmos genes envolvidos no metabolismo do colesterol e da esteroidogênese.

Alterações na esteroidogênese são de fundamental importância, uma vez que os hormônios sexuais regulam o desenvolvimento fetal assim como o início da puberdade. A diferenciação sexual masculina é criticamente dependente da secreção de testosterona pelas células de Leydig. O desequilíbrio na síntese (ou sinalização) de andrógenos afeta adversamente o desenvolvimento sexual pré e pós-natal (GUNNARSSON *et al.*, 2008).

A produção de testosterona nas células de Leydig utiliza o colesterol como substrato, sendo o mesmo absorvido do sangue via receptor LDL (lipoproteína de baixa densidade) ou sintetizado na própria célula (GRAAF *et al.*, 2004).

Várias pesquisas têm investigado os efeitos dos ftalatos no metabolismo dos lipídios e suas implicações no desenvolvimento sexual de humanos e animais. Efeitos como a inibição da colesterologênese no fígado, testículos e adrenal de ratos que receberam DEHP na dieta, assim como a inibição da colesterologênese no cérebro e fígado de fetos provenientes de fêmeas tratadas com DEHP durante a prenhez já foram demonstrados (BELL, 1982; XU *et al.*, 2007). A maioria dos experimentos demonstrou uma redução do colesterol plasmático ou sérico de animais submetidos ao tratamento com DEHP (OISHI, 1984; NAIR e KURUP, 1986; POON *et al.*, 1997; MOCCHIUTTI e BERNAL, 1997). Outros efeitos também foram observados como um aumento no colesterol testicular em ratos tratados com DEHP 2% (g/g na dieta) (OISHI, 1984) e diminuição do colesterol sérico em ratos jovens e adultos tratados com altas doses de DEHP (DOSTAL *et al.*, 1987).

O colesterol modula uma série de funções de proteínas de membrana e participa de vários processos de transporte e sinalização transmembrana (IKONEN, 2008), isto significa que uma alteração no suprimento celular de colesterol poderia estar implicada na diversidade de efeitos causados pela administração de DEHP, além de refletir no comportamento diverso observado quando animais de diferentes idades são tratados com o DEHP (AKINGBEMI *et al.*, 2001; GE *et al.*, 2007; CULTY *et al.*, 2008).

### **1.3 Estresse oxidativo e ftalatos: efeitos sobre o sistema endócrino e a fertilidade**

O estresse oxidativo está envolvido na origem de inúmeras alterações patológicas incluindo inflamação, infecção, toxicidade alcoólica, doenças neurodegenerativas, lesão de isquemia-reperfusão, criptorquidismo, desregulação endócrina por poluentes ambientais e lesões por radiação ultravioleta. Estas alterações podem ser consequentes à excessiva produção de ERMO, ao potencial antioxidante insuficiente ou uma associação de ambos. As ERMO levam à lesão tecidual por diferentes mecanismos incluindo injúria ao DNA, peroxidação lipídica, oxidação protéica, depleção de antioxidantes celulares e ativação da liberação de citocinas pró-inflamatórias (DIEMER *et al.*, 2003).

As enzimas da via esteroidogênica, em condições fisiológicas, produzem radicais livres como resultado de uma perda de elétrons decorrente da interação com os esteróides produzidos ou ainda de outros substratos com estas enzimas (PELTOLA *et al.*, 1996). Pelo fato do estresse oxidativo nos testículos ser um dos maiores fatores que induzem apoptose de células germinativas, este órgão tem concentrações relativamente altas de antioxidantes, como a glutatona na forma reduzida (GSH), ácido ascórbico e vitamina E. Estas substâncias protegem as células germinativas contra danos ao DNA e desempenham funções importantes na espermatogênese (KASAHARA *et al.*, 2002). Quando a atividade dos antioxidantes não é suficiente, os testículos tornam-se expostos ao estresse oxidativo.

SARADHA e MATHUR (2005) citaram a influência dos contaminantes ambientais na indução de ERMO, causando estresse oxidativo para as células, tecidos e órgãos. As ERMO estão envolvidas em uma variedade de condições

patológicas nos testículos, e o estresse oxidativo reconhecidamente inibe a esteroidogênese. As células de Leydig, localizadas no interstício testicular, estão particularmente suscetíveis a fontes extracelulares de ERMO devido à sua íntima proximidade com os macrófagos intersticiais (DIEMER *et al.*, 2003).

PELTOLA *et al.* (1995) estudaram a relação entre a posição dos testículos em ratos e a peroxidação lipídica nestes órgãos e os resultados obtidos sugerem que o alto nível de hidroperóxidos lipídicos nos testículos criptorquidas não é apenas uma consequência da lesão testicular. Ao invés disto, os resultados indicam que a posição abdominal dos testículos está associada com o estresse oxidativo ao qual estes órgãos ficam expostos durante a vida fetal.

A formação de radicais livres *in vivo* tem sido demonstrada após a exposição a vários tóxicos, incluindo os ftalatos (KADIISKA *et al.*, 1998; RUSYN *et al.*, 2001). Substâncias que induzem a proliferação de peroxissomas, como o DEHP, têm sido responsabilizadas pelo surgimento de tumores hepáticos e outras anormalidades secundárias ao estresse oxidativo em roedores, embora os mecanismos pelos quais os ftalatos exercem estes efeitos e o risco para a saúde humana permaneçam controversos (RUSYN *et al.*, 2001; POGRIBNY *et al.*, 2008).

Os ftalatos são capazes de produzir radicais livres por vários processos como a ativação de macrófagos hepáticos receptor-independente e a ação no receptor ativado por proliferadores de peroxissomas  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) (RUSYN *et al.*, 2001). Cabe ressaltar que existem importantes diferenças espécie-específicas na expressão e ativação destes receptores. A expressão gênica e a transativação ocorrem com menores concentrações do agonista e resultam em expressão do gene alvo com maior eficiência nos de roedores quando comparado com os humanos. Porém, a toxicidade testicular do DEHP ocorre na ausência de expressão de PPAR  $\alpha$ , sendo



considerada um efeito independente da ativação destes receptores (RUSYN *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo induzido por ftalatos parece afetar principalmente a função mitocondrial e há evidências de que os ftalatos aumentam a produção de ERMO no fígado antes que as oxidases peroxissomais sejam induzidas (RUSYN *et al.*, 2001; KASAHARA *et al.*, 2002).

DIEMER *et al.* (2003) chamaram atenção para o papel desempenhado pelas mitocôndrias na biossíntese de hormônios esteróides. A primeira e limitante etapa deste processo nas adrenais e nas gônadas é a transferência do colesterol através do espaço interno da membrana mitocondrial, e isto ocorre na dependência da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR). Estudos prévios a respeito dos efeitos do estresse oxidativo sobre a esteroidogênese indicaram que um dos efeitos das ERMO nas células produtoras de esteróides é a alteração da função da proteína StAR, afetando o transporte de colesterol nas mitocôndrias e reduzindo os níveis de testosterona.

Muitos estudos demonstram resultados conjuntos de efeitos adversos endócrinos e oxidativos de contaminantes ambientais, levando à hipótese da existência de várias outras associações entre estes dois bem estabelecidos mecanismos de ação. Estudos adicionais são necessários para a confirmação experimental desta proposição, que deverá esclarecer vários efeitos adversos de contaminantes cujo mecanismo ainda não está estabelecido (SARADHA e MATHUR, 2005).

#### **1.4 Antioxidantes**

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis de proteção no organismo, podendo impedir a formação de radicais livres, interceptar aqueles gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas ou através do reparo das lesões causadas no organismo (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Com a finalidade de proteção contra a ação dos radicais livres, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, sendo constituída por glutathione reduzida, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione redutase e pela glutathione peroxidase, entre outros. Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante. As lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino são minimizadas pela superóxido dismutase, pela catalase e pelo alopurinol, sendo este último um bloqueador da produção de ERMO pela via da xantina-oxidase (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Substâncias químicas como os ftalatos, pesticidas como o lindano e o metoxicloro e o herbicida dioxina-TCDD têm sido associados ao estresse oxidativo testicular em modelos experimentais com roedores. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar a necessidade de suplementação com antioxidantes, a combinação e a dose que proporciona máxima proteção contra o estresse oxidativo (TREMELLEN, 2008).

O ácido ascórbico ou vitamina C (figura 2) há tempos está associado à fertilidade e está presente em altas concentrações nos tecidos da hipófise, glândula

adrenal e gônadas (LUCK *et al.*, 1995). Isolado ou associado à vitamina E, tem sido empregado como antioxidante na prevenção do efeito deletério de vários compostos tóxicos como o Cádmio (ACHARYA *et al.*, 2008), o dióxido de enxofre (ZHAO *et al.*, 2008) e o cromo hexavalente (HEMMATI *et al.*, 2008).

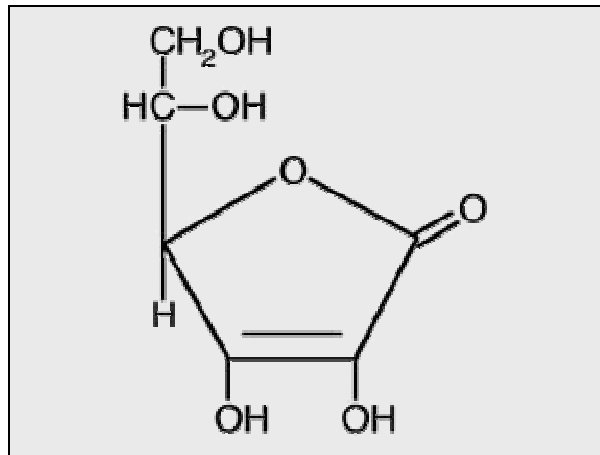


Figura 2: Estrutura química da vitamina C.  
(fonte: adaptado de NCBI *on line*, 2009)

Além das vitaminas antioxidantes, outras substâncias como as fitoalexinas, naturalmente presentes em algumas plantas, vêm sendo estudadas com relação ao seu potencial antioxidante e suas propriedades terapêuticas. O resveratrol (figura 3), um polifenol encontrado principalmente na uva e seus derivados, possui atividade antioxidante e vasorrelaxante, além de modular o metabolismo de lipoproteínas, inibir a agregação plaquetária e exercer ações quimiopreventiva e terapêutica no tratamento do câncer (JUAN *et al.*, 2005).

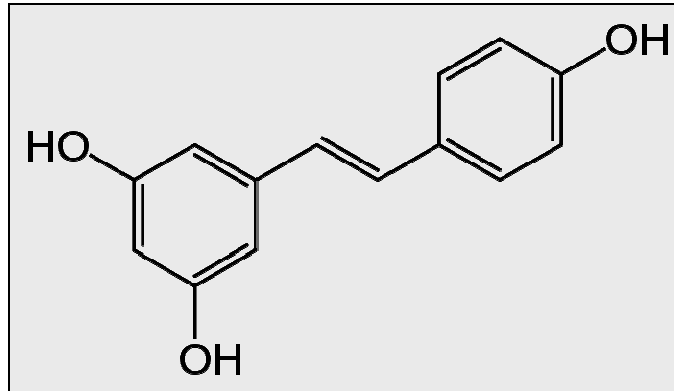


Figura 3: Estrutura química do resveratrol  
(fonte: adaptado de NCBI *on line*, 2009)

Em recente estudo dos efeitos do resveratrol na reprodução masculina, SHIN *et al.* (2008) relataram que o resveratrol induziu um efeito concentração-dependente de relaxamento do corpo cavernoso pré-contraído com fenilefrina, além de provocar aumento na testosterona sérica e na contagem e motilidade espermática, sem causar deformidades espermáticas.

JIANG *et al.* (2008) estudaram algumas atividades do resveratrol na terapia da infertilidade masculina e descobriram aplicações deste antioxidante na redução da disospermia induzida por toxinas ambientais e quimioterápicos. Os autores reforçaram a necessidade de estudos relacionados a esses efeitos protetores nas alterações reprodutivas quimicamente induzidas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivos gerais***

- Avaliar o grau de estresse oxidativo induzido em ratos machos recém-nascidos cujas progenitoras foram expostas ao DEHP, suas implicações para o trato reprodutivo e a influência da suplementação com os antioxidantes vitamina C ou resveratrol nestes parâmetros;
- Relacionar as variáveis de desenvolvimento reprodutivo aos níveis de colesterol e testosterona de ratos machos expostos ao DEHP na puberdade.

### **2.2 *Objetivos específicos:***

#### **2.2.1 *Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono***

Este experimento foi realizado com a finalidade de treinar técnicas de manejo dos animais e análises laboratoriais a serem empregadas nos experimentos subsequentes.

#### **2.2.2 *Experimento DEHP e antioxidantes***

- Quantificar os efeitos do DEHP isolado ou associado a antioxidantes na indução de estresse oxidativo celular, através da análise dos seguintes indicadores: atividade das enzimas glutathione S transferase e catalase, e níveis de hidroperóxidos lipídicos;

- Analisar o impacto da exposição de ratas gestantes ao DEHP isolado e associado a antioxidantes no trato reprodutivo dos descendentes machos recém-nascidos através da avaliação da distância anogenital e da análise hormonal, histológica e imuno-histoquímica (proteína StAR) dos testículos.

### ***2.2.3 Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal***

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de DEHP no desenvolvimento pubertal de ratos machos, por meio da análise de características de desenvolvimento sexual;
- Estudar o impacto do DEHP em alguns aspectos endócrinos de ratos sexualmente imaturos através da mensuração dos níveis séricos de tiroxina total (T4) e dos níveis testiculares e séricos de colesterol e testosterona.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### ***3.1 Substâncias e reagentes utilizados***

Di(2-etilexil) ftalato (DEHP), pureza 99% (Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany); Resveratrol (trans-3,5,4'-triidroxystilbeno) (Resvetrol® - Attivos Magistrais - São Paulo, Brazil); vitamina C (DEG - São Paulo, Brazil); reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories – Hercules, CA), CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 97%) (Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany), GSH (Glutathiona reduzida 98-100%) (Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany), BHT (Hidroxitolueno butilado) (Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany), Sulfato de ferro amoniacal (Vetec - Rio de Janeiro, Brazil), Xylenol laranja (Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany). As demais substâncias utilizadas foram de grau analítico.

#### ***3.2 Protocolos experimentais***

Os protocolos realizados nas diversas etapas experimentais foram desenvolvidos com base nas diretrizes éticas preconizadas pelas agências de proteção ambiental e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Instituição (números de protocolo: 175 e 259).

##### ***3.2.1 Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono***

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, adultos, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, com peso médio de 270 g. Os animais foram

alojados em caixas coletivas de polipropileno, receberam água e ração comercial à vontade e foram submetidos a um ciclo claro / escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos em seis grupos (n=5), conforme os seguintes tratamentos:

- 1- **Controle:** veículo (Tween 80 1%) (10 dias) + óleo de canola (10° dia)
- 2- **Tetracloroeto de carbono (CCl<sub>4</sub>):** veículo (Tween 80 1%) (10 dias) + CCl<sub>4</sub> (10° dia)
- 3- **Vitamina C (VC):** Vitamina C (200 mg/kg) (10 dias) + CCl<sub>4</sub> (10° dia)
- 4- **Resveratrol 2 (R2):** Resveratrol<sup>1</sup> (2 mg/kg) (10 dias) + CCl<sub>4</sub> (10° dia)
- 5- **Resveratrol 10 (R10):** Resveratrol (10 mg/kg) (10 dias) + CCl<sub>4</sub> (10° dia)
- 6- **Resveratrol 20 (R20):** Resveratrol (20 mg/kg) (10 dias) + CCl<sub>4</sub> (10° dia)

Os animais foram tratados com uma solução de Tween 80 à concentração de 1% (grupo controle) ou com os antioxidantes (vitamina C e resveratrol) durante 10 dias. No décimo dia, os animais receberam tetracloroeto de carbono diluído em óleo de canola, na concentração de 20% (LIN *et al.*, 2008). Todas as substâncias foram administradas por via oral através de gavagem, em um volume de 5 mL/kg.

A vitamina C foi utilizada na dose de 200 mg/kg (ZHAO *et al.*, 2008), como controle positivo da função antioxidante do resveratrol por ser uma substância com potencial já amplamente descrito para esta finalidade. O tetracloroeto de carbono foi utilizado em uma única administração a fim de induzir estresse oxidativo a ser avaliado de forma aguda.

---

<sup>1</sup> Resvetrol® (Attivos Magistrais)



Os animais foram mortos por meio de decapitação em guilhotina, transcorridas 48 horas da administração de  $\text{CCl}_4$ . Em seguida, o sangue foi colhido, coagulado em repouso (5 minutos) e centrifugado a aproximadamente 1000 rpm (10 minutos) para a separação do soro. O soro foi aliquoteado e armazenado em freezer -20°C. Os órgãos (fígado, rins, testículos, epidídimos, vesícula seminal vazia e próstata ventral) foram dissecados e pesados. Os fígados e os testículos foram acondicionados em embalagens individuais, identificados e armazenados em freezer -70°C para as provas enzimáticas.

### **3.2.2 Experimento DEHP e antioxidantes**

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas, adultas, provenientes do biotério da UFPR, com peso médio de 250 g. Os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno, receberam água e ração comercial à vontade e foram submetidos a um ciclo claro / escuro de 12 horas.

As fêmeas foram acasaladas diariamente na proporção de quatro fêmeas para cada macho adulto, durante a fase escura do ciclo de luz (12 horas), para a obtenção das progenitoras. Foram obtidos esfregaços vaginais das fêmeas, no período da manhã, para verificar a presença de espermatozóides e confirmar a cópula, sendo este dia considerado como dia zero de gestação (gd 0) e às 24 horas seguintes como dia um de gestação (gd 1).

As fêmeas com prenhez confirmada foram separadas das não prenhes e distribuídas em caixas coletivas (4 animais/caixa), onde foram mantidas até o 18º dia de gestação (gd 18). Após esta data, foram colocadas em caixas individuais, sendo o dia do parto designado como dia um pós-natal (pnd 1). Os tratamentos iniciaram

no 7º dia de gestação (gd 7) e se estenderam até o 2º dia de lactação (ld 2), conforme o protocolo a seguir:

**1- Controle:** Veículo 1 (tween 80 1%) + veículo 2 (óleo de canola)

**2- Vitamina C (VC):** Vitamina C (200 mg/kg diluída em tween 80 1%) + veículo 2

**3- Resveratrol<sup>2</sup> (R):** Resveratrol (10 mg/kg diluído em tween 80 1%) + veículo 2

**4 - DEHP<sup>3</sup> (DEHP):** DEHP (500 mg/kg diluído em óleo de canola) + veículo 1

**5 – DEHP + Resveratrol (D+R):** DEHP (500 mg/kg diluído em óleo de canola) + Resveratrol (10 mg/kg diluído em tween 80 1%)

**6 – DEHP + Vitamina C (D+V):** DEHP (500 mg/kg diluído em óleo de canola) + Vitamina C (200 mg/kg diluída em tween 80 1%)

A dose de DEHP foi determinada baseada em estudos que demonstram que este ftalato na dose de 500 mg/kg/dia produz alterações reprodutivas significativas nos descendentes do sexo masculino sem provocar toxicidade materna ou reduzir o tamanho das ninhadas (GRAY *et al.*, 2000; SHIROTA *et al.*, 2005) Todas as substâncias foram administradas na quantidade de 2,5 mL/kg e todos os animais receberam duas gavages, totalizando o volume de administração de 5 mL/kg.

A massa corporal de cada fêmea gestante foi registrada diariamente desde o início da gestação até o último dia de tratamento. Durante este procedimento foi também realizado o exame físico dos animais em busca de sinais de toxicidade dos tratamentos (diarréia, piloereção, tremores, salivação, convulsões, etc.).

A partir do 18º dia de gestação, cada fêmea foi examinada duas vezes ao dia para averiguar o nascimento das ninhadas e registrar o tempo de gestação. Após o

---

<sup>2</sup> Resvetrol® (Attivos Magistrais)

<sup>3</sup> Di-2-etilexil ftalato em solução 99%

parto, foram analisadas as demais variáveis, como o número de filhotes nascidos e a proporção de filhotes nascidos vivos.

As fêmeas que não pariram até o 24<sup>o</sup> dia de gestação (gd 24) foram mortas por decapitação e submetidas à contagem de implantes uterinos para avaliação das perdas pós-implante, cuja técnica consiste na observação a olho nu e contagem direta dos sítios de implantação placentária.

As variáveis citadas foram determinadas conforme recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency - EPA, 1996):

$$a) \text{ Índice de nascimento (\%)} = \frac{\text{número de filhotes nascidos vivos}}{\text{número de filhotes nascidos}} \times 100$$

$$b) \text{ Perdas pós-implantes (\%)} = \frac{\text{número de implantes} - \text{número de filhotes nascidos vivos}}{\text{número de implantes}} \times 100$$

Foram selecionados aleatoriamente dois descendentes machos de cada ninhada, quando presentes, e estes foram mortos por decapitação no segundo dia pós-natal. Foram tabulados os dados macroscópicos como peso de órgãos (fígado e encéfalo) e distância ano-genital (figura 4) em milímetros, mensurada com o emprego de paquímetro digital<sup>4</sup> (figura 5). Os testículos (figura 6) foram coletados para a dosagem de testosterona e análise histológica e imuno-histoquímica. O fígado foi armazenado em freezer -70°C para análise dos marcadores de estresse oxidativo.

---

<sup>4</sup> TCM (Hamburg, Germany)

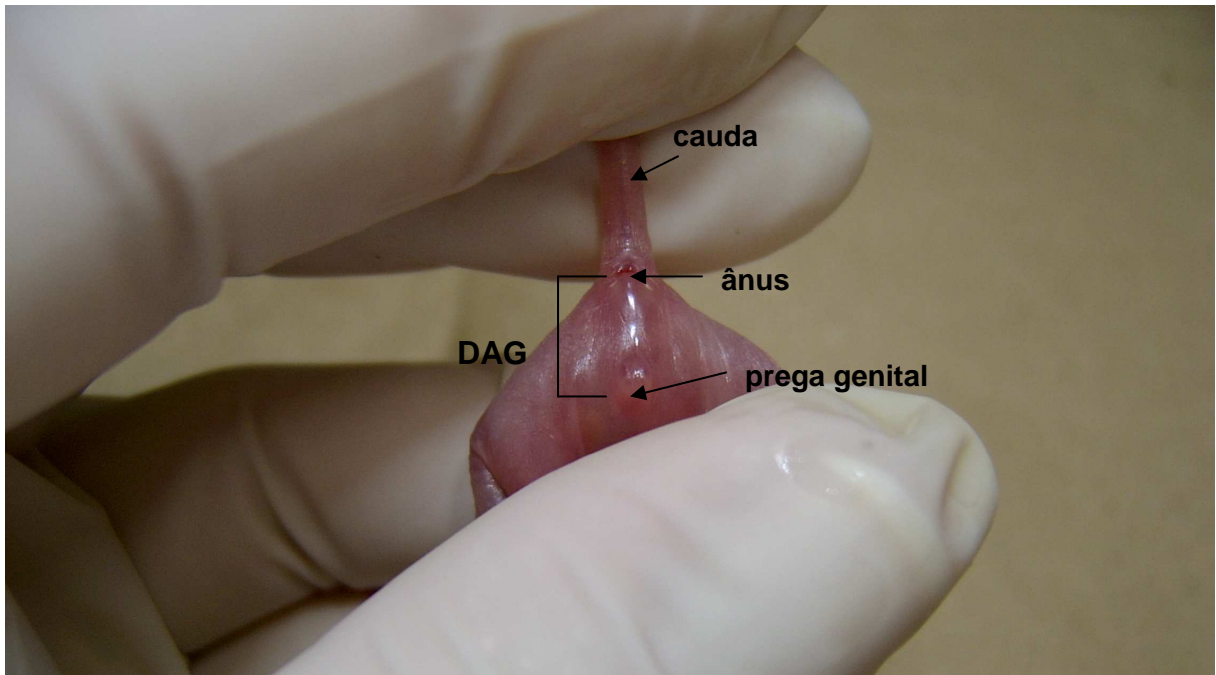


Figura 4: Referências anatômicas (indicadas pelas setas) para a mensuração da distância anogenital, definida como a distância entre o centro do ânus e o centro da prega genital.

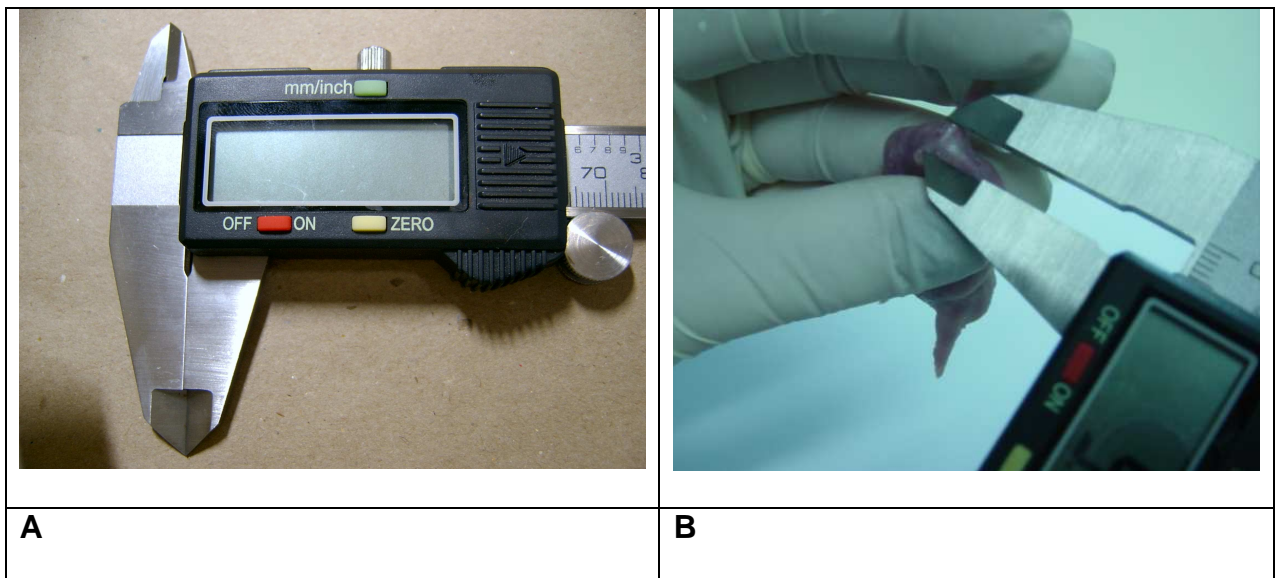


Figura 5: Paquímetro digital utilizado para a mensuração da distância anogenital dos machos (pnd 2) (A) e mensuração da distância anogenital sendo realizada (B).



Figura 6: Posição dos testículos nos machos (pnd 2).

### **3.2.3 Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal**

Foram utilizados ratos Wistar machos em idade pré-púbere (21 dias), provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno, receberam água e ração comercial à vontade e foram submetidos a um ciclo claro / escuro de 12 horas.

Foi administrado o DEHP através de gavagem, nas doses de 250, 500 e 750 mg/kg/dia conforme o grupo experimental, sendo estabelecido o volume de administração de 5 mL/kg/dia.

Cada caixa alojou um animal de cada grupo (4 grupos, n=15), sendo estes escolhidos aleatoriamente e mantidos durante todo o período do experimento. O

tratamento iniciou-se no 21<sup>o</sup> dia pós-natal e foi repetido diariamente durante os 30 dias seguintes, conforme o protocolo abaixo:

- 1 – Controle:** Veículo (óleo de canola)
- 2 – DEHP 250:** DEHP (250 mg/kg diluído em óleo de canola)
- 3 – DEHP 500:** DEHP (500 mg/kg diluído em óleo de canola)
- 4 – DEHP 750:** DEHP (750 mg/kg diluído em óleo de canola)

Os animais foram pesados diariamente e submetidos a exame físico geral. Foi observada também a ocorrência de separação prepucial (figura 7), acontecimento característico da puberdade em ratos (GRAY *et al.*, 2004). Esta variável foi avaliada mediante inspeção visual e classificada como inexistente, incompleta ou completa conforme sua apresentação.

Os animais foram mortos por meio de decapitação em guilhotina, transcorridas 24 horas após o último tratamento. Em seguida, o sangue foi colhido, coagulado em repouso (5 minutos) e centrifugado a aproximadamente 1000 rpm (10 minutos) para a separação do soro. O soro foi aliqotado e armazenado em freezer - 20°C para a dosagem de testosterona, colesterol e tiroxina séricos.

Na sequência, as seguintes estruturas foram removidas e pesadas: fígado, rins e adrenais (avaliação da toxicidade dos tratamentos), vesículas seminais vazias, próstata ventral, testículos, epidídimos e músculo elevador anal/bulbocavernoso (estruturas andrógeno-dependentes). Os testículos foram armazenados em freezer - 70°C para serem submetidos às dosagens de colesterol e testosterona.

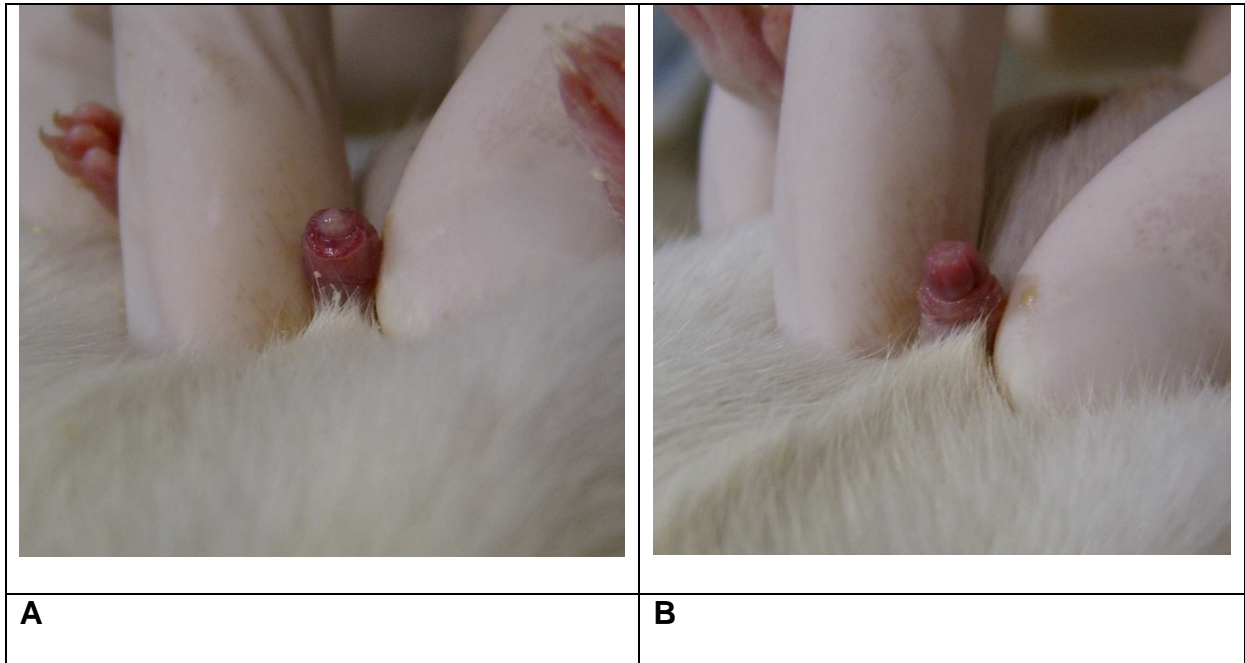


Figura 7: Avaliação da ocorrência de separação prepucial através da retração do prepúcio e exposição da glande. Separação prepucial incompleta (**A**) e completa (**B**).

### **3.3 Análises laboratoriais**

#### **3.3.1 Histologia e imuno-histoquímica testiculares**

Os testículos dos animais neonatos do experimento 3.1.2 foram removidos e submetidos à análise histológica e imuno-histoquímica, conforme o protocolo a seguir:

***Histologia:*** O testículo esquerdo de um animal de cada ninhada selecionado conforme descrito anteriormente foi fixado em solução de Bouin durante duas horas. Após a fixação, o órgão foi mergulhado em soluções alcoólicas de concentração crescente por 90 minutos cada, para a desidratação e, posteriormente, mantido durante 40 minutos em solução de etanol e xilol absolutos na proporção de 1:1. Após isto, os órgãos receberam mais três banhos de xilol absoluto (dois de 20



minutos e um de 5 minutos) e foram emblocados em parafina. Estas amostras foram trimadas, seccionadas em micrótomo e as lâminas permanentes foram preparadas através da adesão dos cortes a lâminas de vidro com albumina líquida. As amostras foram desparafinizadas, coradas com hematoxilina e eosina para análise histopatológica (WOLF *et al.*, 2002). A histopatologia testicular foi realizada com o objetivo de quantificar os gonócitos multinucleados (GMN) (figura 8), através da avaliação de 50 secções de cordas seminíferas de seis animais de ninhadas distintas por grupo tratado (SHARPE *et al.*, 2007).

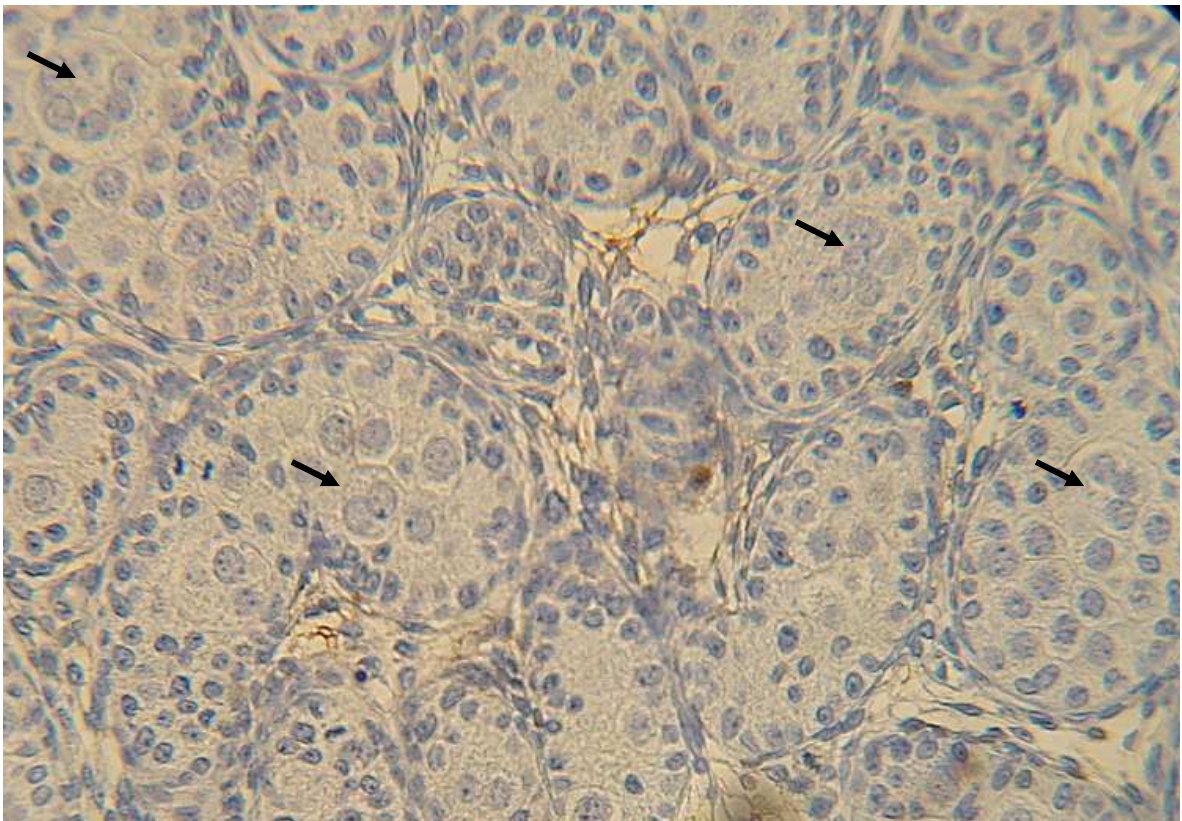


Figura 8: Fotomicrografia de corte histológico do testículo de um animal (pnd 2) cuja progenitora foi exposta ao DEHP na dose de 500 mg/kg/dia, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Notar a presença de gonócitos multinucleados (indicados pelas setas) nas cordas seminíferas. Coloração HE, aumento de 400x.



Imuno-histoquímica: Para a realização da imuno-histoquímica, os órgãos seguiram a mesma sequência de preparação histológica do item anterior (BORCH *et al.*, 2006). Os cortes de tecido processados rotineiramente foram colocados sobre lâminas previamente silanizadas. A recuperação antigênica pelo método do calor úmido foi realizada em panela a vapor, à temperatura de 95°C por 20-30 minutos. A incubação com os anticorpos primários foi realizada durante toda a noite (anticorpo policlonal para proteína StAR<sup>5</sup>). Para amplificação e revelação da reação foi utilizado o sistema Advance<sup>6</sup>. A coloração foi feita com 3,3-diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração com hematoxilina de Harris. Cabe ressaltar que a reativação antigênica, os anticorpos secundários e seus respectivos tempos e diluições seguiram as recomendações do laboratório fornecedor do kit.

Foram escolhidos, ao acaso, dois animais de cada grupo e as lâminas foram analisadas sob microscopia óptica. A intensidade da coloração pela reação imuno-histoquímica refletem a expressão da proteína StAR no tecido testicular dos diferentes grupos experimentais.

### **3.3.2 Dosagem de testosterona**

Foram realizadas dosagens de testosterona nos testículos direitos dos animais selecionados no 2º dia pós-natal (experimento 3.1.2) e no plasma e testículos dos animais tratados com diferentes concentrações de DEHP (experimento 3.1.3).

---

<sup>5</sup> Affinity Bioreagents®, Rockford, IL, USA

<sup>6</sup> Dako® Glostrup Denmark

O sangue coletado após a decapitação dos animais foi centrifugado e o soro foi separado e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o dia da análise. Os órgãos utilizados para as dosagens hormonais e ensaios enzimáticos foram mantidos em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$

A extração dos esteróides para a mensuração da testosterona testicular foi realizada segundo o seguinte protocolo:

Neonatal:

As amostras (testículo inteiro) foram homogeneizadas manualmente com 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato em tubos tipo eppendorff, com o auxílio de bastão metálico. Foram adicionado 500  $\mu\text{L}$  de éter dietílico a cada tubo e as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 30 segundos e centrifugadas a 1000 x 4 giros à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após a centrifugação, cada tubo foi submetido individualmente à imersão em nitrogênio líquido até que a fase aquosa estivesse congelada e o sobrenadante (fase etérea) foi então transferido para outro tubo. A extração com éter foi repetida três vezes e os tubos contendo o extrato etéreo foram colocados para evaporação em capela de fluxo laminar à temperatura ambiente. O conteúdo residual foi ressuspendido em 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e mantido em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  até a análise hormonal (WOLF *et al.*, 2002).

Pubertal:

Dois fragmentos de 0,2 gramas de tecido testicular obtidos de cada animal foram acondicionados em microtubos do tipo eppendorfs e dessecados (24 horas em dessecador a vácuo à temperatura controlada de  $45^{\circ}\text{C}$ ). O tecido desidratado foi

pulverizado manualmente e as amostras foram transferidas para tubos de vidros, em cada qual foi adicionado 0,75 mL de metanol 90%. Os tubos foram submetidos a 30 minutos de agitação à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 1500 X g durante 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o procedimento de extração com metanol foi repetido para a fração sólida resultante. Ao final do processo, os sobrenadantes obtidos em cada extração foram combinados, resultando em um total de 3 mL de extrato (NEUBAUER *et al.*, 2004).

O método de quantificação de testosterona empregado para os extratos foi o mesmo utilizado para a testosterona sérica, sendo que as curvas padrão já se encontram validadas. Várias diluições de misturas de plasmas produzem curvas paralelas em relação ao padrão validando o teste. Diluições seriadas de amostras do extrato produziram curvas de deslocamento paralelas às da testosterona padrão (BOARETO, *et al.*, 2008). Estas análises foram realizadas em parceria com o laboratório de Fisiologia da Reprodução do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná.

Os níveis séricos e testiculares de testosterona foram quantificados por meio de EIA (*Enzyme Immunoassay*). O princípio deste ensaio está baseado na competição entre a testosterona da amostra e a testosterona conjugada utilizada como reagente para uma quantidade constante de anticorpo antitestosterona. Os anticorpos (policlonais antitestosterona R 156/7, diluição 1:7500) foram obtidos de Coralie Munro<sup>7</sup>. O anticorpo R 156/7 apresenta reação cruzada com testosterona 100,0%, 5<sup>a</sup>-diidrotestosterona 57,4%, androstenediona 0,27%, e androsterona, deidroepiandrosterona (DHEA), colesterol, estradiol, progesterona e pregnenolona <

---

<sup>7</sup> Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA

0,05%. As amostras foram testadas em duplicatas, a sensibilidade do ensaio foi de 2,3 pg/poço. As placas foram lidas com um filtro de 405nm em leitor de microplaca.

### **3.3.3 Dosagem de colesterol**

O plasma e os extratos testiculares foram submetidos à dosagem de colesterol através de teste enzimático colorimétrico utilizando-se espectrofotômetro e kit específico para dosagem de colesterol total<sup>8</sup>. Nesta técnica, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-enona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4 aminoantipirina são oxidadas formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A sensibilidade analítica foi 1,0 mg/dL.

### **3.3.4 Dosagem de tiroxina (T4)**

Os níveis séricos de T4 foram determinados com a finalidade de pesquisar indícios de distúrbios da tireóide que pudessem alterar secundariamente os níveis séricos de colesterol. A análise foi realizada por um método automatizado de imunensaio por quimioluminescência de micropartículas<sup>9</sup>, seguindo as instruções do fabricante. A sensibilidade analítica foi 1,0 µg/dL.

---

<sup>8</sup> Colesterol liquiform Cat. 76 (Labtest)®

<sup>9</sup> ARCHITECT total T4 (TT4) assay (Abbot Laboratories, Illinois, USA)

### 3.3.5 Indicadores de estresse oxidativo

As amostras congeladas de fígado (experimentos 3.1.1 e 3.1.2) e testículo (experimento 3.1.1) foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 6,5 (1:10 massa/volume), com o auxílio de homogeneizador automático<sup>10</sup> e centrifugadas a 1000 x 10 giros a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi dividido em alíquotas e utilizado para a determinação da atividade da catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), lipoperoxidação (LPO) e concentração de proteína.

Atividade da catalase: O sobrenadante foi diluído na proporção 1: 10 (volume/volume) e a atividade enzimática da catalase foi determinada através do procedimento descrito por AEBI (1984). O decréscimo na absorbância a 240 nm a partir da adição de uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à concentração de 30% foi monitorado a cada 15 segundos durante 60 segundos em espectrofotômetro<sup>11</sup>. Este método consiste na mensuração da atividade da catalase pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerando O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

Atividade da Glutathione-S-transferase (GST): O sobrenadante foi diluído na proporção 1:100 (fígado) e 1:20 (testículo) (volume/volume) e a atividade enzimática da GST foi mensurada a partir do procedimento descrito por HABIG *et al.* (1974). Este método está baseado no fato do composto formado pelo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e pela glutathione reduzida (GSH) absorver luz a 340 nm mais intensamente que a GSH ou o CDNB isoladamente.

---

<sup>10</sup> Potter-Elvehjem

<sup>11</sup> U/V Visible, Ultrospec 2000

Lipoperoxidação: Foi realizada uma nova suspensão do sobrenadante em metanol PA (1:2 volume/volume), sonificado por 2 minutos e centrifugado a  $1000 \times 10^3$  g a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. O novo sobrenadante foi utilizado para a mensuração da concentração de hidroperóxidos lipídicos através do procedimento de FOX, descrito por JIANG *et al.* (1992). Este método se baseia na oxidação rápida do  $\text{Fe}^{2+}$  mediada por hidroperóxidos, sob condições de acidez. O  $\text{Fe}^{3+}$  forma um cromóforo em associação ao xilenol laranja que absorve luz fortemente a 560 nm.

Concentração proteica: Todos os resultados foram referidos com base na concentração proteica da amostra, mensurada através do método de BRADFORD (1976). O reagente de Bradford contém como seu principal componente o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida que, ao se ligar às proteínas, tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm. Os resultados são comparados com uma curva padrão, com valores de concentração proteica conhecidos. As leituras dos resultados da atividade de GST, da lipoperoxidação e da concentração protéica das amostras foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca<sup>12</sup>.

Estudo in vitro da atividade sequestradora de radicais livres (DPPH): A reatividade do resveratrol (concentrações de 10 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada através de medidas de alteração da absorbância a 517 nm, de acordo com o método de CHEN *et al.* (1999) modificado. O sistema de reação foi constituído de 750  $\mu\text{L}$  de solução teste (EHS e EHS<sub>p</sub>) e 250  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de DPPH (1mg em 25 ml). Após 5 minutos, o decréscimo da absorbância foi medido. A solução do agente redutor, ácido ascórbico (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),

---

<sup>12</sup> Sunrise – TECAN

foi utilizada como controle positivo do teste e como controle negativo foi utilizado tampão Tris.

### **3.4 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística. As variáveis foram submetidas ao teste de distribuição normal e homocedasticidade e, por serem variáveis paramétricas, foi aplicada a análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelos testes de Dunnett ou Tukey. Para as variáveis relacionadas aos dados da prenhez e da ninhada foi utilizada a fêmea como unidade estatística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono

Não houve diferença significativa entre os pesos dos animais (figura 9) e pesos relativos dos órgãos analisados (figuras 10 a 15), sugerindo ausência de toxicidade sistêmica dos tratamentos.

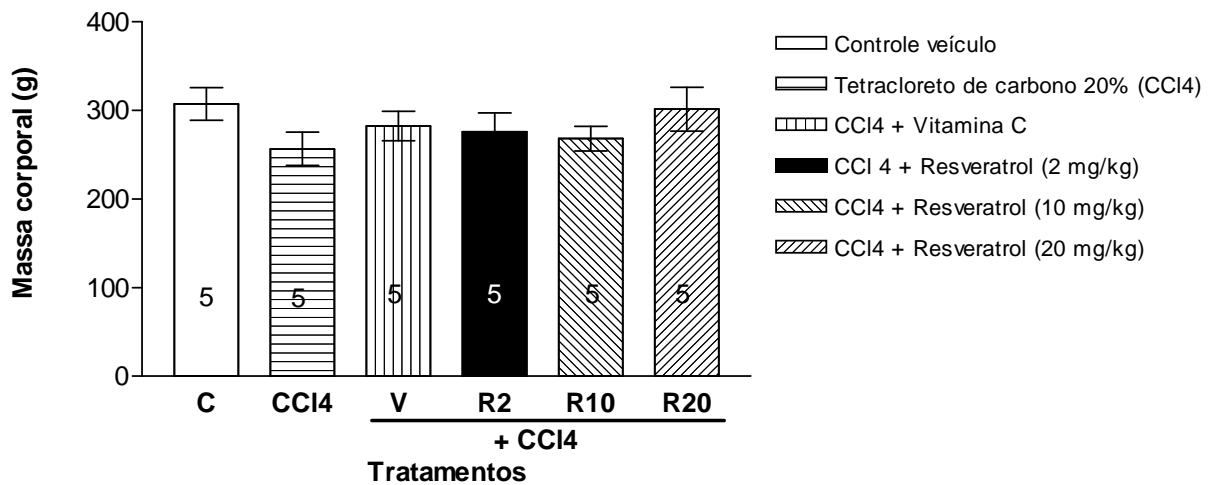


Figura 9: Massa corporal média (g) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras.

Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).



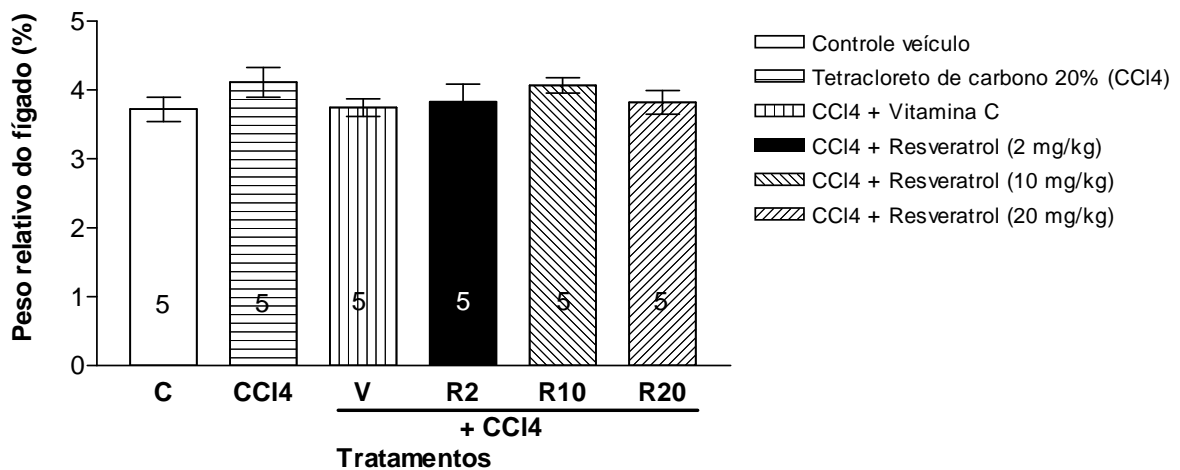


Figura 10: Valores dos pesos do fígado em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).

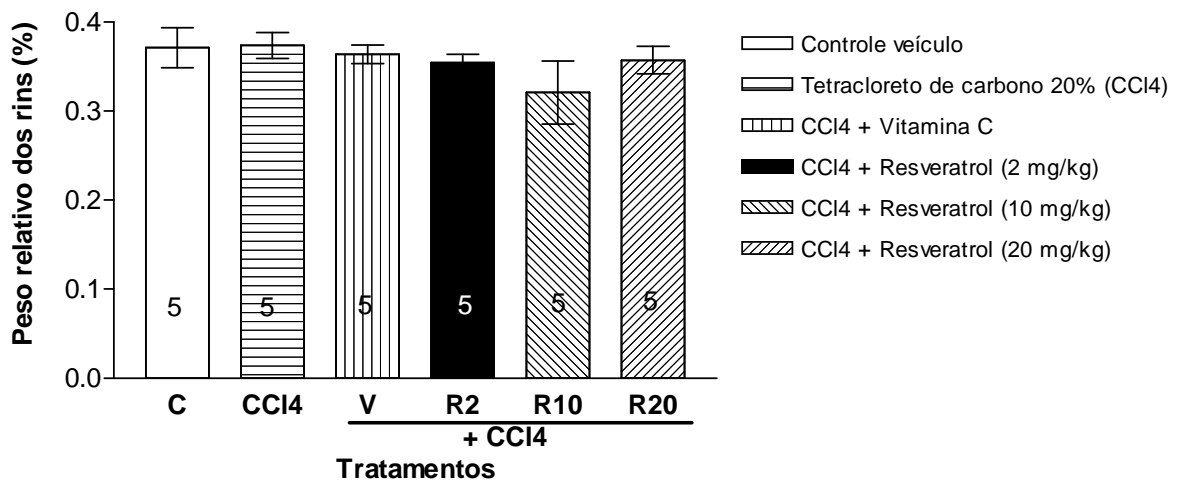


Figura 11: Valores dos pesos dos rins em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).

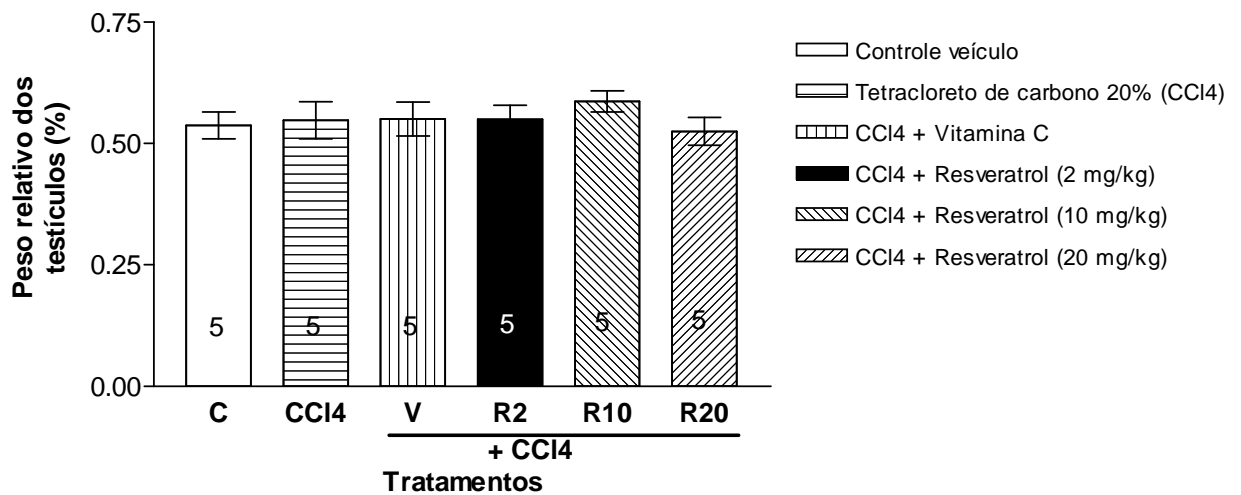


Figura 12: Valores dos pesos dos testículos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras.

Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).

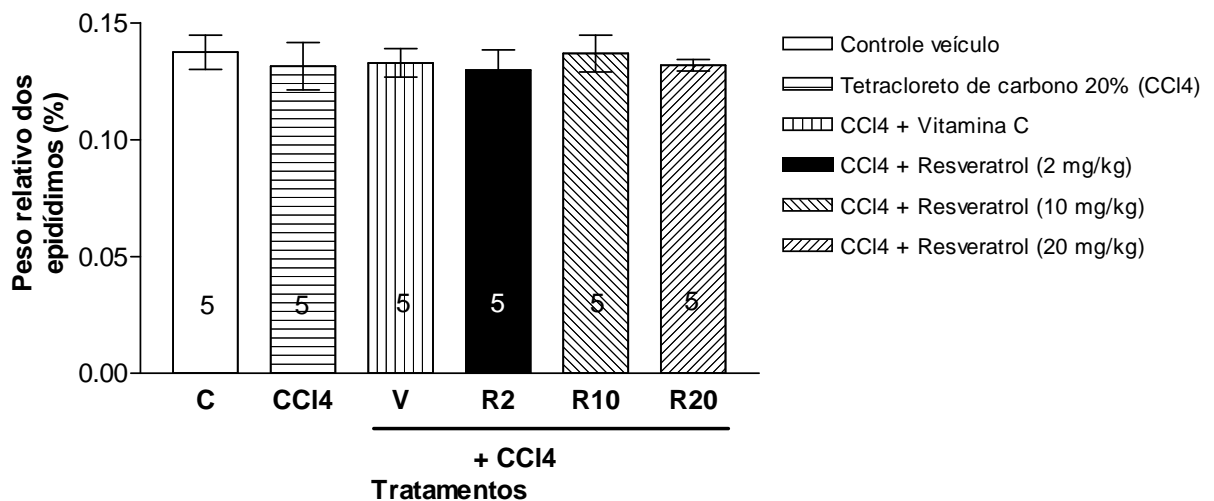


Figura 13: Valores dos pesos dos epidídimos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras.

Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).

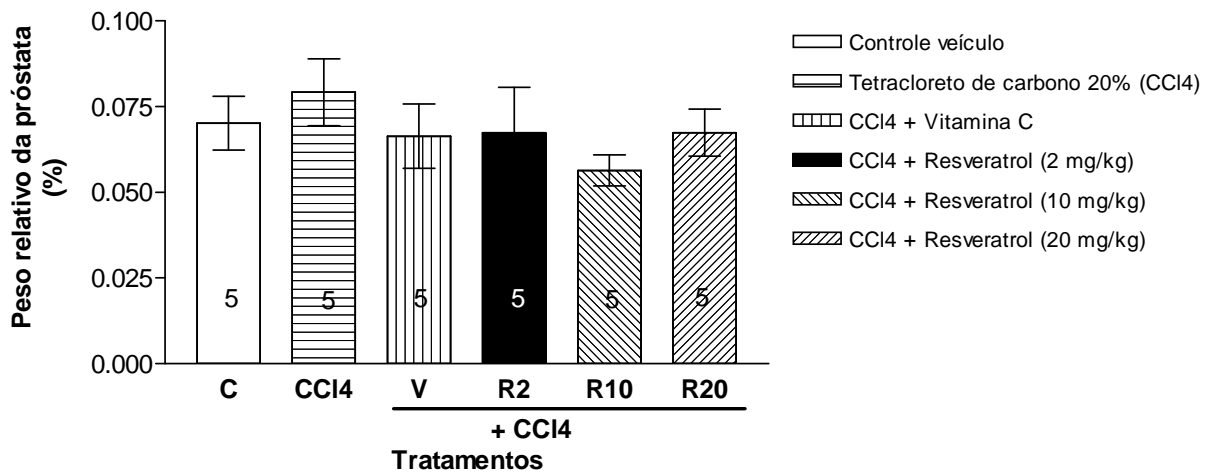


Figura 14: Valores dos pesos da próstata em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras.

Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).

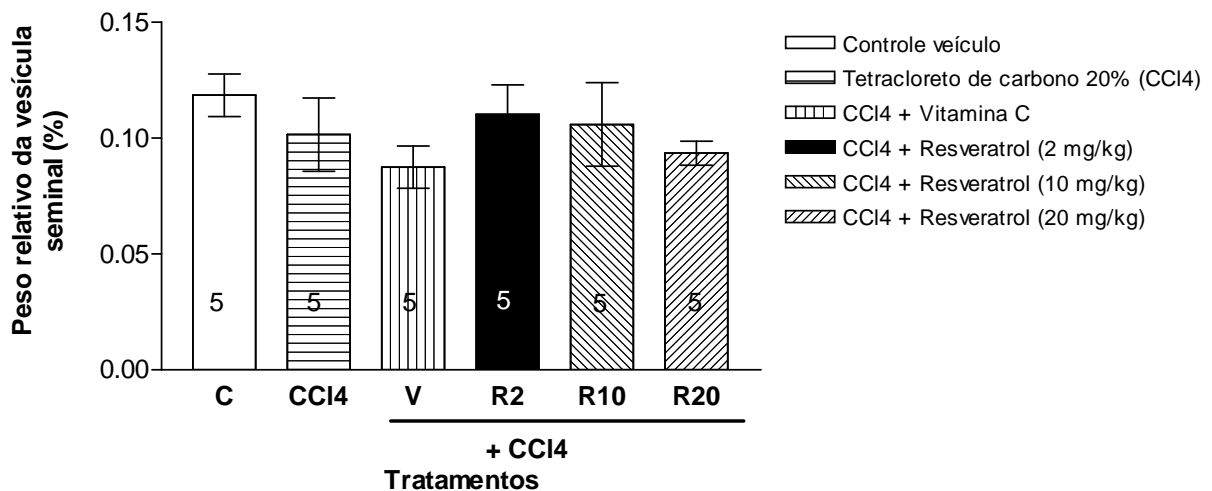


Figura 15: Valores dos pesos da vesícula seminal em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras.

Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).

A avaliação da atividade específica de GST hepática demonstrou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos pré-tratados com vitamina C e resveratrol na dose de 10 mg/kg associados ao tetracloreto de carbono (figura 16), sendo que nestes observou-se uma redução na atividade enzimática.

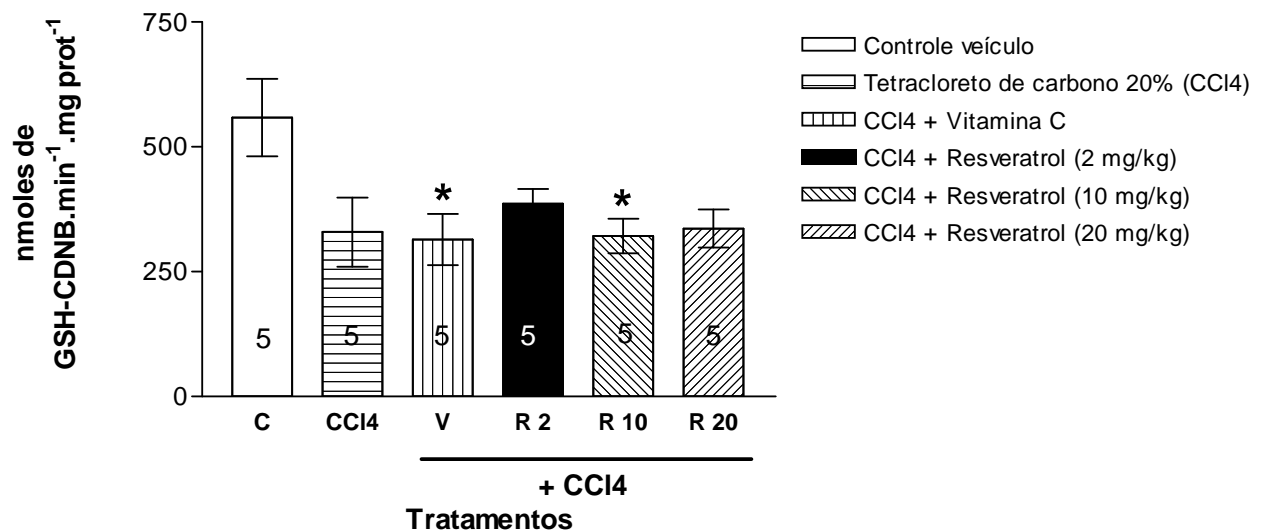


Figura 16: Atividade específica da GST hepática de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras.

Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (ANOVA – teste de Tukey).

Não houve diferença significativa na atividade específica da GST testicular entre os diferentes tratamentos, conforme demonstrado na figura 17.

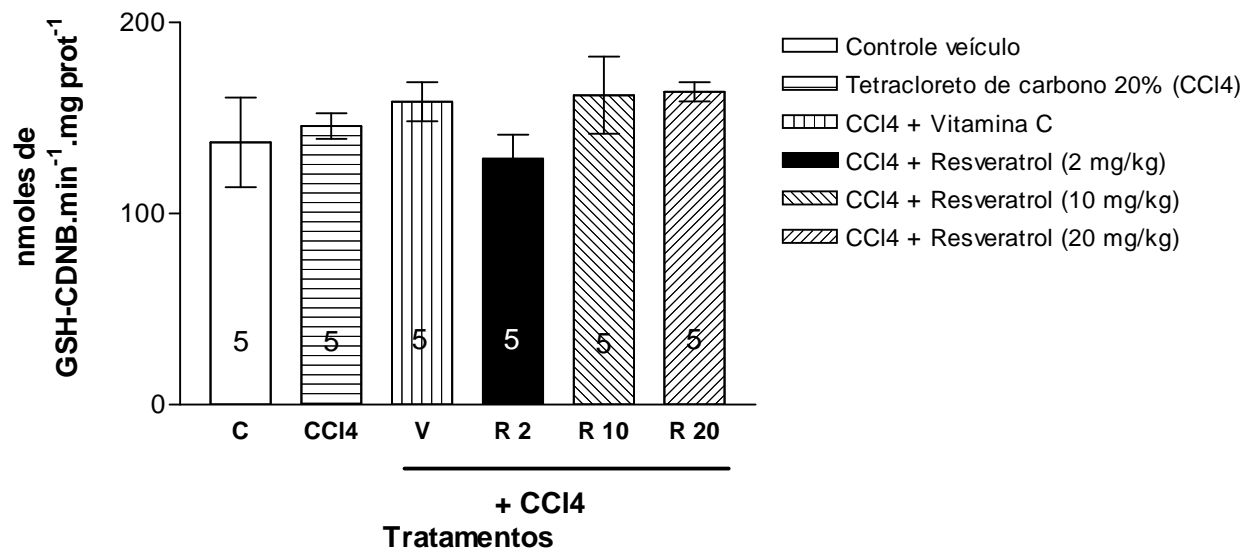


Figura 17: Atividade específica da GST testicular de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com tetracloreto de Carbono isolado ou precedido de tratamento com vitamina C ou diferentes doses de resveratrol. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras.

Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. Nível de significância  $p < 0,05$  (ANOVA).

A atividade antioxidante *in vitro* do resveratrol foi avaliada através de sua ação sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por meio do decréscimo da absorvância a 517 nm. Houve diferença significativa em relação ao controle negativo em todas as doses testadas (figura 18).

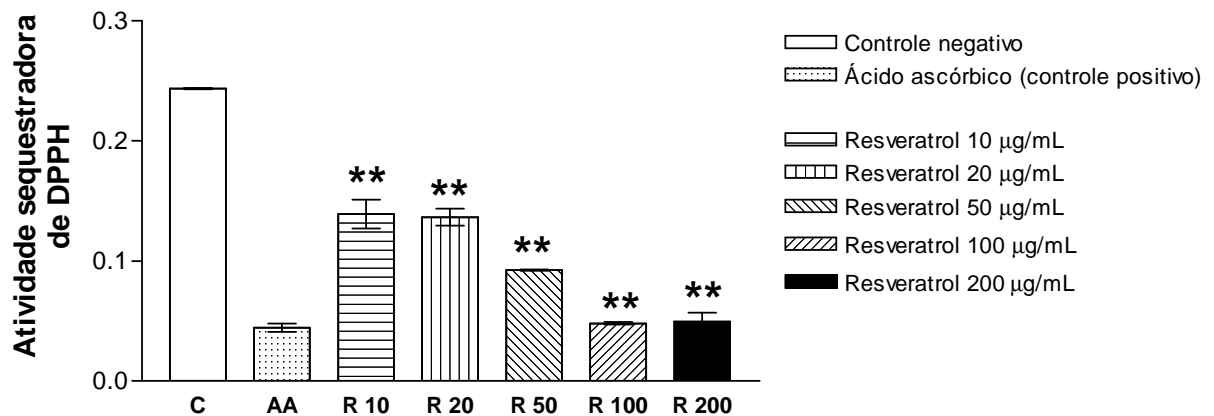


Figura 18. Atividade sequestradora do radical livre DPPH pelo resveratrol. Como controle negativo, foi utilizado o diluente, Tampão Tris, representado por C. Como controle positivo, foi utilizado o ácido ascórbico, representado no gráfico como AA. Os valores 10, 20, 50, 100 e 200 representam as concentrações de resveratrol, em µg/mL.

Os resultados expressam média ± erro padrão. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle (ANOVA – teste de Dunnett).

## 4.2 Experimento DEHP e antioxidantes

### 4.2.1 Dados da gestação

Não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação a índice de nascimentos, perdas pós-implante, tamanho da ninhada e peso médio da ninhada. Os dados da gestação apresentaram-se pouco uniformes, como resultado da perda de alguns indivíduos em decorrência de problemas no parto ou canibalismo, fato que também contribuiu para reduzir o número de machos neonatos nos grupos.

Tabela 1. Dados referentes à gestação de fêmeas de ratos Wistar submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação.

Variáveis	Grupos					
	Controle	Vitamina C	Resveratrol	DEHP	DEHP e vitamina C	DEHP e resveratrol
Animais (n)	15	16	13	16	16	16
Índice de nascimentos (%)	68,3 ± 11,0	46,6 ± 12,2	56,5 ± 13,3	54,3 ± 11,3	55,6 ± 11,9	69,4 ± 11,4
Perdas pós-implante (%)	40,8 ± 10,1	58,8 ± 11,2	44,8 ± 13,0	54,7 ± 10,2	57,6 ± 10,1	44,3 ± 9,88
Tamanho da ninhada	8,47 ± 1,20	6,81 ± 1,30	7,92 ± 1,35	6,88 ± 1,12	5,69 ± 1,12	7,44 ± 1,11
Peso médio da ninhada (g)	5,79 ± 0,201	5,74 ± 0,207	5,78 ± 0,128	5,23 ± 0,268	5,25 ± 0,192	5,72 ± 0,800

Os valores expressam média ± erro padrão.

#### 4.2.2 Dados das fêmeas

O ganho de peso das progenitoras não diferiu entre os grupos, bem como não foram observadas alterações comportamentais ou clínicas nas fêmeas durante o tratamento. Nenhum tratamento afetou o peso relativo do encéfalo das progenitoras, porém pôde ser detectado um aumento significativo no peso relativo do fígado das fêmeas expostas ao DEHP isolado ou associado à vitamina C e ao resveratrol.

Tabela 2. Dados de massa corporal e massa relativa de órgãos (g/g%) de fêmeas de ratos Wistar submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação.

Variáveis	Grupos					
	Controle	Vitamina C	Resveratrol	DEHP	DEHP e vitamina C	DEHP e resveratrol
Animais (n)	15	16	13	16	16	16
Massa corporal (g)	271,5 ± 7,06	267,3 ± 7,26	253,2 ± 6,83	258,6 ± 5,20	252,9 ± 4,90	254,9 ± 6,29
Útero (%)	0,533 ± 0,112	0,620 ± 0,128	0,397 ± 0,107	0,614 ± 0,085	0,558 ± 0,093	0,527 ± 0,077
Encéfalo (%)	0,642 ± 0,016	0,695 ± 0,020	0,698 ± 0,012	0,761 ± 0,075	0,653 ± 0,051	0,786 ± 0,088

Os valores expressam média ± erro padrão.

O peso relativo do fígado apresentou diferença significativa entre os tratamentos conforme demonstrado na figura 19.

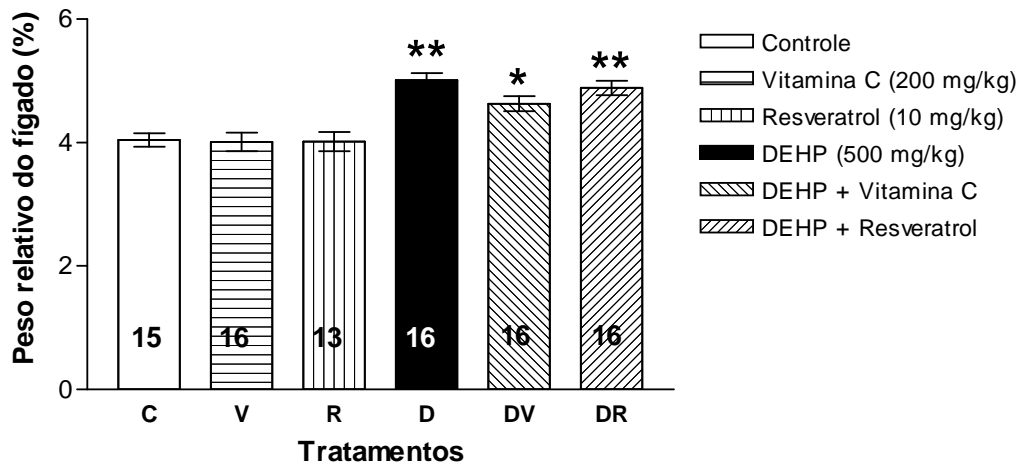


Figura 19: Valores do peso do fígado em relação ao peso corporal (g/g %) de fêmeas de ratos Wistar submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA – teste de Tukey). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle.

#### 4.2.3 Dados dos descendentes machos no 2º dia pós-natal (pnd 2)

Os resultados a seguir se referem aos dados dos machos selecionados (1 ou 2 por ninhada, 7 a 10 ninhadas por grupo), conforme o desenho experimental proposto.

Os animais do grupo tratado com DEHP associado à vitamina C apresentaram uma menor massa corporal quando comparados aos grupos tratados somente com a vitamina C e o resveratrol, mas não quando comparados ao grupo controle (figura 20), sendo que o mesmo ocorreu com a distância anogenital (figura 21).

O peso relativo do encéfalo foi similar em todos os grupos (figura 22) e o peso relativo do fígado, como ocorreu nas progenitoras, apresentou-se aumentado em todos os grupos expostos ao DEHP (figura 23).



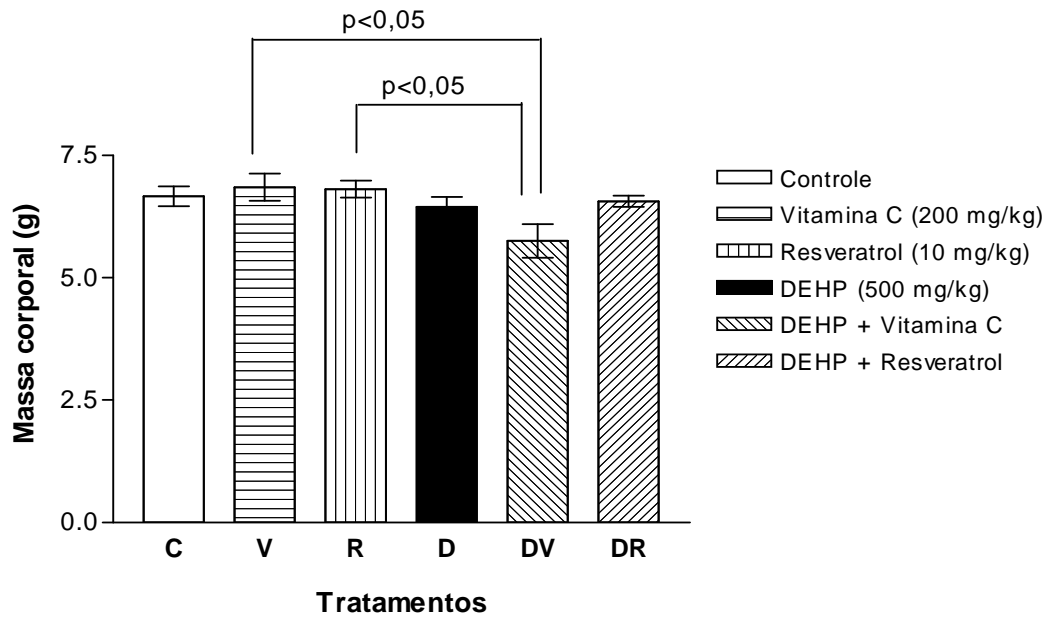


Figura 20: Valores de massa corporal (g) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão e as linhas de conexão entre as barras expressam o nível de significância das diferenças entre os grupos. (ANOVA – teste de Tukey).

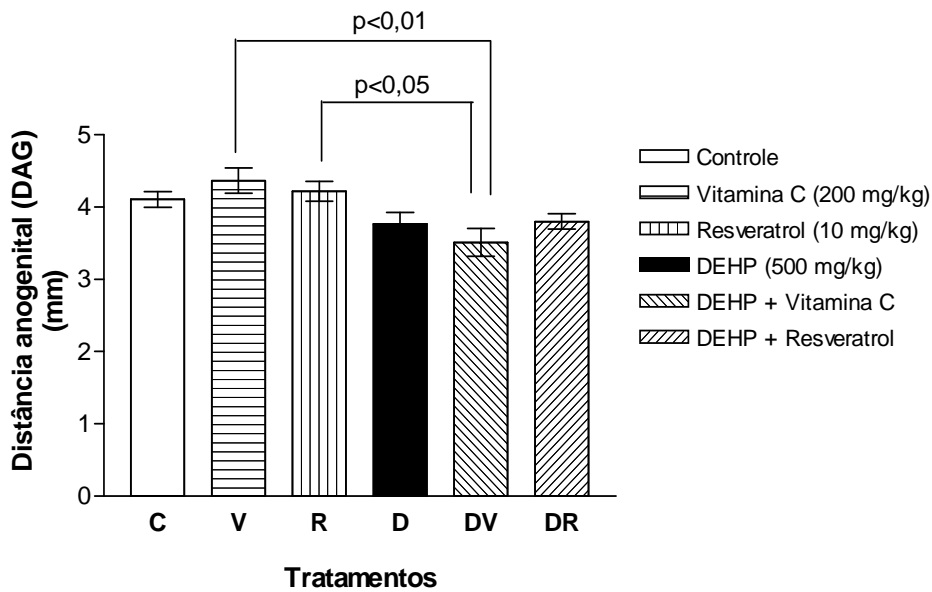


Figura 21: Valores de distância anogenital (mm) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão e as linhas de conexão entre as barras expressam o nível de significância das diferenças entre os grupos. (ANOVA – teste de Tukey).

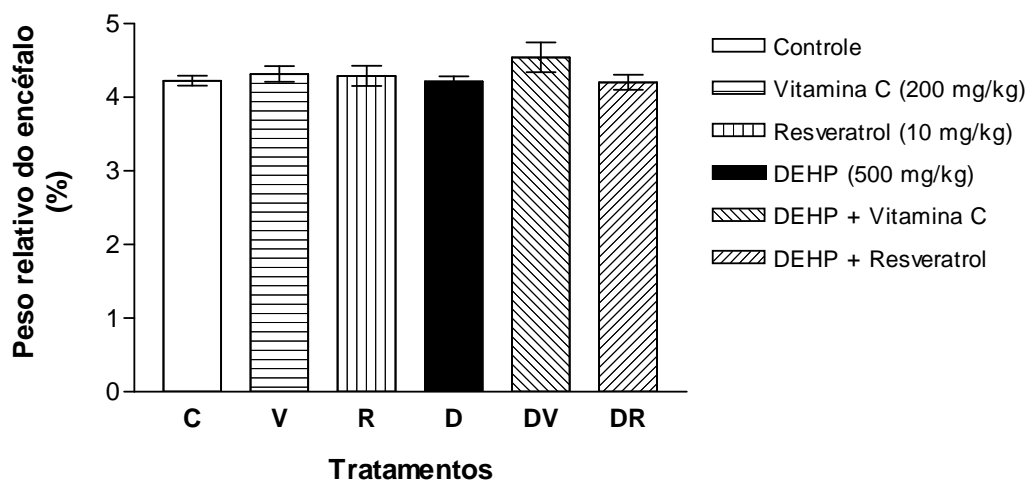


Figura 22: Valores do peso do encéfalo em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA). Nível de significância  $p < 0,05$ .

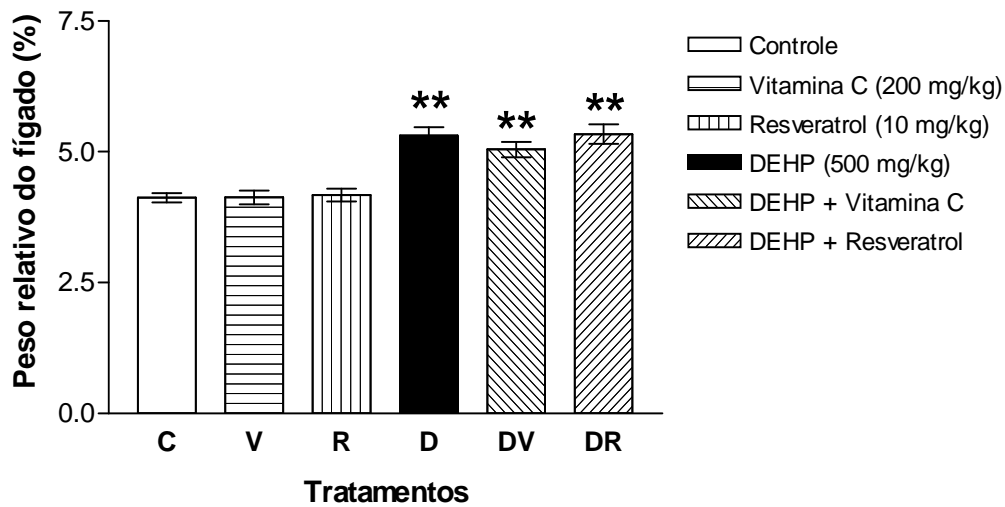


Figura 23: Valores do peso do fígado em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA – teste de Tukey). \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle.

### Histologia

Todos os grupos, exceto o grupo tratado apenas com vitamina C, apresentaram GMNs nas cordas seminíferas. A exposição ao DEHP isolado ou em associação a antioxidantes resultou em um aumento significativo na ocorrência de GMNs, quando comparado aos grupos que não receberam DEHP (figura 24).

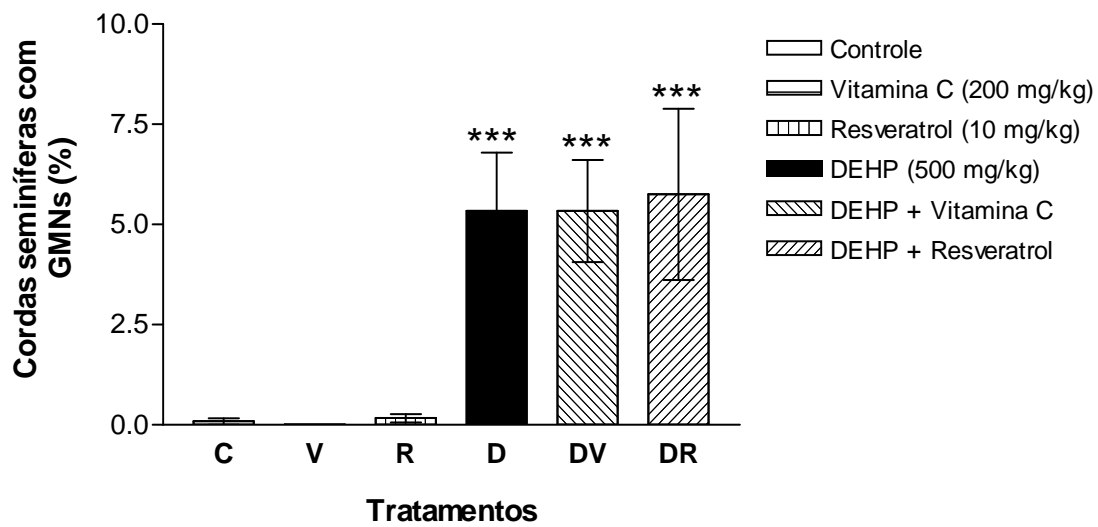


Figura 24: Ocorrência de gonócitos multinucleados nas secções avaliadas de cordas seminíferas de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA – teste de Tukey). \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.

### Imuno-histoquímica

Foram analisadas de forma qualitativa as lâminas pertencentes a dois animais de cada grupo, sendo três secções testiculares de cada animal. Todos os grupos apresentaram coloração caracterizada pela imunomarcagem da proteína StAR no tecido testicular, conforme observado na figura 25.

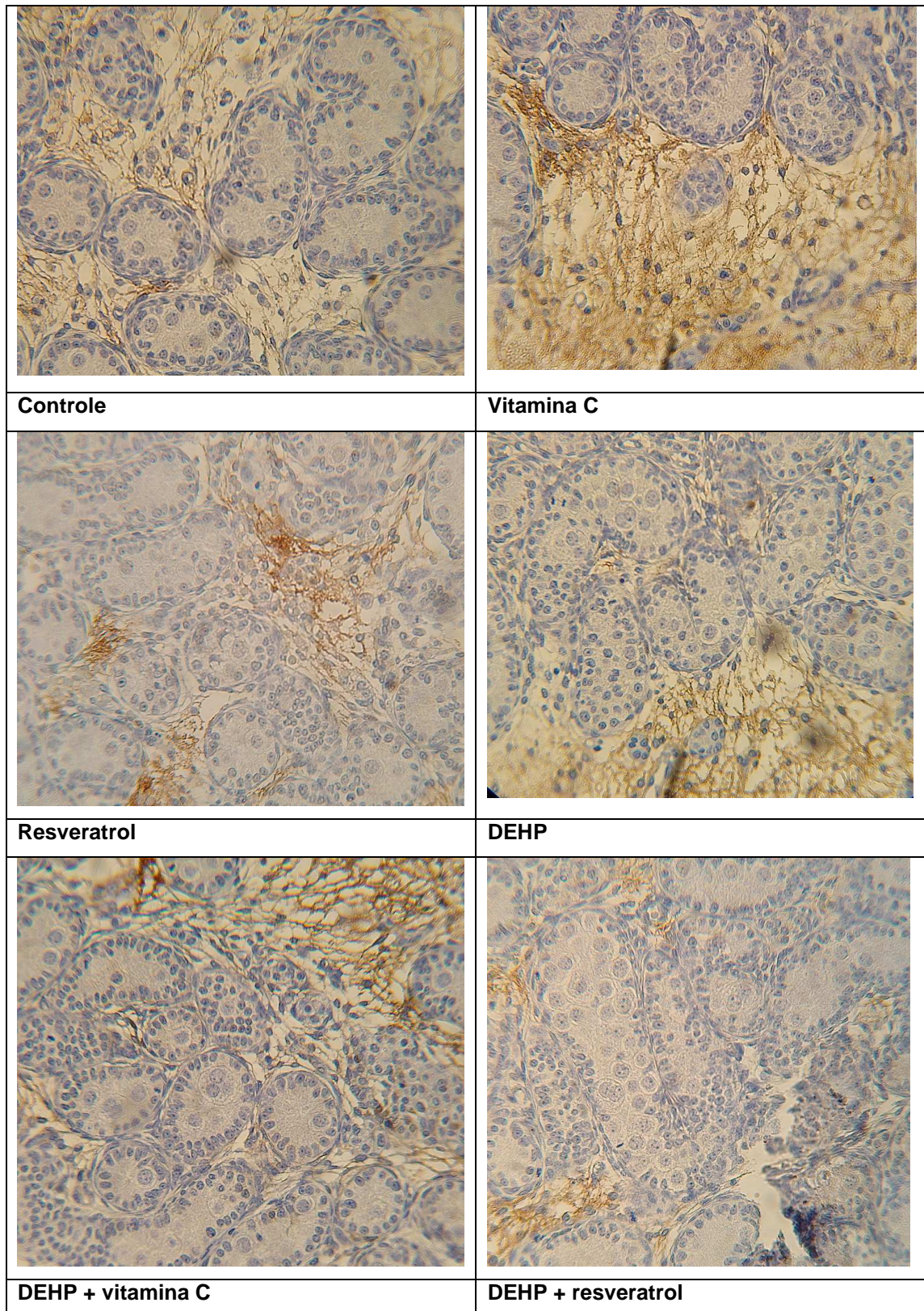


Figura 25: Fotomicrografias representando secções testiculares dos diferentes grupos experimentais submetidas à análise imuno-histoquímica. As regiões de coloração castanha correspondem às áreas imunomarcadas para a proteína StAR. Aumento de 400 X.



### Avaliação hormonal

Os níveis intratesticulares de testosterona não reduziram significativamente nos grupos expostos ao DEHP quando comparados ao grupo controle, porém o grupo tratado com vitamina C apresentou níveis mais elevados de testosterona testicular quando comparado ao grupo que recebeu DEHP associado ao resveratrol, conforme observado na figura 26.

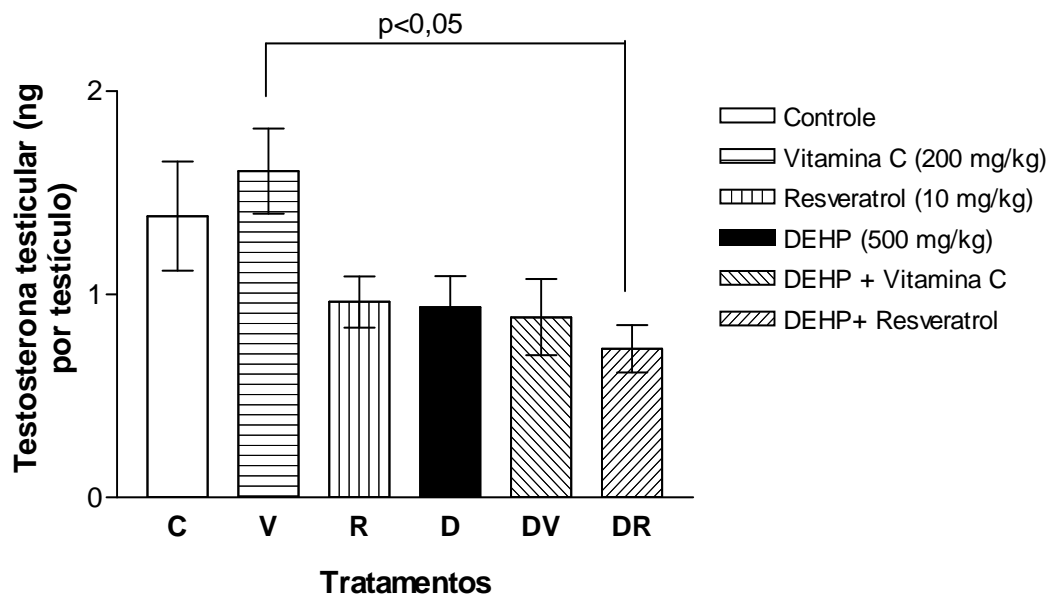


Figura 26: Níveis intratesticulares de testosterona de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão e as linhas de conexão entre as barras expressam o nível de significância das diferenças entre os grupos. (ANOVA – teste de Tukey).

Indicadores de estresse oxidativo

A atividade da catalase foi significativamente maior do que no grupo controle nos grupos expostos ao DEHP em associação com antioxidantes. O mesmo não ocorreu no grupo exposto ao DEHP isolado, apesar de haver uma tendência ao aumento. Todos os grupos expostos ao DEHP apresentaram uma maior atividade da catalase quando comparados aos grupos tratados apenas com vitamina C e resveratrol. O grupo que recebeu o DEHP associado à vitamina C exibiu aumento na atividade da catalase quando comparado ao DEHP isolado (figura 27).

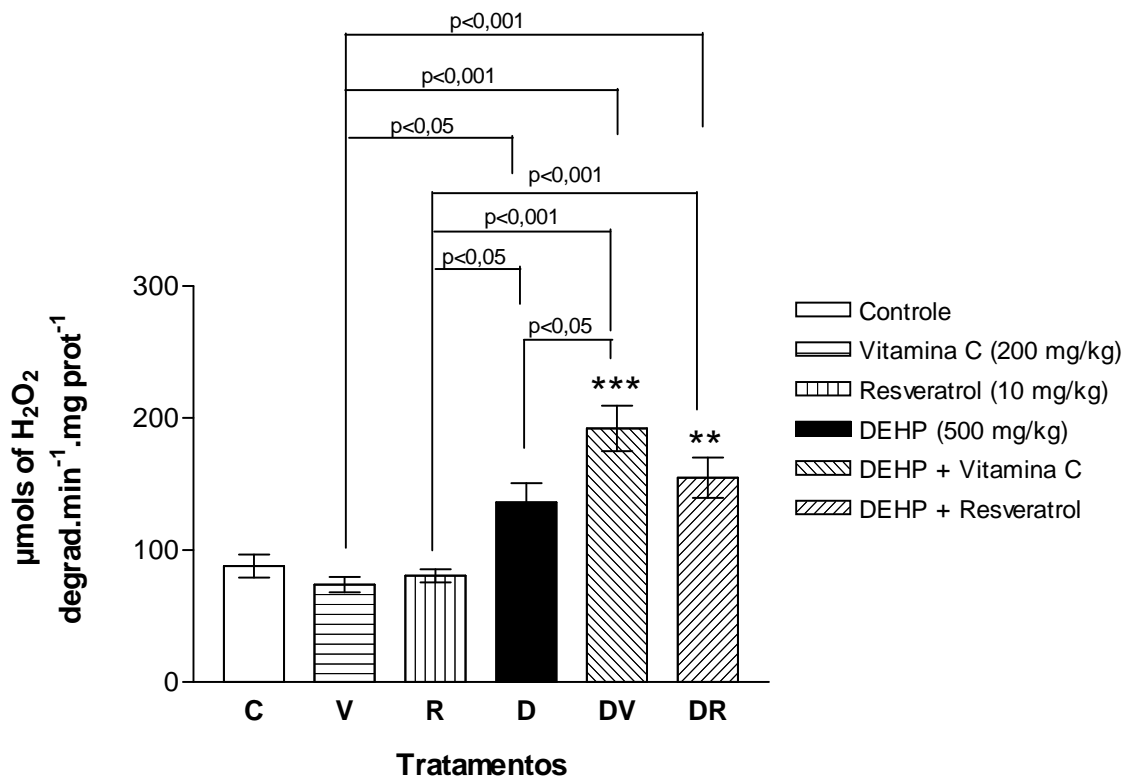


Figura 27: Atividade específica da catalase no fígado de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média ± erro padrão e as linhas de conexão entre as barras expressam o nível de significância das diferenças entre os grupos. (ANOVA – teste de Tukey). \*\*p<0,01, \*\*\*p< 0,001 em relação ao controle.

Todos os grupos expostos ao DEHP apresentaram uma redução na atividade da GST quando comparados ao grupo controle. O grupo que recebeu apenas resveratrol apresentou uma maior atividade de GST em relação a ambos os grupos tratados com DEHP em associação a antioxidantes (figura 28).

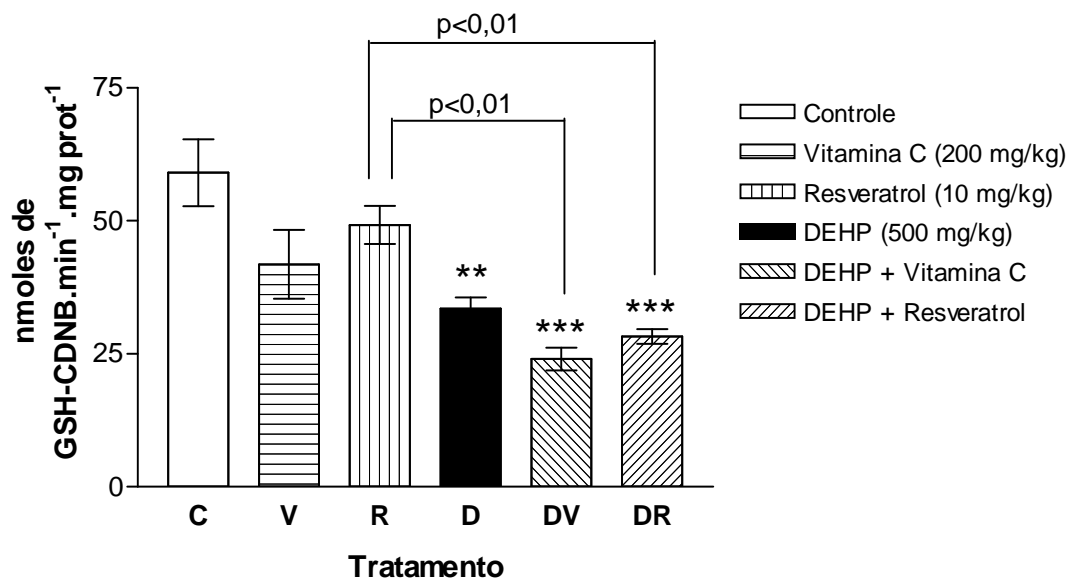


Figura 28: Atividade específica da GST hepática de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão e as linhas de conexão entre as barras expressam o nível de significância das diferenças entre os grupos. (ANOVA – teste de Tukey). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

O nível de hidroperóxidos lipídicos foi elevado significativamente apenas no grupo que recebeu DEHP em associação à vitamina C, quando comparado ao grupo controle. O mesmo grupo também apresentou uma maior lipoperoxidação comparado aos grupos expostos ao DEHP e à vitamina C isoladamente (figura 29).



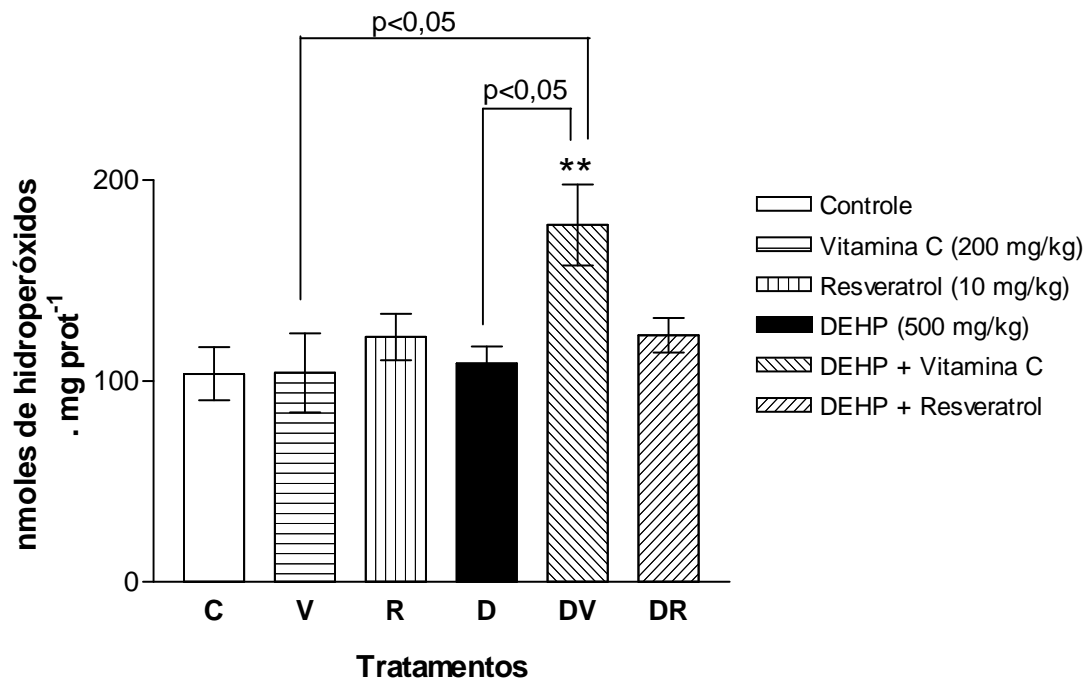


Figura 29: Concentração de hidroperóxidos lipídicos no fígado de ratos Wistar machos (pnd2) cujas mães foram submetidas ao tratamento com DEHP isolado e associado à vitamina C ou ao resveratrol, do 7º dia de gestação ao 2º dia de lactação. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão e as linhas de conexão entre as barras expressam o nível de significância das diferenças entre os grupos. (ANOVA – teste de Tukey). \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle.

#### 4.3 Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal

Não houve diferença significativa entre os pesos dos animais e peso médio relativo de fígado, rins e adrenais, sugerindo ausência de toxicidade sistêmica dos tratamentos.

Tabela 3. Dados referentes à massa corporal e peso relativo dos órgãos (g/g%) de ratos Wistar machos expostos ao DEHP em três diferentes doses durante 30 dias consecutivos.

Variáveis	Grupos			
	Controle	DEHP 250 mg/kg/dia	DEHP 500 mg/kg/dia	DEHP 750 mg/kg/dia
Animais (n)	15	15	14	15
Fígado (%)	5,12 ± 0,63	5,16 ± 0,11	5,31 ± 0,09	5,41 ± 0,07
Rins (%)	0,414 ± 0,004	0,405 ± 0,006	0,405 ± 0,004	0,415 ± 0,006
Adrenais (%)	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001

Os valores expressam média ± erro padrão.

Foi observada uma redução significativa nos pesos relativos dos testículos (figuras 30 e 31), vesícula seminal (figura 32) e músculo elevador anal/bulbocavernoso (figura 33), assim como um aumento no peso relativo dos epidídimos (figura 34) nos animais expostos à maior concentração de DEHP.

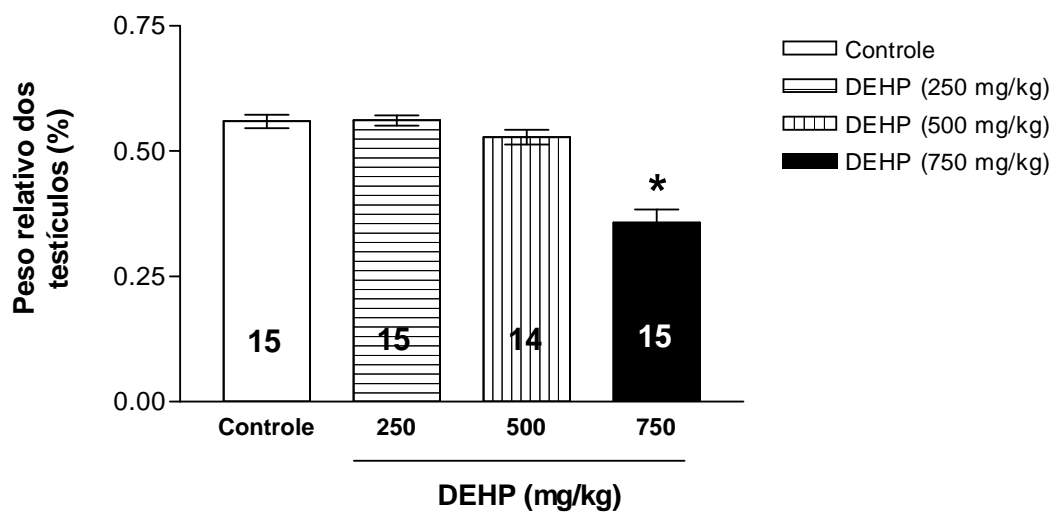


Figura 30: Valores do peso dos testículos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média ± erro padrão. (ANOVA – teste de Dunnett). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.



Figura 31: Fotografia dos testículos de um animal do grupo controle (indicado pela letra C) e um animal do grupo da maior dose de DEHP (750 mg/kg) (indicado como D750). Notar a diferença de tamanho, evidenciando a interferência no desenvolvimento testicular induzida pelo DEHP.

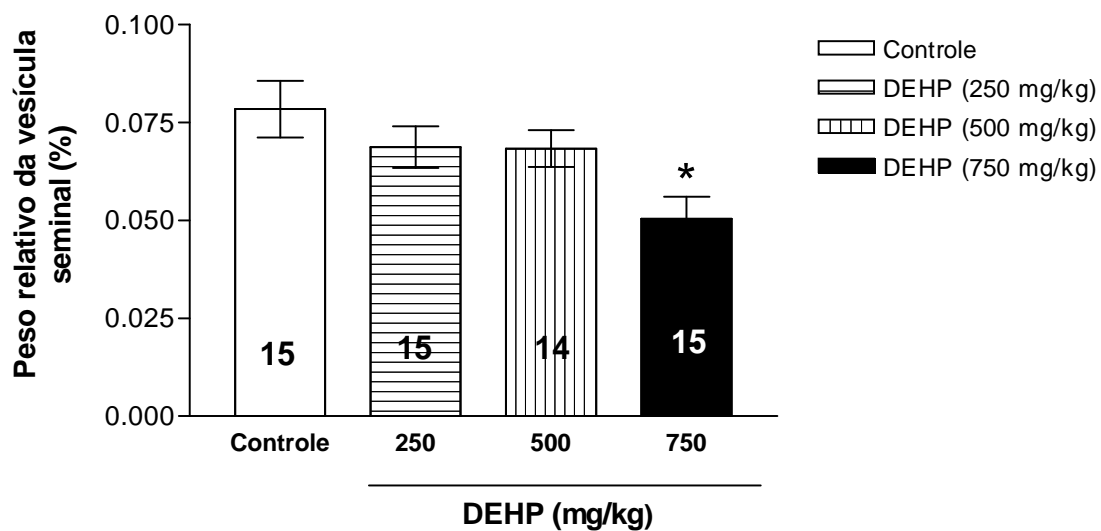


Figura 32: Valores do peso da vesícula seminal em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA – teste de Dunnett). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

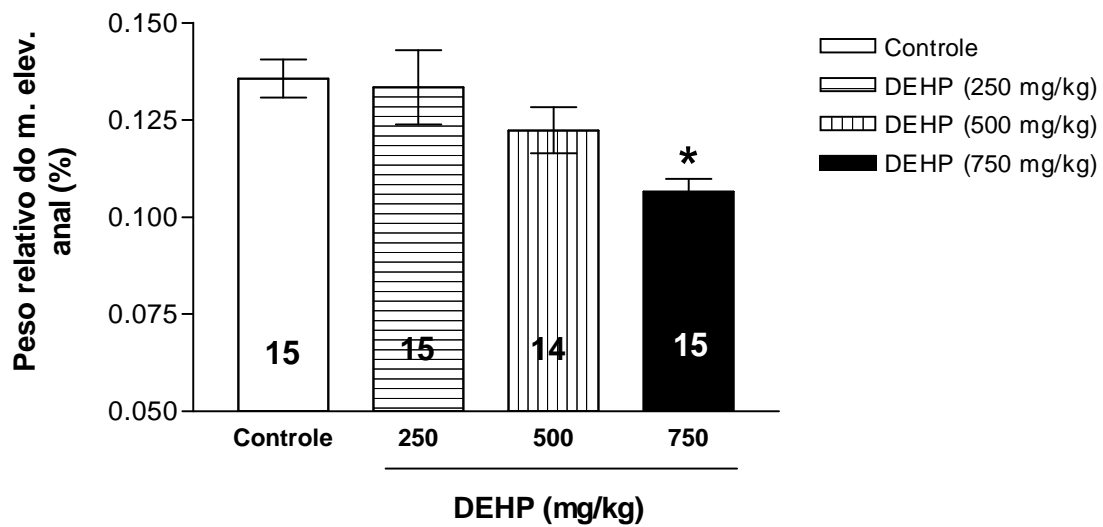


Figura 33: Valores do peso do músculo elevador anal/bulbocavernoso em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA – teste de Dunnett). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

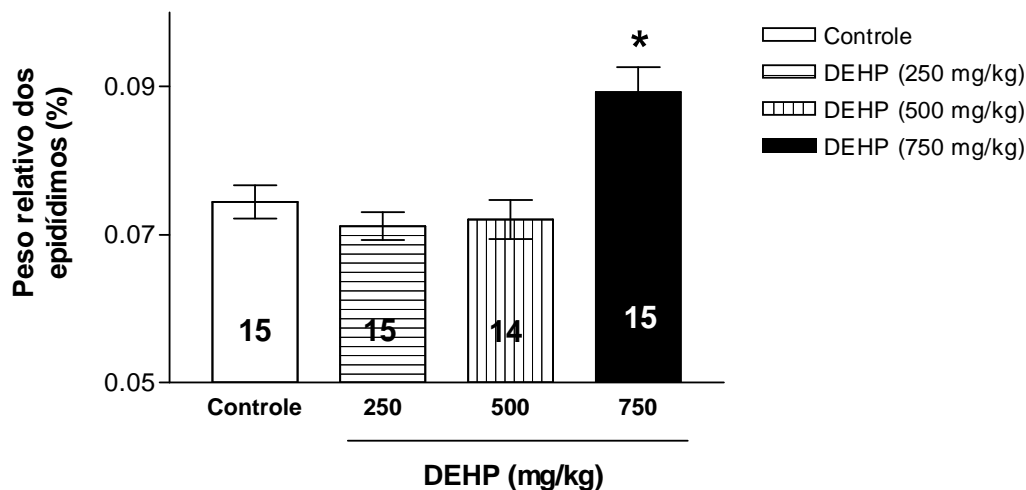


Figura 34: Valores do peso dos epidídimos em relação ao peso corporal (g/g %) de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA – teste de Dunnett). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

A idade média para a ocorrência de separação prepucial não diferiu entre os grupos. Porém, houve uma tendência ao atraso na separação prepucial nos animais tratados com o DEHP como observado nas figuras 35 e 36. O grupo exposto à maior dose de DEHP apresentou uma maior porcentagem de animais que não atingiram a separação prepucial completa ao pnd 44 quando comparado ao grupo controle. Além disso, alguns animais dos grupos que receberam as doses de 500 mg/kg/dia (n=1) e 750 mg/kg/dia (n=3) completaram a separação prepucial após o pnd 48.

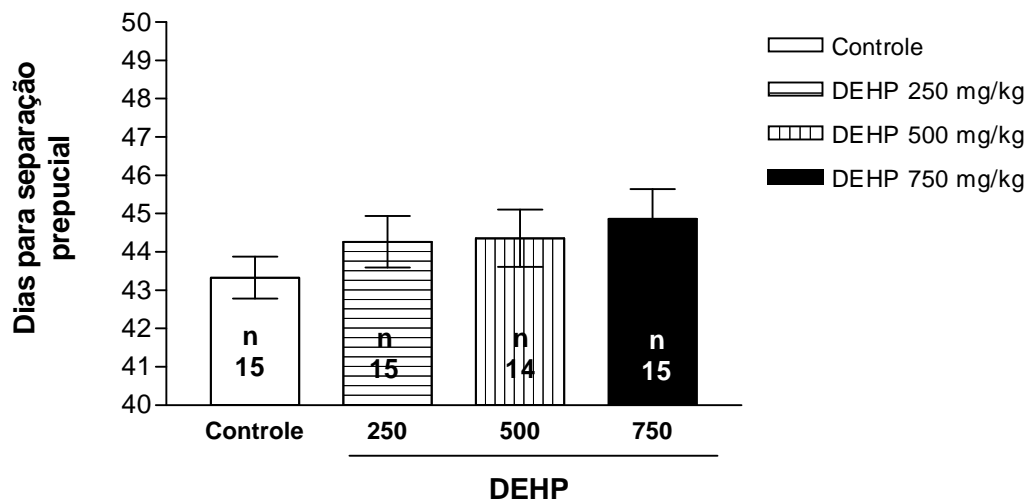


Figura 35: Valores médios de dias para a ocorrência de separação prepucial em ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA).

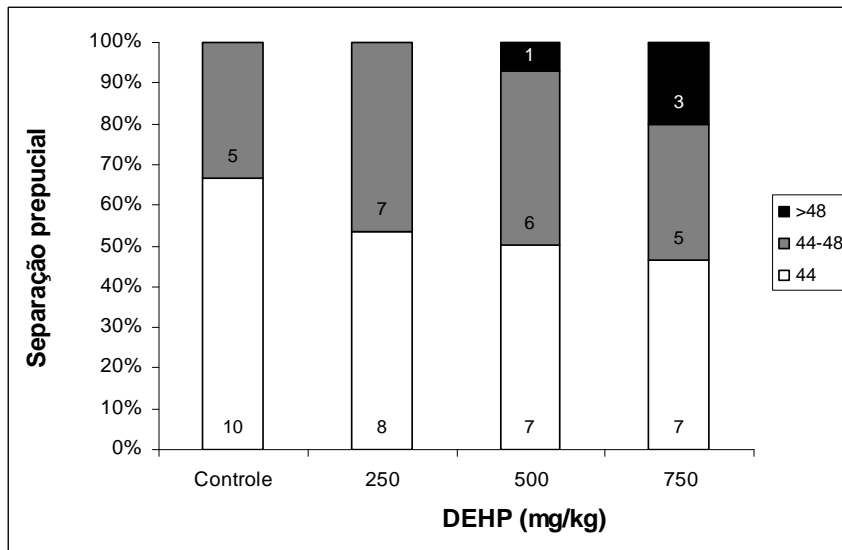


Figura 36: Porcentagem de animais que apresentaram separação prepucial completa. As barras indicam a porcentagem de animais nas diferentes categorias. O número de animais encontra-se dentro das barras.

Os níveis de colesterol foram mensurados após o tratamento com o DEHP no soro e tecido testicular e a relação entre a dose de DEHP e o colesterol sérico revelou uma curva dose-resposta bifásica. A concentração de colesterol no soro reduziu significativamente na dose mais baixa de DEHP (250 mg/kg), porém retornou aos valores do controle na dose de 750 mg/kg (figura 37). Os níveis de colesterol no tecido testicular (mg/g) aumentaram significativamente com a exposição ao DEHP (figura 38). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas nos níveis de colesterol total testicular (mg por testículo) entre os grupos, apesar de haver uma tendência à diminuição na maior dose de DEHP (750 mg/kg) (figura 39).

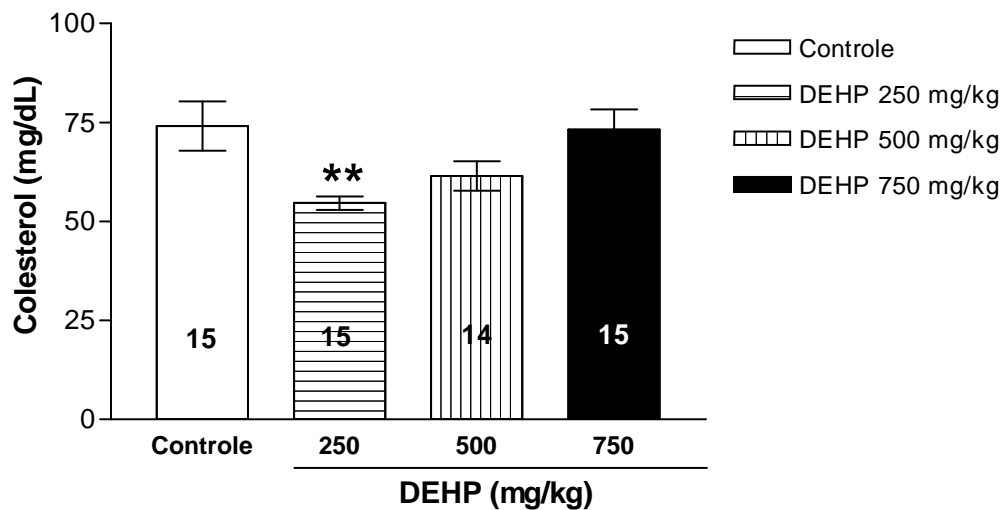


Figura 37: Níveis séricos de colesterol de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA – teste de Dunnett). \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle.

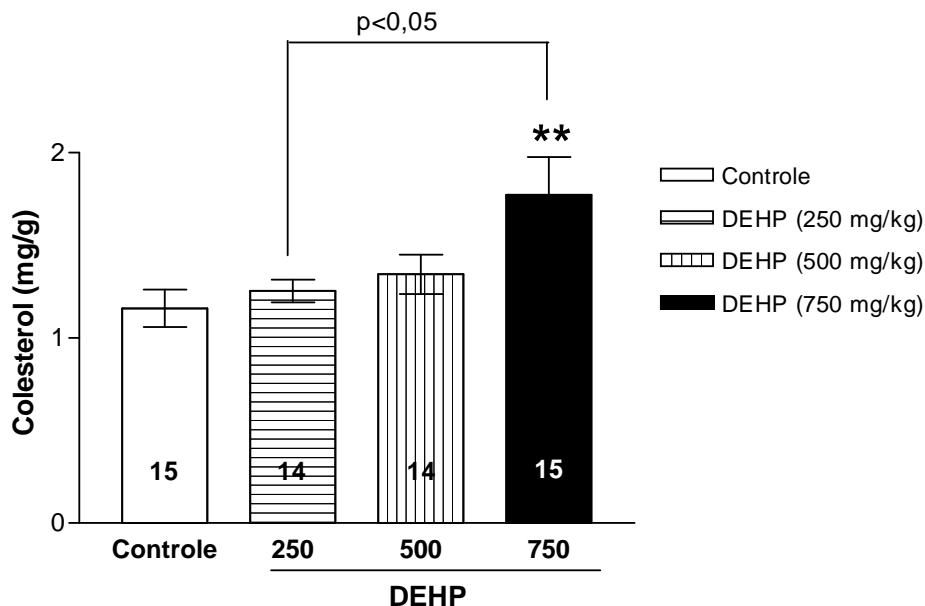


Figura 38: Níveis de colesterol no tecido testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão e a linha de conexão entre as barras expressa o nível de significância da diferença entre os grupos. (ANOVA – teste de Dunnett). \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle.

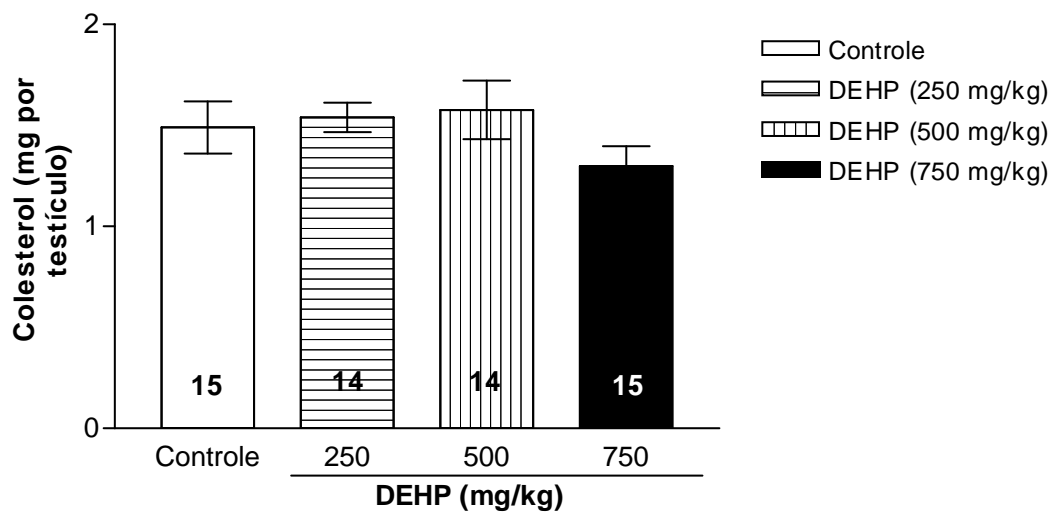


Figura 39: Níveis de colesterol total testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA). Nível de significância  $p < 0,05$  em relação ao controle.

Os níveis de testosterona foram mensurados no soro e nos testículos e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, foi observada uma tendência à redução tanto nos níveis séricos quanto testiculares de testosterona nos animais expostos à dose de 750 mg/kg de DEHP (figuras 40 a 42). Quanto aos níveis de T4, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 43).



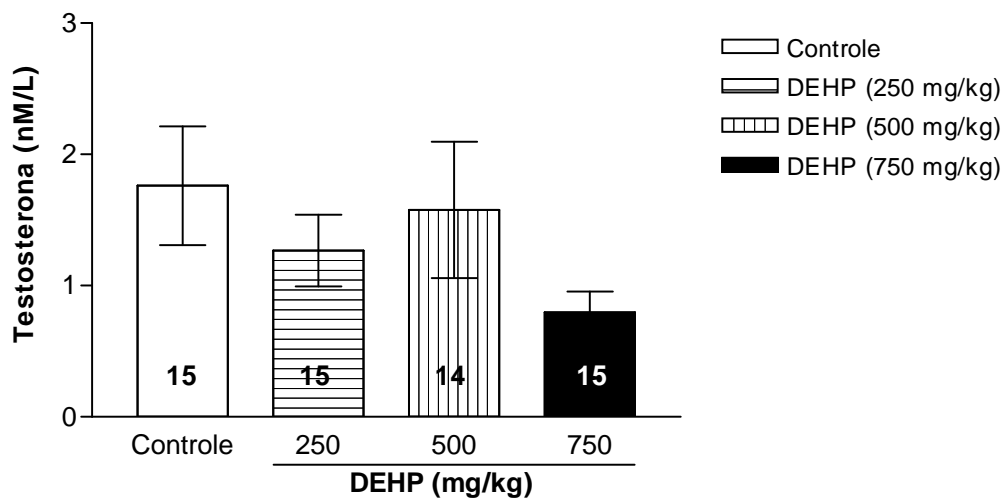


Figura 40: Níveis de testosterona sérica de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA).

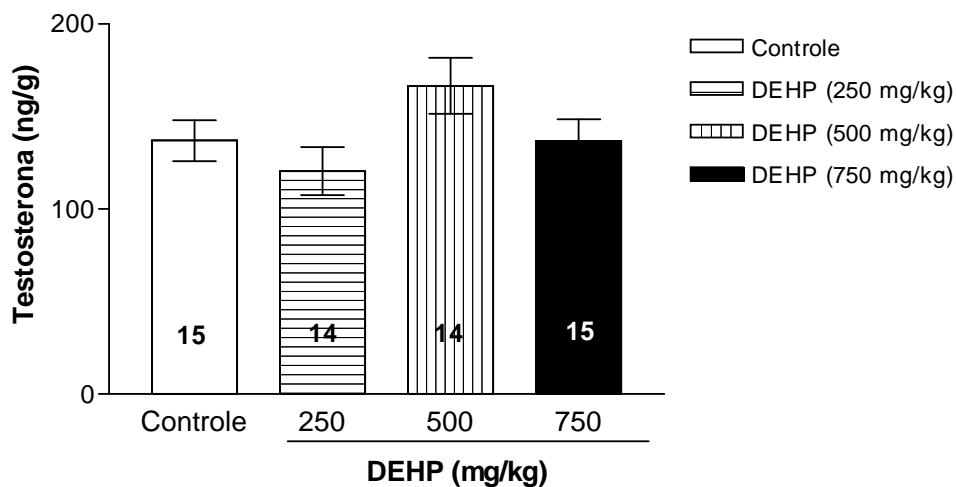


Figura 41: Níveis de testosterona no tecido testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA).

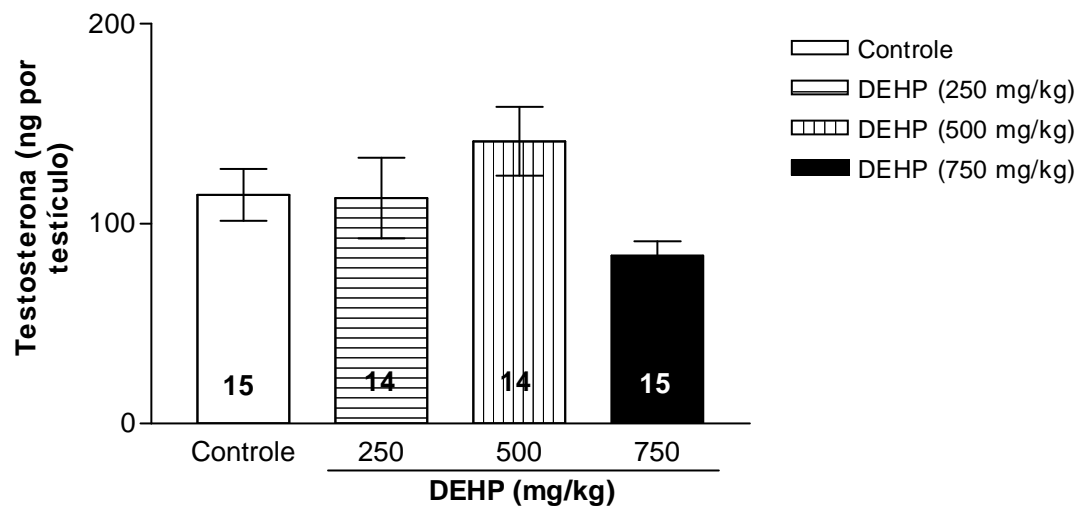


Figura 42: Níveis de testosterona total testicular de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA).

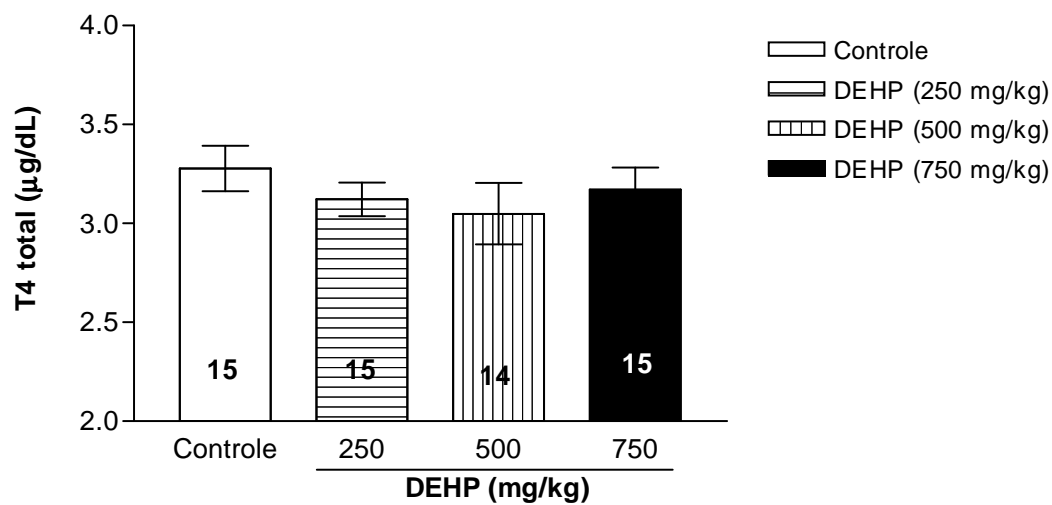


Figura 43: Níveis de tiroxina (T4 total) sérica de ratos Wistar machos em idade pubertal (pnd 51) submetidos ao tratamento com diferentes doses de DEHP durante 30 dias consecutivos. Os resultados expressam média  $\pm$  erro padrão. (ANOVA).

## 5. DISCUSSÃO

Vários estudos são conduzidos com o objetivo de desenvolver técnicas mais precisas para a avaliação dos riscos da exposição aos ftalatos, porém este tem se revelado um problema bastante complexo e permanece um vasto campo para pesquisas futuras. Os ftalatos apresentam uma multiplicidade de efeitos que variam de acordo com diferentes fatores, tais como a espécie animal, a dose empregada, a faixa etária e a via de exposição. Um exemplo desta diversidade é a maior susceptibilidade de crianças recém-nascidas ao DEHP por possuírem maior atividade da lipase gástrica, aumentando a sua absorção e menor potencial de glicuronidação, dificultando a sua eliminação (WEUVE et al., 2006). A mensuração da concentração de metabólitos urinários dos ftalatos em humanos constitui uma importante ferramenta na avaliação da exposição, entretanto a significância fisiológica desta análise ainda não está bem estabelecida e, portanto, deixa lacunas a serem preenchidas nas análises de risco toxicológico (CALAFAT e McKEE, 2006). Desta forma, quaisquer estudos que objetivem esclarecer aspectos farmacológicos e fisiológicos do mecanismo de ação dos ftalatos são fundamentais para aprimorar o conhecimento nesta área da toxicologia.

### **5.1 Experimento resveratrol e tetracloreto de carbono**

O tetracloreto de carbono é um composto comumente utilizado em estudos de hepatotoxicidade e estresse oxidativo. Estudos anteriores conduzidos para avaliar a ação de alguns compostos na quimioprevenção de efeitos induzidos pela administração de CCl<sub>4</sub> demonstraram que algumas substâncias são capazes de

minimizar os efeitos tóxicos decorrentes desta exposição. Os resultados obtidos por MARZI *et al.* (1980) indicaram que a necrose hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub> pode ser minimizada pela administração de benadril. LIN *et al.* (2008) demonstraram que a suplementação com extratos de *Solanum nigrum Linn* reduziu a incidência de lesões hepáticas e o estresse oxidativo em ratos expostos ao CCl<sub>4</sub>.

A glutathione S transferase é uma enzima pertencente a uma família multigênica de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos à GSH. A família destas enzimas é caracterizada por ter uma ampla especificidade de substrato com baixa afinidade. Esta baixa eficiência catalítica teve importante papel na evolução das GSTs como agente detoxificador de amplo espectro, tanto de componentes endógenos quanto exógenos (TEW *et al.*, 1999).

Os dados de GST hepática dos animais submetidos ao CCl<sub>4</sub>, associado ou não a antioxidantes revelaram uma redução significativa ou uma tendência à redução na atividade desta enzima em comparação ao grupo controle tratado apenas com veículo. Estes resultados são condizentes com outros estudos realizados com a administração de CCl<sub>4</sub> por via oral de forma aguda (SHEWEITA *et al.*, 2001; MANNA *et al.*, 2006) ou subcrônica (LIN *et al.*, 2008). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com vitamina C e resveratrol em relação ao grupo exposto apenas ao CCl<sub>4</sub>, o que demonstrou que estas substâncias, nas doses utilizadas, não foram capazes de prevenir a ação do CCl<sub>4</sub> sobre a GST hepática. Desta forma, o CCl<sub>4</sub> não se caracterizou como uma substância ideal para a indução de estresse oxidativo e para a avaliação da atividade de substâncias antioxidantes neste desenho experimental.

A administração aguda de CCl<sub>4</sub> isolado ou associado ao pré-tratamento com antioxidantes não alterou significativamente a atividade de GST testicular. Estudos

de toxicidade crônica induzidas por substâncias como a ocratoxina e a carbendazina resultaram na redução dos níveis de GST testicular em camundongos e ratos (RAJESWARY *et al.*, 2007; VERMA e CHAKRABORTY, 2008). CASTILLA-CORTAZAR *et al.* (2004) demonstraram que a barreira hematotesticular pode ser alterada pela administração crônica de CCl<sub>4</sub>. A não ocorrência de alterações significativas na GST testicular no presente experimento pode ter relação com a resistência da barreira hematotesticular a uma única dose oral de CCl<sub>4</sub>.

A atividade antioxidante *in vitro* do resveratrol foi comprovada através de sua ação sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) em todas as doses testadas. HUNG *et al.* (2000) testaram a atividade sequestradora de DPPH do resveratrol em diferentes doses e correlacionaram com sua atividade *in vivo* e obtiveram resultados promissores para seu uso em lesões de isquemia e reperfusão, uma condição clássica de geração de radicais livres.

Os dados de ganho de peso, massa corporal e massa dos órgãos avaliados ao final do experimento não demonstraram diferença significativa, sugerindo que as substâncias nas doses e tempo de tratamento utilizados não foram capazes de comprometer os animais de forma sistêmica.

Com base no que foi citado, o protocolo do experimento realizado *in vivo* não foi eficiente na avaliação da ação quimioprotetora do resveratrol. Desta forma, optou-se por utilizar a dose de 10 mg/kg de resveratrol nos experimentos subsequentes, uma vez que esta dose é preconizada por outros autores em experimentos *in vivo* com estresse oxidativo em ratos (CHANDLER *et al.*, 2005; TOKLU *et al.*, 2006) e no presente experimento não houve diferença significativa entre as doses testadas.

## 5.2 Experimento DEHP e antioxidantes

Os órgãos do trato reprodutivo são equipados de uma linha de defesa contra o estresse oxidativo mantendo o ambiente celular em equilíbrio, uma vez que a esteroidogênese gera radicais livres sob condições fisiológicas (PELTOLA *et al.*, 1996). Xenobióticos como os ftalatos podem alterar este balanço pelo aumento da geração de ERMO ou por depleção das defesas antioxidantes (KASAHARA *et al.*, 2002). Os resultados obtidos neste trabalho a partir do tratamento de fêmeas prenhes com o DEHP associado ao resveratrol ou à vitamina C demonstraram que estas combinações podem não ser benéficas para a função reprodutiva dos descendentes, podendo ainda resultar em uma exacerbação do estresse oxidativo em algumas situações.

Várias estratégias para prevenir o estresse oxidativo causado por poluentes já foram empreendidas e o emprego de vitaminas antioxidantes constitui a abordagem mais comum. GUPTA *et al.* (2004) verificaram que a suplementação com vitamina C e/ou vitamina E minimizou o estresse oxidativo e desempenhou funções fundamentais na co-regulação da produção de esteróides em ratos expostos ao cádmio. ISHIHARA *et al.* (2000) observaram que a suplementação com as vitaminas C e E para ratos expostos ao DEHP foi capaz de proteger os testículos da ocorrência de gonadotoxicidade. Recentemente, em um estudo delineado para avaliar o efeito do resveratrol na proteção testicular aos danos provocados por toxinas ambientais, os autores concluíram que esta fitoalexina natural pode melhorar significativamente a disospermia induzida pela 2,5-hexanodiona e restabelecer a espermatogênese (JIANG *et al.*, 2008).

No presente estudo, a administração de DEHP isolado ou associado a antioxidantes resultou em hepatomegalia nas progenitoras e nos filhotes avaliados, entretanto os animais tratados apenas com os antioxidantes não apresentaram esta alteração. ISHIHARA *et al.* (2000) observou a ocorrência de hepatomegalia em animais tratados com dietas contendo 2% de DEHP em associação com as vitaminas C e E, bem como em animais que receberam apenas a suplementação vitamínica. RUSYN *et al.* (2001) sugeriram que baixos níveis de substâncias oxidantes podem desempenhar uma função em sinalizar a indução de proliferação de células do parênquima hepático expostas a agentes proliferadores de peroxissomas. Conseqüentemente, o tratamento concomitante com antioxidantes pode não ser capaz de prevenir esta típica ação dos ftalatos no tecido hepático e, em alguns casos, pode ainda funcionar como uma fonte de atividade pró-oxidativa.

A vitamina C possui três atividades biológicas de particular relevância à reprodução, todas dependentes de seu potencial como agente redutor; ela é necessária para a biossíntese de colágeno, para a biossíntese de hormônios esteróides e peptídicos e previne ou reduz a oxidação de biomoléculas (LUCK *et al.*, 1995). A suplementação das progenitoras com vitamina C isoladamente não afetou os parâmetros reprodutivos avaliados nas ninhadas. Adicionalmente, não houve evidência da indução de estresse oxidativo pela administração de vitamina C, evidenciada pelos baixos níveis de catalase e LPO, similar àqueles exibidos pelo grupo controle.

Pesquisas já apontaram a função do resveratrol na modulação dos sistemas de resposta estrogênica por exercer atividade mista agonista/antagonista podendo, portanto, estar envolvido em certos aspectos da reprodução masculina (BHAT *et al.*, 2001; JUAN *et al.*, 2005). JUAN *et al.* (2005) administraram resveratrol por via oral a

ratos machos adultos, e observaram um aumento das concentrações séricas de gonadotrofinas e testosterona. Entretanto HARPER *et al.* (2007) estudaram a ação do resveratrol na supressão do câncer prostático e não observaram alterações nos níveis de hormônios sexuais dos animais tratados com o resveratrol, sugerindo uma modulação dos receptores esteróides como mecanismo de quimioprevenção. No presente estudo, os filhotes avaliados cujas progenitoras receberam resveratrol não demonstraram alterações nos biomarcadores selecionados para avaliar o estresse oxidativo quando comparados ao grupo controle, assim como o resveratrol não revelou nenhuma tendência a modificar as variáveis reprodutivas nos machos recém-nascidos.

A exposição pré-natal ao DEHP isolado ou associado a antioxidantes resultou em um aumento significativo na ocorrência de GMN, de acordo com relatos prévios deste mecanismo de ação dos ftalatos (SHIROTA *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2006; MAHOOD *et al.*, 2007). Desta forma, o tratamento com antioxidantes não foi efetivo na proteção dos gonócitos fetais contra a lesão induzida pelo DEHP. Houve um decréscimo nos níveis testiculares de testosterona nos grupos tratados com DEHP quando comparados com o controle e a mesma tendência pôde ser notada nos valores de DAG, embora para ambas as variáveis não tenha havido significância estatística. Existem vários estudos demonstrando efeitos positivos de antioxidantes como a vitamina C e o resveratrol na reprodução como o aumento dos níveis de testosterona e melhorias na qualidade e na contagem espermática (JUAN *et al.*, 2005; SÖNMEZ *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2008). Apesar disto, no presente trabalho, a suplementação com estes antioxidantes para as progenitoras não foi capaz de evitar a ocorrência de nenhum dos efeitos deletérios do DEHP nos machos recém-nascidos. BORCH *et al.* (2006) relataram uma diminuição na expressão da proteína



StAR com a exposição ao DEHP, observada pela diminuição na intensidade da coloração pela técnica imuno-histoquímica. Esta análise realizada de forma qualitativa no presente estudo não revelou alterações entre os grupos.

Corroborando relatos anteriores (LAKE *et al.*, 1987; TAMURA *et al.*, 1990), a exposição ao DEHP isoladamente induziu um aumento discreto nos níveis de catalase hepática, não significativo quando comparado ao grupo controle, mas sim quando comparado aos grupos tratados apenas com os antioxidantes. Embora esta enzima tenha sido pouco afetada pelo DEHP, esta linha de defesa antioxidante foi amplificada com as associações à vitamina C e ao resveratrol, refletindo a geração de estresse oxidativo adicional. SEIFRIED *et al.* (2004) advertiram que antioxidantes podem comportar-se como pró-oxidantes quando associados a outras substâncias, pois um novo radical livre pode ser gerado a partir desta interação. A atividade pró-oxidante da vitamina C é intensificada quando esta é utilizada em altas doses e na presença de um suprimento aumentado de peróxidos, devido à ativação da reação de Fenton (JEDLINSKA-KRAKOWSKA *et al.*, 2006).

A atividade da GST hepática foi reduzida com a exposição ao DEHP, de acordo com este já reconhecido efeito dos proliferadores de peroxissomas (TAMURA *et al.*, 1990; VOSKOBOINIK *et al.*, 1996) e não demonstrou ter sido afetada pela associação com a vitamina C ou com o resveratrol.

O DEHP não induziu a peroxidação lipídica, evidenciado pelos baixos níveis de hidroperóxidos gerados no fígado dos grupos expostos ao DEHP isoladamente. Estes resultados confirmam e estendem relatos anteriores apontando o pequeno grau de peroxidação lipídica induzido pelo DEHP, o qual não apresenta significado biológico (KORNBRUST *et al.*, 1984; ELLIOTT e ELCOMBE, 1987). Entretanto, os níveis de hidroperóxidos aumentaram significativamente quando o DEHP foi

associado à vitamina C. LAUDICINA e MARNETT (1990) observaram que a adição simultânea de ácido ascórbico e hidroperóxidos orgânicos a microssomas hepáticos de ratos resultou em uma exacerbação da lipoperoxidação. No presente estudo, o aumento da concentração de hidroperóxidos poderia ser explicado pela magnificação do pequeno grau de peroxidação induzido pelo DEHP com a associação da vitamina C.

Os ftalatos *per se* não constituem uma fonte de oxidantes, entretanto estes compostos são capazes de induzir a formação de radicais livres por diferentes processos metabólicos (RUSYN *et al.*, 2001). Esta geração de radicais livres supostamente induz várias condições patológicas, incluindo o crescimento de tumores e desordens reprodutivas (KASAHARA *et al.*, 2002; RUSYN *et al.*, 2006). A utilização de antioxidantes para minimizar efeitos deletérios de compostos tóxicos é uma estratégia comum (GUPTA *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2008), entretanto em algumas situações o antioxidante age como um pró-oxidante e agrava a injúria oxidativa (AVDOĞAN *et al.*, 2008). No presente trabalho, foi demonstrado que o emprego do resveratrol e da vitamina C não preveniu os efeitos deletérios do DEHP nos ratos machos recém-nascidos, e sob certas condições, promoveu um estresse oxidativo adicional, enfraquecendo as defesas orgânicas contra o DEHP. Os mecanismos que determinam quando um antioxidante torna-se um pró-oxidante são amplamente desconhecidos, e precisam ser estabelecidos antes de ser feita qualquer recomendação de intervenções nutricionais ou farmacológicas (SEIFRIED *et al.*, 2004). Desta forma, a utilização de antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo induzido por ftalatos não deve ser recomendada sem extensa pesquisa prévia a respeito de suas propriedades farmacológicas e impacto biológico.

### **5.3 Experimento DEHP e desenvolvimento pubertal**

Os desreguladores endócrinos estão entre os poluentes ambientais mais complexos que se conhecem na atualidade. Suas ações incluem a mimetização de hormônios naturais, a interação com receptores esteróides, a interferência com a proliferação e a diferenciação de células germinativas e a indução de mal-formações reprodutivas (SARADHA e MATHUR, 2005). Embora o DEHP e outros ftalatos ativos sejam capazes de desregular o sistema endócrino, seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. Alguns estudos demonstram efeitos paradoxais do DEHP sobre o metabolismo de esteróides e parâmetros reprodutivos (DOSTAL *et al.*, 1987; AKINGBEMI *et al.*, 2001; BORCH *et al.*, 2006) e este comportamento poderia ser explicado por uma grande diversidade de sítios de interação ou pela ocorrência de mecanismos compensatórios.

No presente trabalho, a administração de DEHP em três diferentes doses a animais jovens resultou em um padrão de efeitos que pode ser usado para esclarecer sua interação com o metabolismo do colesterol e da testosterona. As alterações reprodutivas observadas em animais tratados com a maior dose de DEHP (750 mg/kg/dia) estão de acordo com a variedade de efeitos induzidos por ftalatos ativos (baixo peso de órgãos testosterona-dependentes, tendência ao atraso na separação prepucial e diminuição nos níveis de testosterona sérica e testicular) (PARK *et al.*, 2002; STROHEKER *et al.*, 2005). Entretanto, os parâmetros de desenvolvimento sexual masculino nos grupos expostos ao DEHP 250 e 500 mg/kg/dia não diferiram estatisticamente do controle. Adicionalmente, os níveis de testosterona no soro e nos testículos não foram afetados nestes grupos. Estes resultados suportam a idéia que os ftalatos exercem efeitos antiandrogênicos

cronicamente ou em altas doses e que animais adultos e púberes são mais resistentes que fetos e recém-nascidos (THOMAS *et al.*, 1982; AKINGBEMI *et al.*, 2004; RAIS-BAHRAMI *et al.*, 2004).

A concentração de colesterol no soro foi reduzida significativamente na dose mais baixa de DEHP, em concordância com os efeitos inibitórios dos ftalatos na colesterologênese e na interferência com enzimas que participam do metabolismo lipídico (NAIR e KURUP, 1986; HOWARTH *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2006; RUSYN *et al.*, 2006; ITSUKI-YONEDA *et al.*, 2007). Entretanto, os níveis séricos de colesterol retornaram aos valores normais conforme a dose de DEHP foi aumentada. Este resultado pode ser explicado pela habilidade do DEHP, em doses maiores, interferir com a utilização de colesterol pelas células esteroideogênicas, o que também explica o aumento nos níveis de colesterol observado no tecido testicular. Estudos anteriores já demonstraram que os ftalatos podem reduzir os níveis de colesterol nas células de Leydig tanto pela diminuição da síntese quanto pela captação das células através do sangue (BARLOW *et al.*, 2003; THOMPSON *et al.*, 2004). Além disso, dados os relatos de disfunções da tireóide induzidas por ftalatos (POON *et al.*, 1997; GAYATHRI *et al.*, 2004; MEEKER *et al.*, 2007), foi considerada a hipótese que a ausência de efeitos do DEHP nos níveis séricos de colesterol nas maiores doses poderia ser atribuída ao hipotireoidismo, uma condição associada à hipercolesterolemia e que poderia de certa forma contrabalancear os efeitos hipolipidêmicos. Entretanto, o tratamento com o DEHP não produziu efeitos detectáveis no nível sérico de T4 em nenhuma das doses testadas. Em conjunto, estes resultados indicam que a curva dose-resposta em U observada para os níveis séricos de colesterol pode refletir efeitos distintos do DEHP sobre o balanço de colesterol em doses baixas e altas. Como mencionado acima, a resposta bifásica

pode estar relacionada aos efeitos de doses altas de DEHP na captação e utilização do colesterol.

A redução da disponibilidade de colesterol para as células esteroidogênicas é também um componente provável da supressão de testosterona induzida pelo DEHP em ratos, embora algumas etapas da via esteroidogênica anteriores à captação ou à síntese de colesterol têm sido apontadas como alvos dos ftalatos (BARLOW *et al.*, 2003). O fato do colesterol participar de várias rotas bioquímicas implica no fato de que alterações significativas em seus níveis podem estar envolvidas em vários efeitos causados pela administração de DEHP. Isto também pode refletir no comportamento diverso observado quando animais de diferentes idades são tratados com doses distintas de DEHP (AKINGBEMI *et al.*, 2001; GE *et al.*, 2007; CULTY *et al.*, 2008). Adicionalmente, apesar do fato do DEHP assim como outros ftalatos serem capazes de induzir atrofia testicular severa em doses altas, o número de células de Leydig tem sido relatado como inalterado ou até mesmo aumentado após a exposição a ftalatos (AKINGBEMI *et al.*, 2001; SHIROTA *et al.*, 2005). Isto indica que reduções nos níveis de testosterona testicular não são devidas ao número reduzido de células esteroidogênicas, mas à redução da eficiência da via de biossíntese.

Desta forma, este estudo permitiu a observação das alterações de colesterol no soro e testículos de animais jovens tratados com diferentes doses de DEHP, e a investigação de possíveis relações entre estes efeitos e outras alterações endócrinas como a insuficiência de testosterona e o hipotireoidismo. De uma maneira geral, os resultados obtidos confirmam achados prévios que relatam que alterações no balanço de colesterol podem desempenhar um importante papel na supressão da esteroidogênese induzida por ftalatos em ratos. Entretanto, apesar

destes resultados auxiliarem na compreensão de alguns aspectos da toxicidade reprodutiva do DEHP em relação à colesterologênese, é importante notar que as doses empregadas neste estudo estão acima da exposição esperada em humanos.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho resultou nas seguintes conclusões:

1. O resveratrol, na forma farmacêutica e nas doses testadas é uma substância com propriedades antioxidantes, comprovadas pela ação sequestradora de radicais livres *in vitro*;
2. O resveratrol, quando administrado por via oral, nas condições experimentais estabelecidas não é capaz de provocar nenhum efeito adverso clinicamente detectável;
3. A suplementação com vitamina C e resveratrol para ratas gestantes não previne a toxicidade hepática induzida pelo DEHP nestes animais e nos seus filhotes;
4. A suplementação com vitamina C e resveratrol para ratas gestantes não protege os filhotes machos de alterações reprodutivas induzidas pelo DEHP, caracterizadas pelo aumento de gonócitos multinucleados nas cordas seminíferas e pela tendência à redução na distância anogenital e nos níveis testiculares de testosterona;
5. A exposição ao DEHP é capaz de induzir estresse oxidativo e a suplementação com substâncias antioxidantes pode não ser capaz de evitar este efeito e, em certas condições, exacerbá-lo;
6. A exposição subcrônica de ratos machos em idade pubertal a doses altas de DEHP induz a ocorrência de alterações reprodutivas características de substâncias antiandrogênicas;
7. Os níveis de colesterol sérico e testicular de ratos machos expostos ao DEHP durante a puberdade podem ser afetados por esta exposição e têm um

padrão de variação distinto, podendo refletir diferentes ações do DEHP na síntese e utilização do colesterol pelas células esteroidogênicas;

A exposição de ratos Wistar em diferentes etapas de desenvolvimento ao DEHP em diferentes doses ou associado a antioxidantes demonstrou que este ftalato induz a ocorrência de uma variedade de efeitos, cuja manifestação depende de múltiplos fatores, tais como a dose utilizada, o período de exposição e a interação com outras substâncias. Os resultados obtidos sugerem que a atividade do DEHP no metabolismo lipídico pode influenciar sua ação como desregulador endócrino, evidenciando a necessidade de estudos adicionais nesta linha de pesquisa. A administração de antioxidantes concomitantemente à exposição ao DEHP proporcionou a observação dos efeitos adversos deste tipo de terapia em ocasiões nas quais o mecanismo de ação do agente tóxico não está completamente elucidado. Portanto, o presente trabalho resultou na obtenção de dados importantes a respeito das ações do DEHP em diferentes aspectos do metabolismo dos roedores, os quais auxiliarão no estudo deste composto com um complexo mecanismo de ação e um grande impacto nos sistemas biológicos.



## 7. REFERÊNCIAS

ACHARYA, U. R.; MISHRA M.; PATRO, J.; PANDA, M. K. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 84-88, 2008.

ADVOĞAN, M.; KORKMAZ, A.; BARLAS, N.; KOLANKAVA, D. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. **Toxicology**, v. 249, p. 35-39, 2008.

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

AGARWAL, D. K.; EUSTIS, S.; LAMB IV, J. C.; REEL, J. R.; KLUWE, W. M. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. **Environmental health perspectives**, v. 65, p. 343-350, 1986.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Nota técnica com informações sobre o uso de embalagens de PVC. Brasília, 9 de junho de 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2004/090604.htm>> Acesso em 05 jan. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Resolução n. 105/99. Dispões sobre os aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos, 1999.

AKINGBEMI, B. T.; YOUKER, R. T.; SOTTAS, C. M.; GE, R.; KATZ, E.; KLINEFELTER, G. R.; ZIRKIN, B. R.; HARDY, M. P. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. **Biology of Reproduction**, v.65, p. 1252-1259, 2001.

AKINGBEMI, B. T.; GE, R.; KLINEFELTER, G. R.; ZIRKIN, B. R.; HARDY, M. P. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 775-780, 2004.

ANDRADE, A. J.; GRANDE, S. W.; TALSNESS, C. E.; GROTE, K.; GOLOMBIEWSKI, A.; STERNER-KOCK, A.; CHAHOUD, I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. **Toxicology**, v. 225, p. 64-74, 2006.

ASTM F963-96. Standard consumer safety specification on toy safety. **American Society for Testing and Materials**. 1986.

BARLOW, N. J.; PHILLIPS, S. L.; WALLACE, D. G.; SAR, M.; GAIDO, K. W.; FOSTER, P. M. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. **Toxicological Sciences**, v. 73, p. 431-441, 2003.

BARR, D. B.; SILVA, M. J.; KATO, K.; REIDY, J. A. MALEK, N. A. HURTZ, D.; SADOWSKI, M.; NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M. Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 1148-1151, 2003.

BELL, F.P. Effects of phthalate esters on lipid metabolism in various tissues, cells and organelles in mammals. **Environmental Health Perspectives**, v. 45, p. 41-50, 1982.

BHAT, K. P.; LANTVIT, D.; CHRISTOV, K.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. **Cancer Research**, v. 61, p. 7456-7463, 2001.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOARETO, A. C.; MULLER, J. C.; BUFALO, A. C.; BOTELHO, G. G.; de ARAUJO, S. L.; FOGLIO, M. A.; de MORAIS, R. N.; DALSENER, P. R. Toxicity of artemisinin [Artemisia annua L.] in two different periods of pregnancy in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 239-246, 2008.

BORCH, J.; METZDORFF, S. B.; VINGGAARD, A. M.; BROKKEN, L.; DALGAARD, M. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. **Toxicology**, v. 223, p. 144-155, 2006.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Constituição Brasileira**. Capítulo VI, artigo 225, parágrafo 1 e inciso V, 1988.

CALAFAT, A. M.; McKEE, R. H. Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate] as a case study. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1783-1789, 2006.

CASTILLA-CORTAZAR, I.; DIEZ, N.; GARCIA-FERNANDEZ, M.; PUCHE, J. E.; DIEZ-CABALLERO, F.; QUIROGA, J.; DIAZ-SANCHES, M.; CASTILLA, A.; CASARES, A. D.; VARELA-NIETO, I.; PRIETO, J.; GONZALES-BARON, S. Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: effect of insulin-like growth factor 1. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, p. 2529-2534, 2004.

COSTNER, P.; BUTCHER, J. Sumário executivo do relatório – Substâncias químicas tóxicas na poeira de lares e de ambientes de trabalho no Brasil como um indicador da exposição química em residências e escritórios. (2004) **Greenpeace digital**. Disponível em:<<http://www.greenpeace.org.br/venenodomestico>> Acesso em 05 jan. 2006.

CULTY, M.; THUILLIER, R.; LI, W.; WANG, Y.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; BENJAMIN, C. G.; TRIANTAFILOU, K. M.; ZIRKIN, B. R.; PAPADOPOULOS, V. In

Utero Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 1018-1028, 2008.

CHANDLER, V.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin preprotects against cyclosporine-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism. **Toxicology**, v. 210, p. 55-64, 2005.

CHEN, Y.; WANG, M.; ROSEN, R. T.; HO, C. T. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2226-2228, 1999.

DIEMER, T.; ALLEN, J. A.; HALES, K. H.; HALES, D. B. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (Star) protein and steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 144, p. 2882-2891, 2003.

DOSTAL, L. A.; JENKINS, W. L.; SCHWETZ, B. A. Hepatic peroxisome proliferators and hypolipidemic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate in neonatal and adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 87, p. 81-90, 1987.

DOSTAL, L. A.; CHAPIN R. E.; STEFANSKI, S. A.; HARRIS, M. V. V.; 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, p. 104-121, 1988.

ELLIOTT, B. M.; ELCOMBE, C. R. Lack of DNA damage or lipid peroxidation measured in vivo in the rat liver following treatment with peroxisomal proliferators. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1213-1218, 1987.

EPA. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. **EPA/630/R-96/009**, Washington, 1996.

EUROPEAN COMMISSION. Restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (phthalates in toys and childcare articles) Directive 2005/84/EC. **Official Journal of the European Union**, L 344, p. 40-43.

FAROMBI, E. O.; ABARIKWU, S. O.; ADEDARA, I. A; OVEYEMI, M. O. Curcumin and kolaviron ameliorate di-n-butylphthalate-induced testicular damage in rats. **Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology**, v. 100, p. 43-48, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FOSTER, P. M.; HARRIS, M. W. Changes in androgen-mediated reproductive development in male rat offspring following exposure to a single oral dose of flutamide at different gestational ages. **Toxicological Sciences**, v. 85, p. 1024-1032, 2005.

FREIRE, M. T.; SANTANA, I. A.; REYES, F. G. Plasticizers in Brazilian food-packaging materials acquired on the retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 93-99, 2006.

GANGI, J. D. Phthalates in PVC medical products from 12 countries. **Greenpeace digital**. Disponível em:

<<http://www.greenpeace.org.uk/MultimediaFiles/Live/FullReport/899.PDF>> Acesso em 05 jan. 2006.

GANGOLLI, S. D. Testicular effects of phthalate esters. **Environmental health perspectives**, v. 45, p. 77-84, 1982.

GAYATHRI, N. S.; DHANYA, C. R.; INDU, A. R.; KURUP, P. A. Changes in some hormones by low doses of di(2-ethyl exyl)phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags e medical tubing. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 139-144, 2004.

GE, R. S.; CHEN, G. R.; DONG, Q.; AKINGBEMI, B.; SOTTAS, C. M.; SANTOS, M.; SEALFON, S. C.; BERNARD, D. G.; HARDY, M. P. Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 513-520, 2007.

GRAAF, L.; BROUWERS, A. H.; DIEMONT, W. L. Is decreased libido associated with the use of HMG-CoA-reductase inhibitors? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, p. 326-328, 2004.

GRAY, T. J.; BUTTERWORTH, K. R. Testicular atrophy produced by phthalate esters. **Archives of Toxicology, Supplement**, v. 4, p. 452-455, 1980.

GRAY, T. J. B.; GANGOLLI, S. D. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. **Environmental health perspectives**, v. 65, p. 229-235, 1986.

GRAY Jr, L. E.; OSTBY, J.; FURR, J.; PRICE, M.; VEERAMACHANENI, D., N.; 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, p. 350-365, 2000.

GRAY Jr., L. E.; WILSON, V.; NORIEGA, N.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; STOKER, T. E.; LAWS, S. C.; GOLDMAN, J.; COOPER, R. L.; FOSTER, P. M. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. **Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 45, p. 425-437, 2004.

GUNNARSSON, D.; LEFFLER, P.; EKWURTZEL, E.; MARTINSSON, G.; LIU, K. Mono-(2-ethylhexyl)phthalate stimulates basal steroidogenesis by a cAMP-independent mechanism in mouse gonadal cells of both sexes. **Reproduction**, v. 135 p. 693-703, 2008.



GUPTA, S. R.; GUPTA, S. E.; DHAKAL, B. K.; THAKUR, A. R.; AHNN J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. **Molecules and Cells**, v. 17, p. 132-139, 2004.

HABIG, W. H.; PAPST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLMARK, N.; WALKER, McKINNELL, C.; MAHOOD, I. K.; SCOTT, H.; BAYNE, R.; COUTTS, S.; ANDERSON, R. A.; GREIG, I.; MORRIS, K.; SHARPE, R. M. Effects of monobutyl and di(*n*-butyl) phthalate *in vitro* on steroidogenesis and leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat: comparison with effects *in vivo* in the fetal rat and neonatal marmoset and *in vitro* in the human. **Environmental health perspectives**, v. 115, p. 390-396, 2007.

HARPER, C. E.; PATEL, B. P.; WANG, J.; ARABSHAHI, A.; ELTOUM, I. A.; LAMARTINIERE, C. A. Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 1946-1953, 2007.

HEMMATI A. A.; NAZARI, Z.; RANJBARI, N.; TORFI, A. Comparison of the preventive effect of vitamin C and E on hexavalent chromium induced pulmonary fibrosis in rat. **Inflammopharmacology**, v. 16, p. 195-197, 2008.

HOWARTH, J. A.; PRICE, S. C.; DOBROTA, M.; KENTISH, P. A.; HINTON, R. H. Effects on male rats of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. **Toxicology Letters**, v. 121, p. 35-43, 2001.

HUNG, L.; CHEN, J.; HUANG, S.; LEE, R.; SU, M. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 549-555, 2000.

IKONEN, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 125-138, 2008.

ISHIHARA, M.; ITOH, M.; MIYAMOTO, K.; SUNA, S.; TAKEUCHI, Y.; TAKENAKA, I.; JITSUNARI, F. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamin C in the rat. **International Journal of Andrology**, v. 23, p. 85-94, 2000.

ITSUKI-YONEDA, A.; KIMOTO, M.; TSUJI, H.; HIEMORI, M.; YAMASHITA, H. Effect of a hypolipidemic drug, di(2-ethylhexyl) phthalate, on mRNA-expression associated fatty acid and acetate metabolism in rat tissues. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, p. 414-420, 2007.

JAMES, J. T. e J S CENTER. Spacecraft water exposure guidelines for selected contaminants. **National Academies Press**, v.1, Houston, Texas, 2004.

JEDLINSKA-KRAKOWSKA, J.; BOMBA G.; JAKUBOWSKI, K.; ROTKIEWICZ T.; JANA, B.; PENKOWSKI, A. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 203-209, 2006.

JIANG Z-Y., HUNT J. V.; WOLFF S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384-389, 1992.

JIANG, Y.; PENG, T.; LUO, Y.; LI, M.; LIN, Y. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. **Chinese Medical Journal**, v. 121, p. 1204-1209, 2008.

JUAN, M. E.; GONZÁLEZ-PONS, E.; MUNUERA, T.; BALLESTER, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; PLANAS, J. M. Trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 757-760, 2005.

KADIISKA, M. B.; MORROW, J. D.; AWAD, J. A.; ROBERTS, L. J. 2<sup>ND</sup>; MASON, R. P. Identification of free radical formation and F2-isoprostanes in vivo by acute Cr(VI) poisoning. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 1516-1520, 1998.

KASAHARA, E.; SATO, E. F.; MIYOSHI, M.; KONAKA, R.; HIRAMOTO, K.; SASAKI, J.; TOKUDA, M.; NAKANOS, Y.; INOUE, M. Role of oxidative stress in germ cell

apoptosis induced by di(2-ethylhexyl) phthalate. **The Biochemical Journal**, v. 365, p. 849-856, 2002.

KATO, K.; SILVA, M.; REIDY, J. A.; HURTZ III, D.; MALEK, N. A.; NEEDHAM, L. L.; NAKAZAWA, H.; BARR, D. B.; CALAFAT, A. M. Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 327-330, 2004.

KOCH, H. M.; DREXLER, H.; ANGERER, J. Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 207, p. 15-22, 2003a.

KOCH, H. M.; ROSSBACH, B.; DREXLER, H.; ANGERER, J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates – determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. **Environmental Research**, v. 93, p. 177-185, 2003b.

KORNBRUST, D. J.; BARFKNECHT, T. R.; INGRAM, P.; SHELBURNE, J. D. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate on DNA repair and lipid peroxidation in rat hepatocytes and on metabolic cooperation in Chinese hamster V-79 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 13, p. 99-116, 1984.

LAHOUSSE, S. A.; WALLACE, D. G.; LIU D.; GAIDO, K. W.; JOHNSON, J. Testicular gene expression profiling following prepubertal rat mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure suggests a common initial genetic response at fetal and prepubertal ages. **Toxicological Sciences** v. 93, p. 369-381, 2006.

LAKE, B. G.; KOZLEN, S. L.; EVANS, J. G.; GRAY, T. J.; YOUNG, P. J.; GANGOLLI, S. D. Effect of prolonged administration of clofibrac acid and di-(2-ethylhexyl)phthalate on hepatic enzyme activities and lipid peroxidation in the rat. **Toxicology**, v. 44, p. 213-228, 1987.

LATINI, G. Monitoring phthalate exposure in humans. **Clinica Chimica Acta**, v. 361, p. 20-29, 2005.

LAUDICINA, D. C.; MARNETT, L. J. Enhancement of hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes by ascorbic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 278, p. 73-80, 1990.

LEE, B. M. Risk reduction of endocrine disruption by antioxidants. **Forum of Nutrition**, v. 56, p. 405-407, 2003.

LIN, H. M.; TSENG, H. C.; WANG, C. J.; LIN, J. J.; LO, C. W.; CHOU, F. P. Hepatoprotective effects of Solanum nigrum Linn extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 283-293, 2008.

LIU K.; LEHMANN, K. P.; SAR, M.; YOUNG, S.; GAIDO, K. W. Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. **Biology of reproduction**, v. 73, p. 180-192, 2005.

LUCK, M. R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R. A. Ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 262-266, 1995.

MA, M.; KONDO, T.; BAN, S.; UMEMURA, T.; KURAHASHI, N.; TAKEDA, M.; KISHI, R. Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl) phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. **Toxicological Sciences**, v. 93, p. 164-171, 2006.

MAHOOD, I. K.; SCOTT, H. M.; BROWN, R.; HALLMARK, N.; WALKER, M.; SHARPE, R. M. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. **Environmental Health Perspectives**, v. 1, p. 55-61, 2007.

MANNA, P.; SINHA, M.; SIL, P. C. Aqueous extract of Terminalia arjuna prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, p. 6-33, 2006.

MARZI, A.; de TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A. Studies on the prevention of CCL4 induced liver necrosis by agents having effects on cell membrane. **Research**

**Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 30, p. 581-584, 1980.

McKINNEL, C.; SHARPE, R. M.; MAHOOD, K.; HALLMARK, N.; SCOTT, H.; IVELL, R.; STAUB, C.; JÉGOU, B.; HAAG, F.; KOCH-NOLTE, F.; HARTUNG, S. Expression of insulin-like factor 3 protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by in utero exposure to di(n-Butyl) phthalate. **Endocrinology**, v. 46, p. 4536-4544, 2005.

MEEKER, J. D.; CALAFAT, A. M.; HAUSER, R. Di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 1029-1034, 2007.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE DO BRASIL, MMA. **Perfil Nacional da Gestão de Substâncias Químicas**. Centro de Informação, Documentação Ambiental e Editoração Luís Eduardo Magalhães – CID Ambiental, Esplanada dos Ministérios, Brasília, 280 p., 2003.

MOCCHIUTTI, N. O. BERNAL, C. A. Effects of chronic di(2-ethylhexyl) phthalate intake on the secretion and removal rate of triglyceride-rich lipoproteins in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1017-1021, 1997.

MYLCHREEST, E.; SAR, M.; CATTLEV, R. C.; FOSTER, P. M. 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, p. 81-95, 1999.

NAIR, N., KURUP, C. K. Investigations on the mechanism of the hypocholesterolemic action of diethylhexyl phthalate in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, p. 3441-3447, 1986.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Pubchem compound: ascorbic acid compound summary.** Disponível em: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5785&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5785&loc=ec_rcs).

Acesso em: 30 mar. 2009

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Pubchem compound: resveratrol compound summary.** Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5056>. Acesso em: 30

mar. 2009.

NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1517-1524, 2004.

OISHI, S. Effects of di-2-ethylhexyl phthalate on lipid composition of serum and testis in rats. **Toxicology Letters**, v. 23, p. 67-72, 1984.



PARK, J. D.; HABEEBU, S. S.; KLAASSEN, C. D. Testicular toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in young Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v.171, p. 105-115, 2002.

PARKS, L. G.; OSTBY, J. S.; LAMBRIGHT, C. R.; ABBOTT, B. D.; KLINEFELTER, G. R.; BARLOW, N. J.; GRAY JR., L. E. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 339-349, 2000.

PELTOLA, V.; HUHTANIEMI, I.; AHOTUPA, M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1146-1150, 1995.

PELTOLA, V.; HUHTANIEMI, I.; METSA-KETELA, T.; AHOTUPA, M. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. **Endocrinology**, v. 137, p. 105-11, 1996.

POGRIBNY, I. P.; TRYNDYAK, V. P.; BOUREIKO, A.; MELNYK, S.; BAGNYUKOVA, T. V.; MONTGOMERY, B.; RUSYN, I. Mechanisms of peroxisome proliferators-induced DNA hypomethylation in rat liver. **Mutation Research**, v. 644, p. 17-23, 2008.

POON, R.; LECAVALIER, P.; MUELLER, R.; VALLI, V. E.; PROCTER, B. G.; CHU, I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 225-239, 1997.

RAIS-BAHRAMI, K.; NUNEZ, S.; REVENIS, M. E.; LUBAN, N. L.; SHORT, B. L. Follow-up study of adolescents exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as neonates on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 1339-1340, 2004.

RAJESWARY, S.; KUMARAN, B.; ILANGO VAN, R.; YUVARAJ, S.; SRIDHAR, M.; VENKATARAMAN, P.; SRINIVASAN, N.; ARULDHAS, M. M. Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 371-380, 2007.

REYS, L. L. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 6, p. 213-225, 2001.

RHODES, C.; ORTON, T. C.; PRATT, I. S.; BATTEN, H.; JACKSON, S. J.; ELCOMBE, C. R. Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. **Environmental Health Perspectives**, v. 65, p. 299-307, 1986.

RUSYN, I.; KADIISKA, M. B.; DIKALOVA, A.; KONO, H.; YIN, M.; TSUCHIYA, K.; MASON, R. P.; PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J.; SEGAL, B. H.; HOLLAND, S. M.; THURMAN, R. G. Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 744-750, 2001.

RUSYN, I.; PETERS, J. M.; CUNNINGHAM, M. L. Modes of action and species-specific effects of di(2-ethylhexyl) phthalate in the liver. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 459-479, 2006.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 2, p.18-29, 2001.

SARADHA, B.; MATHUR, P. P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 31-41, 2005.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; SORKIN, B. C.; COSTELLO, R. B. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3143S-3163S, 2004.

SHEWEITA, S. A.; ABD EL-GABAR, M.; BASTAWY, M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. **Toxicology**, v. 165, p. 217-224, 2001.

SHIN, S.; JEON, J. H.; PARK, D.; JANG, M. J.; CHOI, J. H.; CHOI, B. H.; JOO, S. S.; NAHN, S. S.; KIM, J. C.; KIM, Y. B. trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 83-87, 2008.

SHIROTA, M.; SAITO, Y.; IMAI, K.; HORIUCHI, S.; YOSHIMURA, S.; SATO, M.; NAGAO, T.; ONO, H.; KATOH, M. Influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 30, p. 175-194, 2005.

SCHMID, P.; SCHLATTER, C. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. **Xenobiotica**, v. 15, p. 251-156, 1985.

MAHOOD, I. K.; SCOTT, H. M.; BROWN, R.; HALLMARK, N.; WALKER, M.; SHARPE, R. M. In utero exposure to di(n-butyl)phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult endpoints and their dose sensitivity. **Environmental Health Perspectives**, v. 115 Suppl 1, p. 55-61, 2007.

SJÖBERG, P.; LINDQVIST, N. G.; PLÖEN, L. Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. **Environmental Health Perspectives**, v. 65, p. 237-242, 1986.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v. 63, p. 2063-2072, 2005.

STROHEKER, T.; CABATON, N.; NOURDIN, G.; RÉGNIER, J. F.; LHUGUENOT, J. C.; CHAGNON, M. C. Evaluation of anti-androgenic activity of di(2-ethylhexyl) phthalate. **Toxicology**, v. 208, p. 115-121, 2005.

SWAN, S. H.; MAIN, K. M.; LIU, F.; STEWART, S.L.; KRUSE, R. L.; CALAFAT, A. M.; MAO, C. S.; REDMON, B.; TERNAND, C. L.; SULLIVAN, S.; TEAGUE, J. L. and the Study for Future Families Research Team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Doi: 10.1289/ehp.8100. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>> Acesso em: 01 jun. 2005.

TAMURA, H.; IIDA, T.; WATANABE, T.; SUGA, T. Long-term effects of hypolipidemic peroxisome proliferator administration on hepatic hydrogen peroxide metabolism in rats. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 445-450, 1990.

TEW, K. D.; RONAI, ZE'EV. GST function in drug and stress response. **Drug Resistance Updates**, v.2, p. 143-147, 1999.

THOMAS, J. A.; CURTO, K. A.; THOMAS, M. J. MEHP/DEHP: gonadal toxicity and effects on rodent accessory sex organs. **Environmental Health Perspectives**. v. 45, p. 85-88, 1982.

THOMPSON, C. J.; ROSS, S. M.; GAIDO, K. W. Di(*n*-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. **Endocrinology**. v. 145, p. 1227-1237, 2004.

TOKLU, H.; ALICAN, I.; ERCAN, F.; SENER, G. The beneficial effect of resveratrol on rat bladder contractility and oxidant damage following ischemia/reperfusion. **Pharmacology**, v. 78(1), p. 44-50, 2006.

TREMELLEN K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 243-258, 2008.

VERMA, R.; CHAKRABORTY, D. Emblica officinalis aqueous extract ameliorates ochratoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 65, p. 187-194, 2008.

VOSKOBOINIK, I.; DREW, R.; AHOKAS, J. T. Differential effect of peroxisome proliferato on rat glutathione S-transferase isoenzymes. **Toxicology letters**, v. 87, p. 147-155, 1996.

WEUVE, J.; SÁNCHEZ, B. N.; CALAFAT, A. M.; SCHETTLER, T.; GREEN, R. A.; HU, H.; HAUSER, R. Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1424-1431, 2006.

WILSON, V. S.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; OSTBY, J.; WOOD, C.; HELD, G.; GRAY Jr., E. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 207-215, 2004.

WILSON, V. S.; BLYSTONE, C. R.; HOTCHKISS, A. K.; RIDER, C. V.; GRAY Jr., L. E. Diverse mechanisms of anti-androgen action: impact on male rat reproductive tract development. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 178-187, 2008.

WOLF, C. J.; HOTCHKISS, A.; OSTBY, J. S.; LEBLANC, G. A.; GRAY Jr., L. E. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 71-86, 2002

XU, Y.; AGRAWAL, S.; COOK, T. J.; KNIPP, G. T. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal brain upon maternal exposure. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 57-62, 2007.

ZHAO, H.; XU, X.; NA, J.; HAO, L.; HUANG, L.; LI, G.; XU, O. Protective effects of salicylic acid and vitamin C on sulfur dioxide-induced lipid peroxidation in mice. **Inhalation Toxicology**, v. 20, p. 865-871, 2008.