

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**ANA CAROLINA DOS SANTOS LOURENÇO**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VEÍCULOS OLEOSOS NA TOXICIDADE  
REPRODUTIVA DO DI-BUTIL FTALATO (DBP).**

CURITIBA  
2011

**ANA CAROLINA DOS SANTOS LOURENÇO**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VEÍCULOS OLEOSOS NA TOXICIDADE  
REPRODUTIVA DO DI-BUTIL FTALATO (DBP).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração Toxicologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

**CURITIBA  
2011**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



## PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VEÍCULOS OLEOSOS NA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO DIBUTIL FTALATO (DBP)", de autoria da pós-graduanda ANA CAROLINA DOS SANTOS LOURENÇO, sob orientação Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade e composta pelos professores: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (UFPR) e Prof. Dr. Sérgio Noboru Kuriyama (FIOCRUZ-RJ). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 08 de julho de 2011.

Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade (Orientador - UFPR)

Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (UFPR)

Prof. Dr. Sérgio Noboru Kuriyama (FIOCRUZ-RJ)

## **NOTA EXPLICATIVA**

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo – artigo para publicação – de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, constando de uma revisão de literatura, objetivos do trabalho e um artigo científico abordando os experimentos realizados, com resultados e discussão, além da conclusão. O Artigo foi formatado conforme as normas propostas pelo periódico “*Toxicology*” ao qual o artigo foi submetido em Junho de 2011.

Dedico esse trabalho às pessoas que tenho como exemplo de vida, meus pais e avós, por me ensinarem que nada na vida se consegue sem trabalho e dedicação e por me apoiarem incondicionalmente.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora de Guadalupe por serem minha força e apoio espiritual.

Aos meus pais, avós e irmã por sempre estarem ao meu lado. Amo vocês!

Ao meu orientador, cuja inteligência e profissionalismo vão além da normalidade. Obrigada por ter me aceitado como sua primeira orientada de Mestrado e espero que me aceite novamente como primeira doutoranda!

Ao Diego, que mesmo sendo engenheiro trocou caixa de rato e foi trabalhar inúmeros finais de semana comigo. E por ser meu melhor amigo e me apoiar nos bons e nos maus momentos. Obrigada pelo companheirismo, pelas suas palavras e pelo seu amor.

À Ana Cláudia, a Juliane e ao Emerson por terem me guiado nos meus primeiros passos no laboratório. À Ana Cláudia também por ter me ajudado tanto nos experimentos e por ser uma inspiração de pessoa.

À Carol por ter sido meu braço direito, e às vezes o esquerdo também, comparecendo todos os dias do experimento e me ajudando infinitamente! Eu serei imensamente grata a você pelos finais de semana perdidos no laboratório! Muito obrigada mesmo!

À Naty, Marina, Bruna e Munisa, as ICs mais prestativas do mundo que trabalharam tanto e também merecem um espaço aqui.

À Renata Mueller, sem você os clusters estariam esperando ser medidos! Muito obrigada, Re! Você foi crucial!

À Fabíola pelas intermináveis semanas perdidas com as IHQs!

À Sylvia, à Eli e à Patrícia por me aguentarem com as minhas perguntas repetitivas! Ao pessoal do biotério!

À Professora Rosana e à Kethy pelas dosagens de testosterona!

À professora Katya pela parceria com as dosagens de ácidos graxos!

Ao Lucas da Biologia Celular e ao professor Edvaldo por compartilhar seus conhecimentos e por doar parte de seu tempo as minhas amostras.

Aos professores que aceitaram ser banca dessa dissertação, obrigada por aceitarem o convite e espero que seja uma leitura agradável!

Ao Herbarium Laboratório Botânico pela doação do óleo de peixe.

Se eu me esqueci de alguém e você sabe que me ajudou, sinta-se agradecido e me desculpe!

*¡Vale más poder brillar que solo buscar ver el sol!*

**Diego Torres**

## RESUMO

Alguns ésteres de ftalatos podem alterar o desenvolvimento do trato reprodutivo masculino quando administrados a ratos *in utero*, induzindo efeitos similares aos distúrbios que fazem parte da Síndrome da Disgenesia Testicular humana (TDS). A incidência e severidade das respostas tóxicas induzidas pelos ftalatos durante o período pré-natal se mostram significativamente variáveis entre diferentes laboratórios, o que poderia ser explicado por diversos fatores, incluindo linhagem de ratos, condições laboratoriais, dieta e tipo de veículo oleoso utilizado. Assim, tem sido proposto que a suplementação com óleos contendo altos níveis de ácidos graxos Omega-3 (encontrados em óleo de peixe e canola) poderia reverter alguns dos efeitos reprodutivos adversos induzidos por ftalatos. Para determinar o possível efeito dos veículos oleosos na toxicidade dos ftalatos, ratas Wistar prenhes foram tratadas com di-butil ftalato (DBP) diluído em três diferentes veículos: óleo de milho, canola ou peixe. Três grupos controle receberam somente veículos, e três grupos foram expostos a 500 mg/kg/dia, diluído em óleo de milho, canola ou peixe. O tratamento se deu via oral (gavage) dos dias 13 a 20 de gestação e o volume administrado foi de 5 mL/kg/dia para todos os grupos. As fêmeas foram pesadas durante a gestação e eutanasiadas no dia 20 de gestação, duas horas após a última administração de DBP ou veículos. A distância anogenital (AGD) foi medida em fetos machos e fêmeas. Após serem decapitados, três fetos machos por ninhada tiveram seus testículos coletados para imunohistoquímica, histologia e dosagem de testosterona testicular e de lipídeos. A exposição ao DBP reduziu significativamente os níveis de testosterona testicular e a distância anogenital em fetos machos, independente do veículo utilizado. Foi observado um aumento no percentual de cordões seminíferos contendo gonócitos multinucleados (MNGs) e no diâmetro dos cordões seminíferos em grupos expostos ao DBP, sem haver diferença entre esses grupos. No entanto, não houve diferença significativa entre o grupo tratado com DBP diluído em óleo de canola e seu respectivo controle em relação a presença de MNGs. Além disso, o grupo tratado com DBP diluído em óleo de peixe não diferiu do seu grupo controle na análise de diâmetro de cordões seminíferos. Para avaliação dos clusters de células de Leydig, foi realizada imunohistoquímica com anti-3 $\beta$ -HSD. Houve significativa diminuição na contribuição de clusters pequenos para a área total de clusters em todos os grupos expostos ao DBP. No entanto, não houve influência do veículo oleoso nesse parâmetro. O perfil lipídico determinado por HPLC indicou que a administração dos óleos de peixe e canola foi capaz de aumentar a quantidade de ácidos graxos Omega-3 no testículo fetal. No entanto, a incorporação de Omega-3 foi reduzida em grupos tratados com DBP, quando comparados aos controles. Juntos, esses resultados indicam que mesmo os óleos de canola e peixe tendo sido incapazes de alterar a deficiência de testosterona induzida por DBP ou a diminuição da distância anogenital, mudanças sutis na histologia testicular puderam ser observadas. Os efeitos de uma suplementação mais prolongada com óleos ricos em Omega-3 ainda precisam ser determinados.

Palavras chave: di-butil ftalato, ratos, ácidos graxos, testículo.



## ABSTRACT

Certain phthalate esters can disrupt the development of male reproductive tract when administered to rats during pregnancy, inducing effects remarkably similar to the disorders that comprise the human Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS). The spectrum and severity of toxic responses induced by phthalates during the pre-natal period has been shown to vary significantly across different laboratories, which could be explained by several factors, including rat strain, laboratory conditions, diet and type of oily vehicle used. In this regard, it has been hypothesized that dietary supplementation with oils containing high levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids (found in fish and canola oil) could counteract some of the adverse reproductive effects induced by phthalates. In order to determine the possible role of oily vehicles on phthalate toxicity, pregnant Wistar rats were treated with di-butyl phthalate (DBP) diluted in three different vehicles: corn, canola and fish oil. Three control groups, consisting of dams receiving oily vehicles only, and three groups exposed to 500 mg DBP/kg/day, diluted in corn, canola or fish oil, were used. Rat dams were treated by oral route (gavage) from gestation days 13 to 20 and the administration volume was 5 mL/kg/day for all groups. Females were weighed throughout pregnancy and sacrificed on gestation day 20, two hours after the last administration of DBP or vehicles. Anogenital distance (AGD) was measured in male and female fetuses. Following decapitation, testes from up to three male fetuses of each dam were collected for immunohistochemistry, histology and determination of testicular testosterone and lipid profile. DBP exposure significantly lowered intratesticular testosterone levels and anogenital distance in male pups, regardless the vehicle used. In most cases, it was observed an increase in percentage of seminiferous cords containing multinucleated gonocytes (MNGs) and in diameter of seminiferous cords in groups exposed to DBP, with no difference among them. However, there was no significant difference between the group treated with DBP in canola oil and its concurrent control for the presence of MNGs. Also, the group treated with DBP diluted in fish oil did not differ from its control in the analysis of seminiferous cord diameter. For evaluation of Leydig cell clustering, immunostaining with anti-3 $\beta$ -HSD was performed. A clear shift in the pattern of Leydig cell distribution was observed, with a significant decrease in the contribution of small clusters to the total cluster area in all groups exposed to DBP. However, there was no influence of oily vehicle on this parameter. Lipid profile determined by HPLC indicated that administration of canola and fish oil in late gestation (days 13 to 20) was able to increase the content of omega-3 fatty acids in rat fetal testis. However, incorporation of omega-3 was diminished in DBP-treated groups, when compared to controls. Taken together, our results indicate that even though canola and fish oil were unable to alter DBP-induced testosterone deficiency or shortening of anogenital distance, slight changes in testicular histology could be observed. The use of either canola or fish oil as vehicles was able to slightly attenuate gonocyte multinucleation and enlargement of seminiferous cords, so that differences with control (vehicle-only) groups were often blurred. The effects of longer periods of dietary supplementation with omega-3 rich oils remain to be determined.

Key-words: di-butyl phthalate, rats, fatty acids, testis

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
1.1	SÍNDROME DA DISGENESIA TESTICULAR.....	11
1.1.1	Etiologia da Síndrome da Disgenesia Testicular.....	12
1.2	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	14
1.3	DI-BUTIL FTALATO.....	16
1.3.1	Aspectos Gerais dos Ftalatos.....	16
1.3.2	Estrutura Química e Propriedades Gerais dos Ftalatos.....	17
1.3.3	Exposição Humana e Aspectos Regulatórios do DBP.....	18
1.3.4	Farmacocinética do DBP.....	19
1.3.5	Toxicidade do DBP.....	20
1.3.6	Mecanismo de Ação dos Ftalatos.....	21
1.3.7	TDS-like Syndrome e Evidências em Humanos.....	22
1.4	ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS.....	24
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
<b>4.</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>29</b>
1.	Introduction.....	31
2.	Material and Methods.....	33
2.1	Animals.....	33
2.2	Chemicals, Dose Selection and Treatment.....	33
2.3	Anogenital Distance and Collection of Fetal Testis.....	34
2.4	Fatty Acids Composition in Fetal Testis.....	34
2.5	Testicular Testosterone.....	34
2.6	Percentage of Cords Containing Multinucleated Gonocytes and Cord Diameter.....	35
2.7	Immunohistochemistry and Evaluation of Leydig Cell Aggregation	35
2.8	Statistical Analysis.....	36
3.	Results.....	37
3.1	Pregnancy Data.....	37
3.2	Anogenital Distance.....	37
3.3	Lipid Profile.....	39
3.4	Fetal Testicular Testosterone.....	39
3.5	Percentage of Cords Containing Multinucleated Gonocytes and Cord Diameter.....	42
3.6	Evaluation of Leydig Cell Aggregates.....	43
4.	Discussion.....	45
5.	References.....	49
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO EXTENDIDA E CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....</b>	<b>58</b>

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. SÍNDROME DA DISGENESIA TESTICULAR

Muitos estudos epidemiológicos indicam que distúrbios no sistema reprodutor masculino têm se tornado mais prevalentes durante os últimos cinquenta anos (SHARPE E SKAKKEBAEK, 2003; TOPPARI *et al.*, 1996, MAHOOD *et al.*, 2006). Evidências sugerem que muitos destes distúrbios, como criptorquidismo, hipospádias, baixa contagem de espermatozóides e câncer testicular, são anormalidades com origem comum na vida fetal (DIECKMANN E SKAKKEBAEK, 1999; OTTSEN *et al.*, 1999), inter-relacionadas, e que constituem fatores de risco entre si (SKAKKEBAEK *et al.* 2001, SHARPE, 2003).

Em humanos, evidências histológicas de disgenesia ou desorganização testicular (túbulos seminíferos imaturos com células de Sertoli indiferenciadas, microcalcificações e túbulos seminíferos contendo apenas células de Sertoli, hiperplasia de células de Leydig, e presença de carcinoma *in situ*) foram encontradas em biópsias de pacientes com câncer testicular e também em pacientes com infertilidade, hipospádias e criptorquidismo (SKAKKEBAEK *et al.* 2003, HOEIHANSEN *et al.* 2003, HOLM *et al.* 2003). A frequente coexistência entre criptorquidismo, hipospádias, baixa contagem de espermatozóides e câncer testicular, sugere uma possível ligação patogénica entre essas condições. O fenótipo resultante tem sido denominado Síndrome da Disgenesia Testicular (Testicular Dysgenesis Syndrome – TDS). A hipótese da TDS implica que indivíduos que manifestam um ou mais sinais clínicos da síndrome apresentam maior risco para o desenvolvimento dos outros distúrbios associados.

Skakkebaek e colaboradores (2001) propuseram que a presença desses sinais clínicos pode variar de acordo com a severidade da síndrome. A forma mais severa de TDS, como por exemplo, em indivíduos com cariótipo 45,X/46,XY, frequentemente inclui três ou quatro sinais clínicos, incluindo criptorquidismo, hipospádias, baixa contagem de espermatozóides e/ou câncer testicular. Por outro lado, indivíduos com uma forma menos severa podem apresentar apenas um ou dois sinais clínicos (Figura 1).

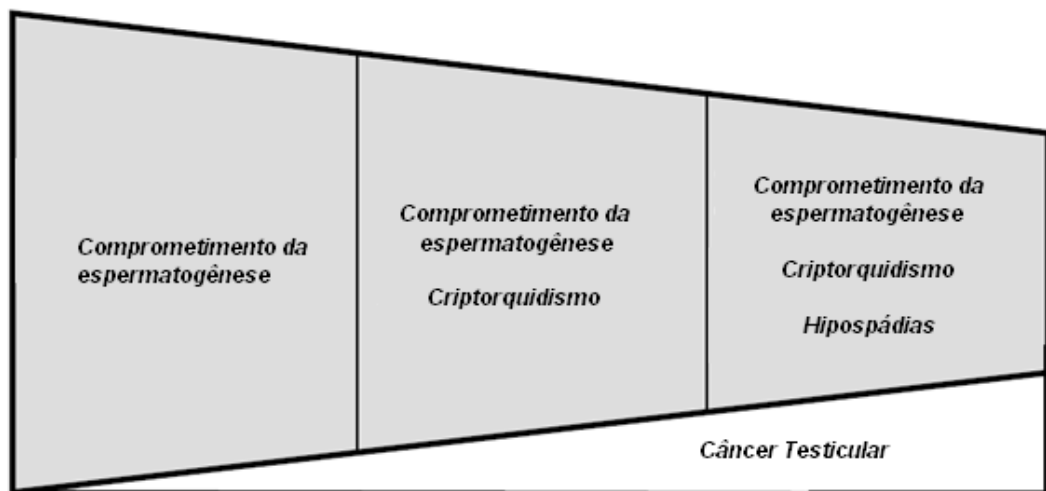


Figura 1: Relação entre a frequência relativa dos diferentes sinais clínicos que compõe a Síndrome da Disgenesia Testicular (TDS). Adaptado de Skakkebaek e colaboradores (2001).

### 1.1.1 Etiologia da Síndrome da Disgenesia Testicular

Uma provável causa das alterações no sistema reprodutor masculino seria o desenvolvimento anormal do testículo e a consequente disfunção das células de Leydig e/ou de Sertoli durante a diferenciação sexual masculina (SHARPE E SKAKKEBAEK 2003; SKAKKEBAEK *et al.* 2001), que resulta em síntese ou ação anormal dos hormônios durante o desenvolvimento do trato reprodutivo.

Está bem documentado que raras anormalidades genéticas, como cariótipo 45,X/46,XY e insensibilidade a androgênios, causam disgenesia testicular e estão frequentemente associadas ao aparecimento de criptorquidismo e hipospádias (AARSKOG, 1970; SCULLY, 1981; SAVAGE E LOWE, 1990; RAJPERT-DE MEYTS *et al.*, 2000). Apesar de algumas alterações genéticas serem apontadas como causa de disgenesia testicular, em um número significativo de casos de malformações no sistema reprodutor masculino, nenhuma alteração genética pode ser demonstrada através de nossos conhecimentos. Contudo, as marcantes diferenças regionais e o rápido aumento na incidência dos distúrbios que compõem a TDS indicam que fatores ambientais ou relacionados com o estilo de vida estejam possivelmente envolvidos nessa etiologia dessa síndrome (JORGENSEN *et al.*, 2001, 2006; SWAN *et al.*, 2003). Homens dinamarqueses, por exemplo, apresentam uma incidência aproximadamente quatro vezes maior de câncer testicular, criptorquidismo e

hipospádias que homens finlandeses, além de apresentarem também uma contagem de espermatozóides mais baixa (FERLAY *et al.*, 2001).

A ideia de que fatores exógenos podem alterar o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino já é bem documentada. Asklund e colaboradores (2004) sugeriram que um balanço entre androgênios e estrogênios durante a vida fetal é crucial para o desenvolvimento normal. A hipótese de Sharpe e Skakkebaek (1993) propõe que o aumento na incidência de anormalidades do sistema reprodutor masculino em humanos pode estar relacionado com o aumento da exposição *in utero* a substâncias estrogênicas. Sabe-se, por exemplo, que os hormônios estrogênicos podem induzir criptorquidismo pela supressão do gene *insl3* (insulin-like factor 3) (SHARPE, 2003) (Figura 2). Essa hipótese tem sido expandida para incluir os desreguladores endócrinos, que incluem tóxicos ambientais que podem desregular o balanço hormonal do feto e então alterar a diferenciação sexual tanto por um efeito estrogênico como por um efeito anti-androgênico (TOPPARI *et al.*, 1996).

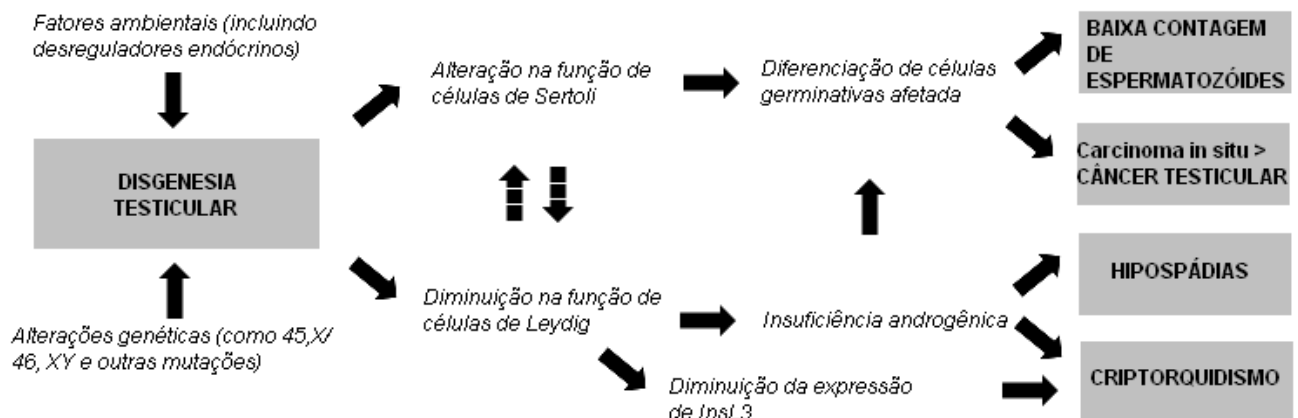


Figura 2: Representação sistemática das ligações patogenéticas entre os componentes e manifestações clínicas de TDS. Adaptado de Asklund *et al.*, 2004.

## 1.2. DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada ao potencial de uma gama de xenobióticos em interagir e desregular sistemas endócrinos de animais e seres humanos.

Desreguladores endócrinos são definidos como “substâncias ou misturas exógenas que alteram uma ou mais funções no sistema endócrino e conseqüentemente causam efeitos adversos à saúde do organismo, de sua (s) prole (s) ou (sub) populações” (EUROPEAN COMMISSION, 1996). As ações dessas substâncias podem ocorrer de várias maneiras. Alguns se ligam aos receptores hormonais e mimetizam ou bloqueiam a ação de hormônios endógenos, como o dietilestilbestrol, o tamoxifeno, o bisfenol A e o DDT. (DFG E EISENBRAND, 1996) Outros podem ainda alterar síntese ou metabolismo dos hormônios, como os ésteres de ftalatos, ou desregular a síntese dos receptores dos hormônios (AMARAL MENDES, 2002).

Existem muitas evidências comprovando a ação hormonal exercida por substâncias presentes no ambiente e em produtos industrializados. Muitas evidências de efeitos adversos causados por desreguladores endócrinos vieram de observações feitas na vida selvagem, após desastres ambientais acidentais. Um caso bem conhecido de feminilização e alterações no sistema reprodutor masculino induzidas por xenobióticos ocorreu em crocodilos no Lago Apopka (Florida, EUA), onde houve um derramamento do pesticida organoclorado DDT, um composto fracamente estrogênico que é metabolizado no DDE, uma substância anti-androgênica (GUILLETE *et al.*, 1994). Na mesma região, uma significativa diminuição na função reprodutiva de panteras foi observada e relacionada com desreguladores endócrinos (FACEMIRE *et al.*, 1995).

Apesar da maioria dos efeitos observados na vida selvagem virem de locais altamente poluídos, há uma grande ocorrência de efeitos mais sutis, como o desenvolvimento de imposex (crescimento de pênis em fêmeas) em gastrópodes marinhos após exposição ao TBT (BRYAN *et al.*, 1986), a presença de cascas mais finas em diversas espécies de aves e alterações reprodutivas em ursos polares, o que sugere que a contaminação por desreguladores endócrinos pode ser um problema global e relevante também para seres humanos (VOS *et al.*, 2000).

No início da década de 1990, Colborn e colaboradores sugeriram que os desreguladores endócrinos poderiam ser responsáveis pelo comprometimento da espermatogênese, aumento de câncer testicular, câncer de próstata e criptorquidismo, assim como endometriose e câncer de mama em seres humanos (COLBORN *et al.*, 1993).

A primeira evidência humana foi encontrada em homens responsáveis pela pulverização de DDT em plantações, que apresentaram baixa contagem de espermatozoides (SINGER, 1949). Outros estudos epidemiológicos reportaram um aumento no risco de malformações genitais em filhos de trabalhadores expostos a pesticidas (WEIDNER *et al.*, 1998) e o aumento no aparecimento de criptorquidismo em áreas de agricultura intensiva (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998). No entanto, somente os efeitos do dietilestilbestrol (potente estrogênio sintético que causa anormalidades no trato reprodutivo da prole feminina) foram bem documentados como desreguladores endócrinos após exposição humana pré-natal (STILLMAN, 1982). Além disso, relativamente poucos compostos foram minuciosamente avaliados para identificação de seus efeitos hormonais.

Grande parte das evidências de efeitos adversos de desreguladores endócrinos sobre o desenvolvimento sexual tem sido obtida de estudos experimentais com animais de laboratório. Dentre as substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino e causar distúrbios reprodutivos, destacam-se os ésteres de ftalatos, aditivos químicos utilizados como plastificantes. Alguns ftalatos podem comprometer a organogênese do sistema reprodutor masculino quando administrados a ratas durante a gestação, através de uma drástica redução da síntese de testosterona fetal (MYLCHREEST *et al.*, 1999; PARKS *et al.*, 2000).

### 1.3. DI-BUTIL FTALATO

#### 1.3.1 Aspectos gerais dos ftalatos

Os ésteres de ftalatos têm sido utilizados como compostos plastificantes desde a década de 1920. Eles foram introduzidos no mercado com este propósito para substituir a cânfora, plastificante de escolha da época cujo forte odor o tornava indesejável. Os ftalatos são adicionados ao policloreto de vinila (PVC) para conferir maleabilidade a esses plásticos desde a síntese do primeiro ftalato, o DEHP (dietilexil ftalato), o que causou um rápido crescimento na indústria do PVC. Hoje, estão presentes em brinquedos, na composição de produtos cosméticos (esmaltes e perfumes), como aditivos em produtos de limpeza e agrotóxicos, equipamentos médicos, produtos farmacêuticos e solventes de tintas.

Já em 1970, Jaeger e Rubin detectaram a presença do plastificante DEHP em tecidos e órgãos de dois pacientes hospitalizados que haviam recebido transfusões sanguíneas. O sangue havia sido armazenado em bolsas feitas de PVC plastificadas com DEHP. Já havia sido publicado que equipamentos médicos contendo ftalatos poderiam liberar essas substâncias (GUESS *et al.*, 1967; MARCEL E NOEL, 1970), mas pouca preocupação foi dada aos possíveis efeitos na saúde humana com a liberação do DEHP. No entanto, a partir da publicação de Jaeger e Rubin (1970), grande interesse foi despertado em relação aos possíveis efeitos tóxicos não somente do DEHP, mas de todos os ésteres de ftalatos. Hoje já é bem documentado que os ésteres de ftalatos não se ligam ao PVC e com tempo e uso desprendem-se da matriz plástica, contaminando o meio ambiente (BAUER E HERRMANN, 1997; BRADBURY, 1996; GIAM *et al.*, 1978; GRIFFITHS *et al.*, 1985). Além disso, ésteres de ftalatos já foram detectados em diversos fluidos corporais humanos como urina materna durante a gestação (SWAN *et al.*, 2005), leite materno (MORTENSEN *et al.*, 2005), e líquido amniótico (LATINI *et al.*, 2003).



### 1.3.2 Estrutura química e propriedades gerais dos ftalatos

Estruturalmente, os ésteres de ftalatos consistem em grupos ésteres pareados ligados a um anel benzeno (Figura 3).

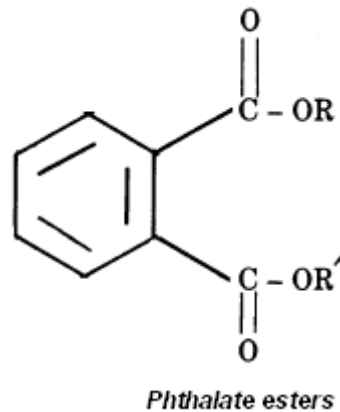


Figura 3: Estrutura química geral dos ésteres de Ftalatos (KLUWE, 1982).

As configurações meta e para são conhecidas como isoftalatos e tereftalatos respectivamente. No entanto, o termo “éster de ftalato” é restrito a configuração orto da molécula. Os ftalatos são sintetizados comercialmente pela condensação de um álcool apropriado com o anidrido ftálico, como indicado na Figura 4.

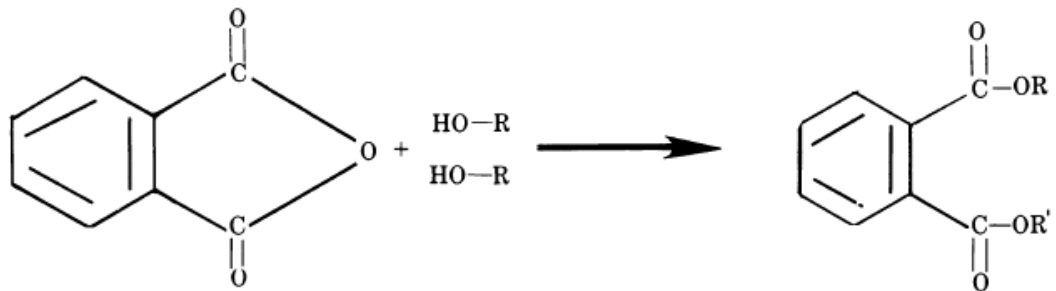


Figura 4: Reação química da síntese de ésteres de ftalatos (KLUWE, 1982).

A maioria dos ésteres são incolores, apresentam baixa volatilidade e são praticamente insolúveis em água devido a sua estrutura lipofílica, sendo solúveis então, em solventes orgânicos e óleos. Eles não são quimicamente ligados ao polímero, mas sim dispersos na matriz do mesmo para proporcionar maleabilidade e flexibilidade (AUTIAN, 1973).

O Di-n-butil ftalato é sintetizado através da reação do n-butanol com anidrido ftálico (Figura 5) (CMA, 1999).

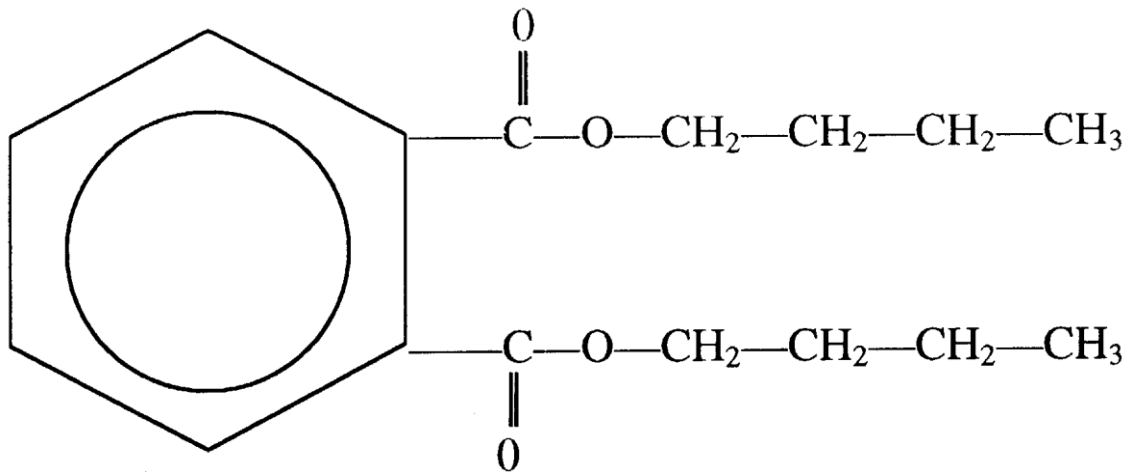


Figura 5: Estrutura química do di-butil ftalato.

### 1.3.3 Exposição humana e aspectos regulatórios do DBP

Em 2000, Blount e colaboradores mostraram que dentre os ftalatos com potencial para afetar o desenvolvimento reprodutivo, o DBP é o composto mais comumente encontrado em urina de mulheres em idade reprodutiva, em uma amostra da população geral dos Estados Unidos. Kohn e colaboradores (2000) estimaram que a exposição máxima humana ao DBP é de 113  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ .

De acordo com as estimativas de Chan e Meek (1994) e IPCS (International Program in Chemical Safety) (1997), a maior fonte de exposição humana ao DBP são os alimentos.

A exposição ao DBP através dos alimentos em adultos foi estimada em 7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  pela IPCS (1997) e 1,9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  por Chan e Meek (1994). Já em crianças, foi documentado por Chan e Meek (1994) uma exposição de 2,3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  em crianças de 12 a 19 anos e 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  em crianças de 6 meses a 4 anos.

Em relação a legislação brasileira, a Portaria nº 369/2007 do Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) determina o limite de 0,1% de ftalatos (DINP, DIDP, DNOP, DEHP, DBP e BBP) na composição de brinquedos feitos a base de PVC. A ANVISA, através da Resolução 105/99 libera o ftalato até o limite de 3% da composição do produto.

#### 1.3.4 Farmacocinética do DBP

Os diésteres de ftalatos ingeridos são hidrolisados por lipases e absorvidos quase totalmente como seus correspondentes monoésteres (ROWLAND *et al.*, 1977). Em roedores, foi estimada a absorção intestinal de ftalatos através do monitoramento da excreção urinária do composto, ou de seus metabólitos, após administração oral de uma quantidade conhecida do composto radioativamente marcado. Mais de 90% da radioatividade seguida da administração de uma dose oral de DBP foi recuperada na urina em dois dias, indicando uma absorção intestinal quase completa (TANAKA *et al.*, 1978).

Em humanos, o DBP foi detectado no sangue após ingestão de alimentos contendo o ftalato, havendo um aumento significativo dos níveis sanguíneos após exposição (IPCS, 1997). Infelizmente, os autores mediram somente o composto diéster sem levar em consideração seus metabólitos, o que impede uma estimativa de absorção total.

Em um estudo comparando a hidrólise de DBP em humanos, macacos e ratos no intestino, Lake e colaboradores (1977) mostraram que as lipases dessas três espécies apresentam atividade similar. A atividade da lipase pancreática não foi analisada. Já foi documentado em roedores que os ésteres de ftalatos são metabolizados a monoésteres em diversos tecidos. Como já mencionado anteriormente, é aceito que ésteres de ftalatos ingeridos são hidrolisados a monoésteres por lípases pancreáticas e da parede do intestino e a absorção ocorre na forma de monoéster (ROWLAND *et al.*, 1977).

A absorção pela pele é baixa, tendo sido estimada através de estudo *in vitro* com pele humana (Scott *et al.*, 1987) e *in vivo* em roedores (ELISISI *et al.*, 1989).

Em função da rápida metabolização, há pouca ou nenhuma bioacumulação. Um estudo revelou que uma semana após a exposição a uma dose única de DBP, nenhum tecido continha mais de 2% da dose administrada (ELISISI, 1989).

A principal rota de excreção dos metabólitos do DBP é a urina (FOSTER *et al.*, 1982). O mono-butil ftalato é excretado para a bile (cerca de 45%), mas apenas cerca de 5% é eliminado pelas fezes, indicando uma eficiente circulação êntero-hepática (TANAKA *et al.*, 1978).

### 1.3.5 Toxicidade do DBP

Um grande número de estudos experimentais tem avaliado os efeitos tóxicos do DBP sobre o desenvolvimento pré e pós-natal. A grande maioria destes estudos é realizada em ratos usando a exposição oral e diferentes doses.

Ratos machos apresentam alterações e malformações no trato reprodutivo após exposição *in utero* a certos ésteres de ftalatos durante o período de desenvolvimento do sistema reprodutor. A exposição a ftalatos durante essa janela crítica de vulnerabilidade resulta em efeitos adversos no trato reprodutivo masculino que são indicativos de uma supressão da via androgênica, sendo estes ésteres de ftalatos então classificados como substâncias anti-androgênicas (GRAY *et al.*, 2006). Apesar de muitos compostos anti-androgênicos atuarem como antagonistas do receptor androgênico (AR), os ésteres de ftalato não se ligam a esses receptores *in vitro* em concentrações fisiológicas (PARKS *et al.*, 2000), o que já foi demonstrado para o DBP e para seu metabólito MBP por Foster e colaboradores (2001). Alguns estudos reportaram a ligação de ftalatos ao receptor estrogênico *in vitro* (JOBLING *et al.*, 1995), mas aparentemente os ésteres de ftalatos não exercem efeitos estrogênicos *in vivo* em ratos, como abertura precoce de canal vaginal ou indução de estro persistente (GRANDE *et al.*, 2007; GRAY *et al.*, 1999; MYLCHREEST *et al.*, 1998, 2000).

A exposição de ratos machos *in utero* a altas doses de DBP induz uma série de malformações do trato reprodutivo que se manifestam como efeitos imediatos (detectados ao nascimento) ou tardios (encontrados na vida adulta). Essas malformações incluem diminuição na distância anogenital, retenção de mamilos (GRAY *et al.*, 2006), agenesia do epidídimo, hipospádias, malformações testiculares (incluindo criptorquidismo) e desenvolvimento peniano anormal (FOSTER, 2006; GRAY *et al.*, 2006). Os metabólitos monoésteres são o componente bioativo dos ésteres de ftalatos responsáveis pela toxicidade reprodutiva (GRAY E BEAMAND, 1984; SJOBERG *et al.*, 1986).

O principal alvo da toxicidade pré-natal dos ftalatos parece ser o testículo. Em um estudo com exposição de ratos a 100-500 mg/kg/dia de DBP durante os dias 13 a 20 de gestação foi reportado uma redução na síntese de testosterona testicular fetal. Além disso, a avaliação histológica dos testículos fetais (retirados no dia 20 de

gestação) revelaram múltiplas áreas de hiperplasia de células de Leydig, que se apresentavam agregadas em clusters maiores que os encontrados nos testículos controles, e o aparecimento de cordões seminíferos apresentando gonócitos multinucleados (FOSTER, 2006). A hiperplasia de células intersticiais também foi reportada em ratos adultos expostos *in utero* ao DBP (MYLCHREEST *et al.*, 1999, 2000). No entanto, dados recentes indicam que a exposição a ftalatos não altera o número de células de Leydig, mas apenas a sua distribuição no testículo, formando grandes agregados. Além disso, os parâmetros hormonais e histológicos avaliados em fetos expostos são bons indicadores da toxicidade testicular, sendo aparentemente mais sensíveis que os efeitos tardios da exposição pré-natal (MAHOOD *et al.*, 2007).

Criptorquidismo e hipospádias, duas malformações presentes na Síndrome de Disgenesia Testicular Humana, também já foram reportados por diversos laboratórios, após a exposição *in utero* a altas doses de DBP (FISHER *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 1999, 2000; MCKINNEL *et al.*, 2005; MYLCHREEST *et al.*, 1998, 1999).

### 1.3.6 Mecanismo de ação dos ftalatos

Como já mencionado anteriormente, os ftalatos suprimem a síntese de testosterona pelo testículo fetal, o que desencadeia manifestações clássicas de insuficiência androgênica como diminuição na distância anogenital e retenção de mamilos. Alguns aspectos referentes aos mecanismos de ação dos ftalatos já foram parcialmente elucidados. Estudos genéticos têm identificado vários alvos potenciais para a ação dessas substâncias. Sabe-se, por exemplo, que os ftalatos inibem a expressão do gene *Insl3*, que participa da síntese do hormônio *Insl3* (*insuline like hormone 3*), responsável pela primeira fase de descida dos testículos, do abdômen para a região inguinal (WILSON *et al.*, 2004; LEHMANN *et al.*, 2004). Os ftalatos também alteram a expressão de genes que participam da esteroidogênese, como o gene *StAR* (*steroidogenic acute regulatory gene*), o *P450scc* e *cyp17a* (LEHMANN *et al.*, 2004).

Mahood e colaboradores (2005) propuseram que as células de Leydig se agrupam em clusters maiores após a exposição pré-natal a ftalatos devido a uma migração celular anormal. Ferrara e colaboradores (2006) sugeriram que o aparecimento de gonócitos multinucleados pode ser desencadeado por uma alteração nas interações entre gonócitos e células de Sertoli. Além disso, alguns estudos indicam que alterações histológicas nos testículos causadas pelos ftalatos ocorrem por um mecanismo independente da redução da síntese de testosterona (GAIDO *et al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2007). Por exemplo, Gaido e colaboradores (2007), demonstraram que camundongos expostos ao DBP apresentam aumento na incidência de gonócitos multinucleados nos testículos fetais, mesmo na ausência de insuficiência androgênica. Apesar dessas proposições, os mecanismos responsáveis pelas alterações histológicas induzidas pela exposição pré-natal aos ftalatos ainda permanecem obscuros.

Mais recentemente tem sido proposto que os ésteres de ftalatos possam induzir processos inflamatórios. Latini e colaboradores (2003) propuseram um papel dos ftalatos na indução de inflamação intrauterina devido a uma semelhança estrutural entre os ésteres de ftalato e algumas prostaglandinas e tromboxanas pró-inflamatórias (Figura 6). Scarano e colaboradores (2009) mostraram a presença de focos de inflamação na próstata de ratos expostos *in utero* e durante a lactação a 100 mg/kg/dia de DBP.

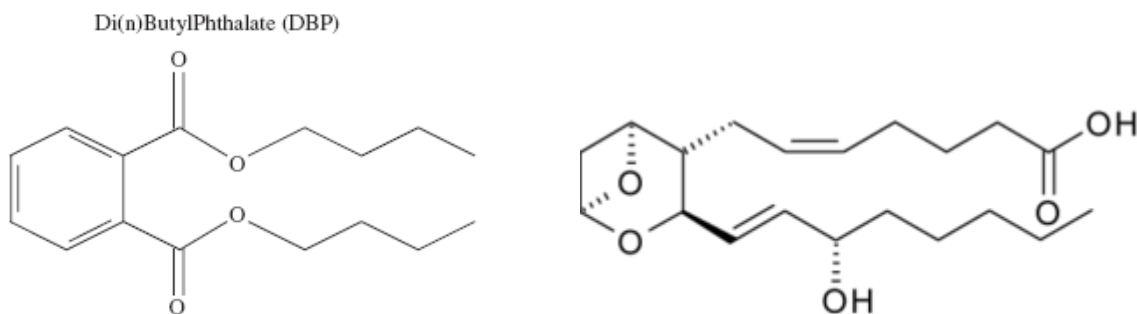


Figura 6: Estruturas químicas do DBP e de uma tromboxana pró-inflamatória.

### 1.3.7 *TDS-like syndrome* e evidências em humanos.

A exposição a ftalatos durante a diferenciação sexual de ratos machos induz o aparecimento de algumas alterações muito similares àquelas apresentadas por

homens portadores da Síndrome da Disgenesia Testicular, como criptorquidismo, hipospádias e baixa contagem de espermatozóides. Apesar da exposição pré-natal a ftalatos não induzir câncer testicular em ratos, pode causar a expressão de alguns genes que são marcadores de carcinoma *in situ* (CIS) nos testículos de humanos. Um estudo recente reportou um retardo na expressão do fator de transcrição Oct-4 nos gonócitos de ratos expostos ao DBP (FERRARA *et al.*, 2006). Esse fator é usado como marcador de células de carcinoma *in situ* em homens portadores da TDS (FERRARA *et al.*, 2006; FISHER *et al.*, 2003). Em humanos, evidências histológicas de disgenesia testicular foram encontradas em biópsias de testículos de pacientes com câncer testicular e também de pacientes com infertilidade, hipospádias e criptorquidismo (SKAKKEBAEK *et al.*, 2003; HOEI-HANSEN *et al.*, 2003; HOLM *et al.*, 2003). Isso não indica que a exposição aos ftalatos cause TDS em humanos, mas sugere que em ratos a exposição pré-natal ao DBP e outros ftalatos pode ser utilizada como uma importante ferramenta na investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na etiologia dessa síndrome. Vale a pena ressaltar que as vias de desenvolvimento fetal são altamente conservadas nos mamíferos. As enzimas envolvidas na esteroidogênese são similares em humanos e ratos e acredita-se que todos os mamíferos apresentem mecanismos de sinalização androgênica parecidos. Graças às semelhanças apresentadas pelos ratos expostos aos ftalatos e homens portadores de TDS, pode-se dizer que os ftalatos induzem em ratos a Síndrome do Ftalato ou “*TDS-like syndrome*”, constituindo um importante modelo animal para o estudo da síndrome humana (FISHER *et al.*, 2003).

Além disso, já existem algumas evidências que indicam possíveis efeitos de ftalatos em humanos. Um estudo conduzido em Xangai mostrou uma associação positiva entre a incidência de malformações em espermatozóides e a concentração de DEHP no sêmen (ZHANG *et al.*, 2006). Swan e colaboradores (2005) reportaram uma associação negativa entre os níveis urinários de ftalatos em gestantes e a distância anogenital de seus filhos meninos. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar estes e outros efeitos em seres humanos.

#### 1.4. ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Os ácidos graxos desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Em humanos, os ácidos linoléico (Omega 6 ou n-6) e  $\alpha$ -linolênico (Omega 3 ou n-3) são necessários para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos.

Esses ácidos graxos são denominados genericamente de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs – polyunsaturated fatty acids), assim como outros ácidos graxos que apresentam duas ou mais insaturações. A distinção entre as famílias de ácidos graxos pode ser realizada pela localização da dupla ligação a partir de sua extremidade metila (DOMMELS *et al.*, 2002). Assim, o ácido graxo n-3 apresenta sua primeira dupla ligação entre os carbonos três e quatro, o n-6 entre os carbonos seis e sete da cadeia hidrocarbônica (Figura 7).

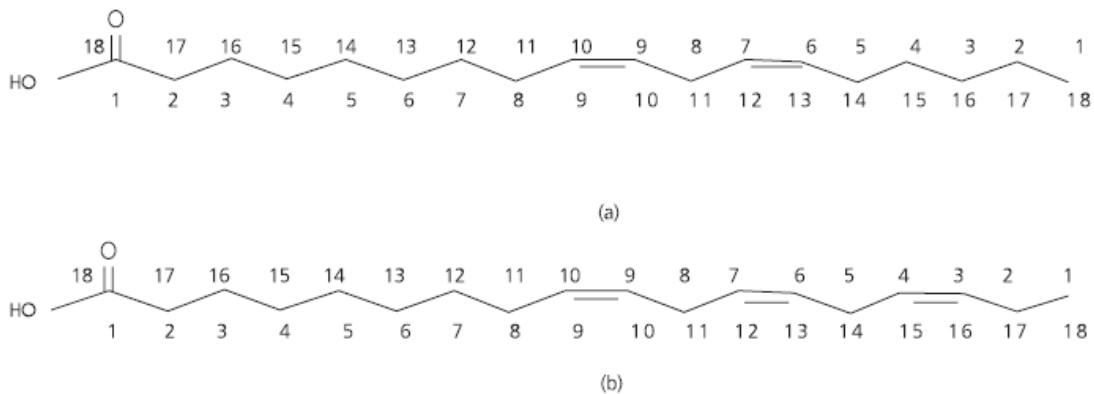


Figura 7: Estruturas dos ácidos linoléico (a) e  $\alpha$ -linolênico (b) (Martin *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados linoléico (Omega-6) e  $\alpha$ -linolênico (Omega-3) são precursores de duas famílias de ácidos graxos com efeitos fisiológicos geralmente opostos (TAPIERO *et al.*, 2002). Os ácidos graxos derivados de precursores Omega-6 (ex.: ácido araquidônico – AA) podem funcionar como substratos lipídicos para enzimas cicloxigenases e lipoxigenases, gerando eicosanóides pró-inflamatórios. Por outro lado, os derivados Omega-3 (ex.: ácido eicosapentaenóico - EPA) usualmente originam eicosanóides com propriedade anti-inflamatórias, quando utilizados como substratos das mesmas enzimas.

Os eicosanóides constituem as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas. Ácidos graxos n-6 formam prostaglandinas da série 2 e leucotrienos



da série 4. Já a família de ácidos graxos n-3, formam a série 3 de prostanoídes (prostaglandinas e tromboxanas) e a série 5 dos leucotrienos.

Os ácidos graxos n-6 e n-3 devem ser providos através da dieta, uma vez que não são sintetizados endogenamente por mamíferos, sendo que um equilíbrio entre os dois tipos parece ter um papel importante sob diferentes aspectos fisiológicos, enquanto que um desequilíbrio na ingestão desses compostos lipídicos pode ocasionar ou favorecer o surgimento de algumas doenças (MCENTEE *et al.*, 2002). Os ácidos graxos Omega-3 são encontrados principalmente em peixes, óleo de peixe, canola e linhaça, nozes, bem como em folhas verdes escuras. O Omega-6 compõe principalmente os óleos vegetais e sementes, como milho, girassol, soja entre outros (BARTSCH *et al.*, 1999).

Vários estudos têm destacado a importância da ingestão de ácidos graxos poliinsaturados na fase gestacional e nos primeiros meses após o nascimento (HORNSTRA, 2000; SANDERS, 1999; SAN GIOVANNI *et al.*, 2000; UAUY *et al.*, 2001). O crescimento e desenvolvimento do feto e seus órgãos dependem de um suprimento suficiente de nutrientes (HAGGARTY, 2004). Os ácidos graxos essenciais e seus derivados (ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados, PUFAs) são capazes de atravessar a placenta e desempenham papéis importantes no desenvolvimento fetal, tais como constituição e síntese de membranas celulares e armazenamento de energia (INNIS, 2003). A exposição a xenobióticos que alteram o suprimento fetal de ácidos graxos, pode levar a um desenvolvimento alterado ou até mesmo uma organogênese imprópria (HAGGARTY, 2004; INNIS, 2003).

Os ácidos graxos Omega 3 e Omega 6 competem pelas mesmas enzimas de dessaturação e alongamento da cadeia, que apresentam maior afinidade pelos ácidos da família Omega 3. Assim, a razão entre a ingestão diária de alimentos fonte de ácidos graxos Omega 3 e 6 assume grande importância na alimentação humana.

A razão n-6/n-3 recomendada por diversos autores fica entre 2:1 e 5:1 (SCHAEFER, 2002; CHARDIGNY *et al.*, 2001; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2000). Esses valores também têm sido sugeridos pelos resultados de alguns estudos clínicos que mostraram a diminuição da taxa de mortalidade em pacientes com doença cardiovascular submetidos a uma dieta com razão 4:1; redução dos sintomas da asma quando a razão ficou em torno de 5:1, e intensificação desses

sintomas com elevação da razão para 10:1 (LORGERIL *et al.*, 1994; BROUGHTON *et al.*, 1997).

Os ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolênico estão presentes tanto em espécies vegetais como animais empregados na alimentação humana. As tabelas 1 e 2 apresentam as concentrações desses ácidos em alimentos de origem vegetal e animal, respectivamente.

Tabela 1: Concentração dos ácidos linoléico, alfa-linolênico e razão n-6/n-3, em alimentos de origem vegetal (BROUGHTON *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2001 In MARTIN *et al.*, 2006).

Hortaliças	18:2 n-6(mg/g)	18:3 n-3 (mg/g)	n-6/n-3	Cereais e leguminosas	18:2 n-6 (mg/g)	18:3 n-3 (mg/g)	n-6/n-3
Agrião <sup>1</sup>	0,4	1,8	0,2	Arroz <sup>2</sup>	0,6	0,1	4,8
Alface <sup>1</sup>	0,4	0,9	0,4	Arroz <sup>2</sup> (parboilizado)	3,1	0,2	17,9
Brócolis <sup>1</sup>	0,5	1,1	0,5	Aveia <sup>1</sup>	24,4	1,1	22,0
Beldroega <sup>1</sup>	0,9	4,1	0,2	Ervilha <sup>2</sup>	1,4	0,3	4,9
Couve <sup>1</sup>	1,4	1,8	0,8	Feijão <sup>2</sup>	0,8	1,1	0,7
Couve-flor <sup>1</sup>	0,5	1,7	0,3	Lentilha <sup>2</sup>	1,4	0,4	3,7
Espinafre <sup>1</sup>	0,3	1,3	0,2	Milho <sup>2</sup>	58,6	1,8	32,5
Hortela <sup>1</sup>	0,3	2,0	0,2	Soja <sup>2</sup>	44,6	6,0	7,5
Frutas				Óleos			
Abacate <sup>1</sup>	16,7	1,3	12,5	Canola	203,0	93,0	2,2
Banana <sup>1</sup>	0,5	0,3	1,7	Linhaça	127,0	533,0	0,2
Mamão <sup>1</sup>	0,1	0,3	0,3	Milho	523,0	11,6	45,1
Manga <sup>1</sup>	0,4	0,1	4,0	Oliva	97,6	7,60	12,8
Morango <sup>1</sup>	1,8	0,7	2,6	Soja	510,0	68,0	7,5

<sup>1</sup>Alimento cru; <sup>2</sup>Alimento cozido.

Tabela 2: Concentração dos ácidos linoléico, alfa-linolênico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosaenóico em alimentos de origem animal (MARTIN *et al.*, 2006).

Alimento	18:2 n-6 (mg/g)	18:3 n-3 (mg/g)	20:4 n-3 (mg/g)	20:5 n-3 (mg/g)	22:6 n-3 (mg/g)
Carne bovina <sup>1</sup>	4,1	0,4	0,5	-	-
Carne de frango <sup>1</sup>	46,5	2,5	1,6	0,2	0,2
Bagre <sup>3</sup>	26,2	1,8	1,0	1,2	2,2
Carpa <sup>2</sup>	6,6	3,5	2,0	3,1	1,5
Salmão <sup>2</sup>	2,2	3,8	3,4	4,1	14,3
Sardinha <sup>1a</sup>	35,4	5,0	-	4,7	5,1
Tilápia <sup>2</sup>	2,9	0,5	3,5	-	1,3
Truta <sup>2</sup>	2,2	2,0	2,4	2,6	6,7
Leite de vaca <sup>1</sup>	16,7	0,8	-	-	-
Leite de cabra <sup>1</sup>	10,9	0,4	-	-	-
Salsicha (bovina) <sup>1</sup>	5,7	0,5	-	-	-
Ovos (galinha) <sup>1</sup>	26,1	0,5	5,0	-	1,1

<sup>1</sup>Alimento fresco; <sup>2</sup>Cozido; <sup>3</sup>Grelhado; <sup>a</sup>enlatada com óleo de soja.

## 2. JUSTIFICATIVA

Recentemente, tem sido proposto que a toxicidade dos ésteres de ftalato poderia estar relacionada com processos inflamatórios. Alguns autores já propuseram que a indução de cicloxigenases por alguns ftalatos poderia resultar em uma inflamação intrauterina, o que poderia explicar a maior incidência de partos pré maturos observada em alguns estudos epidemiológicos (LATINI *et al.*, 2005). Outros mostraram que os ésteres de ftalatos são capazes de alterar a transferência placentária de ácidos graxos essenciais através da super expressão do receptor PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) (XU *et al.*, 2005). Com base nesses resultados, foi proposto que a suplementação com óleos contendo altos níveis de Omega 3 poderia amenizar ou reverter alguns dos efeitos tóxicos reprodutivos induzidos pelos ftalatos devido as propriedades antiinflamatórias dessas substâncias (LATINI *et al.*, 2005).

Além disso, diversos laboratórios reportam diferenças na incidência ou severidade dos efeitos tóxicos reprodutivos dos ftalatos. Algumas dessas diferenças podem ser explicadas pelo uso de diferentes linhagens de animais (WILSON *et al.*, 2007), mas outra possível explicação poderia ser o tipo de veículo oleoso usado no estudo.

Nesse sentido, a suplementação com óleos contendo diferentes proporções de ácidos graxos (Omega-6 e Omega-3) poderia ajudar a esclarecer o papel dos veículos oleosos na toxicidade reprodutiva do DBP. No presente estudo, além do óleo de milho (razão n-6/n-3 =  $\pm 45$ ), veículo normalmente utilizado em estudos com ftalatos, e do óleo de canola (razão n-6/n3 =  $\pm 2$ ), veículo previamente utilizado no nosso laboratório, também foi empregado o óleo de peixe, veículo que contém uma grande quantidade de ácidos graxos ômega-3 (razão n-6/-3 =  $\pm 0,5$ ).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de veículos oleosos contendo diferentes proporções de ácidos graxos Omega-6 e Omega-3 na toxicidade testicular fetal induzida pelo plastificante di-butil ftalato (DBP) em ratos. Para tanto, três diferentes veículos foram utilizados: o óleo de milho, veículo usualmente utilizado em estudos com ftalatos e dois veículos ricos em ácidos graxos Omega-3, os óleos de canola e peixe.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a influência de diferentes veículos oleosos na toxicidade reprodutiva masculina do di-butil ftalato (DBP) em ratos expostos no período pré-natal. Assim, os fetos masculinos expostos entre os dias 13 e 20 de gestação foram avaliados quanto a parâmetros tipicamente alterados pela exposição *in utero* ao DBP:

- Testosterona intratesticular
- Distância anogenital (marcador externo de efeitos anti-androgênicos)
- Histologia testicular (diâmetro das cordas seminíferas e percentual de cordas contendo gonócitos multinucleados).
- Imunohistoquímica testicular (análise de clusters de Células de Leydig)

## 4. ARTIGO CIENTÍFICO

The screenshot shows the 'Submissions Being Processed for Author Anderson Joel Martino-Andrade' page. It includes a navigation menu, user information (Username: AAndrade-495, Role: Author), and a table of submissions. The table has columns for Action, Manuscript Number, Title, Initial Date Submitted, Status Date, and Current Status. One submission is listed with the title 'Influence of different oily vehicles on testicular toxicity of di-butyl phthalate (DBP)', submitted on Jun 16, 2011, and with a status of 'Submitted to Journal'.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		Influence of different oily vehicles on testicular toxicity of di-butyl phthalate (DBP)	Jun 16, 2011	Jun 16, 2011	Submitted to Journal

### Influence of different oily vehicles on testicular toxicity of di-butyl phthalate (DBP)

Ana Carolina S. Lourenço <sup>a</sup>, Caroline Gomes <sup>a</sup>, Ana Cláudia Boareto <sup>a</sup>, Renata P. Mueller <sup>c</sup>, Fabíola Nihi <sup>c</sup>, Lucas F. Andrade <sup>b</sup>, Edvaldo S. Trindade <sup>b</sup>, Isabela Coelho <sup>c</sup>, Katya Naliwaiko <sup>b</sup>, Rosana N. Morais <sup>c</sup>, Anderson J. Martino-Andrade <sup>acd</sup>.

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Cellular Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Physiology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil.

<sup>d</sup> Corresponding author:

Phone: ++ (5541) 33611719

Fax: ++ (5541) 33611714

Email: [anderson.andrade@ufpr.br](mailto:anderson.andrade@ufpr.br)

Address: Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico - 81531-980 Curitiba, Brazil - Caixa Postal 19031

## ABSTRACT

The spectrum and severity of toxic responses induced by phthalates during the pre-natal period has been shown to vary significantly across different laboratories, which could be explained by several factors, including rat strain, laboratory conditions, diet and type of oily vehicle used. In order to determine the possible role of oily vehicles on phthalate toxicity, pregnant Wistar rats were treated with di-butyl phthalate (DBP) diluted in three different vehicles: corn, canola and fish oil. Three control groups, consisting of dams receiving oily vehicles only, and three groups exposed to 500 mg DBP/kg/day, diluted in corn, canola or fish oil, were used. Rat dams were treated by oral route (gavage) from gestation days 13 to 20 and the administration volume was 5 mL/kg/day for all groups. Females were sacrificed on gestation day 20, two hours after the last administration of DBP or vehicles. Anogenital distance (AGD) was measured in male and female fetuses. Following decapitation, testes from up to three male fetuses of each dam were collected for immunohistochemistry, histology and determination of testicular testosterone and lipid profile. DBP exposure significantly lowered intratesticular testosterone levels and anogenital distance in male pups, regardless the vehicle used. In most cases, it was observed an increase in percentage of seminiferous cords containing multinucleated gonocytes (MNGs) and in diameter of seminiferous cords in groups exposed to DBP, with no difference among them. However, there was no significant difference between the group treated with DBP in canola oil and its concurrent control for the presence of MNGs. Also, the group treated with DBP diluted in fish oil did not differ from its control in the analysis of seminiferous cord diameter. A clear shift in the pattern of Leydig cell distribution was observed, with a significant decrease in the contribution of small clusters to the total cluster area in all groups exposed to DBP. However, there was no influence of oily vehicle on this parameter. Lipid profile determined by HPLC indicated that administration of canola and fish oil in late gestation (days 13 to 20) was able to increase the content of omega-3 fatty acids in rat fetal testis. However, incorporation of omega-3 was diminished in DBP-treated groups, when compared to controls. Taken together, our results indicate that even though canola and fish oil were unable to alter DBP-induced testosterone deficiency or shortening of anogenital distance, slight changes in testicular histology could be observed.

Keywords: di-butyl phthalate; rats; fatty acids; testis

## 1. Introduction

Several studies indicate that human male reproductive disorders have become more prevalent during the last decades (Sharpe and Skakkebaek, 2003; Toppari et al., 1996). It was proposed that conditions such as hypospadias, cryptorchidism, low sperm counts and testicular cancer are all symptoms of a single entity, the Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS) (Skakkebaek et al., 2001). Epidemiological and experimental evidences suggest that these disorders are interrelated and have a common origin in fetal life (Skakkebaek et al., 2001; Sharpe and Skakkebaek, 2003). The mechanisms that give rise to TDS are unknown but endocrine disrupting chemicals have been suggested as one out of many potential causal agents (Sharpe and Skakkebaek, 2003).

Certain phthalate esters, industrial chemicals mainly used to impart flexibility to polyvinyl chloride plastics, have been shown to disrupt the development of male reproductive tract when administered to rats during pregnancy (Mylchreest et al., 1999; Parks et al., 2000). The effects induced in rats following *in utero* exposure are remarkably similar to TDS disorders in humans, suggesting the existence of a TDS-like condition, the so-called “rat phthalate syndrome”, which could be used as a potential model for understanding the cellular and molecular mechanisms underlying the human syndrome (Fisher, 2004; Foster, 2006).

However, it is important to highlight that the spectrum and severity of toxic responses induced by phthalates during the pre-natal period has been shown to vary significantly across different laboratories. For instance, while Fisher et al. (2003) reported an incidence of 100% of cryptorchidism in male Wistar rat offspring exposed *in utero* to di-butyl phthalate (DBP) at 500 mg/kg/day, Mylchreest et al. (1999) found an incidence of only 10% in Sprague-Dawley exposed to the same dose level and dosing period. Although differences in rat strain sensitivity may be partially responsible for such variability, other factors such as the oily vehicle used could also be involved. In a recent study conducted in our laboratory (Martino-Andrade et al., 2009), no cases of cryptorchidism or hypospadias were seen in rats exposed to DBP 500 mg/kg/day diluted in canola oil.

A number of potential mechanisms have been proposed to explain the action of phthalate esters on the disruption of male reproductive tract development. In

particular, phthalates are known to induce suppression of testosterone biosynthesis (Parks et al., 2000), which appears to be the initial event underlying the induction of malformations (Foster et al., 2001). Nevertheless, the molecular targets leading to these changes remain unclear.

More recently, it has been proposed that the reproductive toxicity of phthalate esters could be related to inflammatory processes. According to Latini et al. (2005), induction of cyclooxygenases by some phthalates could be implicated in intrauterine inflammatory responses and the consequent high incidence of preterm birth observed in some epidemiological studies. In 2003, Latini and coworkers had already suggested a significant ring structure similarity between phthalates and prostaglandins/thromboxanes (pro-inflammatory mediators), which could also be responsible for the induction of intrauterine inflammatory responses. Xu et al., 2005, also showed that phthalates can alter rat placental homeostasis of essential fatty acids (EFAs) via peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) overexpression, leading to a reduction on EFA transfer from the placenta to the fetus. In this regard, it has been hypothesized that dietary supplementation with oils containing high levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids could counteract some of the adverse reproductive effects induced by phthalates (LATINI et al., 2005). Omega-3 fatty acids are found in fish and canola oil and in dark green vegetables, while Omega-6 fatty acids are the components of vegetal oils and seeds, like corn, soy and others (BARTSCH et al., 1999). In contrast to Omega-6 fatty acids derivatives (e.g., arachidonic acid), which originate major pro-inflammatory mediators when metabolized by cyclooxygenases and lipoxygenases, Omega-3 derivatives are believed to originate mainly anti-inflammatory compounds.

In order to determine the influence of different oily vehicles on phthalate toxicity, we investigated the possible effects of two Omega-3 rich oily vehicles, canola and fish oil, on fetal testicular toxicity induced by di-butyl phthalate (DBP) in comparison to corn oil, the usual vehicle for diluting phthalates in experimental studies.



## 2. Material and Methods

### 2.1 Animals

The experimental protocol was approved by the Committee on Animal Research and Ethics of the Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brazil) under the number 421. Wistar rats were obtained from the stock of the Universidade Federal do Paraná and kept under a 12-h light / dark cycle and controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C). Standard pellet food (Nuvilab CR-1; Nuvital, Curitiba, Brazil) and tap water were provided *ad libitum*. Adult female rats were mated for three hours during the dark cycle at the proportion of three females to each male. Vaginal smears were collected daily and the day of sperm detection was considered as day 0 of gestation.

### 2.2 Chemicals, dose selection and treatment

Di-butyl phthalate (DBP) CAS number 84-74-2, purity 99%, was obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). Pregnant dams (n=11-13/group) were treated daily by oral route from gestation days 13 to 20 with 500 mg DBP/ kg body weight (bw) / day. Corn, canola or fish oil were used as vehicles and the administration volume was 5.0 mL/kg bw for all groups (Martino-Andrade et al., 2009). A total of six experimental groups were used: three control groups (vehicle-only) and three DBP-treated groups, which received DBP at 500 mg/kg/day diluted in corn, canola or fish oil. Fish oil was supplied by Herbarium Laboratório Botânico (Colombo, Brazil), while commercially available corn and canola oils were used. According to the supplier, each gram of fish oil contained 0.192g of eicosapentaenoic acid (EPA) and 0.124g of docosahexaenoic acid (DHA).

The dose of 500 mg DBP/kg/day was based on studies that demonstrate the induction of a wide spectrum of anti-androgenic effects and testicular disorders following *in utero* exposure (Mylchreest et al., 1999, 2000; Fisher et al., 2003). This is the typical dose used to induce the rat phthalate syndrome, which has been proposed as a model for the human testicular dysgenesis syndrome.

### 2.3 Anogenital distance and collection of fetal testis

Dams were sacrificed by decapitation on day 20 of gestation, two hours after the last administration of DBP or vehicles. The fetuses were removed from the gravid uterus, weighted and killed by decapitation. The anogenital distance (AGD) was recorded for male and female fetuses using a digital caliper (TCM, Hamburg, Germany). To avoid errors caused by differences in body size, the AGD of each animal was divided by the cube root of body weight (Gallavan et al., 1999).

The right testes of up to three male fetuses per litter were collected and maintained at -80°C until analysis of testicular testosterone or lipid profile. The left testes were immersed-fixed in Bouin's solution for 2 h and routinely processed for histology or immunohistochemistry.

### 2.4 Fatty acid composition in fetal testis.

Lipid profile from fetal testis was determined by HPLC as described by Naliwaiko et al. (2004). Total lipids were extracted from a pool of fetal testis (n=5 testis/group) using chloroform-methanol (2:1 vol/vol) according to Folch et al. (1957) and saponified by NaOH 0.5M in 90% methanol (v/v). Free fatty acids were collected with hexane and derivatized with 4-bromomethyl-7-coumarin. Fatty acids were resolved isocratically using a mobile phase of acetonitrile-water (gradient from 77:23 to 90:10 vol/vol) at a flow rate of 0.8 mL/min and were detected by fluorescence (325-nm excitation; 395-nm emission). Separation was performed on a Varian pro-Star high performance liquid chromatograph (Santa Clara, CA, USA) using an octadecylsilica column (25 cm  $\times$  4.6mm i.d.; particle size 5 mm).

### 2.5 Testicular testosterone

Each fetal testis was homogenized with 200  $\mu$ L of phosphate buffered saline (PBS) and extracted three times with a total volume of 1.5 mL of diethyl ether (Mylchreest et al., 2002; Martino-Andrade et al., 2009). The ether fraction was poured off into clean tubes and evaporated in a fume hood. Extracts were resuspended in 500  $\mu$ L of PBS and analyzed by enzyme immunoassay using a polyclonal anti-testosterone antibody

(R 156/7 1:7500 dilution) obtained from Coralie Munro at the University of California (Davis, CA, USA), cross reacting with testosterone 100.0%, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone 57.4%, androstenedione 0.27%, and androsterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), cholesterol, oestradiol, progesterone and pregnenolone < 0.05%. Serial dilutions of pooled testicular extracts produced displacement curves parallel to those of standards, and the assay sensitivity was 2.3 pg/well. Samples were measured in a single run with an intra-assay coefficient of variation of less than 10%.

## 2.6 Percentage of cords containing multinucleated gonocytes and cord diameter

Testicular sections of 5  $\mu$ m were stained with hematoxylin and eosin and analyzed microscopically. A total of 50 randomly selected seminiferous cords per testis were investigated at 400x magnification for the presence of multinucleated gonocytes (MNGs). Results are expressed as percentage of cords containing multinucleated gonocytes. The diameter ( $\mu$ m) of twenty randomly selected round cords per testis was measured using the 3.0 version of UTHSCSA imagetool software (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). Images were acquired on a Leica microscope coupled with an imaging system (Leica Microsystems LAS Software, Version 3.5.0, Wetzlar, Germany) at 200x magnification.

## 2.7 Immunohistochemistry and evaluation of Leydig cell aggregation

For evaluation of Leydig cell aggregation, immunostaining with anti-3 $\beta$ -HSD was performed. Testicular sections of 5  $\mu$ m were mounted onto poly-L-Lysine coated slides, deparaffinized in xylene, hydrated in alcohol, and incubated in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol to block endogenous peroxidase activity. Sodium Citrate buffer 10 mM was used for antigen unmasking, nonspecific binding was blocked by 1% BSA-PBS solution and possible aldehyde groups were blocked by 0,1 M glycine-PBS. The primary antibody was a rabbit IgG immunoprotein against human type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD, gift from Ian Mason, University of Edinburgh, UK), which was diluted 1:2000 in 0.1% BSA/PBS and incubated on slides in a humidified chamber for 12 h. After washing with PBS, the respective secondary biotinylated antibody (Anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

was added diluted 1:100 in PBS and incubated for 1 h. The slides were washed though roughly and incubated with streptavidin-HSP (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) for 1 h. The reaction binding was revealed with a DAB Substrate kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Slides were stained with haematoxylin and rapidly dehydrated in ethanol, xylene and then mounted.

Quantification of Leydig cell clustering in testicular sections was undertaken using 3.0 version of UTHSCSA imagetool software (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). Digital images were captured at 200x magnification, using a Leica microscope coupled with an imaging system (Leica Microsystems LAS Software, Version 3.5.0, Wetzlar, Germany). The Image Tool Software was used to draw and calculate the area of 3 $\beta$ -HSD-immunopositive cell aggregates. A complete cross section from the center of the testis was analyzed for each animal (n=5/group), and the area of individual clusters was expressed as a percentage of the total Leydig cell cluster area in that section. Clusters were then classified into three groups, according to Mahood et al. (2005): small clusters, accounting for 5% or less of the total Leydig cell cluster area; medium clusters, accounting for between 5.1 and 14.9%; and large clusters, which individually accounted for 15% or more of total cluster area.

## 2.8 Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Normality and homogeneity of variances were evaluated prior to statistical analysis. Data were analysed by analysis of variance (ANOVA) or alternatively, by the Kruskal–Wallis test whenever data did not fit parametric conditions. Differences between groups were tested by Tukey's multiple comparisons test (parametric data) or by Dunn's test (non-parametric data). In all analyses, litters were used as the statistical units. Differences were considered to be statistically significant at a probability level of 5% ( $p < 0.05$ ). All analyses were performed by investigators blind to experimental groups.

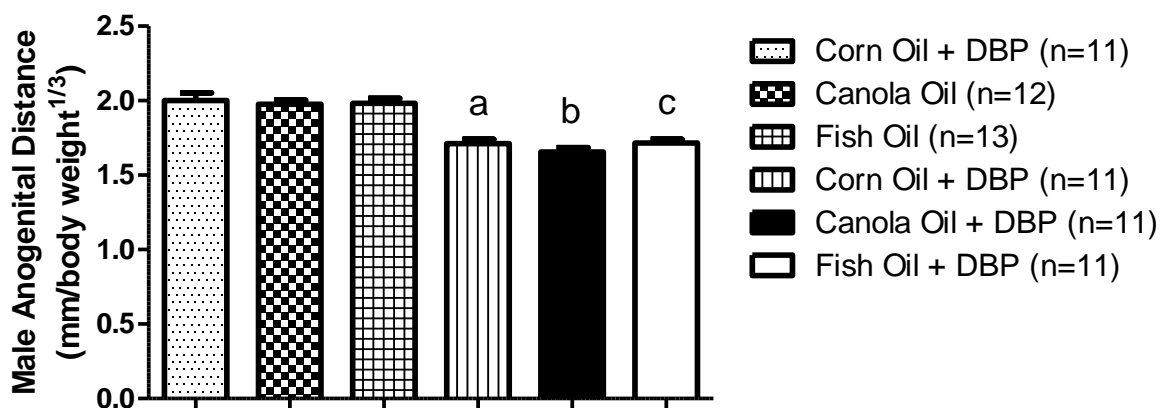
### 3. Results

#### 3.1 Pregnancy data

As expected, no signs of general toxicity were observed in any experimental group. Maternal body weight gain was unaffected by DBP during treatment (gestation day 13-20), and no significant differences were observed in male and female fetal body weight at gestation day 20 for any treatment group (Table 1).

#### 3.2 Anogenital distance

For female fetuses, anogenital distance did not differ among experimental groups (data not shown). Nevertheless, DBP administered to pregnant rats caused a significant decrease in anogenital distance of male fetuses when compared to animals whose mothers received their correspondent vehicles (Figure 1). However, there was no significant difference among DBP groups, regardless the oily vehicle used.



**Figure 1.** Anogenital distance corrected for body weight (gestation day 20) in male offspring rats exposed *in utero* to DBP or oily vehicles. Rat dams were treated from day 13 to 20 of gestation. Values are litter means  $\pm$  standard errors. There was no significant difference among control (vehicle-only) groups. Likewise, DBP-treated groups did not differ significantly among them (ANOVA/Tukey). a =  $p < 0.05$  significantly different from corn oil control group. b =  $p < 0.05$  significantly different from canola oil control group. c =  $p < 0.05$  significantly different from fish oil control group.

**Table 1**

Body weight of dams and rat fetuses exposed to 500 mg DBP/kg/day from gestation days 13 to 20.

Parameters	Treatment					
	Control Corn Oil	Control Canola Oil	Control Fish Oil	Corn Oil + DBP	Canola Oil + DBP	Fish Oil + DBP
Dams (n)	11	13	13	11	12	11
Litter size	7.82 ± 1.12	9.67 ± 0.85	11.08 ± 0.47	11.18 ± 0.71	11.50 ± 0.54	10.55 ± 0.61
Body weight GD 13 (g)	292 ± 6.04	290 ± 7.15	301 ± 5.98	299 ± 7.87	293 ± 6.41	290 ± 2.78
Body weight GD 20 (g)	329 ± 9.35	336 ± 7.13	333 ± 9.93	347 ± 8.05	338 ± 8.15	333 ± 6.61
Weight gain GD20-GD13 (g)	36.5 ± 4.01	46.0 ± 5.00	48.1 ± 4.50	48.1 ± 3.52	44.6 ± 4.11	43.7 ± 4.89
Female fetal weight (g)	3.48 ± 0.137	3.19 ± 0.086	3.23 ± 0.115	3.38 ± 0.125	3.36 ± 0.101	3.37 ± 0.140
Male fetal weight (g)	3.26 ± 0.111	3.33 ± 0.069	3.39 ± 0.078	3.54 ± 0.118	3.57 ± 0.111	3.64 ± 0.153

Numbers are mean ± standard errors.

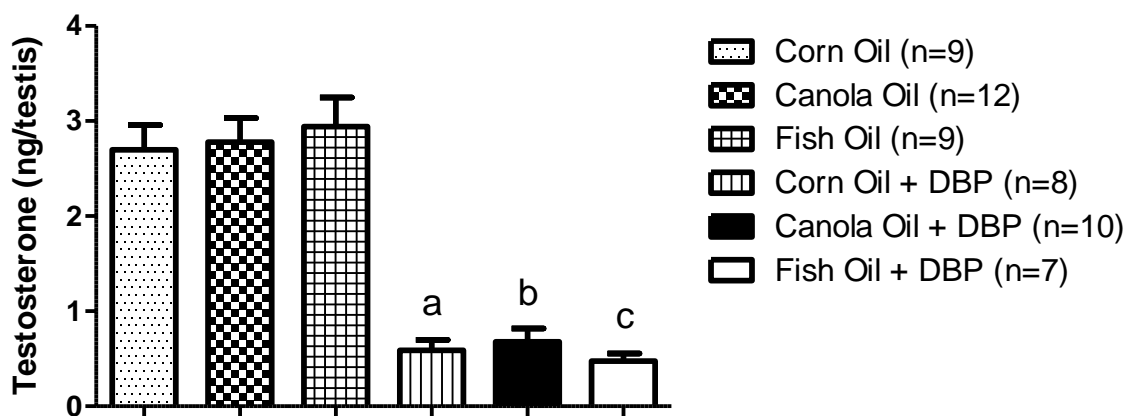
GD, gestation day.

### 3.3 Lipid Profile

Lipid profile is presented in Tables 2 and 3. Lipid content was determined in a pool of 5 testis/treatment group. As shown in Table 3, the content of DHA, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, was increased in canola and fish oil groups, but DBP exposure reduced this increase. When compared to corn oil control group, DHA content was 73% and 228% higher in canola and fish oil control groups, respectively. In the groups treated with DBP diluted in canola and fish oil the increase in DHA content was of 59% and 90%, respectively, when compared to corn oil control. When compared to their concurrent control groups, there was a decrease of 8% and 41% in DHA content in groups exposed to DBP diluted in canola and fish oil, respectively. For EPA, another omega-3 derivative, the pattern was similar to that of DHA, particularly for groups treated with fish oil (Tables 2 and 3).

### 3.4 Fetal testicular testosterone

Exposure to DBP resulted in significant reductions in testicular testosterone levels in relation to control groups. This reduction was similar in all DBP-treated groups (Figure 2).



**Figure 2.** Testosterone levels in fetal testes collected on gestation day 20 from control (oily vehicles) and DBP-exposed rats. DBP was diluted in three different oily vehicles and administered to pregnant rats from gestation 13 to 20 at a dose level of 500 mg/kg/day. Values are litter means  $\pm$  standard errors. There was no significant difference among control (vehicle-only) groups. Likewise, DBP-treated groups did not differ significantly among them (ANOVA/Tukey). a = p<0.05 significantly different from corn oil control group. b = p<0.05 significantly different from canola oil control group. c = p<0.05 significantly different from fish oil control group.

**Table 2**

Lipid profile from fetal testis by HPLC.

Fatty acid (g/100g total fatty acids)	Treatment					
	Control Corn Oil	Control Canola Oil	Control Fish Oil	Corn Oil + DBP	Canola Oil + DBP	Fish Oil + DBP
Lauric	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Miristic	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Palmitic	30.7984	26.2372	30.8932	27.8318	32.0830	28.3355
Stearic	18.3471	13.6256	17.0925	12.6040	16.5717	17.5958
Palmitoleic	6.9061	4.5658	5.1447	7.7455	5.9383	5.4624
Oleic	18.7974	15.9033	13.9962	17.0559	16.2439	17.1879
Linoleic	16.3280	17.8564	10.5796	19.7737	13.5391	14.1861
$\alpha$ -linolenic	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arachidonic	6.1747	5.6862	5.3381	5.1733	5.6812	5.5119
EPA	3.6485	6.0725	11.1556	4.8628	7.1372	8.3524
DHA	1.7698	3.0531	5.8002	1.9529	2.8057	3.3679

Testicular samples were collected from rats exposed *in utero* to DBP or oily vehicles. Fatty acids obtained from a pool of 5 fetal testis/ experimental group. EPA = eicosapentaenoic acid; DHA = docosahexaenoic acid; ND = non detected



**Table 3**

Content of EPA and DHA in fetal rat testis exposed to DBP diluted in different oily vehicles

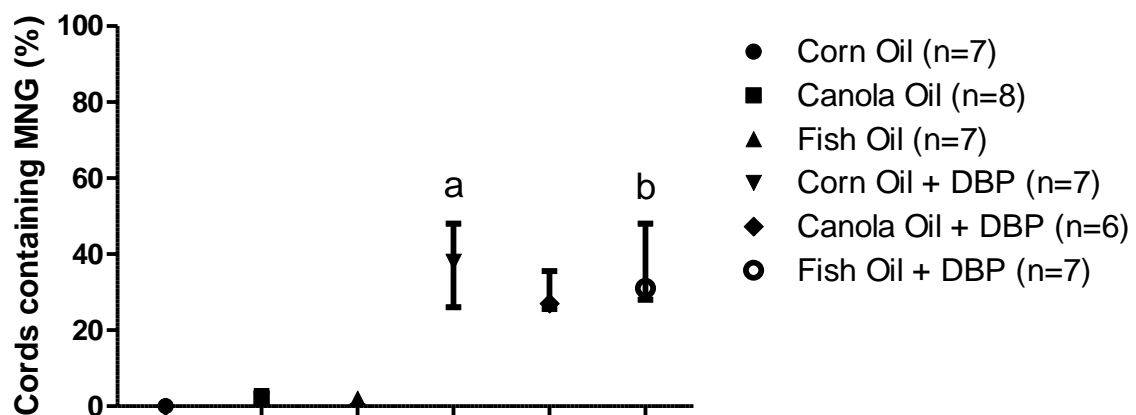
Fatty acid (g/100g total fatty acids)	Treatment					
	Control Corn Oil	Control Canola Oil	Control Fish Oil	Corn Oil + DBP	Canola Oil + DBP	Fish Oil + DBP
EPA	3.6485	6.0725	11.1556	4.8628	7.1372	8.3524
(% of corn oil control)	(100%)	(166%)	(306%)	(133%)	(196%)	(229%)
(% of the concurrent control)	(100%)	(100%)	(100%)	(133%)	(118%)	(75%)
DHA	1.7698	3.0531	5.8002	1.9529	2.8057	3.3679
(% of corn oil control)	(100%)	(173%)	(328%)	(110%)	(159%)	(190%)
(% of the concurrent control)	(100%)	(100%)	(100%)	(110%)	(92%)	(59%)

Fatty acids obtained from a pool of 5 fetal testis/ experimental group. EPA = eicosapentaenoic acid; DHA = docosaheptaenoic acid

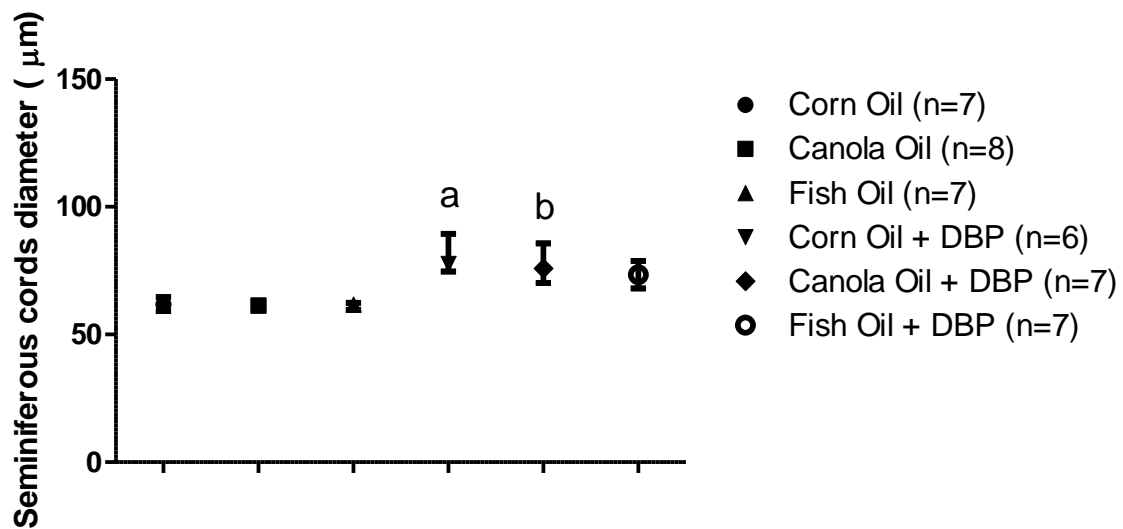
### 3.5 Percentage of cords containing multinucleated gonocytes and cord diameter

All groups, including controls, presented multinucleated gonocytes (MNGs) in seminiferous cords. In most cases, exposure to 500 mg DBP/kg/day caused a significant increase on the occurrence of MNGs, when compared to control groups (Figure 3). However, the group exposed to DBP diluted in canola oil did not differ statistically from its concurrent control group. Nevertheless, DBP-treated groups did not reveal any significant differences among them.

Overall, histological analysis also showed an increase in the diameter of seminiferous cords in animals exposed to DBP, when compared to controls (Figure 4). Again, no significant differences were observed among DBP-treated groups. However, the group exposed to DBP diluted in fish oil did not differ from its control group (fish oil only) (Figure 4).



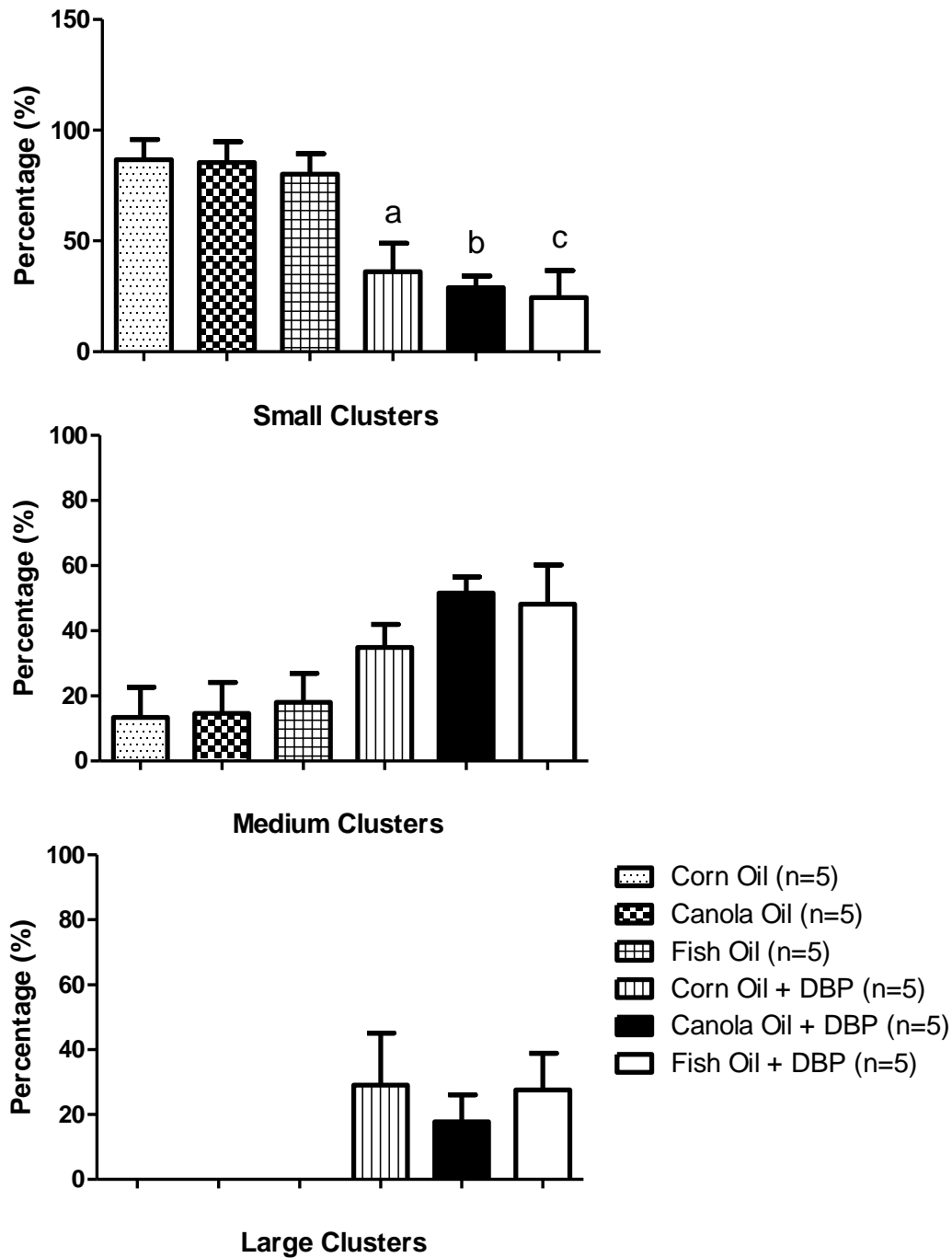
**Figure 3.** Percent of cords containing multinucleated gonocytes (MNGs) in rat fetal testes collected on gestation day 20 following maternal treatment with DBP 500 mg/kg/day or oily vehicles from gestation day 13 to 20. Values are medians  $\pm$  interquartiles (Q1, Q3). There was no significant difference among control (vehicle-only) groups. Likewise, DBP-treated groups did not differ significantly among them (Kruskal-Wallis/Dunn). a =  $p < 0.05$  significantly different from corn oil control group. b =  $p < 0.05$  significantly different from fish oil control group.



**Figure 4.** Diameter of seminiferous cords in rat fetal testes collected on gestation day 20 after exposure to DBP 500 mg/kg/day or oily vehicles. Rat dams were treated from day 13 to 20 of gestation. Values are litter medians  $\pm$  interquartiles (Q1, Q3). There was no significant difference among control (vehicle-only) groups. Likewise, DBP-treated groups did not differ significantly among them (Kruskal-Wallis/Dunn). a =  $p < 0.05$  significantly different from corn oil control group. b =  $p < 0.05$  significantly different from canola oil control group.

### 3.6 Evaluation of Leydig cell aggregates

Abnormal distribution, or clustering, of Leydig cells was apparent in all DBP exposed groups. In DBP treated animals, there was significant decrease in small clusters, regardless the oily vehicle used. For medium and large clusters, differences were not statistically significant (Figure 5).



**Figure 5.** Contribution (%) of small, medium and large clusters to total Leydig cell cluster area in rat fetal testes (n=5/group) collected on gestation day 20 after *in utero* exposure to DBP or oily vehicles. Rat dams were treated from gestation day 13 to 20. Values are litter means  $\pm$  standard errors. Small Leydig cell clusters were defined as those that accounted for 5% or less of the total Leydig cell cluster area per testis, medium clusters as those that accounted for 5.1–14.9%, and large clusters as those that individually accounted for 15% or more of total Leydig cell cluster area per testis. There was no significant difference among control (vehicle-only) groups for any of the assigned categories. Likewise, DBP-treated groups did not differ significantly among them (ANOVA/Tukey). a =  $p < 0.05$  significantly different from corn oil control group. b =  $p < 0.05$  significantly different from canola oil control group. c =  $p < 0.05$  significantly different from fish oil control group.

#### 4. Discussion

Several studies have shown that fetal exposure to DBP or certain other phthalates results in a high incidence of male reproductive disorders in rats, such as malformations of testis and epididymis, cryptorchidism, hypospadias and low sperm counts (Barlow and Foster, 2003; Ema et al., 2000; Fisher et al., 2003; Gray et al., 1999; Mylchreest et al., 1998, 1999, 2000; Foster, 2006, Jiang et al., 2007). However, many laboratories report differences in the incidence and severity of some of these alterations (Martino-Andrade et al., 2009; Jiang et al., 2007; Fisher et al., 2003; Mylchreest et al., 2000). Although many factors can explain these somehow conflicting results, as the use of different animal strains (Wilson et al., 2007) or laboratory conditions, another possible explanation to a lower incidence of adverse effects in some studies could be related to the oily vehicle used.

The focus of the present study was to investigate the possible effects of three different oily vehicles – corn, canola and fish oil – on fetal testicular toxicity in rats exposed to 500 mg DBP/kg/day from gestation day 13 to 20. This experimental protocol has been used as a model for the human testicular dysgenesis syndrome (TDS), as the spectrum of effects induced in rats shares many similarities with the disorders that comprise the human syndrome. According to Mahood et al. (2007), fetal endpoints, including testicular testosterone levels, abnormal Leydig cell aggregation and gonocyte multinucleation, are the most sensitive markers of the rat phthalate syndrome, being able to predict the occurrence and severity of later effects. As expected, DBP exposure was not able to induce maternal toxic responses at the dose level tested in the present study, regardless of the oily vehicle used. In addition, the vehicles alone were also unable to produce clinical signs of toxicity or changes in maternal and fetal body weight. In female fetuses, the anogenital distance (AGD) did not differ significantly among the different experimental groups, confirming the absence of androgenic effects of DBP and the vehicles used. However, male fetuses exposed *in utero* to DBP had decreased values of AGD, significantly different from control animals. This effect was observed in all groups exposed to DBP, in spite of the oily vehicle used. Several studies have demonstrated that DBP and other phthalates can inhibit some enzymes in testosterone biosynthesis, leading to alterations in male sexual development, including genital malformations and shortening of anogenital distance (Martino-Andrade et al., 2009; Fisher et al., 2003;

Mylchreest et al., 2000). The androgen insufficiency induced by DBP was confirmed in the present study by measuring intratesticular testosterone levels. Administration of DBP at the dose of 500 mg/kg/day, diluted in different oily vehicles, caused a significant reduction in testicular testosterone levels, when compared to the groups that received only vehicles. However, there were no significant differences among DBP-groups, indicating that the oily vehicles did not interfere in the androgen insufficiency induced by this high dose of DBP. Taken together, these results indicate that the use of oily vehicles containing different ratios of omega-3 to omega-6 fatty acids are possibly not involved in the variability of responses seen in endpoints related to poor androgen stimulation.

However, beyond changes on “androgenic status”, possible effects of DBP on fetal testicular histology were also investigated. It is interesting to note that several histological alterations induced by phthalates on fetal testis, such as gonocyte multinucleation and enlargement of seminiferous cords, are believed to be unrelated to the decrease in testosterone production (Gaido et al., 2007; Scott et al., 2007). Gaido and co-workers (2007) reported that DBP is able to significantly increase gonocyte multinucleation in mouse testis, without changing testosterone levels. In our study, DBP was, in most cases, able to induce a significant increase in the percentage of seminiferous cords containing multinucleated gonocytes (MNGs), which is in agreement with earlier rat studies (Parks et al., 2000; Mylchreest et al., 2002; Fisher et al., 2003). The group exposed to DBP diluted in canola oil, however, did not differ from its concurrent control (canola oil only). Nevertheless, no significant differences were detected among DBP-treated groups. It was also detected an overall increase in the diameter of seminiferous cords in DBP-exposed animals, which is also a typical histological alteration induced by phthalates. For this histological parameter, there were no differences between the group exposed to DBP diluted in fish oil and its concurrent control group. Similarly to gonocyte multinucleation, however, no differences were observed among DBP-groups.

The analysis of the interstitial testicular compartment revealed the classical presence of large clusters of Leydig cells in DBP-exposed fetuses. A clear shift in the pattern of Leydig cell distribution was observed, with a significant decrease in the contribution of small clusters to the total cluster area in all groups exposed to DBP. These results are in agreement with previous work reported by Mahood et al. (2005).

Taken together, our results indicate that in two histological parameters investigated, gonocyte multinucleation and diameter of seminiferous cord, the use of either canola or fish oil as vehicles was able to slightly attenuate some of the typical DBP responses, so that differences with control (vehicle-only) groups were often blurred. Several mechanisms of phthalate-mediated toxicity remain unclear, such as those leading to histological alterations. Some authors have proposed that phthalates could induce some of their toxic effects through an inflammatory process (Xu et al., 2005; Latini et al., 2003, Scarano et al., 2009). Given the anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids derivatives, Latini et al. (2005) proposed the maternal dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids as a way to counteract the adverse effects of phthalates. Derivatives of omega-3 fatty acids, which are present in canola and fish oil, are able to act as substrates for cyclooxygenase (COX) enzymes and lead to formation of anti-inflammatory compounds, while omega-6 derivatives, such as arachidonic acid, are major COX substrates for the generation of pro-inflammatory mediators.

Determination of lipid profile in the present study revealed that administration of canola and fish oil in late gestation (days 13 to 20) was able to increase the content of omega-3 fatty acids, such as EPA and DHA in rat fetal testis. As expected, administration of fish oil resulted in the highest contents of EPA and DHA. However, DBP diluted in canola or fish oil has overall reduced the content of omega-3 derivatives incorporated into testicular tissue. Even though DBP corresponds to approximately 10% of the total administration volume (5 mL/kg) for a dose of 500 mg/kg (specific gravity of DBP ~ 1.0), this cannot solely explain the reduction in omega-3 fatty acids content. In fact, our results are in agreement with previous studies showing that phthalates like di-2-(ethylhexyl) phthalate (DEHP) are able to reduce the maternal-to-fetal placental transfer of essential fatty acids, resulting in reduced content of omega-3 fatty acids like DHA in fetal plasma and brain (Xu et al., 2008; Xu et al., 2007).

The results of the present study indicate that administration of either canola or fish oil as vehicles is unable to alter DBP-induced testosterone insufficiency and its downstream consequences. However, we detected a small decrease in the severity of DBP early effects in some histological parameters. Even though the attenuation of DBP responses were relatively modest, the use of different oily vehicles could at

least partially account for some of the variability in phthalate responses observed in different studies, even when similar doses and exposure protocols are used. Although our aim was to evaluate these effects at a high DBP dose (500 mg/kg/day), which is the common dosage used to induce the so-called “rat phthalate syndrome”, it would be interesting to study the influence of oily vehicles at lower doses. Besides, it would be valuable to investigate the possible protective role of oily vehicles containing omega-3 fatty acids following longer periods of supplementation (e.g., prior to mating and pregnancy).

#### Acknowledgments

Ana Carolina S. Lourenço was a scholarship recipient from CAPES – Brazil (Master of Science). The authors are grateful to Herbarium Laboratório Botânico for donation of fish oil and Dr. Ian Mason from University of Edinburgh for kindly providing anti-3 $\beta$ -HSD antibody.



## 5. References

- Barlow N.J., Foster P.M., 2003. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol. Pathol.* 31, 397–410.
- Bartsch, H., Nair, J., Owen, R.W., 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 20, 2209-2218.
- Ema, M., Miyawak, E., Kawashima, K., 2000. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol. Lett.* 111, 271–78.
- Fisher, J., 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*. 127, 305-15.
- Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N., Sharpe, R.M., 2003. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using *in utero* exposure of the rat to di-butyl phthalate. *Hum. Reprod.* 18, 1383–94.
- Folch, J; Lees, M; Sloane, S.G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497-509.
- Foster, P.M.D, Mylchreest, E., Gaido, K.W., Sar, M, 2001. Effects on phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Human Reproduction Update*. 7, 231-35.
- Foster, P.M.D., 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following *in utero* exposure to phthalate esters. *Int. J. Andro.* 29, 140-47.
- Gaido, K.W., Hensley, J.B., Liu, D., Wallace, D.G., Borghoff, S., Johnson, K.J., Hall, S.J., Boekelheide, K., 2007. Fetal mouse phthalate exposure shows that gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol. Sci.* 97, 491–503.
- Gallavan, R.H. Jr, Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F.; Reynolds, V. L., 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reproductive Toxicol.* 13, 383-90.

Gray, L.E. Jr, Wolf, C., Lambright, C., Mann, P., Price, M., Cooper, R.L., et al, 1999. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation reduces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol. Ind. Health.* 15, 94–118.

Jiang, J.T., Ma, L., Yuan, L., Wang, X.R., Zhang, W., 2007. Study on developmental abnormalities in hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-*n*-butyl phthalate (DBP). *Toxicology.* 232, 286-93.

Latini, G., De Felice, C., Presta, G. Del Vecchio, A., Paris, I., Ruggieri, F., Mazzeo, P., 2003. *In utero* exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspec.* 111, 1783-85.

Latini, G., Massaro, M., De Felice, C., 2005. Prenatal exposure to phthalates and intrauterine inflammation: a unifying hypothesis. *Toxicol. Sci.* 85, 743.

Mahood, I.K., Hallmark, N., McKinnell, C., Walker, M., Fisher, J.S., Sharpe, R.M., 2005. Abnormal Leydig Cell Aggregation in the Fetal Testis of Rats Exposed to Di (n-butyl) Phthalate and its Possible Role in Testicular Dysgenesis. *Endocrinology.* 146(2), 613-23.

Mahood, I.K., Scott, H.M., Brown, R.; Hallmark, N.; Walker, M., Sharpe, R.M., 2007. *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.* 115 (1), 55-61.

Martino-Andrade, A.J., Morais, R.N., Botelho, G.G.K., Muller, G., Grande, S.W., Carpentieri, G.B., Leão, G.M.C., Dalsenter, P.R., 2009. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. *Int. J. Andrology.* 32(6), 704-712.

Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M., 1998. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.* 43, 47–60.

Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C., Foster, P.M., 1999. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 81-95.

Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D.G., Foster, P.M., 2002. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol*, 16, 19-28.

Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., Foster, P.M., 2000. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.* 55, 143-151.

Naliwaiko, K., Fonseca, R.V., Araujo, R.L.F., Castilho, J.C., Oliveira, B.H., Bellissimo, M.I., Martins, E.F., Andreatini, R., Curi, R., Fernandes, L.C., Ferraz, A.C., 2004. Fish oil and nervous system: a new potetial antidepressant? *Nutritional Neuroscience*. 7(2), 91-99.

Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambricht, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J., Gray, L.E.Jr., 2000. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58, 339-49.

Scarano, W.R., Toledo, F.C., Guerra, M.T., Campos, S.G.P., Justulin Júnior, L.A., Felisbino, S.L., Anselmo-Franci, J.A., Taboga, S.R., Kempinas, W.de G., 2009. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology*. 262, 215-223.

Scott, H.M., Hutchinson, G.R., Mahood, I.M., Hallmark, N., Welsh, M., De Gendt, K., Verhoeven, G., O'Shaughnessy, P., Sharpe, R.M., 2007. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology*. 148, 2027-36.

Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 2003. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure Appl. Chem.* 75, 2023–38.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction*. 16, 972–978.

Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J.Jr. et al., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104 (4), 741–803.

Wilson, V.S., Howdeshell, K.L., Lambright, C., Furr, J. Gray Jr., L.E., 2007. Differential expressions of the phthalate syndrome in male Sprague Dawley and Wistar rats after *in utero* DEHP exposure. *Toxicol. Lett.* 17, 177-84.

Xu, Y., Cook, T.J., Knipp, G.T., 2005. Effects of Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) and Its Metabolites on Fatty Acid Homeostasis Regulating Proteins in Rat Placental HRP-1 Trophoblast Cells. *Toxicological*, 84, 287-300.

Xu, Y., Agrawal, S., Cook, T.J., Knipp, G.T., 2007. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal rat brain upon maternal exposure. *Arch Toxicology*. 81, 57-62.

Xu, Y., Agrawal, S., Cook, T.J., Knipp, G.T., 2008. Maternal Di-(2-ethylhexyl)-phthalate Exposure Influences Essential Fatty Acid Homeostasis in Rat Placenta. *Placenta*. 29, 962-69.

## 5. DISCUSSÃO EXTENDIDA E CONCLUSÃO

Diversos estudos têm mostrado que a exposição fetal ao DBP e a alguns outros ftalatos resulta em um amplo espectro de distúrbios reprodutivos em ratos machos, como malformações nos testículos e epidídimos, criptorquidismo, hipospádias e baixa contagem de espermatozóides (BARLOW E FOSTER, 2003; EMA *et al.*, 2000; FISHER *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 1999; MYLCRHEEST *et al.*, 1998, 1999, 2000; FOSTER, 2006; JIANG *et al.*, 2007). No entanto, muitos laboratórios reportam diferenças na incidência e severidade de algumas dessas alterações (MARTINO-ANDRADE *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2003; Mylchreest *et al.*, 2000). Apesar de muitos fatores explicarem esses resultados conflitantes, como o uso de diferentes linhagens de animais (WILSON *et al.*, 2007) ou condições laboratoriais, outra possível explicação para uma menor incidência de efeitos adversos em alguns estudos poderia estar relacionada com o tipo de veículo oleoso utilizado. Um estudo recente conduzido no nosso laboratório (MARTINO-ANDRADE *et al.*, 2009) mostrou que a exposição *in utero* a uma alta dose de DBP (500 mg/kg/dia) resultou em alterações reprodutivas que foram aparentemente menos severas do que aquelas reportadas por outros laboratórios. Por exemplo, em contraste com outros estudos (MYLCHREEST *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2007), nossos resultados demonstraram ausência de alterações no peso de glândulas sexuais acessórias (próstata e vesícula seminal) nos animais adultos expostos *in utero*. Além disso, não foram reportadas malformações usualmente observadas após a exposição a essa dosagem, como criptorquidismo e hipospádias (JIANG *et al.*, 2007; FISHER *et al.*, 2003; MYLCHREEST *et al.*, 2000). Em contraste com os demais estudos, que usualmente utilizam o óleo de milho como veículo para a diluição e administração de DBP e outros ftalatos, nossos resultados foram gerados com a utilização de óleo de canola como veículo, um óleo vegetal que contém quantidades significativamente maiores de ácidos graxos Omega-3 quando comparado com outros óleos vegetais como o óleo de milho (MARTIN *et al.*, 2006).

O foco do presente estudo foi investigar a possível influência de três diferentes veículos oleosos – óleos de milho, canola e peixe – sobre a toxicidade testicular fetal do DBP em ratos expostos a 500 mg/kg/dia durante os dias 13 a 20 de gestação. Esse protocolo experimental tem sido usado como um possível modelo

para a Síndrome da Disgenesia Testicular (TDS) humana, já que os efeitos induzidos em ratos são muito similares aos distúrbios apresentados na TDS.

Como esperado, a dose de DBP utilizada não foi capaz de induzir alterações no ganho de peso das progenitoras, bem como no peso dos fetos, indicando ausência de toxicidade sistêmica materna e fetal. Os efeitos tóxicos dos ftalatos sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos expostos *in utero* corroboram dados encontrados na literatura. A distância anogenital, marcador externo do grau de androgenização pré-natal, foi significativamente reduzida nos fetos masculinos expostos ao DBP, independentemente do veículo oleoso utilizado. Diversos estudos já demonstraram que o DBP e outros ftalatos podem, em altas doses, inibir enzimas-chave na via biossintética da testosterona, ocasionando alterações no desenvolvimento sexual masculino, incluindo malformações genitais e redução da distância anogenital (MARTINO-ANDRADE *et al.*, 2009; FISHER *et al.*, 2003; MYLCHREEST *et al.*, 2000). A insuficiência androgênica induzida pelo DBP foi confirmada no presente estudo pela quantificação dos níveis de testosterona intratesticular. A administração de DBP na dose de 500 mg/kg/dia, diuído em diferentes veículos oleosos, causou uma redução significativa nos níveis de testosterona intratesticular, em comparação aos grupos que receberam apenas os veículos. Contudo, assim como no caso da redução da distância anogenital, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com DBP, indicando que os diferentes veículos oleosos utilizados não interferiram na insuficiência androgênica induzida por essa alta dose de DBP.

Além da avaliação do “status androgênico” também foram investigados os possíveis efeitos do DBP sobre a histologia testicular fetal. Vale ressaltar que diversas alterações histológicas induzidas por ftalatos no testículo fetal, como a presença de gonócitos multinucleados e o aumento no diâmetro de cordões seminíferos, podem não estar relacionadas com a diminuição da síntese de testosterona, como proposto por Gaido e colaboradores em um estudo com camundongos (2007). Neste estudo, a exposição *in utero* de camundongos a 250 ou 500 mg/kg/dia de DBP causou o aparecimento de gonócitos multinucleados sem alterar a síntese de testosterona. Além disso, os níveis plasmáticos materno e fetal de mono-butil ftalato (MBP), metabólito do DBP responsável pela maior parte dos efeitos tóxicos, foram similares àqueles reportados para ratos. Em nosso estudo, o

DBP foi, na maioria dos casos, capaz de induzir um aumento significativo na porcentagem de cordões seminíferos contendo gonócitos multinucleados, o que está de acordo com estudos realizados anteriormente (PARKS *et al.*, 2000; MYLCHREEST *et al.*, 2002; FISHER *et al.*, 2003). O grupo exposto a DBP diluído em óleo de canola, no entanto, não diferiu de seu respectivo controle. Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos expostos ao DBP. Ferrara e colaboradores (2006) sugeriram que o aparecimento de gonócitos multinucleados pode ser desencadeado por uma alteração nas interações entre gonócitos e células de Sertoli. Por outro lado, Boekelheide e colaboradores (2009) propuseram que as alterações celulares nos cordões seminíferos em desenvolvimento estão relacionadas com uma redução na proliferação celular. No nosso estudo, além da presença de gonócitos multinucleados, também foi observado um aumento do diâmetro de cordões seminíferos, uma alteração histológica típica e já demonstrada anteriormente após exposição pré-natal ao DBP e outros ftalatos (FOSTER *et al.*, 2006; PARKS *et al.*, 2000, MARTINO-ANDRADE *et al.*, 2009). Apesar de nenhuma diferença estatística ter sido encontrada entre os grupos tratados com DBP, também não foi encontrada diferença entre o grupo exposto a DBP diluído em óleo de peixe e seu respectivo controle.

A análise do compartimento intersticial testicular revelou a presença de grandes clusters de células de Leydig em animais expostos ao DBP (Figura 8). Mahood e colaboradores (2005) propuseram que as células de Leydig se agrupam em clusters maiores após a exposição pré-natal a ftalatos devido a uma migração celular anormal. No nosso estudo, a contribuição de pequenos clusters para a área total de clusters foi reduzida significativamente em todos os grupos expostos a ftalatos, um efeito anteriormente reportado por Mahood e colaboradores (2005). Os diferentes veículos oleosos, no entanto, não ocasionaram alterações evidentes no padrão de distribuição de clusters.

Muitos mecanismos da toxicidade mediada por ftalatos permanecem obscuros, como aqueles responsáveis pelas alterações histológicas. Alguns autores propuseram que os ftalatos poderiam induzir alguns de seus efeitos tóxicos através de processos inflamatórios (XU *et al.*, 2005; LATINI *et al.*, 2003; SCARANO, *et al.*, 2009). Latini e colaboradores (2005) propuseram que a indução de cicloxigenases por alguns ftalatos poderia resultar em uma inflamação intrauterina, o que poderia

explicar a maior incidência de partos pré maturos observada em alguns estudos epidemiológicos. Em 2003, Os mesmos autores já haviam sugerido uma semelhança estrutural entre ftalatos e prostaglandinas/tromboxanas pró-inflamatórias. Xu e colaboradores (2005) também mostraram que os ftalatos podem alterar a transferência placentária de ácidos graxos essenciais através da super expressão do receptor PPAR (peroxisome proliferator activated receptor). Levando em consideração as propriedades antiinflamatórias de derivados de ácidos graxos ômega-3, Latini e colaboradores (2005) sugeriram que a suplementação materna com ômega-3 poderia amenizar ou reverter alguns dos efeitos tóxicos dos ftalatos.

O perfil lipídico realizado por HPLC mostrou que a administração dos óleos de canola e peixe durante os dias 13 a 20 de gestação foi capaz de aumentar o conteúdo de ácidos graxos Omega-3, como EPA e DHA, no tecido testicular. Como esperado, a administração de óleo de peixe resultou em uma maior incorporação desses lipídios. Contudo, o DBP diluído nos óleos de canola e peixe reduziu a incorporação de ácidos graxos Omega-3 em comparação aos grupos que receberam apenas os veículos. Esses resultados estão de acordo com os dados previamente publicados por Xu e colaboradores (2007, 2008), que demonstraram que o di-2(etilhexil) ftalato (DEHP) é capaz de reduzir a transferência placentária materno-fetal de ácidos graxos, diminuindo, dessa forma, o conteúdo de ácidos graxos Omega-3 no plasma e cérebro fetal de ratos.

De maneira geral, nossos resultados indicam que a utilização dos óleos de canola e peixe como veículos não é capaz de alterar a insuficiência androgênica fetal induzida pelo DBP ou mesmo suas repercussões futuras. No entanto, em dois parâmetros histológicos investigados, presença de gonócitos multinucleados e aumento de diâmetro de cordões seminíferos, o uso desses óleos causou uma pequena atenuação dos efeitos. Apesar de muito sutis, esses efeitos poderiam ajudar a explicar a variabilidade de respostas observadas em estudos experimentais com DBP e outros ftalatos. No entanto, outros fatores, como a linhagem de ratos, dieta e condições laboratoriais, também devem ser considerados. Além disso, seria interessante investigar o possível efeito protetor dos veículos oleosos ricos em Omega-3 após exposição a doses mais baixas de DBP e períodos mais longos de suplementação (ex., antes do acasalamento e durante a gestação).



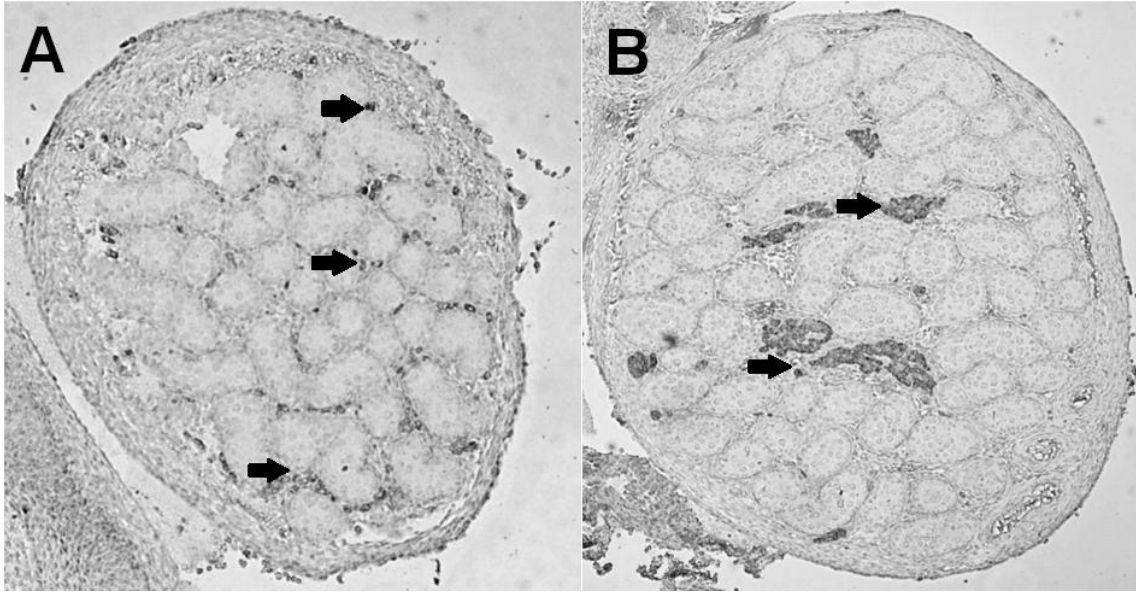


Figura 8: Clustering ou agrupamento de células de Leydig em grupo controle (A) e grupo exposto ao DBP (B). Em grupos controle os clustes são geralmente pequenos e aparecem em todo o diâmetro do testículo, como apontado pelas flechas pretas na figura A. Nos grupos expostos ao DBP, estes clusters são maiores e se concentram na região central do testículo, como apontado pelas flechas pretas na figura B.

## 6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

AARSKOG, D. Clinical and cytogenetic studies in hypospadias. **Acta Paediatrica Scandinavica. Supplement**, v. 203, p. 1-62, 1970.

AMARAL MENDES, J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 781-88, 2002.

ASKLUND, C.; JØRGENSEN, N.; KOLD JENSEN, T.; SKAKKEBÆK, N.E. Biology and epidemiology of testicular dysgenesis syndrome. **BJU International**, v. 93, n. 3, p. 6-11, 2004.

AUTIAN, J. Toxicity and health threats of phthalate esters: Review of the literature. **Environmental Health Perspectives**, v. 4, p. 3-26, 1973.

BARLOW, N.J.; FOSTER, P.M. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate. **Toxicologic Pathology**, v. 31, p. 397-410, 2003.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R.W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2209-2218, 1999.

BAUER, M.J.; HERRMANN, R. Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes. **Science of the Total Environment**, v. 8, p. 49-57, 1997.

BLOUNT, B.C.; SILVA, M.J.; CAUDILL, S.P.; NEEDHAM, L.L.; PIRKLE, J.L.; SAMPSON, E.J.; LUCIER, G.W.; JACKSON, R.J., BROCK, J.W. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 979-82, 2000.

BOEKELHEIDE, K.; KLEYMENOVA, E.; LIU, K.; SWANSON, C.; GAIDO, K.W. Dose-Dependent Effects on Cell Proliferation, Seminiferous Tubules, and Male Germ Cells in the Fetal Rat Testis Following Exposure to Di(n-butyl) Phthalate. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, p. 629-638, 2009.

BRADBURY, J. UK panics over phthalates in baby milk formulae. **Lancet**, v. 347, p. 1541, 1996.

BROUGHTON, K.S.; JOHNSON, C.S.; PACE, B.K.; LIEBMAN, M.; KLEPPINGER, K.M. Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 1011-1017, 1997.

BRYAN, G.W.; GIBBS, P.E.; HUMMERSTONE, L.G.; BURT, G.R. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from anti-fouling paints. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 66, p. 611–640, 1986.

CHAN, P.K.L.; MEEK, M.E. Di-n-butyl phthalate evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 12, p. 257–268, 1994.

CHARDIGNY, J.M.; BRETILLON, L.; SÉBÉDIO, J.L. New insights in health effects of trans alpha-linolenic acid isomers in humans. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.103, n. 7, p. 478-482, 2001.

CMA. Comments of the Chemical Manufacturers Association phthalate esters panel in response to request for public input on seven phthalate esters. FR Doc. 99-9484. Washington, DC: Chemical Manufacturers Association, 1999.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F.S.; SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378–384, 1993.

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Eisenbrand, G., 1996. Symposium: hormonally Active Agents in Food, organised by the DFG Senate Commission of Food Safety, Kaiserslautern, October, 6–9. Toxicology and Applied Pharmacology.

DIECKMANN, K.P.; SKAKKEBÆK, N.E. Carcinoma in situ of the testis; review of biological and clinical features. **International Journal of Cancer**, v. 83, p. 815-822, 1999.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B.. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 233-244, 2002.

ELSISI, A.E.; CARTER, D.E.; SIPES, I.G. Dermal absorption of phthalate diesters in rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.12, p. 70–77, 1989.

EMA, M.; MIYAWAK, E.; KAWASHIMA, K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. **Toxicology Letters**, v. 111, p. 271–78, 2000.

European Commission, 1996. European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, 2–4 December 1996, Weybridge, UK. Report of Proceedings.

FACEMIRE, C.F.; GROSS, T.S.; GUILLETE, L.J. Jr. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 4, p. 79-86, 1995.

FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P.; PARKIN, D.M. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence. Worldwide, IARC Cancerbase No. 5. Lyon. Lyon: ARC Press, 2001.

FERRARA, D.; HALLMARK, N.; SCOTT, H.; BROWN, R.; MCKINNELL, C.; MAHOOD, I.K.; SHARPE, R.M. Acute and long-term effects of *in utero* exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. **Endocrinology**, v. 147, p. 5352–5362, 2006.

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

FOSTER, P.M.D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following *in utero* exposure to phthalate esters. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 140-47, 2006.

FOSTER, P.M.D.; FOSTER, J.R.; COOK, M.W.; THOMAS, L.V.; GANGOLLI, S.D. Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 63, p. 120–132, 1982.

FOSTER, P.M.D.; MYLCHREEST, E.; GAIDO, K.W.; SAR, M. Effects on phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 231-235, 2001.

GAIDO, K.W.; HENSLEY, J.B.; LIU, D.; WALLACE, D.G.; BORGHOFF, S.; JOHNSON, K.J.; HALL, S.J.; BOEKELHEIDE, K. Fetal mouse phthalate exposure

shows that gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. **Toxicological Sciences**, v. 97, p. 491–503, 2007.

GARCIA-RODRIGUEZ, J.; GARCIA-MARTIN, M.; NOGUERAS-OCANA, M.; LUNA-DEL-CASTILLO, J.D.; GARCIA, M.E.; OLEA, N.; LARDELLI-CLARET, P. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 1090-1095, 1996.

GIAM, C.S.; CHAN, H.S.; NEFF, G.S.; ATLAS, E.L. Phthalate ester plasticisers: a new class of marine pollutant. **Science**, v. 199, p. 419–421, 1978.

GRANDE, S.W.; ANDRADE, A.J.; 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): reproductive effects on adult female offspring rats. **Toxicology**, v. 229, p. 114–122, 2007.

GRAY JR., L.E.; WILSON, V.S.; STOKER, T.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; NORIEGA, N.; HOWDESHELL, K.; ANKLEY, G.T.; GUILLETTE, L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 96–104, 2006.

GRAY JR., L.E.; WOLF, C.; LAMBRIGHT, C.; MANN, P.; PRICE, M.; COOPER, R.L.; OSTBY, J. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p0-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 94–118, 1999.

GRAY, L.E.JR.; 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, T.J.; BEAMAND, J.A. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, p. 123–131, 1984.

GRIFFITHS, W.C.; CAMARA, P.; LERNER, K.S. Bis-(2-ethylhexyl) phthalate, an ubiquitous environmental contaminant. **Annals of Clinical and Laboratory Sciences**, v. 15, p. 140–151, 1985.

GUESS, W.L.; JACOB, J.; AUTIAN, J.A. study of polyvinyl chloride blood bag assemblies. I. Alteration or contamination of ACD solutions. **Drug Intelligence**, v. 1, p. 120, 1967.

GUILLETE, L.J. JR.; GROSS, T.S.; MASSON, G.R.; MATTER, J.M.; PERCIVAL, H.F.; WOODWARD, A.R. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentration in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 102; p. 680-88, 1994.

HAGGARTY, P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 1559–1570, 2004.

HOEI-HANSEN, C.E.; HOLM, M.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; SKAKKEBÆK, N.E. Histological evidence of testicular dysgenesis in contralateral biopsies from 218 patients with testicular germ cell cancer. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 370–374, 2003.

HOLM, M.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; ANDERSSON, A.M.; SKAKKEBÆK, N.E. Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. **Journal of Pathology**, v. 199, p. 378–86, 2003.

HORNSTRA, G. Essential fatty acids in mothers and their neonates. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 262S-1269s, 2000.

INNIS, S.M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 4, p. S1–S8, 2003.

IPCS. Environmental health criteria 189 Di-n-butyl phthalate, ISBN 92 4 157189 6. Geneva: Health Organization, 1997.

JAEGER, R.J.; RUBIN, R.J. Plasticizers from plastic devices: extraction, metabolism, and accumulation by biological systems. **Science**, v. 170, p. 460-462, 1970.

JIANG, J.T.; MA, L.; YUAN, L.; WANG, X.R.; ZHANG, W. Study on developmental abnormalities in hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). **Toxicology**, v. 232, p. 286-93, 2007.

JOBLING, S.; REYNOLDS, T.; WHITE, R.; PARKER, M.G.; SUMPTER, J.P. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers,

are weakly estrogenic. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 582–587, 1995.

JORGENSEN, N.; ANDERSEN, A.G.; EUSTACHE, F.; IRVINE, D.S.; SUOMINEN, J.; PETERSEN, J.H.; ANDERSEN, A.N.; AUGER, J.; CAWOOD, E.H.; HORTE, A.; JENSEN, T.K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; VIERULA, M.; TOPPARI, J.; SKAKKEBÆK, N.E. Regional differences in semen quality in Europe. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1012-1019, 2001.

JORGENSEN, N.; ASKLUND, C.; CARLSEN, E.; SKAKKEBÆK, N.E. Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 54-61, 2006.

KLUWE, W.M. Overview of Phthalate Ester Pharmacokinetics in Mammalian Species. **Environmental Health Perspectives**, v. 45, p. 3-10, 1982.

KOHN, M.C.; PARHAM, F.; MASTEN, S.A.; PORTIER, C.J.; SHELBY, M.D.; BROCK, J.W.; NEEDHAM, L.L. Human exposure estimates for phthalates. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 440-42, 2000.

KRIS-ETHERTON, P.M.; TAYLOR, D.S.; YU-POTH, S.; HUTH, P.; MORIARTY, K.; FISHELL, V.; HARGROVE, R.L.; ZHAO, G.; ETHERTON, T.D. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. **American Journal of Clinical Nutrition**, p. 71, n. 1, p. 179S-188S, 2000.

LAKE, B.G.; PHILLIPS, J.C.; LINNELL, J.C.; GANGOLLI, S.D. The *in vitro* hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 39, p. 239–48, 1977.

LATINI, G.; DE FELICE, C.; PRESTA, G.; DEL VECCHIO, A.; PARIS, I.; RUGGIERI, F.; MAZZEO, P. *In Utero* Exposure to Di-(2-ethylhexyl) phthalate and Duration of Human Pregnancy. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 14, p. 1783-1785, 2003.

LATINI, G.; MASSARO, M.; DE FELICE, C. Prenatal exposure to phthalates and intrauterine inflammation: a unifying hypothesis. **Toxicological Sciences**, v. 85, p. 743, 2005.

LEHMANN, K.P.; PHILLIPS, S.; SAR, M.; FOSTER, P.M.; GAIDO, K.W. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal

testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. **Toxicological Sciences**, v. 81, p. 60–68, 2004.

LORGERIL, M.; RENAUD, S.; MAMELLE, N.; SALEN, P.; MARTIN, J.L.; MONJAUD, I.; GUIDOLLET, J.; TOUBOUL, P.; DELAYE, J. Mediterranean alpha-linolenic acid rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. **Lancet**, v. 343, p. 1454-1459, 1994.

MAHOOD, I.K.; HALLMARK, N.; MCKINNELL, C.; WALKER, M.; FISHER, J.S.; SHARPE, R.M. Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to Di(n-butyl) Phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 613-623, 2005.

MAHOOD, I.K.; MCKINNELL, C.; WALKER, M.; HALLMARK, N.; SCOTT, H.; FISHER, J.S.; RIVAS, A.; HARTUNG, S.; IVELL, R.; MASON, J.I.; SHARPE, R.M. Cellular origins of testicular dysgenesis in rats exposed *in utero* to di(n-butyl) phthalate. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 148-54, 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. 115, n. 1, p. 55-61, 2007.

MARCEL, Y.L.; NOEL, S.P. Contamination of blood stored in plastic packs. **Lancet**, v. 296, p. 151, 1970.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINO-ANDRADE, A.J.; MORAIS, R.N.; BOTELHO, G.G.K.; MULLER, G.; GRANDE, S.W.; CARPENTIERI, G.B.; LEÃO, G.M.C.; DALSENTER, P.R. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. **International Journal of Andrology**, v.32, n. 6, p. 704-712, 2009.

McENTEE, M.F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 380-387, 2002.

MCKINNELL, C.; SHARPE, R.M.; MAHOOD, K.; HALLMARK, N.; SCOTT, H.; IVELL, R.; STAUB, C.; JEGOU, 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. 146, p. 4536–4544, 2005.

MORTENSEN, G.K.; MAIN, K.M.; ANDERSSON, A.M.; LEFFERS, H.; SKAKKEBÆK, N.E. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1084–1092, 2005.

MYLCHREEST, E.; CATTLEY, R.C.; FOSTER, P.M. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? **Toxicological Sciences**, v. 43, p. 47–60, 1998.

MYLCHREEST, E.; SAR, M.; CATTLEY, 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.

MYLCHREEST, E.; SAR, M.; WALLACE, D.G.; FOSTER, P.M. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 19-28, 2002.

MYLCHREEST, E.; WALLACE, D.G.; CATTLEY, R.C.; FOSTER, P.M. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. **Toxicological Sciences**, v. 55, p. 143-151, 2000.

OTTSEN, A.M.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; SKAKKEBÆK, N.E. The role of foetal and infantile development in the pathogenesis of testicular germ cell cancer. In:

O'BRIEN, P.M.; WHEELER, T.; BARKER, D.J.P. (eds.) **Fetal programming: Influences of development and disease in later life**. London: RCOG Press, p. 174-86, 1999.

PARKS, L.G.; OSTBY, J.S.; LAMBRIGHT, C.R.; ABBOTT, B.D.; KLINEFELTER, G.R.; BARLOW, N.J.; GRAY, L.E.JR. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 339-49, 2000.

PEREIRA, C.; LI, D.; SINCLAIR, A.J. The alpha-linolenic acid content of green vegetables commonly available in Australia. **International Journal of Vitam and Nutrition Research**, v. 71, n. 4, p. 223-228, 2001.

RAJPERT-DE MEYTS, E.; TOPPARI, J.; SKAKKEBÆK, N.E. Testicular tumors with endocrine manifestation. In De Groot, L.J.; Jameson, J.L. (eds.) **Endocrinology**, 4<sup>th</sup> edn. Saunders: Philadelphia, chapter 175, 2000.

ROWLAND, I.R.; COTTRELL, R.C.; PHILLIPS, J.C. Hydrolysis of phthalate esters by the gastro-intestinal contents of the rat. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, p. 17-21, 1977.

SANDERS, T.A.B. Essential fatty acid requirements of vegetarians in pregnancy, lactation and infancy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 555S-559S, 1999.

SAN GIOVANNI, J.P.; BERKEY, C.S.; DWYER, J.T.; COLDITZ, G.A. Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. **Early Human Development**, v. 57, n. 3, p. 165-88, 2000.

SAVAGE, M.O.; LOWE, D.G. Gonadal neoplasia and abnormal sexual differentiation. **Clinical Endocrinology**, v. 32, p. 519-533, 1980.

SCARANO, W.R.; TOLEDO, F.C.; GUERRA, M.T.; CAMPOS, S.G.P.; JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; FELISBINO, S.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; TABOGA, S.R.; KEMPINAS, W.DE G. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. **Toxicology**, v. 262, p. 215-223, 2009.

SCHAEFER, E.J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 191-212, 2002.

SCOTT, R.C.; DUGARD, P.H.; RAMSEY, J.D.; RHODES, C. *In vitro* absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 223-227, 1987.

SCOTT, H.M.; HUTCHINSON, G.R.; MAHOOD, I.M.; HALLMARK, N.; WELSH, M.; DE GENDT, K.; VERHOEVEN, G.; O'SHAUGHNESSY, P.; SHARPE, R.M. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. **Endocrinology**, v. 148, p. 2027-2036, 2007.

SCULLY, R.E. Neoplasia associated with anomalous sexual development and abnormal sex chromosomes. **Pediatric and Adolescent Endocrinology**, v. 8, p. 203-217, 1981.

SHARPE, R.M. The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? **International Journal of Andrology**, v. 26, p. 2-15, 2003.

SHARPE, R.M.; SKAKKEBÆK, N.E. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: advances in understanding and identification of areas for future research. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, p. 2023-2038, 2003.

SHARPE, R.M.; SKAKKEBAK, N.E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.

SINGER, P.L. Occupational oligospermia. **Journal of the American Medical Association**, v. 140, p. 1249, 1949.

SJOBERG, P., BONDESSON, U.; GRAY, T.J.; PLOEN, L. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and five of its metabolites on rat testis *in vivo* and *in vitro*. **Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)**, v. 58, p. 225-233, 1986.

SKAKKEBÆK, N.E.; HOLM, M.; HOEI-HANSEN, C.; JØRGENSEN, N.; RAJPERT-DE MEYTS, E. Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 111, p. 1-9, 2003.

SKAKKEBÆK, N.E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K.M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human Reproduction**, v. 16, p. 972-978, 2001.

STILLMAN, R.J. *In utero* exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 142, p. 905-921, 1982.

SWAN, S.H.; BRAZIL, C.; DROBNIS, E.Z.; LIU, F.; KRUSE, R.L.; HATCH, M.; REDMON, J.B.; WANG, C.; OVERSTREET, J.W. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 414-420, 2003.

SWAN, S.H.; MAIN, K.M.; LIU, F.; STEWART, S.L.; KRUSE, R.L.; CALAFAT, A.M.; MAO, C.S.; REDMON, J.B.; TERNAND, C.L.; SULLIVAN, S.; TEAGUE, J.L. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 1056–1061, 2005.

TANAKA, A.; MATSUMOTO, A.; YAMAHA, T. Biochemical studies on phthalic esters. Part III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. **Toxicology**, v. 9, p. 109–123, 1978.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 56, p. 215-222, 2002.

TOPPARI, J.; LARSEN, J.C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L.J.JR. *et al.* Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 4, p. 741–803, 1996.

UAUY, R.; HOFFMAN, D.R.; PEIRANO, P.; BIRCH, D.G.; BIRCH, E.E. Essential fatty acids in visual and brain development. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 885-895, 2001.

VOS, J.G.; DYBING, E.; GREIM, H.A.; LADEFOGED, O.; LAMBRÉ, C.; TARAZONA, J.V.; BRANDT, I.; VETHAAK, A.D. Health effects on endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, p. 71-133, 2000.

WEIDNER, I.S.; MOLLER, H.; JENSEN, T.K.; SKAKKEBÆK, N.E. Cryptorchidism and Hypospadias in sons of gardeners and farmers. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 793-796, 1998.

WILSON, V.S.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; OSTBY, J.; WOOD, C.; HELD, G.; GRAY JR., L.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.; HOWDESHELL, K.L.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; GRAY JR., L.E. Differential expressions of the phthalate syndrome in male Sprague Dawley and Wistar rats after *in utero* DEHP exposure. **Toxicological Letters**, v. 17, p. 177-84, 2007.

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

XU, Y.; AGRAWAL, S.; COOK, T.J.; KNIPP, G.T. Maternal Di-(2-ethylhexyl)-phthalate Exposure Influences Essential Fatty Acid Homeostasis in Rat Placenta. **Placenta**, v. 29, p. 962-69, 2008.

XU, Y.; COOK, T.J.; KNIPP, G.T. Effects of Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) and Its Metabolites on Fatty Acid Homeostasis Regulating Proteins in Rat Placental HRP-1 Trophoblast Cells. **Toxicological Sciences**, v. 84, p. 287-300, 2005.

ZHANG, Y.H.; ZHANG, L.X.; CHEN, B.H. Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai: a cross-sectional study. **Biomedical and Environmental Sciences**, 19, 205–209, 2006.