

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIOGO HENRIQUE KITA

**MANIPULAÇÃO DO AMBIENTE ENDÓCRINO PRÉ E PÓS-NATAL E DISTÂNCIA
ANOGENITAL EM RATOS**

**CURITIBA
2015**

DIOGO HENRIQUE KITA

**MANIPULAÇÃO DO AMBIENTE ENDÓCRINO PRÉ E PÓS-NATAL E DISTÂNCIA
ANOGENITAL EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em fisiologia, ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Nogueira de Moraes

**CURITIBA
2015**



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



Ata da defesa de dissertação de mestrado de DIOGO HENRIQUE KITA

Aos vinte e nove dias do mês de outubro do ano de dois mil e quinze, foi realizada no Anfiteatro 05 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação do mestrando **DIOGO HENRIQUE KITA**, intitulada “**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO ANDROGÊNICA PRÉ E PÓS-NATAL SOBRE A DISTÂNCIA ANOGENITAL EM RATOS**”. A abertura teve início às 15h30min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador do candidato, Professor Doutor Anderson Joel Martino de Andrade. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Anderson Joel Martino de Andrade passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Paulo Roberto Dalsenter do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professora Doutora Maritana Mela Prodócimo do Departamento de Biologia Celular da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Anderson Joel Martino de Andrade fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “APROVAÇÃO”, habilitando-o ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professor Doutor Anderson Joel Martino de Andrade, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 29 de outubro de dois mil e quinze.

Professor Doutor Paulo Roberto Dalsenter
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Maritana Mela Prodócimo
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Anderson Joel Martino de Andrade
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre está ao meu lado me apoiando, aconselhando, incentivando e às vezes, puxando a orelha. Vocês são o meu porto seguro em meus momentos de tormenta.

Ao meu orientador e amigo, *Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade* por me acolher, sempre estar por perto, mesmo que fosse virtualmente, e me guiar na busca de conhecimento, que é a nossa maior riqueza.

A minha co-orientadora *Prof^a. Dr^a. Rosana Nogueira de Moraes* por ser mais que uma professora, foi amiga, mãe, colega. Você me mostrou como trilhar no mundo científico e encorajar a sempre seguir em frente e nunca desistir.

Ao meu amor, *Noemy Tsuneta* por sempre me apoiar em minhas decisões e estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, *Katlyn, Amanda, Andrei, Evaldo, Paulo, Michele, Rafa e Daria* a amizade de vocês foi o melhor resultado desse mestrado! Cada um de vocês me ensinou muito (de ciência a marcenaria). Vocês são pessoas únicas que tenho a honra de chamá-los de meus amigos!

As pesquisadoras do Departamento de Medicina Preventiva da Icahn School of Medicine - Mount Sinai, *Dr^a Shanna H. Swan* e *Dr^a Chris Gennings* pelo auxílio prestado em toda a análise estatística destes dados.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que me ajudaram de maneira direta ou indireta (mesmo que fosse só em espírito).

みなさんありがとうございます！！

RESUMO

Diversas desordens reprodutivas masculinas estão ligadas à insuficiência andrógênica no período pré-natal. A distância anogenital (AGD), definida como a distância entre o ânus e a genitália externa, tem sido utilizada como um marcador externo que pode indicar alterações no ambiente androgênico pré-natal em animais de laboratório e em humanos. Contudo, a utilização da AGD como marcador de longo prazo da ação androgênica *in utero* depende da plasticidade do períneo a estímulos hormonais pós-natais. Neste estudo foram utilizadas ferramentas farmacológicas para manipular o ambiente androgênico *in utero* e durante a puberdade, períodos críticos para o desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino. Ratas Wistar prenhas foram tratadas durante a gestação (GD13 a 20) com óleo de canola (veículo), o antagonista de receptores andrógenos flutamida (20mg/kg/dia), o plastificante Di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP, 750mg/kg/dia), e propionato de testosterona (TP, 1,0mg/kg/dia). Todas as substâncias foram administradas por via oral (gavage) com exceção da testosterona, a qual foi administrada por injeção subcutânea. Após o desmame, os descendentes machos de cada ninhada foram divididos randomicamente em quatro novos grupos pós-natais, os quais receberam os mesmos tratamentos do período pré-natal – veículo, flutamida, DEHP e testosterona. Deste modo, dezesseis grupos experimentais foram estabelecidos baseados na combinação das exposições pré- e pós-natais. O tratamento pós-natal foi conduzido durante o desenvolvimento púbere entre os dias 23 e 53 de vida. A AGD foi medida com o auxílio de um paquímetro digital nos dias pós-natais (PND) 4, 10, 23, 38, 53, 68 e 83 e corrigida pela raiz cúbica do peso corporal. No dia 88 os descendentes foram eutanasiados para coleta dos órgãos reprodutivos e determinação de espermátides resistentes à homogenização. A exposição a flutamida *in utero* reduziu significativamente a AGD dos descendentes machos (24-45%) e induziu uma ampla variedade de malformações, enquanto a exposição pré-natal ao DEHP produziu somente reduções discretas na AGD. A exposição pós-natal à flutamida, ao DEHP e à testosterona induziu sutis, porém significativas reduções na AGD dos descendentes. Estas mudanças foram particularmente consistentes no grupo tratado com testosterona pós-natal, o qual apresentou redução da AGD independentemente do tratamento pré-natal recebido. A exposição pré-natal a flutamida ou DEHP reduziu significativamente o peso de tecidos e órgãos sexuais acessórios andrógeno-dependentes, enquanto que o impacto do tratamento pós-natal foi mais evidente nos testículos, possivelmente como resultado da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. De modo geral, nosso estudo indica que a AGD masculina é um marcador anatômico estável que reflete a ação andrógênica *in utero*, embora também possa ser sutilmente responsiva a mudanças no ambiente endócrino durante o desenvolvimento puberal.

ABSTRACT

Several male reproductive disorders are linked to androgen insufficiency in prenatal life. The anogenital distance (AGD), defined as the distance between the anus and the genitals, has been used as an external landmark that can retrospectively indicate changes in the prenatal androgen environment in laboratory animals and humans. The usefulness of AGD as a long-life marker of the androgen action in utero depends on the postnatal plasticity of the perineum to hormonal stimuli. In this study we used pharmacological tools to manipulate the androgen environment in utero and during puberty, critical periods for male reproductive development. Wistar rat dams were treated from gestation day 13 to 20 with canola oil (vehicle), the androgen receptor antagonist flutamide (20 mg/kg/day), the plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, 750 mg/kg/day), or testosterone (TP, 1.0 mg/kg/day). All substances were given by oral route with exception of testosterone, which was administered by subcutaneous injections. After weaning, male pups within each litter were randomly assigned to one of four postnatal groups, which received the same treatments given prenatally – vehicle, flutamide, DEHP, or testosterone. Thus, sixteen treatment groups were established based on the combination of pre- and postnatal exposures. The postnatal treatments were conducted during pubertal development from postnatal days 23 to 53. AGD was measured with a digital caliper on postnatal days 4, 10, 23, 38, 53, 68, and 83 and corrected by the cubic root of body weight. On day 88 rats were euthanized for collection of reproductive organs and determination of homogenization resistant spermatids. In utero flutamide exposure significantly reduced male AGD (24-45%) and induced a wide range of reproductive tract malformations, while prenatal DEHP produced only discrete reductions in AGD. Postnatal exposure to flutamide, DEHP, and testosterone induced slight but significant changes in male AGD. These changes were particularly consistent in the group treated postnatally with testosterone, which reduced AGD regardless of the prenatal treatment received. Prenatal exposure to flutamide or DEHP significantly reduced the weight of androgen-dependent sex-accessory organs and tissues, whereas the impact of postnatal treatments was more evident on the testis, possibly as a result of hypothalamic-pituitary-gonadal axis inhibition. Overall, our rat study indicates that male AGD is a stable anatomical landmark that reflects the androgen action in utero, although it can also be slightly responsive to changes in the androgen environment during the pubertal development.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Fatores que podem desencadear a TDS em humanos.....	11
Figura 2 - Representação da Distância Anogenital em Humanos.....	12
Figura 3 - Estrutura química do DEHP.....	15
Figura 4 - Estrutura química da Flutamida.....	16

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 - Pre- and postnatal treatment groups.....	23
Figure 2 - Effects of prenatal androgen manipulation on female rat AGD.....	27
Figure 3 - Effects of prenatal androgen manipulation on male rat AGD. Prenatal treatment with vehicle, flutamide, DEHP and testosterone.....	28
Figure 4 - Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD. Prenatal treatment with vehicle and postnatal treatment with vehicle, flutamide, DEHP, or testosterone.....	29
Figure 5 - Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD following in utero exposure to flutamide.....	30
Figure 6 - Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD following in utero exposure to DEHP.....	30
Figure 7 - Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD following in utero exposure testosterone.....	31
Figure 8 - Age at preputial separation.....	32
Figure 9 - Reproductive endpoints at termination.....	34
Figure 10 - Reproductive endpoints at termination.....	35

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 - Pregnancy outcomes.....	26
-----------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGD – Anogenital Distance / (Distância Anogenital)
- DBP – Dibutyl phthalate / Dibutil ftalato
- DEHP – Di(2-ethylhexyl)phthalate / (Di(2-etilhexil)ftalato)
- ED – Endocrine Disruptor / Desregulador Endócrino
- EIA – Enzymatic Immunoassay / Enzimo imunoensaio
- GD – Gestational Day / Dia de Gestação
- MPW – Male Programming Window / Janela de programação da masculinização
- PBS – Phosphate-Buffered Saline / Tampão fosfato-salina
- PND – Postnatal Day / Dia pós-natal
- TDS – Testicular Dysgenesis Syndrome / Síndrome de Disgenesia Testicular
- TP – Testosterone Propionate / Propionato de Testosterona

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. ARTIGO CIENTÍFICO	18
MANIPULATION OF PRE AND POSTNATAL ANDROGEN ENVIRONMENTS AND ANOGENITAL DISTANCE IN RATS	18
ABSTRACT	19
INTRODUCTION	20
MATERIAL AND METHODS	21
ANIMALS, DOSES, AND TREATMENT	21
MATERNAL AND OFFSPRING DATA	24
ANOGENITAL DISTANCE (AGD)	24
EUTHANASIA.....	25
NUMBER OF HOMOGENIZATION RESISTANT SPERMATIDS	25
STATISTICAL ANALYSIS	25
RESULTS	26
PREGNANCY OUTCOMES	26
EFFECTS OF PRENATAL ANDROGEN MANIPULATION ON AGD	26
EFFECTS OF POSTNATAL ANDROGEN MANIPULATION ON AGD	28
PREPUTIAL SEPARATION.....	31
REPRODUCTIVE TRACT MALFORMATIONS, ORGAN WEIGHTS, AND SPERMATID NUMBER.....	32
DISCUSSION	36
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

Os desreguladores endócrinos podem ser definidos como substâncias químicas exógenas que podem interferir na manutenção da homeostase e regulação dos processos dependentes de hormônios. Essas substâncias têm conquistado a atenção de pesquisadores, agências reguladoras e do público em geral devido a ampla variedade de efeitos adversos que podem ser induzidos pela exposição a esses agentes. Segundo Diamanti-Kandarakis et al., (2009) os mecanismos de interferência hormonal podem abranger várias vias como a interação com receptores nucleares e de membrana (ex.: receptores de neurotransmissores como serotonina, dopamina e norepinefrina), alterações enzimáticas na biossíntese e/ou metabolismo de hormônios e inúmeros outros mecanismos que convergem sobre os sistemas endócrino e reprodutivo.

Dentre os efeitos que causam maior preocupação, destacam-se as possíveis manifestações tardias decorrentes da exposição a essas substâncias durante fases críticas do desenvolvimento intrauterino. Resultados obtidos em modelos animais e evidências em seres humanos suportam a ideia de que a exposição a desreguladores endócrinos durante o desenvolvimento fetal e a puberdade desempenham um papel na etiologia de doenças reprodutivas, tumores relacionados ao sistema endócrino, problemas comportamentais e de aprendizado, infecções e, possivelmente, obesidade e diabetes mellitus (TABB; BLUMBERG, 2006; WHO, UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2012; BIRNBAUM, 2013).

Vários estudos indicam um possível aumento na incidência de distúrbios reprodutivos masculinos nas últimas décadas, particularmente baixa contagem de espermatozoides, malformações genitais e câncer testicular (TOPPARI et al. 1996). De acordo com Skakkebaek et al. (2001), muitos desses distúrbios podem resultar de falhas no desenvolvimento gonadal pré-natal, especialmente como consequência da disfunção das células de Leydig e das células de Sertoli *in utero*. De acordo com essa hipótese, baixa contagem de espermatozoides, criptorquidismo (permanência dos testículos na cavidade abdominal), hipospádias (abertura da uretra na face ventral do pênis) e câncer testicular, constituem distúrbios interrelacionados que compõem uma síndrome rara com origem pré-natal conhecida como Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS). A Figura 1 ilustra os principais alvos celulares e as alterações endócrinas e fenotípicas associadas a TDS humana.

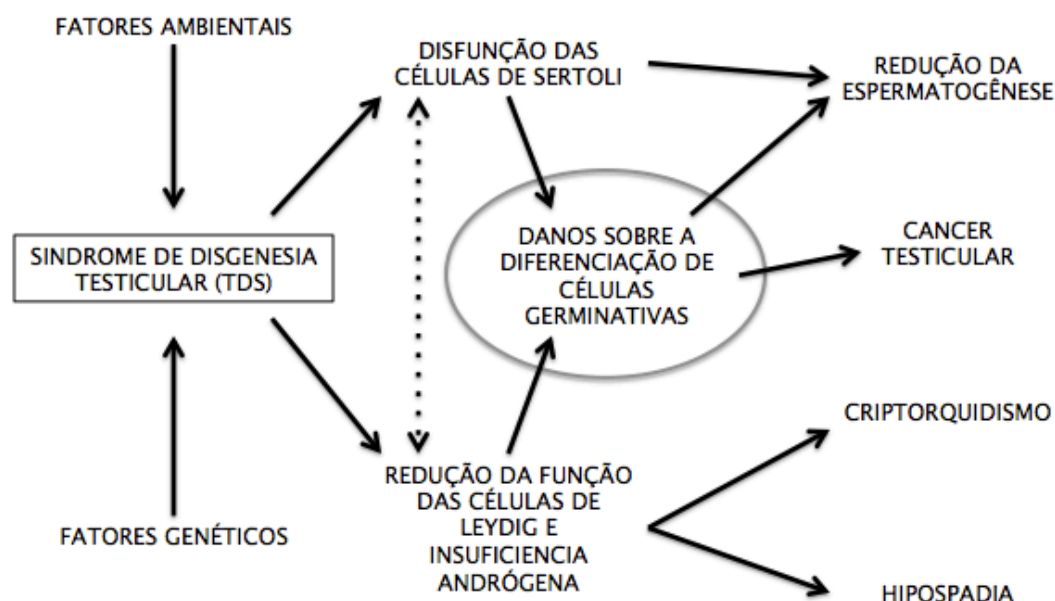


Figura 1 – Fatores que podem desencadear a TDS em humanos e possíveis anomalias relacionadas a TDS.

O possível aumento temporal na incidência dos distúrbios que compõem a TDS indica que fatores ambientais estão possivelmente envolvidos na etiologia dessa síndrome. Nesse contexto, a exposição a desreguladores endócrinos que têm potencial para alterar o desenvolvimento reprodutivo masculino, como substâncias com ações estrogênicas ou anti-androgênicas, tem sido causa de especial preocupação. Ensaio experimental com animais demonstram que a exposição a determinados desreguladores endócrinos durante períodos críticos do desenvolvimento pré-natal pode resultar em alterações similares aos distúrbios observados na Síndrome de Disgenesia Testicular Humana.

Estudos conduzidos por Mylchreest et al. (1999) e Gray et al. (2000) em ratos evidenciaram que a exposição *in utero* a alguns ftalatos, como o dibutil ftalato (DBP) e o di-2-etilexil ftalato (DEHP), podem alterar a formação do sistema reprodutor masculino através da inibição da produção de testosterona testicular acarretando nos surgimento de hipospádias, redução da distância anogenital (distância entre o ânus e a genitália), alterações testiculares (apoptose) e criptorquidismo, demonstrando que a exposição a ftalatos no período pré-natal pode ocasionar

efeitos similares aos distúrbios que caracterizam a TDS humana. Tanto na TDS humana quanto em modelos animais expostos a desreguladores endócrinos, a insuficiência androgênica *in utero* parece ser um fator chave na indução de alterações reprodutivas de manifestação precoce (ex.: malformações genitais) e tardia (ex.: baixa contagem de espermatozóides).

DISTÂNCIA ANOGENITAL

A distância anogenital (AGD), definida como a distância entre o ânus e os genitais, é um marcador anatômico sexualmente dimórfico em humanos e roedores que está ligado diretamente à exposição a andrógenos no período de formação do sistema reprodutor *in utero*. Essa medida é cerca de 50 a 100% maior em machos que em fêmeas e a redução da AGD tem sido utilizada como um indicador de efeitos anti-androgênicos em estudos experimentais com animais e mais recentemente em estudos epidemiológicos em seres humanos (SWAN et al., 2005; SCOTT et al., 2008; MENDIOLA et al., 2011). A Figura 2 ilustra a distância anogenital em seres humanos e em ratos.

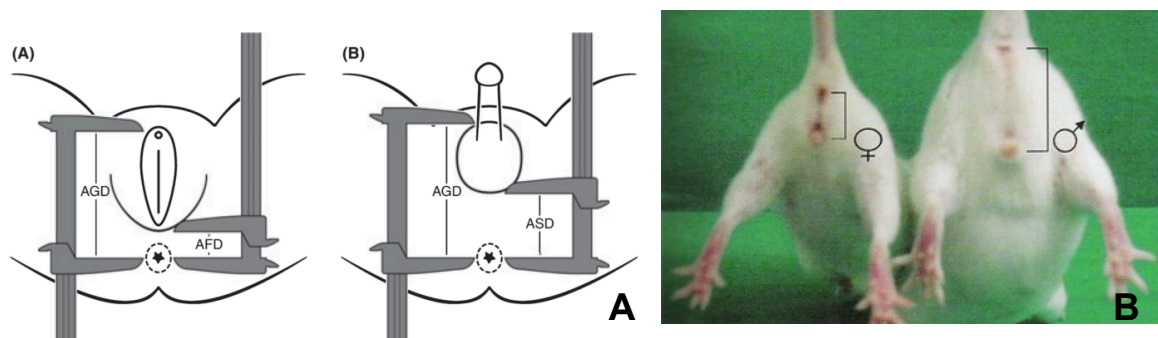


Figura 2 – Representação da Distância Anogenital em humanos (A) – AGD (distância anogenital), AFD (distância ano-vulvar), ASD (distância ano-escrotal) – e ratos (B).

Estudos indicam que a AGD reflete a produção/ação androgênica pré-natal e está positivamente associada com a incidência e a severidade de outras alterações reprodutivas, incluindo componentes da TDS como criptorquidismo, hipospádias e baixa contagem de espermatozóides (VAN DEN DRIESCHE et al. 2011; GRAY et al. 2001; WELSH et al. 2008). Estudos conduzidos por Mendiola et al. (2011), demonstraram a relação entre redução da AGD e baixa qualidade do sêmen em

jovens da cidade americana de Rochester. Esses resultados corroboram dados experimentais com animais de laboratório e indicam que a AGD pode ser utilizada como um marcador de longo prazo do ambiente endócrino (androgênico) pré-natal (SKAKKEBAEK et al. 2001; BAY et al. 2006; VAN DEN DRIESCHE et al. 2012).

Estudos com animais experimentais indicam que o período pré-natal é a fase de maior susceptibilidade para a indução de distúrbios reprodutivos masculinos por substâncias antiandrogênicas que inibem a produção (ex.: ftalatos) ou ação (ex.: flutamida) dos hormônios androgênicos endógenos (SHULTZ et al. 2001; WOLF et al. 2002; HOTCHKISS et al. 2007). Em ratos, a diferenciação testicular ocorre entre os dias 10 e 13 de gestação e após esse período o testículo passa a produzir androgênios e outros hormônios para direcionar o processo de diferenciação sexual (“masculinização”). A ação androgênica *in utero* é fundamental para a diferenciação e o desenvolvimento dos genitais masculinos internos (próstata, vesícula seminal, ducto deferente e epidídimo), externos (pênis, escroto e períneo/AGD) e para complementar o desenvolvimento gonadal (GRAY et al. 2001 e SHARPE et al. 2006). Estudos publicados por diversos autores (MACLEOD et al. 2010; WELSH et al. 2010; VAN DEN DRIESCHE et al. 2012) indicam a existência de uma estreita janela para a programação androgênica pré-natal em ratos, compreendidas entre os dias 15 a 18 de gestação, período no qual a distância anogenital e o tamanho e a função dos órgãos reprodutivos masculinos seriam permanentemente determinados. Esses dados reforçam o uso da distância anogenital como um marcador da produção/ação androgênica pré-natal e, conseqüentemente, da função reprodutiva masculina. Em seres humanos, acredita-se que a janela de masculinização pré-natal (“masculinization programming window”) ocorra no início da gestação entre a 8^a e a 14^a semanas gestacionais (MACLEOD et al. 2010).

Por outro lado, o período peripubertal é considerado uma fase fundamental para complementar o processo de desenvolvimento pré-natal e permitir que os órgãos reprodutivos masculinos atinjam o tamanho e a função “pré-determinados” durante a programação pré-natal. Nesse sentido, poucos estudos exploraram os possíveis efeitos combinados da manipulação androgênica pré- e pós-natal sobre a distância anogenital e outros parâmetros reprodutivos em modelos animais. Van Den Driesche et al., (2011) demonstraram que a exposição a substâncias anti-androgênicas durante a janela de programação androgênica pré-natal seguida de uma nova exposição no período pré-pubertal, entre os dias 1 e 15 de gestação, pode acentuar

a redução do comprimento e peso do pênis em ratos; os efeitos sobre a distância anogenital, no entanto, não foram alterados pela exposição pré-pubertal, indicando pouca ou nenhuma plasticidade dessa medida nesse período pós-natal. Contudo, não existem dados sobre os possíveis efeitos combinados da manipulação androgênica pré-natal e pubertal sobre a distância anogenital, peso de órgãos andrógeno-dependentes e função testicular (ex.: contagem de espermátides) na idade adulta.

DESREGULADORES ENDOCRINOS – FTALATOS

O grupo de moléculas identificadas como desreguladores endócrinos é muito heterogêneo e inclui químicos sintéticos usados como solventes/lubrificantes industriais e seus subprodutos (Bifenilas policloradas e polibromadas [PCBs e PBBs] e dioxinas), plásticos (Bisfenol A – BPA), plastificantes (Di(2-etilhexil)ftalato – DEHP), pesticidas, fungicidas e agentes farmacêuticos (2-metil-N-[4-nitro-3-(trifluorometil) fenil] propanamida – Flutamida).

Substâncias químicas naturais como fitoestrógenos também podem atuar como desreguladores endócrinos, e o potencial de atuação dessas substâncias sobre o sistema endócrino deve ser considerado. Segundo Diamanti-Kandarakis et al., (2009) o desafio no estudo de desreguladores do sistema endócrino é a diversidade apresentada por essas substâncias que podem ou não compartilhar uma similaridade estrutural. Devido a esse fato, é difícil prever se um composto pode ou não exercer uma ação de desregulação endócrina.

Entre as substâncias capazes de desregular o sistema endócrino, destacam-se os antiandrógenos, como alguns ftalatos, fármacos e pesticidas. Muitas dessas substâncias são facilmente encontradas no meio ambiente e ganharam muita atenção na literatura científica e leiga pela sua habilidade em alterar a função reprodutiva ligando-se a receptores androgênicos ou inibindo a biossíntese de testosterona e induzindo ou modulando repostas no sistema reprodutor de descendentes machos que tiveram exposição *in utero* (FOSTER et al. 2005).

Os ésteres de ftalato, como o DEHP, são compostos químicos muito utilizados na indústria plástica por proporcionar flexibilidade, transparência e outras características físicas em uma grande variedade de produtos como pisos de vinil, embalagens para alimentos, brinquedos, cosméticos e materiais médico-

hospitalares. A Figura 3 mostra a estrutura química do DEHP, um dos principais ftalatos usados como plastificante de produtos plásticos à base de policloreto de vinila (PVC).

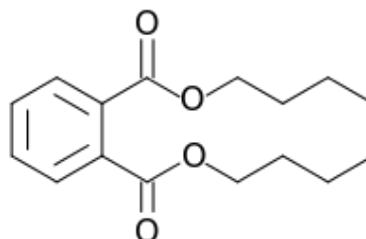


Figura 3 – Estrutura química do DEHP

Como os ftalatos não estão ligados quimicamente ao polímero de PVC, isso permite que alimentos e outros materiais sejam facilmente contaminados através do contato com plásticos, tornando os ésteres de ftalato substâncias ubíquas no meio ambiente devido a grande utilização desses materiais (PARKS et al. 2000; MOORE et al. 2001).

Apesar de serem usados há muito tempo, muitos ésteres de ftalato não foram adequadamente testados quanto aos efeitos endócrinos e reprodutivos transgeração até recentemente. Estudos experimentais com animais de laboratório demonstraram que alguns ftalatos como o DEHP, o butil-benzil ftalato (BBP), o di-butil ftalato (DBP) e o diisononil ftalato (DINP) alteram o trato reprodutivo de ratos machos de forma antiandrogênica, após a exposição *in utero* (MYLCHREEST et al. 1999; PARKS et al. 2000). Segundo Mylchreest et al. (1999) e Moore et al. (2001), ratos recém nascidos mostraram distância anogenital reduzida e alterações nos tecidos dependentes de andrógenos quando expostos a altas doses de DEHP *in utero*. Andrade et al., (2006) avaliaram os efeitos da exposição *in utero* e lactacional de DEHP em altas e baixas doses sobre o desenvolvimento sexual de ratos recém nascidos e os parâmetros mais afetados foram o início da puberdade (retardo na idade da separação prepucial) e alterações testiculares. O efeito antiandrogênico dos ftalatos está relacionado com a supressão da biosíntese de testosterona pelo testículo, ação mediada pela inibição da expressão e atividade de diversas enzimas esteroidogênicas (GRAY et al. 2000; PARKS et al. 2000; SHULTZ et al. 2001; BARLOW et al. 2003).

Estudos conduzidos por Barlow et al., (2003) demonstraram que o DEHP pode reduzir a disponibilidade de colesterol para as células esteroidogênicas, causando

redução da testosterona sérica em ratos. O fato do colesterol participar em uma variedade de etapas bioquímicas, implica que mudanças significantes no suprimento pode estar envolvido em diversos efeitos adversos causados pela administração do DEHP.

FLUTAMIDA

A flutamida é um fármaco antiandrógeno não-esteróide destituído de atividade hormonal, utilizado principalmente no tratamento do câncer avançado de próstata. Este fármaco é um potente antagonista dos receptores androgênicos, atua inibindo a ligação da testosterona ou da diidrotestosterona aos receptores nucleares e citoplasmáticos nas células-alvo, bloqueando a ação de androgênios de origem adrenal e testicular nos tecidos-alvo, sem reduzir os níveis de testosterona sérica (MARONA et al., 2003).

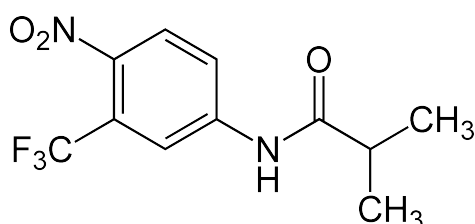


Figura 4 – Estrutura química da flutamida

Estudos efetuados por Kassim et al., (1997) demonstraram que a administração pre-natal da flutamida em ratos da linhagem Albino Swiss durante a janela de masculinização fetal causou feminização da genitália externa, alterações na posição e integridade dos testículos dos descendentes machos durante fase adulta e alterações na função e no desenvolvimento reprodutivo andrógeno dependente acarretando no aumento dos níveis de LH plasmático, estimulando a esteroidogênese intracelular. Mcintyre et al. (2001) demonstraram que a exposição *in utero* à Flutamida resulta em alterações no desenvolvimento andrógeno-dependente dos filhotes machos, incluindo redução da distancia anogenital (AGD), aumento dose-dependente na incidência de hipospadias e redução nos pesos da vesícula seminal, próstata, músculo levantador do ânus/bulbocavernoso e do testículo.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A distância anogenital é um marcador dimórfico caracterizado por ter maior comprimento em indivíduos machos e menor em fêmeas. Alterações na AGD podem indicar interferência exógena sobre a homeostase do ambiente endócrino durante o desenvolvimento fetal. Em machos, a redução da AGD é um indicador de insuficiência androgênica *in utero*, evento-chave para a indução de outras alterações que compõem a síndrome de disgenesia testicular, como hipospádias, criptorquidismo, baixa contagem de espermatozóides e câncer testicular de células germinativas.

A AGD tem sido considerada um marcador permanente capaz de refletir retrospectivamente, mesmo em indivíduos adultos, a ação androgênica pré-natal. No entanto, a utilidade da AGD como um marcador permanente do ambiente androgênico pré-natal, depende da demonstração de sua estabilidade no período pós-natal.

O presente estudo tem como finalidade determinar os efeitos de manipulações dos ambientes androgênicos pré e pós-natais sobre a AGD de ratos machos. Para tanto, determinaremos se alterações na distância anogenital e tecidos andrógeno-dependentes causadas pela exposição *in utero* à flutamida, ao plastificante DEHP e à testosterona podem ser modificadas pelo tratamento com essas mesmas substâncias durante a puberdade.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos da manipulação androgênica pré-natal e pubertal sobre a distância anogenital em diferentes estágios do desenvolvimento, do nascimento à idade adulta.
- Investigar os efeitos da manipulação androgênica pré-natal e pubertal sobre a separação prepucial, marcador externo do início da puberdade em ratos.
- Avaliar os efeitos da manipulação androgênica pré-natal e pubertal sobre o trato reprodutor e função testicular na idade adulta (90 dias de idade), particularmente o peso de tecidos andrógeno-dependentes e o número de espermátides resistentes à homogeneização.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Manipulation of pre and postnatal androgen environments and anogenital distance in rats

Diogo H. Kita¹, Katlyn B. Meyer¹, Amanda C. Venturelli¹, Rafaella Adams¹, Daria L. B. Machado¹, Rosana N. Morais¹, Shanna H. Swan², Chris Gennings², Anderson J. Martino-Andrade¹

¹ Department of Physiology, Division of Biological Sciences, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

² Department of Preventive Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

Corresponding Author:

Anderson J. Martino-Andrade Tel.: +55 41 3361-1719

Email address: anderson.andrade@ufpr.br

Original article

Keywords: Anogenital Distance, DEHP, Phthalates, Endocrine Disruptors

ABSTRACT

We examined the anogenital distance (AGD) plasticity in rats through the manipulation of the androgen environment in utero and during puberty. Dams were treated from gestation days 13-20 with vehicle, flutamide (20 mg/kg/day), di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, 750 mg/kg/day), or testosterone (1.0 mg/kg/day). After weaning, male pups were randomly assigned to one of four postnatal groups, which received the same treatments given prenatally. Sixteen treatment groups were established based on the combination of pre- and postnatal exposures. The postnatal treatments were conducted from postnatal days 23-53. *In utero* flutamide exposure significantly shortened male AGD, while prenatal DEHP produced only discrete reductions in this endpoint. Postnatal flutamide, DEHP, and testosterone induced slight but significant reductions in male AGD. Our study indicates that AGD is a stable anatomical landmark that reflects the androgen action in utero, although it can also be slightly responsive to changes in the androgen environment following pubertal exposure.

Keywords: Anogenital distance (AGD), DEHP, flutamide, testosterone, rats

INTRODUCTION

Trends in male reproductive health indicate a possible increase in the incidence of reproductive disturbances in the last decades, such as low sperm count, genital malformations (hypospadias and cryptorchidism), and testicular germ cell cancer (TOPPARI et al., 1996; PAULOZZI, 1999; MENDIOLA et al., 2011; DEAN et al., 2012; NORDKAP et al., 2012). According to Skakkebaek et al., (2001) these reproductive disorders are interrelated and constitute a common syndrome with prenatal origin known as Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS). Genetic and environmental factors, including the increasing exposure to endocrine disrupting chemicals (EDCs) have been described as possible etiological factors of the human TDS. However, certain TDS disorders (e.g. low sperm counts) and other consequences of *in utero* exposures to EDCs are not manifested until late in life, which can represent a particular challenge in the study of the impact of EDCs on human health.

The anogenital distance (AGD), defined as the measured distance between the anus and the genitals, is a sexually dimorphic anatomical marker in humans and rodents that reflects the androgenic action during the formation of the reproductive system *in utero*. It has been demonstrated that the AGD and the size of male reproductive organs are determined by androgens during a specific time frame, the masculinization programming window (MPW), which occurs during gestation days 15 to 18 in laboratory rats and in humans between weeks 8-14 gestation (WELSH et al., 2008). Postnatally, androgen exposure is needed for achievement of the maximum growth of androgen-dependent structures, but the degree of postnatal plasticity of the AGD is largely unknown. In humans, AGD is negatively associated with the incidence and severity of a number of male reproductive alterations, including TDS components such as cryptorchidism, hypospadias and low sperm counts (GRAY et al. 2001; WELSH et al. 2008; VAN DEN DRIESCHE et al. 2011; MENDIOLA et al., 2011;). These results corroborate experimental data with laboratory animals and indicate that the AGD can be used as a marker of the prenatal androgenic environment (SKAKKEBAEK et al. 2001; BAY et al. 2006; VAN DEN DRIESCHE et al. 2012).

Many industrial chemicals and pharmaceuticals can impair the androgen action during the MPW and cause adverse reproductive effects in laboratory rats and in humans. In rats, administration of the potent androgen receptor antagonist flutamide

during this window can shorten (feminize) the AGD and induce several reproductive abnormalities, including chriptorchidism and hypospadias (MCINTYRE et al., 2001). Certain phthalates, industrial chemicals used as plasticizers of polyvinyl chloride (PVC) plastics and as additive in many other products, can inhibit the testosterone production by the fetal testis and induce similar anti-androgenic effects, although the spectrum and severity of reproductive abnormalities induced by phthalates may be variable depending on rat strain susceptibility (WILSON et al., 2007).

The usefulness of AGD as a long-life marker of the androgen action during the MPW depends on the postnatal plasticity of the perineum to hormonal stimuli. Few studies have explored the effects of postnatal androgen manipulation on AGD. Van den Driesche et al (2011) demonstrated that early postnatal exposure to flutamide or di-butyl phthalate (postnatal days 1 to 15 via maternal milk) can impair penis growth, but have little or no effects on AGD. More recently, Mitchell et al. (2015) demonstrated slight but significant AGD changes in adult male rats treated with the estrogenic compound diethylstilbestrol (DES). This study aims to investigate the effects of pre- and postnatal androgen manipulation on male rat AGD. Rats were exposed to vehicle, flutamide, di-2(ethylhexyl) phthalate, and testosterone, *in utero* and later during puberty.

MATERIAL AND METHODS

Animals, doses, and treatment

The study was conducted at the Laboratory of Endocrine and Reproductive Physiology of the Federal University of Paraná (UFPR). Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the animal facilities of UFPR after approval by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA). All animals received food and water *ad libitum* and were maintained at controlled conditions of light (12h light/dark cycle) and temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$).

Adult female rats were mated for 3h during the dark phase of the light/dark cycle to obtain the progenitors. The detection of sperm on the vaginal smear was considerate as day zero of gestation. Mating procedures were repeated until sufficient number of progenitors was obtained for the experiment (N=8-16/group). However, due to the large number of animals in the postnatal period, the study was divided into two blocks.

We used canola oil as vehicle (Veh, CAS 120962-03-0), Flutamide (Flu, CAS 13311-84-7), Di(2-ethylhexil) phthalate (DEHP, CAS 117-81-7) and Testosterone Propionate (TP, CAS 57-85-2). Canola oil and DEHP were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Flutamide and Testosterone was obtained from Dermoformulas laboratory (Curitiba, PR, Brazil).

The treatment was divided in two periods (*in utero* and pubertal phase). Wistar rat dams were treated once a day from gestation day 13 to 20, which includes the masculinization programming window, with canola oil (control group), flutamide (20 mg/kg/day – flutamide group), DEHP (750 mg/kg/day – DEHP group), or testosterone (1.0 mg/kg/day – testosterone group). All substances were given by oral route with exception of testosterone, which was administered by subcutaneous injections. Groups receiving testing substances by oral route were also treated subcutaneously with vehicle, while animals receiving subcutaneous injections of testosterone received oral vehicle. The administration volumes for oral and subcutaneous routes were 5ml/kg and 1.0 ml/kg, respectively. After birth, on postnatal day four (PND 4), pups were individually marked with black ink tattoo on their limbs. After weaning, male pups within each litter were randomly assigned to one of four postnatal groups using a split-litter-design (BECK et al. 2006; RICCERI et al. 2006). Each of the four groups was given one of the prenatal treatments – vehicle, flutamide, DEHP, and testosterone – at the same doses and routes. The postnatal treatments were conducted once a day during pubertal development from postnatal days 23 to 53. Thus, sixteen treatment groups were established based on the combination of pre- and postnatal exposures. The treatment groups are shown schematically in Figure 1. Although the split-litter design allows a uniform distribution of pups among groups, some littermates may be assigned to the same postnatal treatments (litters with more than 4 males).

The female offspring was kept until weaning and then euthanized, except for female pups from groups treated prenatally with vehicle and testosterone. These animals were randomly assigned to groups receiving either vehicle or testosterone postnatally (split-litter-design) from days 23 to 53 at the same doses and routes used for prenatal treatment.

Dams (prenatal treatment: GD13-20)		Male Offspring (postnatal treatment: PND23-53)		
TREATMENT GROUP	VEHICLE (N=16)	VEHICLE (N=16)	FLUTAMIDE (N=13)	
		FLUTAMIDE (N=16)	DEHP (N=15)	
		DEHP (N=16)	TESTOSTERONE (N=16)	
		TESTOSTERONE (N=16)		
	FLUTAMIDE (N=15)	VEHICLE (N=15)	FLUTAMIDE (N=15)	DEHP (N=14)
		FLUTAMIDE (N=15)	DEHP (N=14)	TESTOSTERONE (N=14)
		DEHP (N=15)	TESTOSTERONE (N=14)	
		TESTOSTERONE (N=15)		
	DEHP (N=11)	VEHICLE (N=10)	FLUTAMIDE (N=09)	DEHP (N=10)
		FLUTAMIDE (N=09)	DEHP (N=10)	TESTOSTERONE (N=09)
		DEHP (N=10)	TESTOSTERONE (N=09)	
		TESTOSTERONE (N=09)		
	TESTOSTERONE (N=10)	VEHICLE (N=07)	FLUTAMIDE (N=06)	DEHP (N=06)
		FLUTAMIDE (N=06)	DEHP (N=06)	TESTOSTERONE (N=07)
		DEHP (N=06)	TESTOSTERONE (N=07)	
		TESTOSTERONE (N=06)		

Figure 1. Pre- and postnatal treatment groups. Dams were treated with vehicle, flutamide (20 mg/kg/day, orally), DEHP (750 mg/kg/day, orally) or testosterone (1.0 mg/kg/day, subcutaneously) from gestation day (GD) 13 to 21. After weaning male pups were split into four different groups, which received one of the prenatal treatments – vehicle, flutamide, DEHP, and testosterone – at the same doses and routes from postnatal day (PND) 23 to 53.

The dose of flutamide was selected based on the data of McIntyre et al. (2001) which showed that doses ranging from 6.25 mg/kg/day to 50 mg/kg/day resulted in significant changes in the AGD as well as other reproductive tract abnormalities in male rats exposed *in utero*. The DEHP dose was based on the study by Parks et al., (2000), which demonstrated that *in utero* exposure to 750 mg/kg/day lowered testicular testosterone concentrations and reduced AGD, with no evidence of severe maternal or fetal toxicity. Wolf et al., (2002) indicated that exposure to doses of 0.5 mg/kg and 1.0 mg/kg of testosterone propionate (TP) during pregnancy can masculinize female offspring without greatly affecting pup viability or harming the pregnancy. Hotchkiss et al., (2007) showed that TP doses of 1.5 mg/kg/day and 2.5 mg/kg/day significantly increased the AGD of females exposed *in utero* during GD 14-18. The dose of 1.0 mg/kg/day was selected because according to Wolf et al.,

(2002), higher doses may result in delayed parturition and extensive mortality of pups.

Maternal and offspring data

Dams were weighed daily throughout the treatment period (GD 13-20). At the end of the lactation (postnatal day 22), all dams were euthanized with an overdose of ketamine and xylazine and the number of implantation sites on the uterus was counted. The post-implantation loss was calculated as the (total number of implantation sites minus the number of viable pups)/number of implantation sites. We also recorded the number of pups born, sex, and the viability index (number of pups alive on PND 4 x 100/ number of pups born alive). The preputial separation, an indicator of the onset of puberty in rats, was investigated by manual retraction of the prepuce starting on PND 33. The landmark used to define the achievement of preputial separation was the exposure of the glans penis, which should be round and free of cartilaginous tissue that characterizes the immature penis. We also investigated possible genital malformations, including the occurrence of hypospadias (opening of urethra in the ventral side of penis), cleft prepuce (incompletely formed prepuce with exposed glans penis), and vaginal pouch (female-like vaginal opening). In animals with hypospadias and/or cleft prepuce, the age at preputial separation was determined by the achievement of a mature morphology of the glans penis (round and without cartilage).

Anogenital Distance (AGD)

The AGD was measured on all male offspring with a digital caliper from the center of the anus to posterior edge of the genital papilla by a single investigator (DHK) using a head magnifier lens (4.0 x magnification). The AGD was measured on PNDs 4, 10 and 23, and then every 15 days until adulthood (PND 83). All anogenital distance measurements were corrected by cubic root of body weight (GALLAVAN et al., 1999).

Euthanasia

Adult male rats were euthanized by decapitation on PND 90 (\pm 3 days). We excised and weighed the liver, spleen, kidneys, adrenals, and reproductive organs and tissues (ventral prostate, seminal vesicle, testis and levator ani/bulbocavernosus muscle (LABC)). Organ weights are reported relative to body weight (g% or mg%). We also determined the positioning of the testes and the penile length. The penis length was measured from its insertion at the LABC muscle to the tip of the glans with a digital caliper. Penis length measurements were made only in the second block of experiments by a single investigator (DHK).

Number of homogenization resistant spermatids

The left testes were used to determine the number of homogenization resistant spermatids. In animals with unilateral cryptorchidism the scrotal testis was used for spermatid count. The tunica albuginea was removed and the testis was homogenized in a solution of 10mL of saline (sodium chloride 0.9%) with 0.5% of Triton X100. The homogenized solution was diluted 10 times in saline to evaluate the number of resistant spermatids (stages 17 to 19) in a hemocytometer (Newbauer chamber) (TOLEDO et al. 2011).

Statistical Analysis

Normality and homogeneity of variances were evaluated prior to data analysis. Pregnancy outcomes were evaluated by Analysis of Variance (ANOVA). For AGD analysis, we used a mixed effects model with treatment, time and block as main effects and litter as a random (nested) factor to adjust for litter effects. Crude and body weight corrected AGD ($\text{AGD}/\text{body weight}^{1/3}$) were evaluated in the mixed model, but corrected AGD was used in the final analyses, because it provided the best model fit estimates, as indicated by lower Akaike Information Criterion (AIC) values. Treatment and time interactions were evaluated and included in the model when the results were significant. For analysis of prenatal androgen manipulation on AGD (groups treated postnatally with vehicle), post hoc comparisons were performed using least square means (LSMEANS). At termination, organ weights were analyzed in a mixed model with block and pre- and postnatal treatments as main effects and litter as a random (nested) factor. Pre- and postnatal treatment interactions were

evaluated and included in the model when the results were significant. Analyses were performed with SAS software, version 9.3 (Cary, NC), and Graphpad Prism® version 5.0 (La Jolla, CA). Differences were considered to be statistically significant at a probability level of 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

Pregnancy outcomes

There were no significant differences between groups in relation to body weight gain during pregnancy, litter size, number of implants, post-implantation losses and viability index (Table 1).

Table 1. Pregnancy outcomes

	Vehicle	DEHP	Flutamide	Testosterone
Number of dams	16	15	11	10
Litter size	9.00 ± 2.25	9.64 ± 2.13	9.17 ± 3.49	8.08 ± 2.91
Body weight gain (GD 0-21)	104.02 ± 22.15	108.37 ± 32.24	106.10 ± 28.80	94.70 ± 18.82
Implants	9.22 ± 2.34	9.64 ± 2.13	8.83 ± 4.16	8.17 ± 2.86
Viability index	97.73 ± 6.71	79.86 ± 30.20	97.32 ± 7.77	97.75 ± 4.78
Post implant loss	1.85 ± 7.86	0	0.51 ± 1.99	1.19 ± 4.12

All data are shown as mean ± standard deviation.

Effects of prenatal androgen manipulation on AGD

The effects of prenatal androgen manipulation were investigated in animals treated postnatally with vehicle. In female offspring, *in utero* exposure to testosterone resulted in a significant increase in AGD with no time interactions (Figure 2). In male offspring, main treatment effects indicated a significant reduction in AGD in the group exposed *in utero* to flutamide (Figure 3; $p < 0.0001$). In addition, overall time effects revealed differences at times 4, 10, and 23 in relation to day 83 (reference). The overall interaction term between treatment and time ($p = 0.0003$) as well as the interaction between DEHP treatment and day 23 ($p = 0.041$) were significant, indicating that the AGD was reduced by DEHP at this time point. Post-hoc analyses

revealed that AGD in the flutamide group was significantly reduced at all time points ($p < 0.0001$), when compared to control group, i.e., days 4 (44.8%), 10 (33.1%), 23 (40.1%), 38 (32.5%), 53 (27.4%), 68 (26.0%), and 83 (24.3%). Although percentages of AGD decrease seem to be more pronounced at earlier ages, no time versus flutamide treatment interactions were observed in our modeled data. In the DEHP group, posthoc analyses indicated that AGD reduction was significant on PND 23 (12.5%; $p = 0.019$) and borderline significant on days 4 (19.5%; $p = 0.086$) and 38 (6.9%; $p = 0.080$) in relation to controls. Prenatal testosterone exposure did not have an overall effect on male AGD.

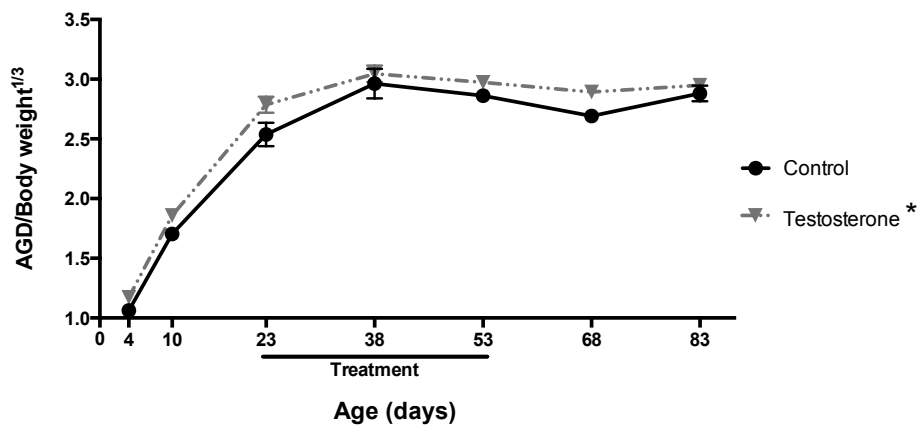


Figure 2: Effects of prenatal androgen manipulation on female rat AGD. Prenatal treatment with vehicle and testosterone (GD13-20) and postnatal treatment with vehicle (PND23-53). The data represent the mean and standard errors of corrected AGD ($AGD/body\ weight^{1/3}$) for unadjusted data at each time point. The adjusted (modeled) data included treatment and time as main effects and the litter as a random factor in the model. The AGD development in testosterone exposed animals was significantly different from controls. *Significant main treatment effects ($p < 0.05$).

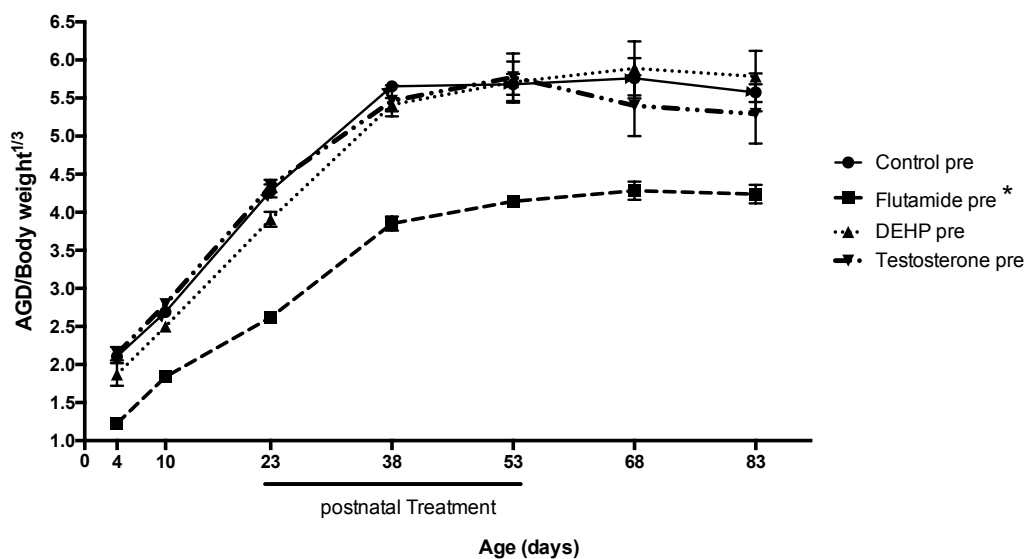


Figure 3. Effects of prenatal androgen manipulation on male rat AGD. Prenatal treatment with vehicle, flutamide, DEHP and testosterone (GD13-20) and postnatal treatment with vehicle (PND23-53). The data represent the mean and standard errors of corrected AGD (AGD/body weight^{1/3}) for unadjusted data at each time point. The adjusted (modeled) data included treatment, time and block as main effects and the litter as a random factor in the model. The AGD development was significantly different for the group exposed in utero to flutamide in relation to controls. Main time effects revealed differences at times 4, 10, and 23 in relation to day 83 (reference). A significant interaction between treatment and time was observed ($p=0.0003$). Post-hoc analyses revealed that AGD in flutamide group was significantly different from control in all time points, while for DEHP, AGD results were significantly different from control only on day 23 ($p=0.019$). * Significant main treatment effects ($p<0.05$).

Effects of postnatal androgen manipulation on AGD

The effects of postnatal androgen manipulation were investigated in animals exposed to different treatments *in utero*. Changes in AGD were evaluated from PND 23, which corresponds to the beginning of postnatal treatments, until adulthood (PND 83). Figure 4 shows the results of postnatal androgen manipulation in rats exposed *in utero* to vehicle. In our model, which included postnatal treatment, time and block as main effects and the litter as a random factor, we observed slight but significant reductions in AGD for testosterone (7.0-9.4%; $p<0.0001$), DEHP (3.2-4.4%; $p=0.0004$), and flutamide groups (2.9-3.0%; $p=0.0022$) in relation to control, with no time interactions. Overall time effects revealed that day 23 was significantly different from day 83 (reference). In female offspring, no significant results were seen for postnatal manipulation with testosterone (data not shown).

Figure 5 shows the effects of postnatal androgen manipulations in animals that were exposed in utero to flutamide. In this cohort, postnatal testosterone (6.6-10.5%; $p=0.0003$) and flutamide (6.1-9.7%; $p=0.0006$) significantly reduced AGD in relation to control in the modeled data, with no time interaction. Days 23 and 38 were significantly different from day 83.

In animals exposed in utero to DEHP, postnatal manipulation with testosterone induced a slight decrease in AGD in relation to control (6.6-9.9%; $p<0.0001$), without treatment versus time interactions (Figure 6). Main time effects indicated differences at days 23 and 38 in relation to day 83.

In the cohort exposed *in utero* to testosterone (Figure 7), the AGD was reduced in relation to control in the group treated postnatally with DEHP (6.0-7.7%; $p=0.011$). This effect was also observed in the group treated postnatally with testosterone, although not significantly so (4.1-5.2%; $p=0.071$). No treatment versus time interactions were observed and main time effects indicated differences only at day 23 in relation to day 83.

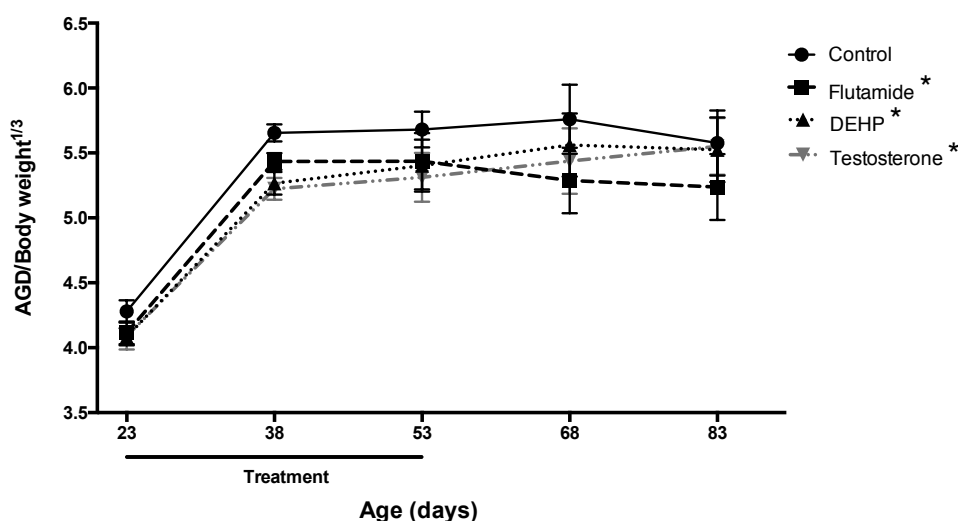


Figure 4. Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD. Male offspring rats were exposed *in utero* to canola oil (vehicle) and postnatally to vehicle, flutamide, DEHP, or testosterone from postnatal days 23 to 53. The data represent the mean and standard errors of corrected AGD (AGD/body weight^{1/3}) for unadjusted data at each time point. The adjusted (modeled) data included treatment, time and block as main effects and the litter as a random factor in the model. The AGD development was significantly different for the groups treated with testosterone, DEHP and flutamide, with no time interactions. Overall time effects revealed that day 23 was significantly different from day 83 (reference). * Significant main treatment effects ($p<0.05$).

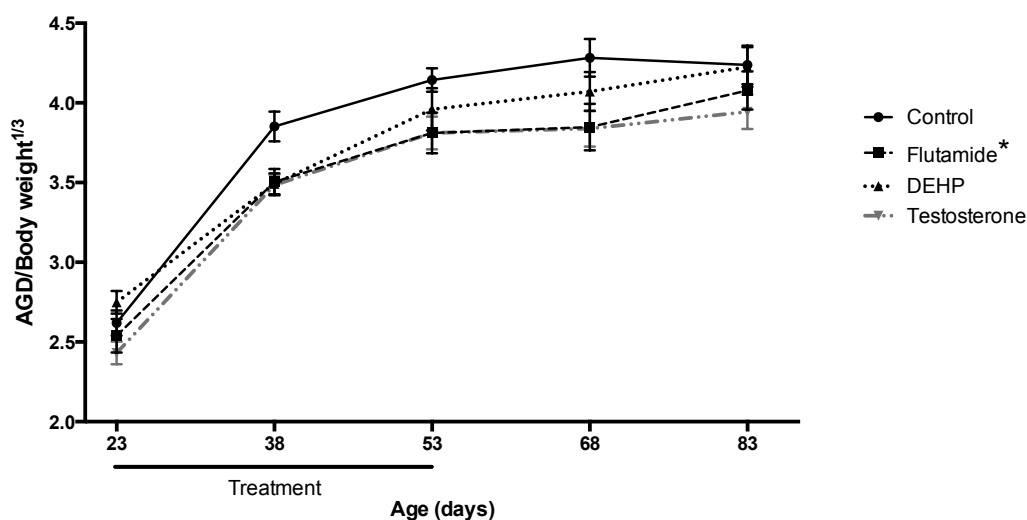


Figure 5. Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD following *in utero* exposure to flutamide. The data represent the mean and standard errors of corrected AGD ($\text{AGD}/\text{body weight}^{1/3}$) for unadjusted data at each time point. The adjusted (modeled) data included treatment, time and block as main effects and the litter as a random factor in the model. The AGD development was significantly different for the groups treated with testosterone and flutamide. Overall time effects revealed that days 23 and 38 were significantly different from day 83 (reference).

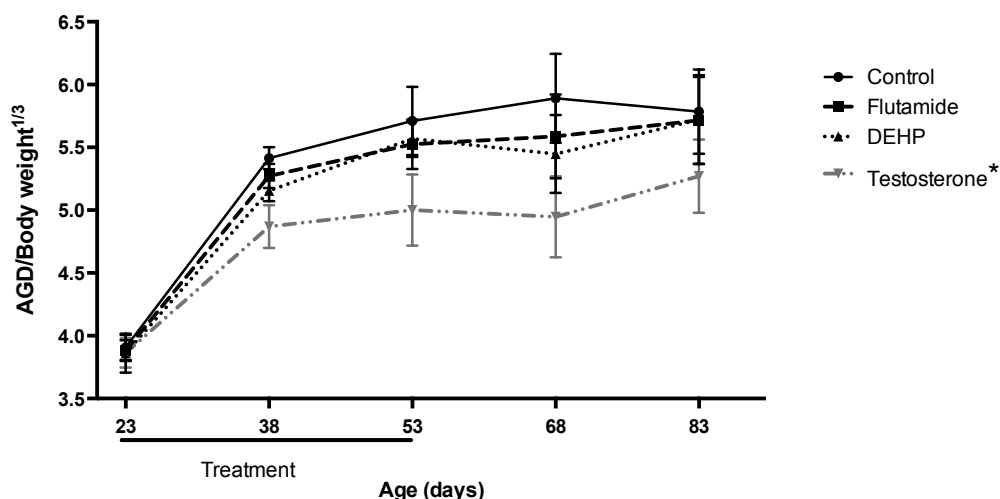


Figure 6. Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD following *in utero* exposure to DEHP. The data represent the mean and standard errors of corrected AGD ($\text{AGD}/\text{body weight}^{1/3}$) for unadjusted data at each time point. The adjusted (modeled) data included treatment, time and block as main effects and the litter as a random factor in the model. The AGD development was significantly different for the group treated with testosterone. Overall time effects revealed that days 23 and 38 were significantly different from day 83 (reference). * Significant main treatment effects ($p < 0.05$).

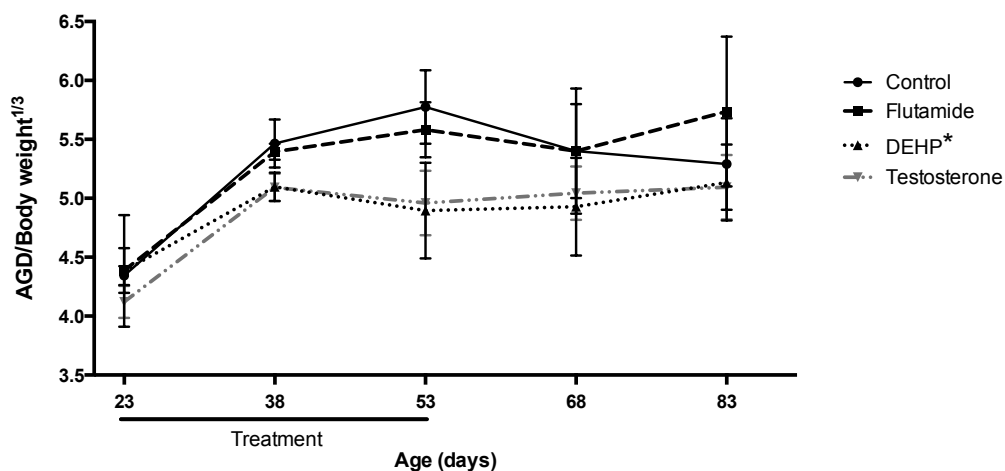


Figure 7. Effects of postnatal androgen manipulation on male rat AGD following *in utero* exposure testosterone. The data represent the mean and standard errors of corrected AGD (AGD/body weight^{1/3}) for unadjusted data at each time point. The adjusted (modeled) data included treatment, time and block as main effects and the litter as a random factor in the model. The AGD development was significantly different for the group treated with DEHP. Overall time effects revealed that day 23 was significantly different from day 83 (reference). * Significant main treatment effects ($p < 0.05$).

Preputial Separation

Data on preputial separation is shown on Figure 8. Prenatal exposure to flutamide significantly delayed the age at preputial separation. Overall postnatal treatments revealed a significant delay in the age at preputial separation in rats treated with flutamide or DEHP, whereas postnatal testosterone significantly advanced this pubertal landmark. A significant pre- versus postnatal interaction was observed ($p = 0.007$) and simple main effects indicate that postnatal DEHP ($p = 0.022$) further delayed the time to preputial separation in the group exposed *in utero* to flutamide.

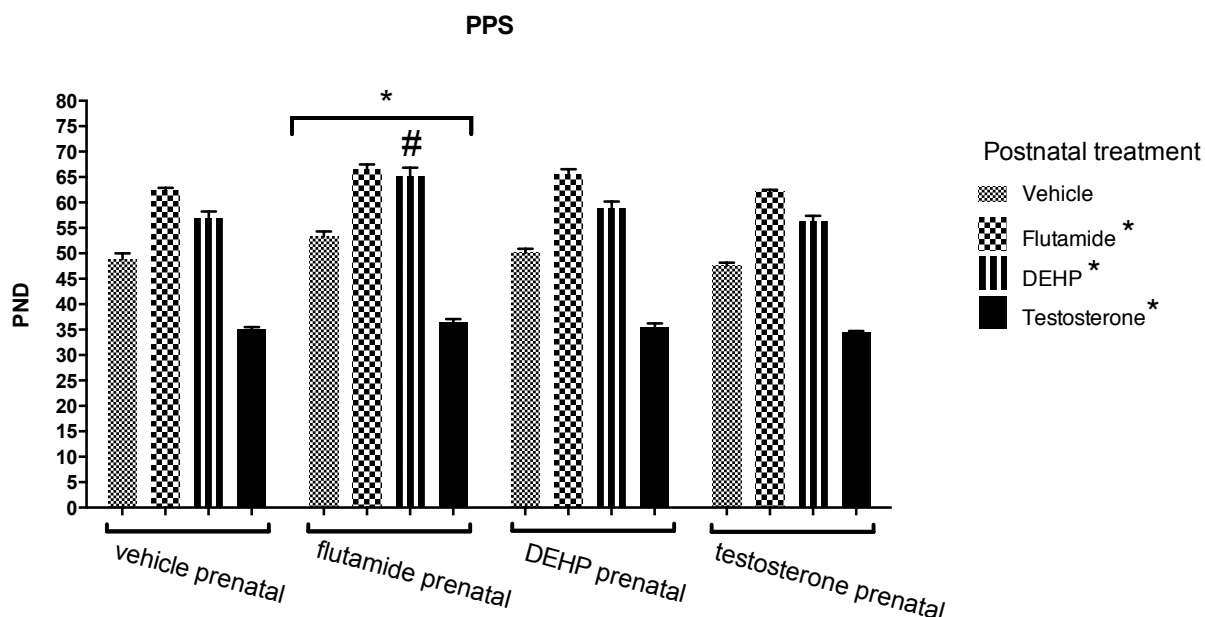


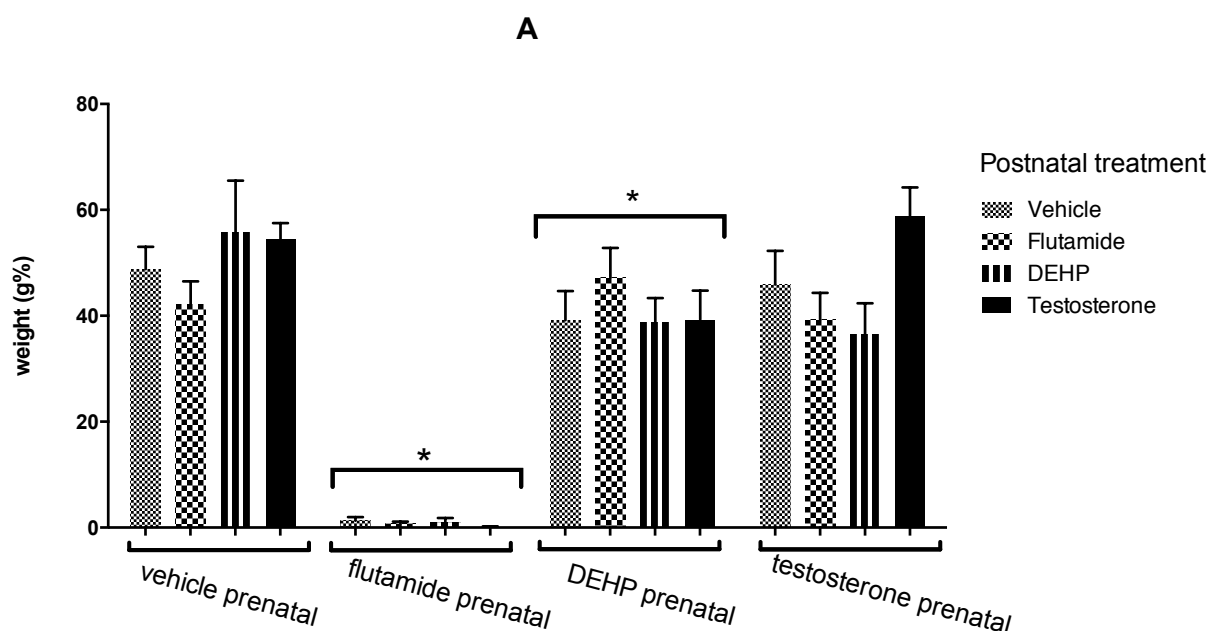
Figure 8. Age at preputial separation. The data represent the mean and standard errors of age at preputial separation (unadjusted data) of the descendants exposed pre- and postnatally to vehicle, flutamide, DEHP and testosterone. The adjusted (modeled) data included treatments (pre- and postnatal) and block as main effects and the litter as a random factor in the model. * Significant main effects ($p < 0.05$). # significant pre versus postnatal treatment interaction ($p < 0.05$). PND = postnatal day.

Reproductive tract malformations, organ weights, and spermatid number

The largest incidence of reproductive tract malformations was observed in rats exposed *in utero* to flutamide. Hypospadias were observed in 33 out of 58 animals (56.9%) in this group. One animal in the DEHP group (total $N=38$) also displayed this malformation. Cryptorchidism was seen in 28 animals (48.3%) in the group exposed *in utero* to flutamide (19 bilateral and 9 unilateral). Unilateral cryptorchidism was also seen in one control and one DEHP exposed rat. Vaginal pouch and cleft prepuce were detected in 41 (70.7%) and 16 (27.6%) rats exposed *in utero* to flutamide, but not in other treatment groups.

Endocrine sensitive organs were collected at adulthood, approximately 35 days after finishing the postnatal treatment. The relative organ weights, spermatid counts and the penile length are shown in Figures 9 and 10. Main prenatal effects revealed that *in utero* flutamide exposure significantly reduced the weight of ventral prostate, seminal vesicle, LABC, and the length of penis. The effects were more pronounced

on prostate than on other reproductive organs. Prenatal DEHP exposure significantly reduced the weight of prostate, seminal vesicle, and LABC, and induced a nonsignificant reduction in the penile length ($p=0.085$). For seminal vesicle weight we observed a significant pre- versus postnatal interaction and the simple main effects revealed that postnatal DEHP exposure significantly increased the seminal vesicle weight in animals treated prenatally with flutamide, DEHP, and testosterone in relation to their respective controls. Similarly, postnatal flutamide exposure increased seminal vesicle weight in rats exposed *in utero* to DEHP. Overall testosterone treatment during the postnatal phase significantly reduced the weights of LABC and scrotal testis. In addition, postnatal testosterone and flutamide treatments reduced the number of homogenization resistant spermatids. Significant interactions between pre- versus postnatal treatments were observed for testes weight and spermatid counts. Postnatal DEHP treatment reduced the weight of testis in rats prenatally exposed to testosterone and the number of spermatids in prenatal cohorts exposed to flutamide and testosterone.



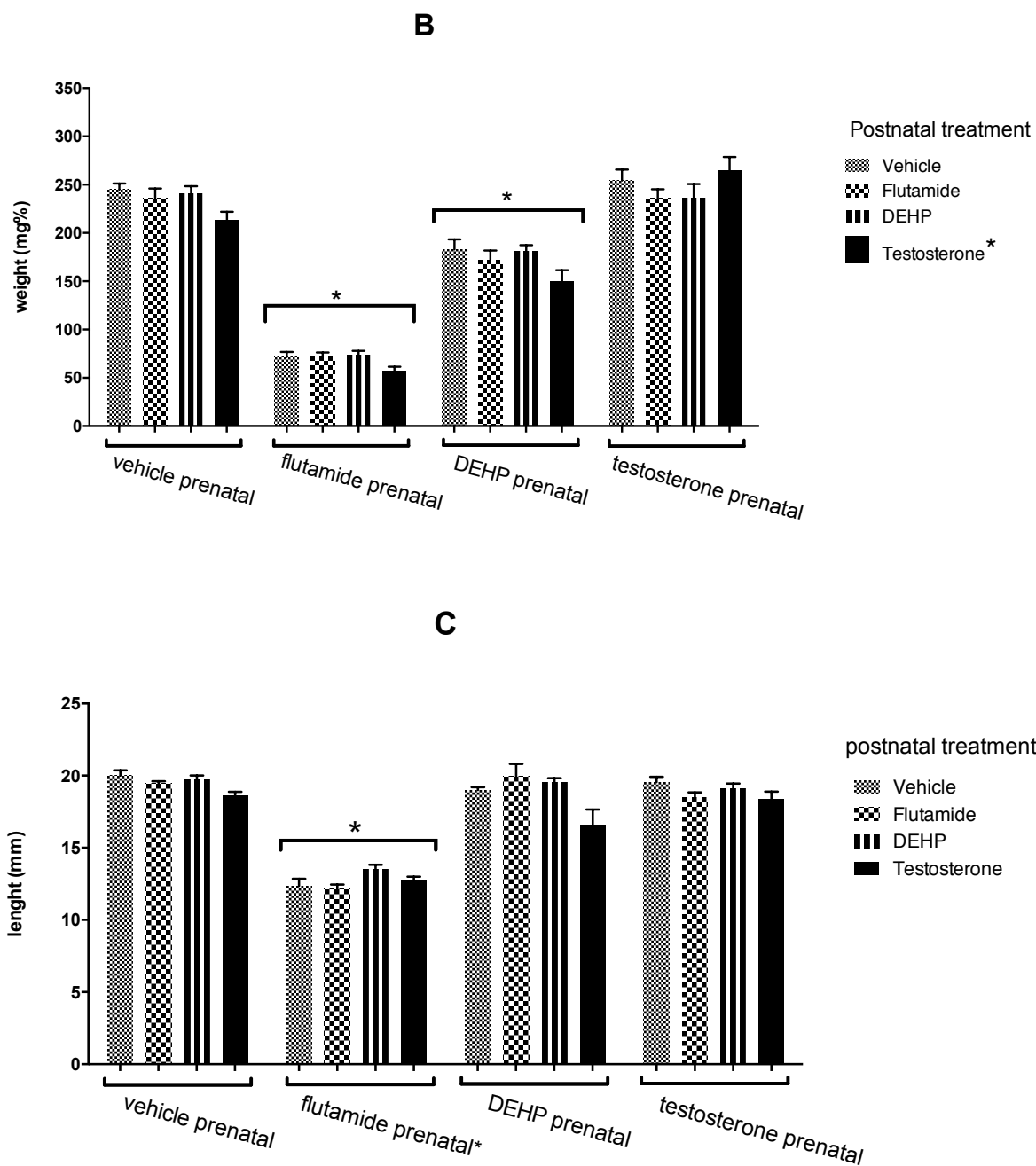
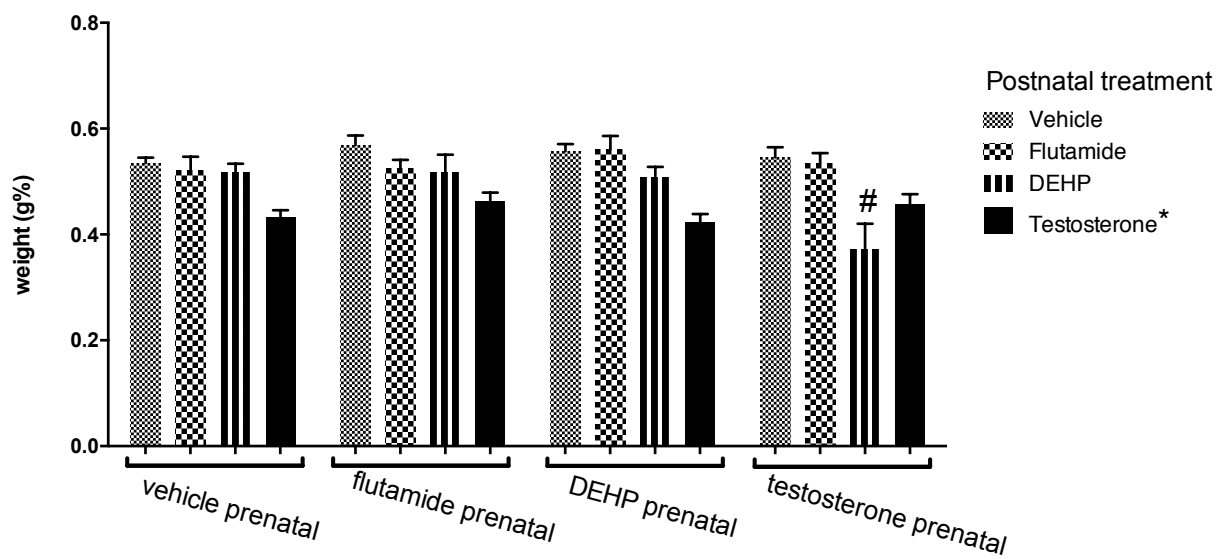
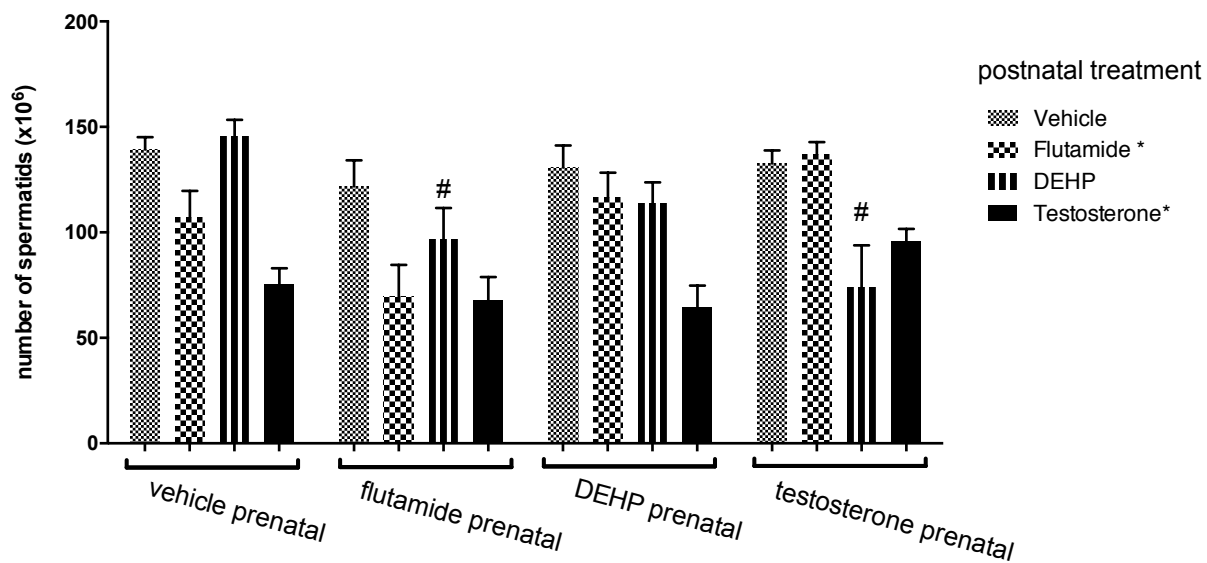


Figure 09. Reproductive endpoints at termination. A) Prostate; B) LABC; C) Penis length. The data represent the mean and standard errors of unadjusted data of groups exposed pre- and postnatally to vehicle, flutamide, DEHP and testosterone. The adjusted (modeled) data included treatments (pre- and postnatal) and block as main effects and the litter as a random factor in the model. Penis length was obtained only in the second block of experiments. * Significant main effects ($p < 0.05$).

D



E



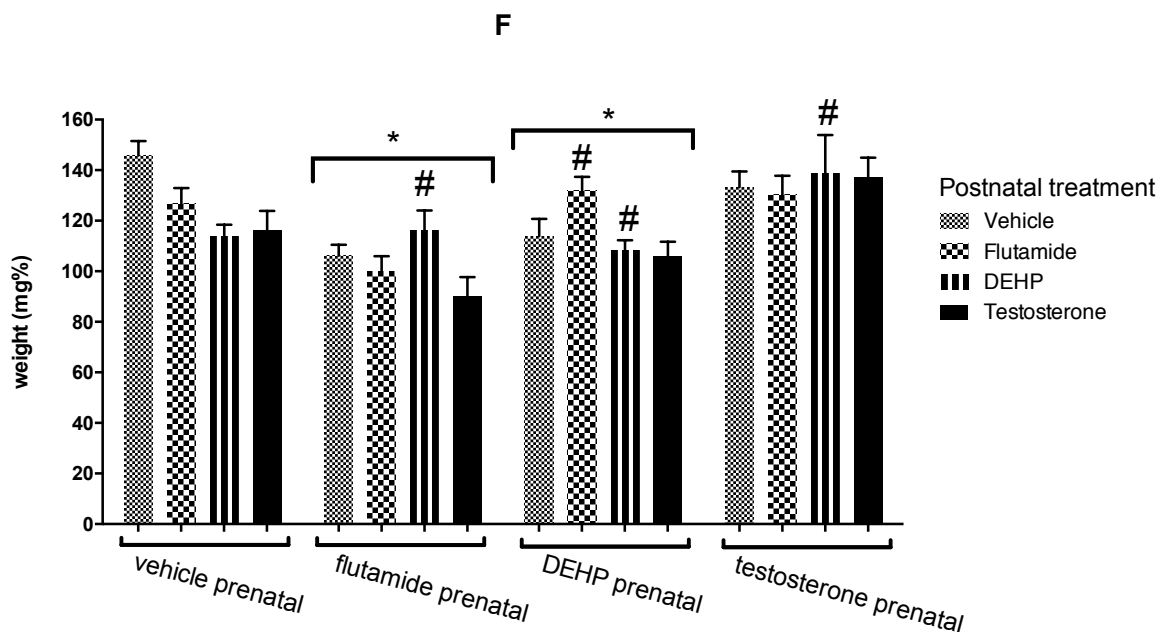


Figure 10. Reproductive endpoints at termination. D) Scrotal testes; E) Spermatid count; F) Seminal vesicle. The data represent the mean and standard errors of unadjusted data of groups exposed pre- and postnatally to vehicle, flutamide, DEHP and testosterone. The adjusted (modeled) data included treatments (pre- and postnatal) and block as main effects and the litter as a random factor in the model. * Significant main effects ($p < 0.05$). # significant pre- versus postnatal treatment interaction ($p < 0.05$).

DISCUSSION

In the present study we used pharmacological tools to manipulate the androgen environment *in utero* and during puberty, critical periods for male reproductive development, and determine the plasticity of the anogenital distance and reproductive organs. We used the potent androgen antagonist flutamide, the plasticizer DEHP, which inhibits testosterone biosynthesis, and the androgen testosterone. Our results indicate that AGD is extremely sensitive to impairment of androgen action *in utero*, in particular to effects mediated by flutamide, whereas it can also slightly respond to hormonal stimuli during pubertal development.

The effects of prenatal androgen manipulation were examined in rats treated postnatally with vehicle. In this cohort, we observed a significant shortening of AGD in male offspring exposed to flutamide (24 to 45%) in relation to controls at the different time points investigated. No overall prenatal treatment effect was seen for DEHP, but a significant time versus DEHP treatment interaction was seen on PND 23, indicating a reduction in AGD at this time point. Except for this change, no other time versus treatment interactions were seen. In general, AGD increased from PND 4

to 38, remaining constant thereafter. Prenatal testosterone did not induce any significant change on male AGD, indicating that there is a maximum potential for AGD growth that is programmed in utero and that additional prenatal exposure to androgens may not modify this endpoint (“ceiling effect”). This observation has already been made in other studies using prenatal testosterone treatment (SCOTT et al., 2007). However, we did see a significant increase in AGD in female offspring exposed *in utero* to testosterone, indicating that the growth of the perineum is sensitive to androgens in both genders. The fact that prenatal flutamide induced severe reductions in AGD, while DEHP produced little or no change in this endpoint even at a high dose (750 mg/kg/day) is possibly related to the mechanism of anti-androgen action of these compounds as well as the susceptibility of the developing male rat to phthalates. Even though active phthalates such as DEHP and Di-butyl phthalate (DBP) can impair the testosterone biosynthesis by the fetal testis, several studies report only discrete changes in male rat AGD. The relative mild AGD effects following *in utero* exposure to phthalates may be related to age-dependent differences in the susceptibility to suppression of testosterone production by these compounds. For example, it has been demonstrated that suppression of testosterone by DBP is more marked on gestation days 20-21 than on earlier stages that include the MPW, the critical time window for AGD programming (SCOTT et al., 2008; WELSH et al., 2008). On the other hand, human epidemiological studies indicate associations between low-dose maternal phthalate exposures (3-5 orders of magnitude lower than those typically used in rat studies) and short male AGD (SWAN et al., 2005, 2015), suggesting a higher susceptibility of the human fetal testis.

The effects of postnatal androgen manipulations on AGD were examined in the cohort exposed *in utero* to vehicle. Main treatment effects revealed slight but significant reductions in AGD, which were constant over time (no treatment versus time interactions) in all postnatal groups. Surprisingly, the most pronounced reductions in AGD were seen in the group treated postnatally with testosterone (7.0-9.4% in relation to controls). Overall time effects indicated that AGD elongated until day 38, remaining constant thereafter. The effects of postnatal manipulations were also examined in cohorts exposed *in utero* to flutamide, DEHP, and testosterone. Postnatal testosterone treatment significantly shortened the AGD in rats exposed in utero to flutamide (6.6-10.5%) and DEHP (6.6-9.9%) and induced a borderline reduction in animals exposed in utero to testosterone (4.1-5.2%). Postnatal flutamide

shortened AGD in animals pre-exposed to this drug *in utero* (flutamide/flutamide), while postnatal DEHP reduced AGD in animals that were exposed prenatally to testosterone. Taken together these results indicate that male rat AGD is responsive to hormonal stimuli during pubertal development, being negatively modulated by high doses of anti-androgens and testosterone. Interestingly, the most consistent results were seen following testosterone treatment, which reduced AGD regardless of the prenatal treatment received.

Recently, Mitchell et al., (2015) suggested that postnatal AGD plasticity may be related to the androgen:estrogen balance. According to this hypothesis, perturbations of this hormonal balance, such as those caused by increased exposure to estrogens or unopposed estrogenic action induced by severe androgen suppression, might impair the normal growth of the perineum towards its maximum length programmed during fetal life. In the study by Mitchell et al (2015), castration permanently reduced AGD in adult male rats (~17%), while a high flutamide dose (100 mg/kg/day) did not induce any significant changes. On the other hand, the potent estrogen Diethylstilbestrol (DES; 100 µg/kg applied every three days by subcutaneous injections) reduced the AGD (~11%) at the end of a 5-week treatment, but the values returned to “normal” after a washout period of 4 weeks. In our results, the shortening in AGD induced by postnatal testosterone treatment might be related to changes in the androgen:estrogen balance, as we treated the animals for 30 days with daily doses of testosterone, an aromatizable androgen. In future studies, the use of non-aromatizable androgens (e.g., dihydrotestosterone) and the measurement of estrogens in testosterone-treated rats may further confirm this hypothesis. The fact that we also observed reductions in AGD after treatment with the two anti-androgens used (flutamide and DEHP) indicates that suppression of androgen action in pubertal animals may be more critical to AGD plasticity than for adults, as Mitchell et al., (2015) failed to see changes in adult AGD following a high dose treatment with flutamide.

In relation to the endpoints examined at termination, main prenatal effects revealed significant reductions in the relative weights of ventral prostate, seminal vesicle, and LABC and shortening of penile length in male offspring exposed *in utero* to flutamide. The prenatal flutamide effects were more severe on the ventral prostate with complete agenesis of this tissue in many exposed animals. No overall prenatal treatment effects were seen on testis weight even in the flutamide group. The more

pronounced *in utero* effects of flutamide on ventral prostate, LABC, penis length and AGD indicate that this drug effectively blocked the androgen action in peripheral tissues, while it produced none or only discrete anti-androgenic effects in sites that display high local testosterone content, such as the testis and Wolffian duct derivatives (seminal vesicle). *In utero* DEHP exposure reduced ventral prostate, seminal vesicle and LABC weights, but similarly to AGD the effects were more discrete than those seen for the group prenatally exposed to flutamide, perhaps reflecting the partial suppression of testosterone production and age-dependent susceptibility of the fetal testis to this effect, as described above. Flutamide was also the only prenatal treatment able to induce reproductive tract malformations, which reflect the severe suppression of androgen action induced by this drug in our protocol. In addition, prenatal flutamide also delayed the age at preputial separation, an external marker of puberty onset in rats. However, this endpoint was more markedly affected by postnatal treatments. Postnatal flutamide and DEHP significantly delayed the age at preputial separation, while testosterone advanced this landmark. In rats treated prenatally with flutamide, postnatal DEHP further delayed the age of preputial separation, suggesting that a second anti-androgenic hit can further delay male pubertal development.

Overall, postnatal treatments did not induce significant main effects in reproductive organs collected at adulthood, except for the testis and LABC. However, it is important to highlight that termination occurred around 35 days after postnatal manipulations, a time interval that may have allowed a recovery of affected organs. Surprisingly, interaction analysis revealed that postnatal DEHP increased the weight of seminal vesicle in groups exposed prenatally to flutamide, DEHP and testosterone, while postnatal flutamide increased seminal vesicle weight in animals exposed *in utero* to DEHP. The significance of these effects are unknown, but may be also related to the time interval between postnatal exposures and termination, e.g., a transient rebound effect following anti-androgenic exposure. Postnatal treatment with testosterone significantly reduced the weight of testis and LABC as well as the number of homogenization resistant spermatids measured at adulthood. The number of spermatids was also reduced by postnatal treatment with flutamide. The testicular effects were expected and possibly reflect the inhibition of hypothalamic-pituitary-gonadal axis by testosterone and the severe suppression of androgen action by flutamide, which may have long-lasting effects on spermatogenesis, a process that

requires approximately 60 days for completion in the rat. Postnatal DEHP treatment significantly decreased testis weight in rats exposed *in utero* to testosterone and reduced the number of spermatids in animals prenatally exposed to flutamide and testosterone. Here it is important to recognize that DEHP is a testicular toxicant that may affect the testis by mechanisms other than those related to endocrine disruption. Although we can not distinguish between endocrine and non-endocrine mediated effects, our results suggest that certain manipulations of the prenatal endocrine environment may favor the negative impact of DEHP on the testis.

Overall, our rat study indicates that male AGD is a stable anatomical landmark that reflects the androgen action *in utero*, although it can also be slightly responsive to changes in the androgen environment during the pubertal development. Similarly, other endpoints such as reproductive organs weights seem to be more dependent on the prenatal endocrine environment, although the disruption of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in postnatal life may complicate the interpretation of some results and the utility of certain endpoints as markers of *in utero* androgen exposure. In addition, not all endpoints are non-invasive and readily translatable to humans as the AGD. The postnatal plasticity of AGD seems to be limited to exposures to high doses of androgens or anti-androgens, which can both slightly reduce male AGD. These results confirm and extend prior findings on AGD plasticity in adult rats, indicating that under normal physiological conditions and environmentally relevant exposure scenarios to endocrine disruptors no significant changes in AGD are expected in postnatal life.

4. DISCUSSÃO

O uso da distância anogenital como marcador do ambiente endócrino pré-natal está sendo estudado por muitos pesquisadores, uma vez que este parâmetro pode ser muito susceptível a estímulos hormonais durante o desenvolvimento intrauterino, em particular à ação androgênica. Neste estudo o ambiente endócrino foi influenciado através de manipulação farmacológica durante o desenvolvimento *in utero* e pubertal, períodos críticos do desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino, com o intuito de elucidar a plasticidade da AGD e órgãos reprodutivos. Para tanto, utilizamos o fármaco flutamida – potente antagonista androgênico, o DEHP, inibidor da síntese de androgênios, e a testosterona.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram prevalência de alterações nos indivíduos tratados *in utero*, indicando que a AGD é extremamente sensível a danos sobre a ação androgênica pré-natal, em particular aos efeitos mediados pela flutamida, e efeitos menos exacerbados quando expostos no período púbere.

Os efeitos da manipulação androgênica pré-natal foram investigados nos indivíduos tratados com veículo no período pós-natal – Grupos controle-pós (Veículo/Veículo, Flutamida/Veículo, DEHP/Veículo e Testosterona/Veículo). O grupo Flutamida *in utero* apresentou uma redução significativa da AGD nos diferentes pontos investigados, permanecendo reduzida em relação ao grupo controle durante todo o desenvolvimento até a fase adulta, corroborando com resultados encontrados por McIntyre et al. (2001). O grupo exposto *in utero* ao DEHP apresentou apenas efeitos discretos sobre a AGD, porém uma interação DEHP x tempo foi observada em PND 23, caracterizado por uma redução da AGD neste ponto. Com exceção desta alteração, não foram observadas outras interações tempo x tratamento neste grupo. Em geral, a AGD apresentou um aumento do PND 4 ao PND 38, permanecendo constante posteriormente, até a idade adulta.

Os efeitos relativamente moderados da exposição de ftalatos *in utero* sobre a AGD podem estar relacionados a diferenças dependentes de idade na susceptibilidade da supressão da produção de testosterona por esses compostos. Estudos realizados por Scott et al., (2008) e Welsh et al., (2008), demonstraram que a supressão de testosterona por DBP é mais evidente nos dias gestacionais 20 a 21 do que em períodos anteriores que incluem a MPW, etapa crítica para a programação da AGD. Por outro lado, estudos epidemiológicos com humanos

indicam associações entre exposições maternas de baixa dosagem e AGD reduzidas em descendentes do sexo masculino (SWAN et al., 2005, 2015) sugerindo alta susceptibilidade dos testículos fetais humanos.

Durante o desenvolvimento embrionário e a puberdade, o aumento da concentração de testosterona promove o desenvolvimento da AGD até atingir sua extensão máxima pré-definida. A ação de Desreguladores Endócrinos durante o período de desenvolvimento pré-natal pode afetar o desenvolvimento da AGD, de modo a alterar essa programação e afetar de maneira permanente seu tamanho final. A exposição *in utero* à testosterona não induziu nenhuma mudança significativa na AGD dos descendentes machos, o que significa que a exposição a andrógenos durante a janela de programação da masculinização (MPW) em machos delimita qual será o tamanho máximo (“ceiling effect”) que a AGD pode alcançar (MITCHELL et al., 2015), e a exposição pré-natal adicional a andrógenos não é capaz de alterar essa programação. A ausência de efeitos da testosterona pré-natal em machos já foi demonstrada em estudo efetuado por Scott et al., (2007). Por outro lado, a exposição *in utero* à testosterona foi capaz de aumentar a AGD em fêmeas, corroborando a hipótese de que, abaixo de determinado limiar, o crescimento do períneo é sensível a androgênios no período pré-natal.

Os resultados da manipulação androgênica pós-natal foram verificados nos indivíduos tratados com veículo pré-natal. Os principais efeitos do tratamento pós-natal demonstraram redução pequena, mas significativa da AGD, as quais apresentaram-se constantes durante o desenvolvimento dos descendentes, não havendo interação tratamento x tempo em todos os grupos pós-natais. De maneira inusitada, o grupo tratado com testosterona pós-natal exibiu as reduções mais pronunciadas na AGD com variação de 7,0 – 9,4% em relação ao grupo controle.

O tratamento pós-natal com testosterona também apresentou uma redução significativa na AGD dos descendentes expostos *in utero* a flutamida e DEHP com variação de 6,2 – 10,5% e 6,6 – 9,9% respectivamente; no grupo tratado com testosterona *in utero* o tratamento pós-natal com esse hormônio induziu uma redução moderada (4,1 – 5,2%). O tratamento com flutamida pós-natal exibiu maior redução da AGD nos descendentes do grupo flutamida pré-natal (flutamida/flutamida), enquanto o grupo DEHP pós-natal apresentou redução na AGD dos animais expostos a testosterona pré-natal. O conjunto desses resultados indica que a AGD dos descendentes machos é responsiva ao estímulo hormonal

durante o desenvolvimento pubertal. De maneira curiosa, os resultados mais consistentes foram do tratamento com testosterona pós-natal, que induziu redução da AGD independentemente do tratamento recebido no período pré-natal.

Mitchell et al., (2015) sugerem que a plasticidade pós-natal da AGD pode estar relacionada ao balanço testosterona/estradiol. Como o equilíbrio nas concentrações desses dois hormônios é sensível, aumentos sutis na concentração sérica de estradiol podem ser suficientes para desencadear alterações plásticas na AGD. De acordo com sua hipótese, a presença de andrógenos deve ser suficiente para suprimir uma sinalização estrogênica anormal e esta supressão na sinalização é importante para assegurar o equilíbrio da concentração testosterona/estradiol e a maximização da AGD. Perturbações neste equilíbrio hormonal, causadas por exposição exógena a estrógenos ou sobreposição de ações estrogênicas resultantes de severa supressão androgênica, podem prejudicar o desenvolvimento normal do períneo alterando a programação do comprimento máximo durante a vida fetal. No estudo de Mitchell et al., (2015) ratos adultos castrados tiveram uma redução permanente da AGD (~17%), enquanto doses elevadas de flutamida (100mg/kg/dia) não induziram mudanças significativas. Por outro lado, tratamento com Diethylstilbestrol (DES – 100µg/kg) aplicado a cada três dias durante 5 semanas através de injeção subcutânea resultou em redução de aproximadamente 11% na AGD ao final do tratamento, porém os valores de AGD retornaram próximos ao comprimento normal após um período de 4 semanas.

No presente estudo, os resultados do encurtamento da AGD induzidos pelo tratamento pós-natal com testosterona podem estar relacionados a mudanças no equilíbrio testosterona/estradiol, uma vez que nosso protocolo incluiu tratamento diário dos animais com testosterona (andrógeno aromatizável) durante 30 dias. Em estudos futuros esta hipótese pode ser comprovada com o uso de andrógenos não aromatizáveis, como a diidrotestosterona (DHT), e a dosagem de estrógenos nos ratos tratados com testosterona. O fato de também observarmos redução na AGD após o tratamento com dois agentes antiandrogênicos (flutamida e DEHP) indica que a supressão da ação andrógena em animais púberes pode ser mais crítica do que para indivíduos adultos, como visto nos resultados de Mitchell et al., (2015), onde não foram observadas mudanças na AGD de ratos adultos após tratamento com flutamida.

Com relação aos dados coletados na eutanásia, o tratamento pré-natal revelou redução significativa no peso relativo da próstata ventral, vesícula seminal e músculo levantador do ânus/bulbocavernoso (LABC) e redução do comprimento do pênis nos ratos expostos *in utero* a flutamida. Os efeitos da flutamida pré-natal foram mais severos sobre a próstata ventral, manifestando agenesia completa deste tecido na maioria dos animais expostos. Não houve efeitos significativos das exposições pré-natais sobre os testículos, mesmo nos animais expostos à flutamida. Os efeitos pré-natais mais marcantes do tratamento com flutamida sobre a próstata ventral, LABC, comprimento de pênis e AGD indicam que este fármaco bloqueia de forma eficaz a ação androgênica em tecidos periféricos, enquanto produz pouco ou nenhum efeito antiandrogênico em locais que contém altas concentrações de testosterona, como os testículos e derivados dos ductos de Wolff (vesícula seminal). Segundo Foster; et al. (2005) as alterações no trato reprodutivo induzidas pela exposição a flutamida são dependentes do período de exposição durante a gestação (tecidos andrógeno-dependentes, AGD e genitália externa). Isso deve-se ao fato dos receptores andrógenos não se formarem até aproximadamente GD 14, e na pré-implantação do embrião, a expressão das proteínas dos receptores andrógenos e desenvolvimento sexual ainda não iniciaram, portanto, a ação antiandrogênica da flutamida não possui efeito antes da MPW (GOTO et al. 2004). A exposição ao DEHP *in utero* induziu redução da próstata ventral, vesícula seminal e peso do LABC, porém, de forma semelhante ao observado para a AGD, os efeitos foram mais discretos quando comparados ao grupo flutamida pré-natal, provavelmente devido a uma supressão parcial da produção androgênica e/ou da susceptibilidade do testículo fetal vinculada à idade.

A flutamida foi o único tratamento pré-natal capaz de induzir má-formação no trato reprodutivo, refletindo a severa supressão da ação androgênica induzida por esse fármaco em nosso protocolo. A separação prepucial (PPS), marcador do início da puberdade, apresentou variação significativa entre os descendentes dos grupos do tratamento pós-natal, exibindo atraso para os grupos tratados com flutamida e DEHP pós-natal e adiantamento para os descendentes tratados com testosterona pós-natal em relação ao grupo controle. Os ratos tratados com flutamida pré-natal e DEHP pós-natal apresentaram maior atraso na separação prepucial, sugerindo que uma segunda exposição antiandrogênica pode atrasar ainda mais o desenvolvimento púbere.

5. CONCLUSÃO

De maneira geral, nosso estudo indica que a AGD é um marcador anatômico estável que reflete a ação andrógena *in utero*, mas que também pode ser levemente responsiva a mudanças no ambiente androgênico durante o desenvolvimento pubertal. De maneira semelhante, outros parâmetros como peso de órgãos reprodutivos parecem ser mais dependentes do ambiente endócrino pré-natal. Entretanto, a alteração da homeostase do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas no período pós-natal pode dificultar a interpretação de alguns resultados e a utilidade de certos parâmetros como marcadores da exposição androgênica *in utero*. Além disso, nem todos os parâmetros testados são não invasivos e transponíveis facilmente para uso em humanos como a AGD. A plasticidade pós-natal da AGD parece ser limitada a doses altas de andrógenos ou antiandrógenos, que em ambos os casos causam pequena redução da AGD de indivíduos do sexo masculino.

Estes resultados confirmam e ampliam descobertas anteriores sobre a plasticidade da AGD em ratos adultos, indicando que sob condições fisiológicas normais e exposições a doses ambientalmente relevantes de desreguladores endócrinos não são esperadas alterações significativas na AGD na vida pós-natal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. J. M. et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 64–74, 1 2006.

BARLOW, N. J. et al. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 431–41, 2003.

BAY, K. et al. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disruptors. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 20, n. 1, p. 77–90, 2006.

BECK, M. J. et al. CHAPTER 8 Nonclinical Juvenile Toxicity Testing. 2006.

BIRNBAUM, L. S. State of the science of endocrine disruptors. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 4, p. A107, 2013.

DEAN, A et al. The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on reproductive development in male and female rats. **International journal of andrology**, v. 35, n. 3, p. 330–9, 2012.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, 2009.

FOSTER, P. M. D.; HARRIS, M. W. Changes in androgen-mediated reproductive development in male rat offspring following exposure to a single oral dose of flutamide at different gestational ages. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 1024–32, 2005.

GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: Potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

GRAY, L. E. et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 58, n. 2, p. 350–65, 2000.

GRAY, L. E. et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. **Human reproduction update**, v. 7, n. 3, p. 248–64, 2001.

HOTCHKISS, A. K. et al. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 335–45, 2007.

KASSIM, N. M. et al. The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. **Journal of anatomy**, v. 190 (Pt 4, p. 577–88, 1997.

KAZUNORI GOTO , KEIJI KOIZUMI, H. T. et al. EFFECTS OF FLUTAMIDE ON SEX MATURATION AND BEHAVIOR OF OFFSPRING BORN TO FEMALE RATS TREATED DURING LATE PREGNANCY. **The Journal of toxicological sciences**, v. 29, n. 5, p. 517–34, 2004.

MACLEOD, D. J. et al. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. **International journal of andrology**, v. 33, n. 2, p. 279–87, 2010.

MARONA, R. N. et al. Flutamida : Revisão de suas propriedades farmacológicas e físico- químicas . Métodos de análise em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 1, p. 37–44, 2003.

MCINTYRE, B. S.; BARLOW, N. J.; FOSTER, P. M. D. Androgen-Mediated Development in Male Rat Offspring Exposed to Flutamide in Utero : Permanence and Correlation of Early Postnatal Changes in Anogenital Distance and Nipple Retention with Malformations in Androgen-Dependent Tissues. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 249, n. 2, p. 236–249, 2001.

MENDIOLA, J. et al. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. **Environmental health perspectives**, v. 119, n. 7, p. 958–63, 2011.

MITCHELL, R. T. et al. Anogenital Distance Plasticity in Adulthood: Implications for Its Use as a Biomarker of Fetal Androgen Action. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 24–31, 2015.

MOORE, R. W. et al. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. 3, p. 229–37, 2001.

MYLCHREEST, E. et al. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 156, n. 2, p. 81–95, 15 1999.

NORDKAP, L. et al. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, n. 2, p. 221–230, 2012.

PARKS, L. G. et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 58, n. 2, p. 339–49, 2000.

PAULOZZI, L. J. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 4, p. 297–302, 1999.

RICCERI, L. et al. Developmental Neurotoxicity of Organophosphorous Pesticides : Fetal and Neonatal Exposure to Chlorpyrifos Alters Sex-Specific Behaviors at Adulthood in Mice. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 93, n. 1, p. 105–113, 2006.

SCOTT, H. M. et al. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2027–36, 2007.

SCOTT, H. M. et al. Relationship between androgen action in the “male programming window,” fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5280–7, 2008.

SHARPE, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 20, n. 1, p. 91–110, 2006.

SHULTZ, V. D. et al. Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 64, n. 2, p. 233–42, 2001.

SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 16, n. 5, p. 972–8, 2001.

SWAN, S. H. et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 8, p. 1056–1061, 2005.

SWAN, S. H. et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. **Human Reproduction**, v. 30, n. 4, p. 963–972, 2015.

TABB, M. M.; BLUMBERG, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 20, n. 3, p. 475–82, 2006.

TOLEDO, F. C. et al. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 9, n. 1, p. 94, 2011.

TOPPARI, J. et al. Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. **Environmental health perspectives**, v. 104, n. August, p. 741–803, 1996.

VAN DEN DRIESCHE, S. et al. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. **International journal of andrology**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. e578–86, 2011.

VAN DEN DRIESCHE, S. et al. Inter-relationship between testicular dysgenesis and Leydig cell function in the masculinization programming window in the rat. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30111, 2012.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization , disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. v. 118, n. 4, 2008.

WELSH, M. et al. Critical androgen-sensitive periods of rat penis and clitoris development. **International journal of andrology**, v. 33, n. 1, p. e144–52, fev. 2010.

WILSON, V. S. et al. Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague–Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure. **Toxicology Letters**, v. 170, n. 3, p. 177–184, 2007.

WOLF, C. J. et al. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 65, n. 1, p. 71–86, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **State of the Science: Endocrine Disrupting Chemicals - 2012, Summary for Decision Makers**. [s.l: s.n.].