

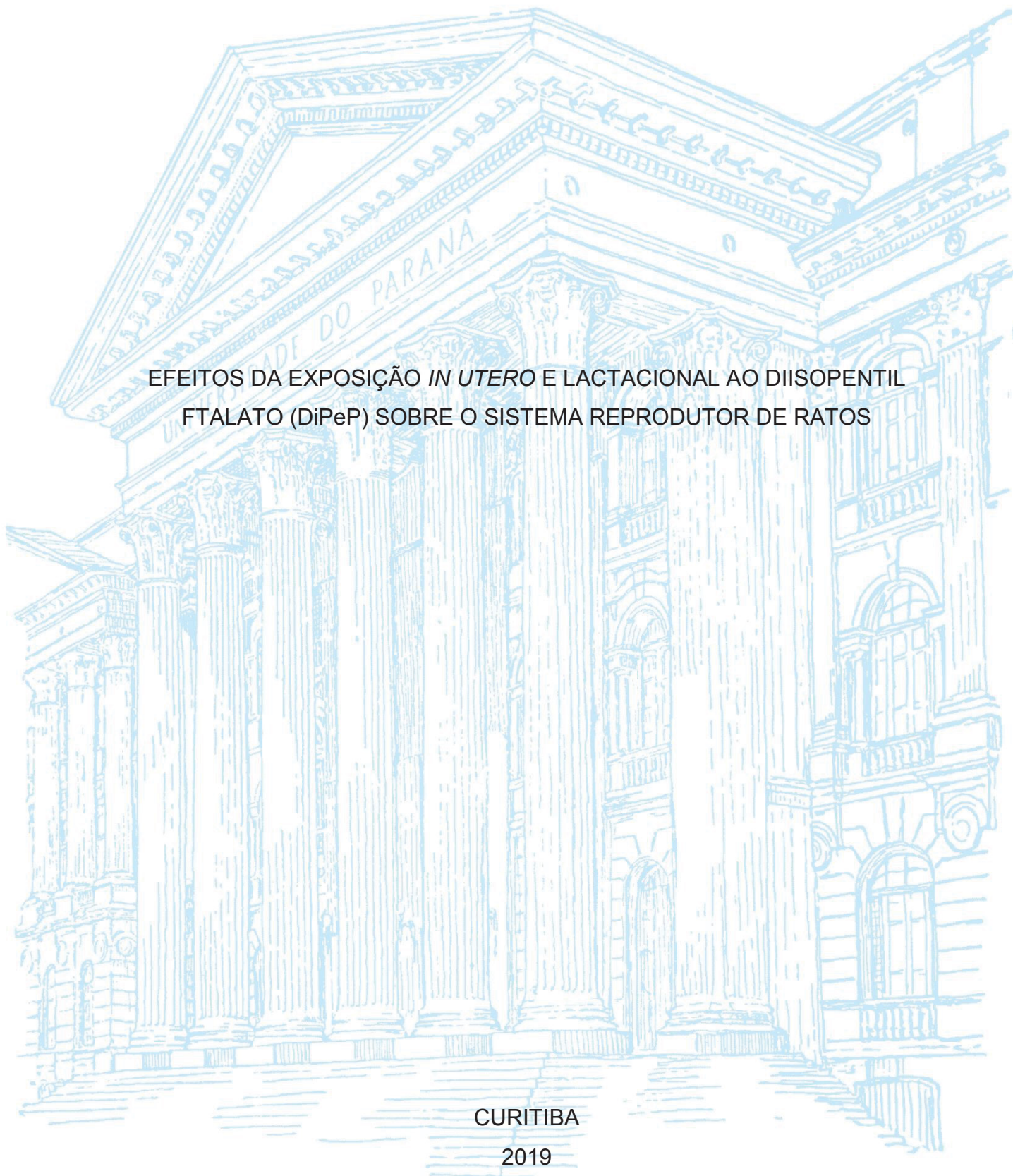
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA ZAUER CURI

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIISOPENTIL
FTALATO (DiPeP) SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS

CURITIBA

2019



TATIANA ZAUER CURTI

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO DIISOPENTIL
FTALATO (DiPeP) SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia, no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração Toxicologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2019

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

Curi, Tatiana Zauer

Efeitos da exposição *in utero* e lactacional ao Diisopentil ftalato (DiPeP) sobre o sistema reprodutor de ratos. / Tatiana Zauer Curi. – Curitiba, 2019. 63 p.: il.

Orientador: Paulo Roberto Dalsenter

Coorientador: Anderson Joel Martino Andrade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Desreguladores endócrinos 2. Reprodução 3. Toxicidade 4. Lactação 5. Ratos Wistar I. Título II. Dalsenter, Paulo Roberto III. Andrade, Anderson Joel Martino IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.951



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TATIANA ZAUER CURI** intitulada: **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO IN UTERO E LACTACIONAL AO DIISOPENTIL FTALATO (DiPeP) SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 26 de Abril de 2019.


PAULO ROBERTO DALSENTER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


EMERSON LUIZ BOTEELHO LOURENÇO

Avaliador Externo (UNIPAR)


HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS

Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter e Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade, por toda dedicação, orientação, paciência, apoio e incentivo ao longo desses dois anos. Sou imensamente grata pela oportunidade de trabalhar com vocês e por todos os ensinamentos e experiências adquiridos. Obrigada!

Às minhas amigas e colegas de laboratório Gabriela, Marcella, Sara, Giovana, Heloísa e Nicole, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Muito obrigada por toda ajuda nesse processo, por estarem sempre do meu lado e nunca me deixarem na mão. O apoio, carinho e principalmente a amizade que construímos foram essenciais ao longo desse período!

Aos meus pais, Viviane e Paulo, familiares e amigos por todo amor, compreensão e incentivo que me deram. Obrigada por acreditarem e se orgulharem de mim. Minha eterna gratidão a vocês!

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR.

A todos aqueles que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram ou auxiliaram na elaboração do presente estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos vocês, minha mais sincera e profunda **GRATIDÃO!**

A vida começa onde o medo termina.

OSHO

RESUMO

Os ésteres de ftalatos são produtos químicos industriais utilizados principalmente como plastificantes no policloreto de polivinila (PVC) e usualmente encontrados em inúmeros produtos de uso comum como embalagens para alimentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal, medicamentos, brinquedos e equipamentos médicos. A toxicidade desses compostos é preocupante para a saúde humana e animal visto que muitos ftalatos são potencialmente tóxicos para o sistema reprodutor masculino, especialmente no período pré-natal, durante janelas críticas para diferenciação sexual dependente de andrógenos. Em um estudo prévio conduzido pelo nosso laboratório em Curitiba, foi observada alta exposição de gestantes brasileiras a vários ftalatos mas, em particular, ao diisopentil Ftalato (DiPeP). Esse composto usualmente não é encontrado em estudos de biomonitoramento de outras populações mundiais, indicando uma ocorrência única no Brasil, o que resulta em escassez de dados acerca da sua toxicidade endócrina e reprodutiva. Foi demonstrado, ainda, que esse ftalato é capaz de reduzir a produção de testosterona testicular fetal em ratos de maneira dose-dependente. Baseando-se nesses dados, o objetivo deste estudo foi investigar se a exposição intrauterina e lactacional a DiPeP é capaz de causar alterações reprodutivas em ratos. Para isso, ratas Wistar prenhes (9-11/grupo) foram expostas via gavagem a veículo (óleo de canola) e quatro doses (1, 10, 100 e 300 mg/kg/dia) de DiPeP entre o 10º dia de gestação e o 21º dia pós-natal (desmame). Os descendentes machos foram avaliados quanto à distância anogenital (AGD) e idade na separação prepucial (PPS), dois marcadores sexuais dependentes de andrógenos. Na puberdade (60-65 dias) e idade adulta (145-150 dias), dois descendentes de cada ninhada tiveram a massa absoluta e relativa de seus órgãos andrógeno-dependentes e os níveis plasmáticos de testosterona registrados. Nos animais adultos, investigou-se também a produção espermática diária e a histopatologia dos testículos. Sinais de toxicidade fetal foram observados na dose mais alta (300 mg/kg), com a ocorrência de abortos em mais de 50% das progenitoras, o que resultou em um pequeno tamanho amostral, prejudicando sua inclusão nas análises estatísticas. A massa absoluta e relativa da vesícula seminal foi reduzida nos grupos expostos ao DiPeP na dose de 10 e 100 mg/kg/dia e a produção diária de espermatozóides foi significativamente reduzida nos animais expostos a 100 mg/kg/dia. Túbulos atróficos e vacuolizados foram observados em um testículo macroscopicamente pequeno de um animal exposto a DiPeP 100 mg/kg/dia e, na maior dose (300 mg/kg/dia), o testículo de um animal apresentou áreas disgenéticas (mal formadas), apesar do tamanho testicular normal. Em conjunto, esses resultados indicam que o DiPeP, um ftalato relevante para o cenário brasileiro de exposição humana, induz toxicidade fetal e efeitos antiandrogênicos em ratos.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; Ftalatos; Diisopentil ftalato (DiPeP); Toxicidade Reprodutiva; Antiandrogênico; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Phthalate esters are industrial chemicals mainly used as plasticizers in polyvinyl chloride plastics (PVC) and usually found in many consumer products like food packaging, cosmetics and personal care products, medicines, toys and medical equipment. The toxicity of these compounds is a concern to human and animal health since many phthalates are potentially toxic to male reproductive system, especially in the prenatal period, during critical windows for androgen-dependent sexual differentiation. In a previous study performed by our laboratory in Curitiba, we observed high exposure of Brazilian pregnant women to several phthalates, in particular to diisopentyl phthalate (DiPeP). This compound is not usually found in biomonitoring studies of other world populations, indicating an unique occurrence in Brazil, which results in limited data about its reproductive and endocrine toxicity. It has also been shown that this phthalate reduces fetal testicular testosterone in rats in a dose-dependent manner. Based on these data, the aim of this study was to investigate whether *in utero* and lactational exposure to DiPeP is capable of causing reproductive changes in rats. Pregnant Wistar rats were exposed by oral gavage to vehicle (canola oil) or four doses (1, 10, 100 and 300 mg/kg/day) of DiPeP between gestation day 10 and post-natal day 21 (weaning). Male offspring were evaluated for anogenital distance (AGD) and age at preputial separation (PPS), which are two androgen-dependent sexual markers. At puberty (60-65 days) and adulthood (145-150 days), two rats from each litter had their absolute and relative weight of androgen-dependent organs and plasma testosterone levels analyzed. At adulthood, daily sperm production and the histopathology of the testes were also investigated. Signs of fetal toxicity were observed at the highest dose (300 mg/kg), with the occurrence of abortions in more than 50% of the progenitors, which resulted in a small sample size, impairing their inclusion in the statistical analysis. Absolute and relative weight of the seminal vesicle were reduced in groups exposed to 10 and 100 mg/kg/day of DiPeP and daily sperm production was significantly reduced in animals exposed to 100 mg/kg/day. Atrophic and vacuolated tubules were observed in a macroscopically small testis of one animal exposed to DiPeP 100 mg/kg/day and, at the highest dose (300 mg/kg/day), the testis of one animal showed dysgenetic (malformed) areas, despite normal testicular size. Taken together, these results indicate that DiPeP, a phthalate relevant to the Brazilian scenario of human exposure, induces fetal toxicity and antiandrogenic effects in rats.

Keywords: Endocrine disrupters; Phthalates; Diisopentyl phthalate (DiPeP); Reproductive Toxicity; Antiandrogenic; Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	18
FIGURA 2 -	EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO.....	20
FIGURA 3 -	DIFERENCIAÇÃO DA GÔNADA BIPOTENCIAL.....	22
FIGURA 4 -	DIFERENCIAÇÃO SEXUAL.....	22
FIGURA 5 -	EVOLUÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA DESDE A CONCEPÇÃO ATÉ O PICO PUBERAL.....	23
FIGURA 6 -	ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS FTALATOS.....	24
FIGURA 7 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO DIISOPENTIL FTALATO (DiPeP)..	27
FIGURA 8 -	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
FIGURA 9 -	DISTÂNCIA ANOGENITAL (AGD) EM RATOS MACHOS E FÊMEAS.....	32
FIGURA 10 -	SEPARAÇÃO PREPUCIAL (PPS) EM RATOS.....	33
FIGURA 11 -	EFEITOS DO DIPEP SOBRE O GANHO DE MASSA DURANTE A GESTAÇÃO DAS PROGENITORAS EXPOSTAS DIARIAMENTE VIA GAVAGEM A PARTIR DO GD10.....	37
FIGURA 12 -	PERCENTUAL DE PROGENITORAS COM FILHOTES VIVOS (%) APÓS EXPOSIÇÃO <i>IN UTERO</i> AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	37
FIGURA 13 -	DISTÂNCIA ANOGENITAL (AGD) E ÍNDICE ANOGENITAL (AGI) DE ANIMAIS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	39
FIGURA 14 -	IDADE DE SEPARAÇÃO PREPUCIAL (PPS) DE ANIMAIS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	40
FIGURA 15 -	MASSA ABSOLUTA (A) E RELATIVA (B) DA VESÍCULA SEMINAL VAZIA DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS <i>IN</i> <i>UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	43
FIGURA 16 -	PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA DE RATOS ADULTOS APÓS EXPOSIÇÃO <i>IN UTERO</i> E LACTACIONAL A 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA DE DIPEP.....	44
FIGURA 17 -	FOTOMICROGRAFIAS DE SEÇÕES TESTICULARES DE RATOS.....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	DADOS DA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO DE RATAS EXPOSTAS AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA DO GD10 AO PND21.....	38
TABELA 2	-	PESO AO NASCER E AO DESMAME DE FILHOTES EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	38
TABELA 3	-	MASSA ABSOLUTA (g) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES DE RATOS PÚBERES EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	41
TABELA 4	-	MASSA RELATIVA (%) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES DE RATOS PÚBERES EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	41
TABELA 5	-	MASSA ABSOLUTA (g) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES, FÍGADO E RINS DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	42
TABELA 6	-	MASSA RELATIVA (%) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES, FÍGADO E RINS DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA.....	42
TABELA 7	-	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA DE ANIMAIS PÚBERES ADULTOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA	
TABELA 8	-	DADOS DE HISTOLOGIA TESTICULAR DE RATOS ADULTOS APÓS EXPOSIÇÃO <i>IN UTERO</i> E LACTACIONAL A 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA DE DIPEP.....	43 46

LISTA DE SIGLAS

ABTS	-	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AMH	-	Anti-Müllerian Hormone: Hormônio Anti-Mülleriano
AGD	-	Anogenital Distance: Distância Anogenital
AGI	-	Anogenital Index: Índice Anogenital
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CDC	-	Centers for Disease Control and Prevention
CUIDAR	-	Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução
DBP	-	Dibutil Ftalato
DDT	-	Diclorodifenildicloroetileno
DEHP	-	Di (2-etilhexil) Ftalato
DES	-	Dietilestilbestrol
DHT	-	Di-hidrotestosterona
DiPeP	-	Diisopentil Ftalato
DnPeP	-	Di-n-pentil Ftalato
FDA	-	Food and Drug Administration
FSH	-	Follicle Stimulating Hormone: Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	-	Gonadotrophin Releasing Hormone: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GD	-	Gestational Day: Dia Gestacional
INSL3	-	Insuline-like Peptide 3: Fator Semelhante a Insulina 3
LH	-	Luteinizing Hormone: Hormônio Luteinizante
MiPeP	-	Monoisopentil Ftalato
NOAL	-	No Observed Adverse Effect Level
PND	-	Postnatal Day: Dia Pós-Natal
PPS	-	Preputial Separation: Separação Prepucial
PVC	-	Polyvinyl Chloride: Policloreto de Polivinila
SEM	-	Standard Error of the Mean: Erro Padrão da Média
TDS	-	Testicular Dysgenesis Syndrome: Síndrome da Disgenesia Testicular

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ED50	-	Dose efetiva mediana
g	-	Gramas
h	-	Horas
kg	-	Quilogramas
mg	-	Miligramas
min	-	Minutos
mL	-	Mililitros
mm	-	Milímetros
n	-	Tamanho da amostra
ng	-	Nanogramas
nm	-	Nanômetro
p	-	Nível de significância estatístico
pg	-	Picograma
SEM	-	Standard Error of the Mean: Erro Padrão da Média
µL	-	Microlitros
µm	-	Micrômetros
°C	-	Graus Celcius
≤	-	Menor ou igual
±	-	Mais ou menos
%	-	Por cento
®	-	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO...	16
2.1.1 Espernatigênese.....	17
2.1.2 Testosterona e regulação hormonal.....	18
2.2 DIFERENCIAÇÃO SEXUAL.....	20
2.3 FTALATOS COMO DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	23
2.3.1 Diisopentil ftalato (DiPeP).....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 ANIMAIS.....	29
4.2 ACASALAMENTOS.....	30
4.3 DOSES E TRATAMENTO.....	30
4.4 GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....	31
4.5 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES.....	32
4.5.1 Distância anogenital.....	32
4.5.2 Separação Prepucial.....	32
4.6 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR.....	33
4.6.1 Massa de órgãos andrógeno-dependentes.....	33
4.6.2 Níveis plasmáticos de testosterona.....	33
4.6.3 Produção espermática diária.....	34
4.6.4 Histologia testicular.....	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 PRENHEZ E LACTAÇÃO.....	36
5.2 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES.....	38
5.2.1 Peso dos filhotes.....	38
5.2.2 Distância anogenital e separação prepucial.....	39
5.3 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR.....	40

5.4.1 Massa de órgãos andrógeno-dependentes.....	40
5.4.2 Níveis plasmáticos de testosterona e produção espermática diária.....	43
5.4.3 Histologia testicular.....	44
6 DISCUSSÃO	46
6.1 PRENHEZ E LACTAÇÃO.....	47
6.2 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE MASCULINA.....	48
6.3 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR.....	51
6.3.1 Status androgênico pós-natal: massa de órgãos e níveis de testosterona plasmática.....	51
6.3.2 Produção espermática e histologia testicular.....	52
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A crescente exposição dos seres humanos e outros seres vivos a compostos químicos presentes no ambiente e em nossas vidas cotidianas traz riscos significativos à saúde. Dentre essas substâncias, há aquelas passíveis de interferir com o sistema endócrino, que são usualmente conhecidas como “desreguladores endócrinos”. Esses agentes são capazes de atuar sobre a regulação hormonal por meio de diferentes mecanismos, agindo diretamente sobre os receptores hormonais (ativando ou bloqueando), ou indiretamente, interferindo na síntese, secreção, transporte, conversão ou eliminação de determinado hormônio. Como consequência, esses compostos podem afetar eventos biológicos cruciais, levando a inúmeros efeitos adversos sobre a reprodução, a diferenciação, o desenvolvimento e o comportamento dos organismos expostos (US EPA, 1997).

As primeiras observações com relação aos danos causados por desreguladores endócrinos foram relatadas entre os anos de 1940 e 1970. Para evitar o aborto espontâneo, foi prescrito a mulheres grávidas o uso de um hormônio sintético chamado dietilestilbestrol (DES). Aparentemente, o uso desse hormônio não causava efeitos nessas mulheres, no entanto, suas filhas posteriormente apresentavam anomalias reprodutivas como adenocarcinoma da vagina, esterilidade, câncer e endometriose, que surgiam de acordo com a maturidade (HERBST et al., 1979; BILA e DEZOTTI, 2007). Houve ainda relatos de efeitos também em filhos dessas mulheres, incluindo a presença de hipospádias, caracterizada por mal formação da uretra (KLIP et al., 2002). Em 1980, na região dos Grandes Lagos, localizada nos Estados Unidos e Canadá, aves coloniais começaram a apresentar características femininas por estarem expostas a agrotóxicos. O mesmo problema foi relatado na Flórida, Estados Unidos, em jacarés que habitavam um lago contaminado com o pesticida DDT (Diclorodifenildicloroetileno), os quais apresentavam anomalias no sistema reprodutivo (GUILLETTE et al., 1996).

Segundo o FDA (U.S Food and Drug Administration), há mais de 1000 substâncias químicas no comércio com propriedades confirmadas ou suspeitas de desregulação endócrina. Esses composto podem ser tanto naturais quanto sintéticos, incluindo pesticidas, fungicidas, bifenilas policloradas (PCBs), ftalatos, bisfenol A, medicamentos, estrogênios naturais, entre outros (BILA e DEZOTTI, 2007).

Uma fase bastante crítica à exposição a esses agentes é o período pré-natal, visto que inúmeros eventos que ocorrem durante janelas específicas do desenvolvimento fetal são dependentes de interações hormonais, principalmente o processo de diferenciação e desenvolvimento sexual (WOODRUFF et al., 2008). Os órgãos sexuais, que ainda estão se diferenciando nesse período, podem ser afetados por substâncias presentes no sangue materno através da placenta ou mesmo durante a lactação, resultando em efeitos irreversíveis. Diversos estudos já relataram desordens relacionadas à desregulação do sistema endócrino, como alterações no sistema reprodutivo, infertilidade, aumento na incidência de alguns tipos de câncer, disfunções tireoidianas, obesidade, entre outros (SHARPE e SKAKKEBAEK, 1993; COLBORN et al., 1993; ANDRADE et al., 2006; BILA e DEZOTTI, 2007; VOM SAAL et al., 2008). Devido aos inúmeros danos que podem causar, existe um interesse crescente por parte da comunidade científica no estudo dessas substâncias.

Uma rigorosa metanálise de dados coletados entre 1973 e 2011 mostrou uma redução de mais de 50% na concentração de espermatozoides entre homens da América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia, sem evidências de estabilização nos últimos anos. Em contraste, não foi observado declínio significativo na América do Sul, Ásia e África, o que pode ser decorrente de um menor número de estudos. Não há uma resposta concreta para esses achados, mas a presença desse declínio em países ocidentais sugere fortemente que fatores ambientais e estilo de vida, incluindo exposição química pré-natal, especialmente aos desreguladores endócrinos, tabagismo, estresse e obesidade, podem estar desempenhando um papel causal nessa tendência. Esse fator é preocupante, visto que além de implicações diretas sobre a fertilidade e a reprodução, existem evidências recentes associando a baixa qualidade do sêmen ao maior risco de hospitalização e morte (LEVINE et al., 2017).

Dentro da grande classe dos desreguladores endócrinos destacam-se os ftalatos, compostos químicos utilizados principalmente como plastificantes, estando presentes nos mais diversos produtos de uso comum, e que podem apresentar potencial de desregular o sistema endócrino ao atuar principalmente como inibidores da produção androgênica (antiandrogênicos) (DALSENTER et al., 2006; ANDRADE et al., 2006). Recentemente, um estudo coorte gestacional, intitulado Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução (CUIDAR) e realizado em Curitiba por nosso laboratório, detectou ampla exposição de gestantes brasileiras a

vários ftalatos, incluindo o diisopentil ftalato (DiPeP), composto que usualmente não é encontrado em estudos de biomonitoramento de outras populações mundiais, o que resulta em escassez de dados acerca de sua toxicidade reprodutiva e endócrina (BERTONCELLO SOUZA et al., 2018). Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar se o DiPeP é capaz de causar alterações reprodutivas em ratos expostos *in utero* e durante a lactação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

A reprodução é um evento biológico essencial para a preservação de uma espécie, sendo ela um dos fatores que diferenciam organismos vivos da matéria não-viva. Nos mamíferos, esse processo envolve mecanismos fisiológicos complexos por meio de estruturas formadoras dos sistemas reprodutores masculino e feminino. O conhecimento da anatomia e fisiologia desses sistemas é de extrema importância para compreender possíveis alterações que possam ocorrer durante o desenvolvimento, maturação e envelhecimento.

A função do sistema reprodutor masculino é de produzir, manter e transferir espermatozoides para o trato reprodutor feminino, onde ocorrerá a fertilização, além de secretar hormônios sexuais masculinos. Para isso, os testículos são órgãos cruciais, pois exercem ambas as funções, ou seja, produzem tanto os espermatozoides quanto os andrógenos, hormônios responsáveis pela sustentação da fisiologia reprodutiva masculina. Os testículos se encontram alojados dentro do escroto e são envoltos por duas camadas distintas de tecido conectivo protetor, a túnica vaginal externa, que é uma membrana serosa, e a túnica albugínea, uma camada de tecido conjuntivo densa. No interior do testículo existem túbulos enovelados (túbulos seminíferos), onde ocorre a produção de espermatozoides, e um compartimento intersticial, onde encontram-se macrófagos, mastócitos e células de Leydig, cuja principal função é a produção de testosterona e outros hormônios esteroides essenciais para espermatogênese. No interior desses túbulos encontram-se as células germinativas em diferentes estágios de maturidade, e as células de Sertoli, responsáveis por nutrir e sustentar essas células germinativas. As células de

Sertoli se estendem da periferia até o lúmen do túbulo e estão unidas por junções de oclusão, gerando dois compartimentos, o basal, que contém espermatogônias e espermatócitos primários, e o adluminal, que contém células germinativas em estágios mais avançados (FIGURA 1). Essas junções criam, ainda, a barreira hematotesticular, que impede o acesso de substâncias encontradas no sangue e líquido intersticial ao compartimento adluminal e, ao mesmo tempo, impede uma possível estimulação de resposta imune a antígenos durante o desenvolvimento de células germinativas (FAWCET, 1973; ASHDOWN e HANCOCK, 1988; FOSTER, 1988).

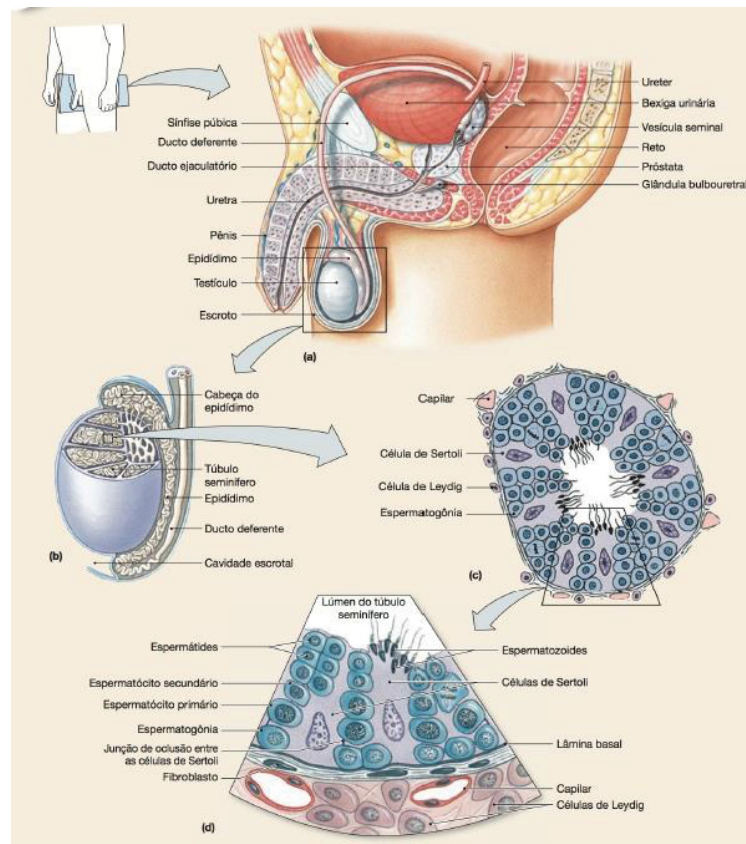
Além dos testículos, existem outras estruturas que compõe o sistema reprodutor masculino, incluindo os ductos genitais (epidídimos, ducto deferente, ducto ejaculatório e uretra), as glândulas sexuais acessórias (vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral), o escroto e o pênis (FIGURA 1). Esses órgãos atuam em conjunto auxiliando no processo de maturação e transferência do esperma, sendo os ductos responsáveis pelo armazenamento e transporte dos gametas masculinos enquanto as glândulas acessórias fazem a secreção de substâncias envolvidas na sua proteção e nutrição, além de facilitarem o seu movimento (BRINSKO, 1999; SILVERTHORN, 2010).

2.1.1 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo que ocorre no interior dos túbulos seminíferos e que depende da ação das gonadotrofinas, produzidas pela adeno-hipófise, e andrógenos, secretados pelas células de Leydig, resultando na diferenciação de células-tronco indiferenciadas (espermatogônias) em espermatozoides altamente especializados (FIGURA 1). O processo começa na puberdade, e os espermatozoides passam então a ser produzidos constantemente ao longo da vida. As espermatogônias revestem a membrana basal no interior do túbulo e dividem-se para produzir novas espermatogônias ou iniciar a espermatogênese originando espermatócitos primários e secundários, seguidos por espermátides que, finalmente, produzem espermatozoides formados. Esse processo se inicia com a mitose das espermatogônias, originando espermatogônias do tipo B. Parte dessas células se diferencia em espermatócitos primários, células diplóides ($2n$) que sofrerão redução cromossômica pelo processo de meiose. Na primeira divisão meiótica, o DNA

é replicado e os cromossomos homólogos segregam-se, formando duas células haploides (espermátocitos secundários) com duas cromátides. Essas células passam então para a segunda divisão meiótica, onde dão origem a espermátides haploides com uma única cromátide. Por fim, ocorre um processo de diferenciação chamado de espermiogênese, que envolve redução do citoplasma e formação de características típicas de um espermatozoide (FOSTER, 1988; SILVERTHORN, 2010).

FIGURA 1 - SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO



FONTE: Silverthorn (2010).

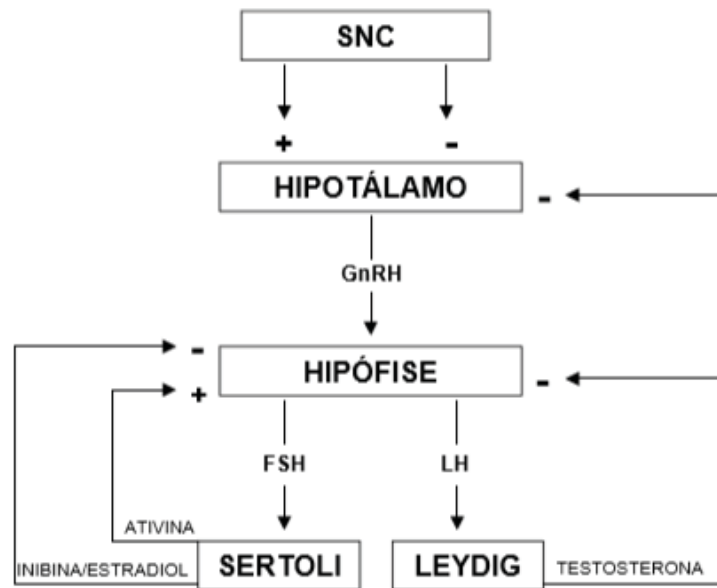
2.1.2 Testosterona e regulação hormonal

A testosterona é um hormônio esteroide produzido pelas células de Leydig, localizadas entre os túbulos seminíferos nos testículos, e é considerada o principal hormônio masculino, possuindo papel crucial no desenvolvimento e amadurecimento dos órgãos genitais, na descida dos testículos para a bolsa escrotal, no aparecimento das características sexuais secundárias masculinas, no desenvolvimento ósseo e muscular, bem como no comportamento e manutenção da libido do indivíduo. A

produção de testosterona se inicia na fase fetal e é a sua presença que determina o desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos, enquanto que na sua ausência o sexo que se desenvolverá será o feminino. Em humanos, esse andrógeno é secretado pelas células de Leydig a partir da oitava semana de gestação, apresentando picos de concentração entre a 10^a e a 14^a-15^a semanas gestacionais (WORD et al., 1989; WELSH et al., 2014). Esta liberação precoce de testosterona é que resultará na diferenciação anatômica dos órgãos sexuais masculinos (RASTRELLI et al., 2018). As concentrações de testosterona são baixas na infância, porém aumentam durante a puberdade, ativando mudanças físicas e o início da espermatogênese, sendo necessária para manter o sistema reprodutor masculino funcionando adequadamente.

A regulação da produção de testosterona pelas células de Leydig se dá por meio do hipotálamo e da glândula adeno-hipófise no cérebro, que integram sinais externos e internos para controlar a síntese e a secreção desse hormônio. Baixas concentrações sanguíneas de testosterona promovem a liberação hipotalâmica de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH). O GnRH se liga, então, aos seus receptores na glândula adeno-hipófise, estimulando a liberação das duas gonadotrofinas: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH). Um ciclo de feedback negativo controla predominantemente a síntese e a secreção de FSH e LH. O FSH liga-se predominantemente às células de Sertoli nos túbulos seminíferos, promovendo a espermatogênese e estimulando a produção de hormônios como a inibina, que age inibindo a liberação de FSH da adeno-hipófise, reduzindo assim a secreção de testosterona. Nos testículos, o LH se liga a seus receptores nas células de Leydig e estimula a síntese de testosterona a partir do colesterol. Quando as concentrações de testosterona no sangue atingem um limiar, ela se liga aos receptores androgênicos tanto no hipotálamo quanto na adeno-hipófise, inibindo a síntese e a secreção de GnRH e LH, respectivamente. Quando as suas concentrações sanguíneas diminuem, a testosterona, GnRH e LH são novamente secretados, estimulando mais produção de testosterona (FIGURA 2) (NEGRO-VILAR e VALENCA, 1988; SILVERTHORN, 2010).

FIGURA 2 - EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO



FONTE: Antunes-Rodrigues e Favaretto (1999).

2.2 DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

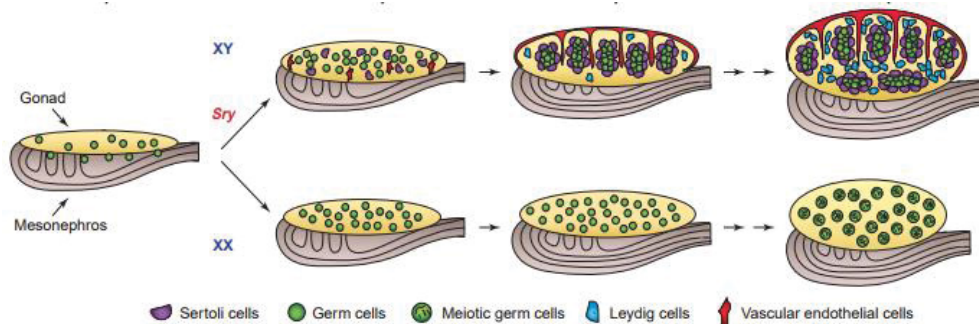
A diferenciação entre os gêneros masculino e feminino é bastante complexa e envolve fatores sexo-específicos, hormonais, genéticos e epigenéticos. Em conjunto e por meio de mecanismos celulares específicos, tais fatores promovem ou eliminam diferenças sexuais em determinados tecidos. Além disso, há também influência de fatores ambientais, que interagem com os fatores biológicos, moldando o fenótipo feminino e masculino (MCCARTHY E ARNOLD, 2011).

A determinação do sexo nos mamíferos se inicia pela combinação formada pelos cromossomos X, originário da fêmea, e X ou Y, originário do macho, sendo portanto os machos heterogaméticos (XY) e as fêmeas homogaméticas (XX). A partir da determinação cromossômica do sexo, a diferenciação cursa então com o desenvolvimento gonadal e desenvolvimento do sexo fenotípico (EGGERS e SINCLAIR, 2012).

Tanto machos quanto fêmeas possuem estruturas primordiais para formar os órgãos sexuais internos masculinos e femininos, ou seja, o tecido gonadal primordial é bipotente, tendo a capacidade de formar tanto ovários quanto testículos (CUMMINGS E KAVLOCK, 2004). Gorski (1999) questionou então de que forma

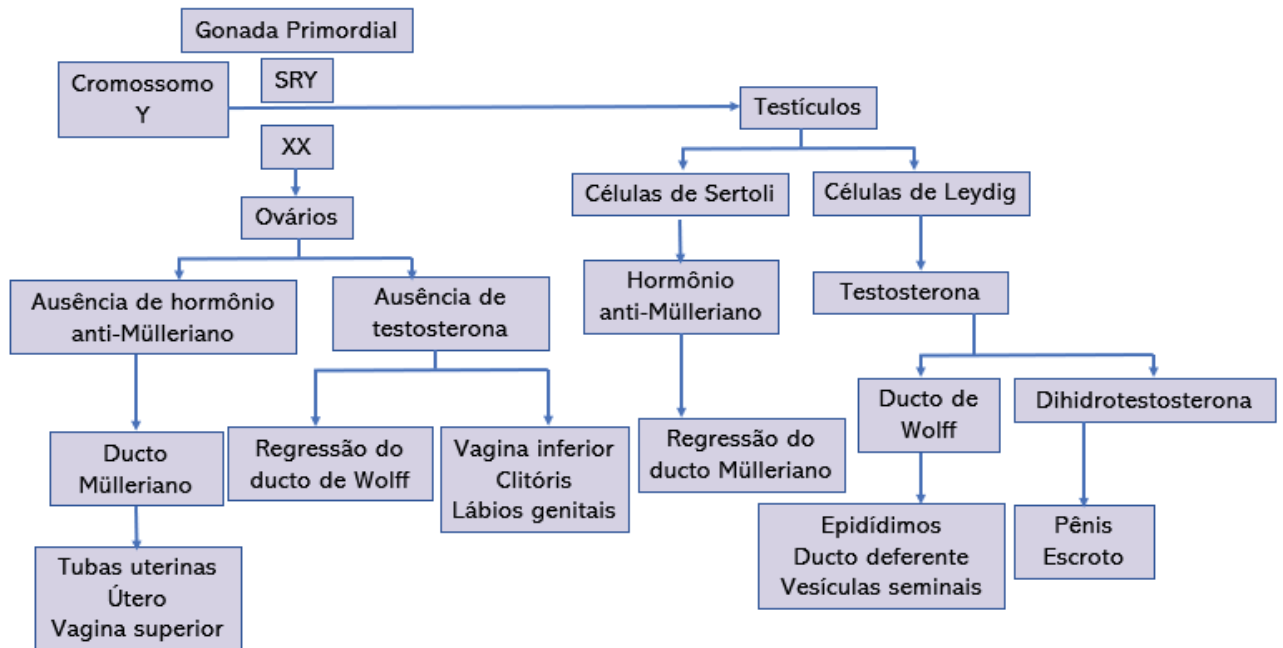
ocorreria a diferenciação anatômica e funcional entre os gêneros, e concluiu que a influência hormonal está envolvida nesse processo. O plano inicial de desenvolvimento tanto do cérebro quanto do corpo é feminino, sendo a masculinização dirigida principalmente por hormônios testiculares. A diferenciação das estruturas primordiais das gônadas se dá sob a influência de uma cascata de genes, que nos meninos começa com um gene localizado no cromossomo Y, o SRY, que codifica o fator determinante de testículos (FIGURA 3). A genitália interna origina-se de ductos pareados que inicialmente são indistinguíveis nos embriões XX e XY: os ductos Müllerianos (paramesonéfricos) e os ductos de Wolff (mesonéfricos). Os testículos secretam através das células de Sertoli o hormônio anti-mülleriano (AMH), capaz de inibir o desenvolvimento do trato reprodutivo feminino, ou seja, dos ductos Müllerianos. Além disso, a testosterona, secretada pelas células de Leydig no testículo fetal, e seu metabólito biologicamente ativo, di-hidrotestosterona (DHT), ligam-se a receptores androgênicos localizados nos tecidos e induzem a diferenciação do ducto de Wolff (testosterona) a canal deferente e epidídimo e masculinizam a genitália externa (DHT) (GORSKI, 1999; CUMMINGS e KAVLOCK, 2004). As células de Leydig também produzem o fator semelhante à insulina tipo 3 (INSL3), que causa a descida dos testículos para a sua posição característica até o escroto (ADHAM et al., 2000). A capacidade de diferenciação dos tecidos reprodutivos masculinos e femininos primordiais a seus respectivos tecidos funcionais depende, portanto, do desenvolvimento apropriado das gônadas e da secreção correta dos hormônios, sendo determinantes críticos do fenótipo masculino e feminino (FIGURA 4).

FIGURA 3 - DIFERENCIAÇÃO DA GÔNADA BIPOTENCIAL



FONTE: Ross e Capel (2005).

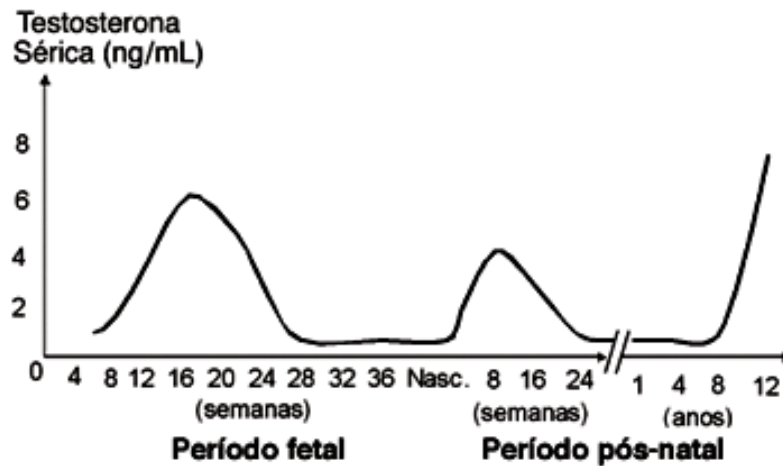
FIGURA 4 - DIFERENCIAÇÃO SEXUAL



FONTE: Holmes (2016) (adaptado).

No ser humano, a partir de 7-8 semanas de vida intra-uterina inicia-se a produção de testosterona e, ao longo do desenvolvimento pré e pós natal e também na puberdade, ocorrem picos de produção desse hormônio, assim como ocorre em outros mamíferos, e que estão diretamente relacionados com desenvolvimento sexual de um indivíduo do sexo masculino (FIGURA 5) (DAMIANI et al., 2005). Sendo assim, a exposição de mamíferos a compostos antiandrogênicos durante o processo de diferenciação sexual pode resultar em malformações do trato reprodutor, como já demonstrado pela administração perinatal de antagonistas de receptores androgênicos, como vinclozolin e flutamida, e químicos que inibem a produção de testosterona, como o di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) e o dibutil ftalato (DBP) (GRAY et al., 1994, 2000; MYLSHREEST et al., 1999). Esses compostos são capazes de desmasculinizar os ratos machos, induzindo algumas alterações que incluem distância anogenital reduzida, redução na massa de órgãos andrógeno dependentes, hipospadia, criptorquidismo, agenesia epididimal e comportamento sexual prejudicado (WOLF et al., 1999; GRAY et al., 2000; DALSENTER et al., 2006; ANDRADE et al., 2006).

FIGURA 5 - EVOLUÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA DESDE A CONCEPÇÃO ATÉ O PICO PUBERAL



FONTE: Damiani et al. (2005).

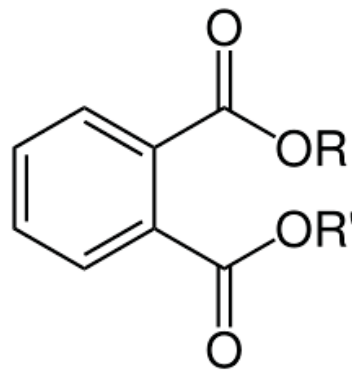
2.3 FTALATOS COMO DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os ftalatos constituem uma grande classe de produtos químicos industriais plastificantes, encontrados de forma ubíqua no meio ambiente, e que possuem inúmeras aplicações em produtos de consumo, incluindo produtos de higiene pessoal, medicamentos, cosméticos, embalagens de alimentos, equipamentos médicos, brinquedos, tintas, entre outros (DALSENTER et al., 2006; SWAN et al., 2005; HANNAS et al., 2011).

Esses compostos são ésteres obtidos sinteticamente por reações químicas de ácido ftálico com diferentes álcoois de 1 a 13 carbonos (FIGURA 6), originando moléculas de diferentes tamanhos de cadeia e pesos moleculares e, conseqüentemente, diferentes propriedades físico-químicas, o que está correlacionado com suas aplicações e o seu perfil toxicológico (HELLWIG et al., 1997; VENTRICE et al., 2013). Os ftalatos que apresentam alto peso molecular (cinco ou mais carbonos nas cadeias laterais) tais como o di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) são utilizados principalmente como plastificantes de materiais de cloreto de polivinilo (PVC), pois conferem maleabilidade e resistência à matriz plástica, sendo encontrados em revestimentos de paredes e automóveis, embalagens de alimentos, dispositivos médicos, brinquedos, materiais de construção, entre outros (ATSDR, 2002). Já aqueles de menor peso molecular, como o dibutil ftalato (DBP), são utilizados na

fabricação de cosméticos e produtos de higiene pessoal, vernizes, tintas e formulações farmacêuticas, atuando como aditivos e fixadores (FIGURA 6) (ATSDR, 2001).

FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DOS FTALATOS



Essa exposição pode acontecer por diferentes vias, sendo que a principal delas se dá pela migração desses compostos para água e alimentos, mas pode ocorrer também por absorção dérmica de cosméticos ou mesmo pela inalação (KOCH et al., 2003). Os indivíduos expostos aos ftalatos produzem metabólitos críticos, que são detectados no sangue e urina da população em geral e também no líquido amniótico humano. A toxicidade desses compostos é derivada dos monoésteres, que são produzidos rapidamente durante os processos metabólicos hidrolíticos e oxidativos. Muitos destes metabólitos são capazes de atravessar a placenta e podem atingir o feto (LIOY et al., 2015; FOSTER, 2006).

Na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, os programas de biomonitoramento mostram consistentemente uma exposição humana generalizada aos ftalatos nos últimos anos (KOCH e CALAFAT, 2009; KOCH et al., 2017). De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), quase 100% da população dos EUA exibe níveis mensuráveis de um ou mais desses produtos químicos (CDC, 2013), no entanto, faltam dados de biomonitoramento de países em desenvolvimento, como o Brasil, um importante produtor e consumidor de produtos químicos industriais. Uma publicação recente de nosso laboratório demonstrou a exposição ubíqua de gestantes curitibanas a inúmeros ftalatos (BERTONCELLO SOUZA et al., 2018). Ainda, Rocha e colaboradores (2017) encontraram onze metabólitos de ftalatos em pelo menos 95% das amostras analisadas de crianças brasileiras.

Foram impostos regulamentos sobre o uso de ftalatos em brinquedos, embalagens de alimentos e cosméticos no Brasil (ANVISA, 2016), no entanto, não há monitoramento para estabelecer se os níveis se encontram dentro da referência. Um estudo encontrou níveis 5 a 10 vezes maiores do que os limites aceitáveis propostos pelo governo brasileiro em materiais de embalagem de alimentos brasileiros (FREIRE et al., 2006).

A exposição a determinados produtos químicos ambientais sintéticos pode resultar em problemas reprodutivos em uma variedade de espécies de vertebrados através de mecanismos endócrinos (ANKLEY e GIESY, 1998; COLBORN e CLEMENT, 1992; GRAY, 1991) e pode inclusive ter contribuído para o declínio nas contagens espermáticas em humanos (LEVINE et al., 2017) e aumento da incidência de malformações urogenitárias (CARLSEN et al., 1992), uma vez que os hormônios desempenham papéis críticos no desenvolvimento. Sendo assim, a desregulação endócrina durante o período de diferenciação sexual pode por produzir fenótipos reprodutivos anormais em humanos e outros animais (SCHARDEIN, 1993).

Vários estudos toxicológicos com ftalatos em animais, durante o desenvolvimento, já foram realizados, e alguns desses químicos, tais como DBP e DEHP, mostraram-se capazes de perturbar a biossíntese de andrógenos, estando associados com algumas alterações reprodutivas em machos (MYLCHREEST et al., 2002; FISHER et al., 2003; DALSENTER et al., 2006; ANDRADE et al., 2006). A sensibilidade a esses compostos depende da idade da exposição, sendo o período fetal o mais sensível, especialmente durante a janela crítica para o desenvolvimento do trato reprodutivo sob controle androgênico, que em ratos ocorre entre os dias 14 e 18 de gestação (janela de programação masculina) (FOSTER, 2006; MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010; WELSH et al., 2014).

Dez ou mais membros da classe dos ftalatos são conhecidos por induzir toxicidade fetal endócrina masculina e malformações reprodutivas pós-natais devido à sua capacidade de interromper a síntese de testosterona testicular fetal durante esse período crítico, ocasionando múltiplos distúrbios hormonais (BARLOW e FOSTER, 2003; MYLCHREEST et al., 1998, 2000; PARKS et al., 2000). Esses compostos podem levar a alterações na expressão gênica das enzimas envolvidas na biossíntese e transporte da testosterona e prejudicar o funcionamento das células de Leydig e Sertoli. Como resultado, a diferenciação tecidual dependente de andrógenos

pode ser negativamente afetada (LEHMANN et al., 2004). Além disso, os ftalatos também podem suprimir a expressão de um fator chave responsável pela primeira fase da descida do testículo, o INSL3 (FOSTER, 2006). Esses efeitos antiandrogênicos, no entanto, são restritos a ftalatos que apresentam de 3 a 7 átomos de carbono na porção linear da cadeia lateral de alquila, como demonstrado por estudos de relação estrutura-atividade (FURR et al., 2014; LIOY et al., 2015).

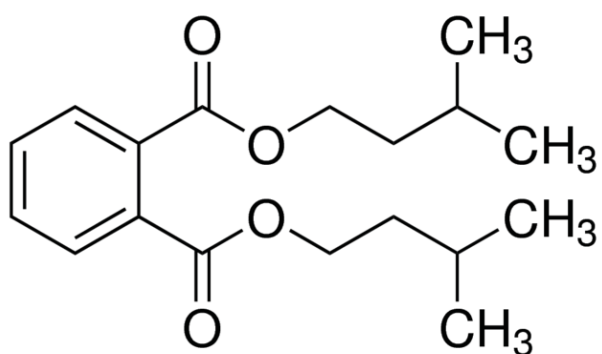
Ratos expostos *in utero* a altas doses de ftalatos como o DEHP, desenvolvem a chamada "Síndrome dos Ftalatos", caracterizada por anormalidades no trato reprodutor masculino, como a redução da distância anogenital (AGD), malformações, criptorquidia, hipospádia, mamilos retidos, menor peso de órgãos andrógeno-dependentes e baixa contagem espermática (GRAY et al., 2000; MYLCHREEST et al., 1998, 1999; FOSTER et al., 2001; PARKS et al., 2000). Essa síndrome em ratos é marcadamente similar a um distúrbio observado em seres humanos, a chamada "Síndrome da Disgenesia Testicular (TDS)", que surge na vida fetal devido ao desenvolvimento anormal de células de Sertoli e Leydig, causando um espectro de efeitos semelhantes como câncer testicular, baixa qualidade do sêmen, espermatogênese prejudicada, hipospádias, testículos não descendentes e AGD reduzida (SKAKKEBAEK et al., 2001). Inclusive, estudos de Swan e colaboradores (2005; 2015) detectaram associações entre a presença de metabólitos de ftalatos na urina de gestantes e reduções na AGD dos recém-nascidos do sexo masculino, sugerindo possível atividade antiandrogênica dos ftalatos em seres humanos expostos a baixas doses.

Existe uma crescente preocupação quanto aos impactos desses compostos sobre a saúde reprodutiva humana, visto que, mesmo com concentrações de exposição humana muito mais baixas do que aquelas que resultam em efeitos adversos em ratos, esses ftalatos podem se combinar entre si e com outras substâncias no meio ambiente levando a efeitos cumulativos (HOWDESHELL et al., 2008). Rider e colaboradores (2010) demonstraram que misturas de substâncias antiandrogênicas durante a gestação ocasionaram efeitos aditivos sobre os tecidos andrógeno dependentes de ratos.

2.3.1 Diisopentil ftalato (DiPeP)

O diisopentil ftalato (DiPeP), também chamado de diisoamil ftalato, é um químico da classe dos ftalatos cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{26}O_4$. Esse composto é sintetizado pela reação do anidrido ftálico com o álcool isoamílico, que contém 5 carbonos e se origina a partir da fermentação da cana de açúcar durante o processo de obtenção do etanol. Dessa maneira, o DiPeP apresenta 5 carbonos na sua cadeia lateral, sendo 4 lineares e um na posição “iso” (FIGURA 7) (PETROM, 2016; ECHA, 2008). Como uma estratégia de substituição do uso de combustíveis fósseis, o etanol e seus derivados são amplamente utilizados no Brasil, fato que pode ter favorecido a produção de DiPeP pela indústria de plastificantes locais devido ao fácil acesso ao álcool isoamílico (BERTONCELLO SOUZA et al., 2018). Estudos demonstram que esse ftalato já foi detectado no solo e em aterros no Brasil (DO NASCIMENTO FILHO et al., 2003; FERREIRA E MORITA, 2012).

FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DIISOPENTIL FTALATO



FONTE: ECHA (2008).

O DiPeP é indicado principalmente como plastificante no policloreto de polivinila, apresentando como vantagem uma menor volatilidade em relação ao DBP. É utilizado também em outras aplicações industriais, como solvente para nitrocelulose, ésteres de celulose em geral, tintas, óleos, resinas sintéticas e naturais e, assim como outros ftalatos, é possivelmente encontrado em diversos produtos de uso comum (BRISCO, 2011; PETROM, 2016). O uso do DiPeP e de outros ftalatos críticos em cosméticos e produtos para cuidados pessoais foi proibido no Brasil em 2016 devido à sua toxicidade (ANVISA, 2016).

No projeto CUIDAR foi observada alta exposição de gestantes brasileiras a vários ftalatos, mas em particular ao DiPeP, que teve seus metabólitos urinários detectados em todas as amostras analisadas. Além disso, foi realizado um experimento em paralelo para avaliar a capacidade e potência de DiPeP em inibir a produção de testosterona testicular fetal em ratos, utilizando as doses de 0, 125, 250 e 500 mg/kg/dia dos dias 14 a 18 de gestação. Foi observada uma redução significativa dose-dependente na produção de testosterona fetal e, inclusive, com maior potência do que o composto de referência, o DBP. O DiPeP também foi capaz de aumentar a distância testículo-bexiga, provavelmente devido à inibição do INSL3, que é comumente observada em ratos expostos a ftalatos ativos, comprometendo a descida testicular (BERTONCELLO SOUZA et al., 2018). Outra publicação recente relatou a presença ubíqua de monoisopentil ftalato (MiPeP), um dos metabólitos do DiPeP, em amostras de urina de crianças brasileiras (n = 300) (ROCHA et al., 2017). Curiosamente, esse ftalato usualmente não é encontrado em estudos de biomonitoramento de outras populações mundiais, indicando que sua ocorrência é uma característica única do Brasil, o que resulta em escassez de dados acerca da sua toxicidade reprodutiva e endócrina publicados na literatura.

Como já dito, a estrutura desses químicos está diretamente relacionada com a sua atividade antiandrogênica, portanto é possível prever que o DiPeP, cuja estrutura apresenta 4 carbonos lineares, seja potencialmente tóxico para o sistema reprodutivo masculino, prejudicando a diferenciação sexual *in utero*. De acordo com a União Europeia (Regulamento (CE) n. o 1272/2008), esse ftalato é classificado como tóxico para a reprodução categoria 1B (presumível toxicidade reprodutiva humana). O isômero do DiPeP, di-n-pentil ftalato (DnPeP), é conhecido como o mais potente dos ftalatos estudados em reduzir a produção de testosterona fetal em ratos, sendo cerca de três a oito vezes mais potente que o DBP e o DEHP (LIOY et al., 2015; HANNAS et al., 2011; BERTONCELLO SOUZA et al., 2018). Baseando-se nesses dados e na exposição significativa a ao DiPeP no Brasil, viu-se a necessidade em caracterizar seu potencial para induzir alterações no sistema reprodutor masculino. Esta é a primeira publicação a investigar endpoints endócrinos e reprodutivos após a exposição a esse ftalato.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível potencial desregulador endócrino do diisopentil ftalato (DiPeP), por meio da exposição *in utero* e lactacional, sobre o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino em ratos machos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possíveis influências da substância sobre a prenhez;
- Analisar o desenvolvimento geral da progênie exposta *in utero* e lactação;
- Investigar marcadores sexuais dependentes de andrógenos na progênie masculina;
- Avaliar possíveis alterações na função esteroidogênica /gametogênica e massa de órgãos sexuais nos descendentes machos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Nesse experimento foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Durante o período de experimentação, os animais foram mantidos em salas com temperatura constante ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, alojados em caixas de polipropileno (414 mm × 344 mm × 168 mm) no laboratório de Toxicologia Reprodutiva (UFPR). O fornecimento de ração e água foi *ad libitum*. Os animais foram aclimatados por uma semana antes do início dos experimentos e todos os protocolos foram aprovados e estão de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (número 1024).

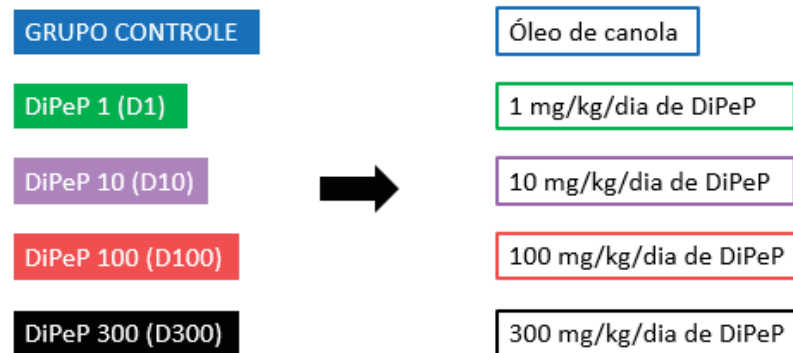
4.2 ACASALAMENTOS

Ratas Wistar adultas foram acasaladas com ratos machos adultos na proporção de 3 fêmeas/macho durante 3 horas da fase escura do ciclo. Lavados vaginais de cada fêmea foram realizados no período da manhã para a verificação de espermatozoides, confirmando a cópula. Os lavados foram realizados com auxílio de micropipeta através de lavagens vaginais com 50 µl de salina e posterior avaliação, a fresco, em microscopia ótica. O dia de detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado como dia de gestação (GD) zero. As fêmeas que não apresentaram espermatozoides no lavado vaginal foram novamente acasaladas até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos. As fêmeas prenhes foram mantidas em caixas coletivas (4 animais por caixa) até o 18º dia de gestação, quando foram separadas individualmente. O dia do parto foi designado como dia pós-natal (PND) 1, e os filhotes desmamados no 21º dia de lactação. Após o período de lactação, as mães foram submetidas à eutanásia.

4.3 DOSES E TRATAMENTO

Em todos os protocolos experimentais foi utilizado o diisopentil ftalato (DiPeP; CAS 84777-06-0), com pureza de 99%, que foi gentilmente cedido pela empresa PETROM, produtora desse ftalato no Brasil. Como veículo, foi utilizado óleo de canola (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As fêmeas que apresentaram espermatozoides no lavado vaginal foram randomicamente distribuídas em 5 grupos (9-11 por grupo) e tratadas diariamente, via gavagem, com óleo de canola (grupo controle) ou DiPeP em 4 diferentes doses, do GD10 ao PND21, utilizando um volume de administração igual a 2,0 mL/kg. A formação dos grupos foi a seguinte (FIGURA 8).

FIGURA 8 - GRUPOS EXPERIMENTAIS



A seleção das doses foi baseada em dados de estudos anteriores de nosso laboratório com o DiPeP e de outra publicação acerca da toxicidade reprodutiva do di-n-pentil ftalato (isômero do DiPeP), particularmente da toxicidade fetal (HANNAS et al., 2011).

4.4 GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

As progenitoras tiveram sua massa corporal aferida diariamente ao longo do tratamento. Durante esse período, foi observada a presença de possíveis sinais de toxicidade, como perda de peso, salivação, entre outros. Entre o GD21-24, as ratas foram observadas em dois períodos (8h00 e 17h00) quanto ao nascimento dos filhotes. No dia do desmame (PND21), as progenitoras foram eutanasiadas por decapitação, após anestesia prévia com isoflurano inalável em câmara saturada. O útero foi removido para a contagem do número de implantes uterinos. Para obtenção de dados da gestação foram registrados o número de filhotes nascidos e as perdas pós-implante e para sobrevivência durante a lactação foram calculados os índices de viabilidade e desmame.

- Perdas pós-implante = $(n^{\circ} \text{ de implantes} - n^{\circ} \text{ de nativos}) \times n^{\circ} \text{ de implantes}^{-1} \times 100$.
- Índice de viabilidade = $n^{\circ} \text{ de filhotes vivos no PND4} \times n^{\circ} \text{ de nativos}^{-1} \times 100$.
- Índice de desmame = $n^{\circ} \text{ de filhotes vivos no desmame} \times n^{\circ} \text{ de nativos}^{-1} \times 100$.

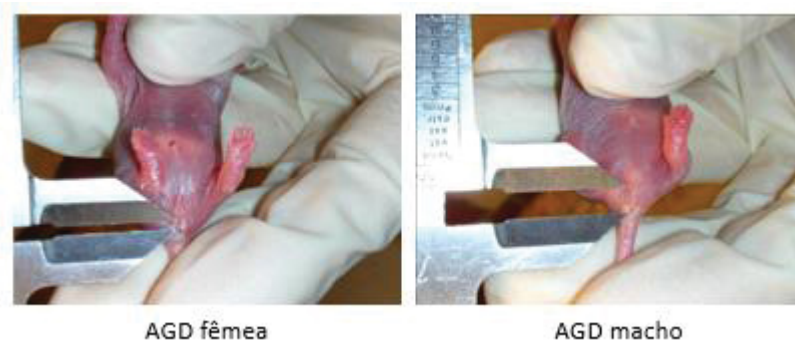
4.5 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES

Os filhotes foram pesados nos dias pós-natais (PND) 1, 4, 7, 14 e 21. Durante o período de lactação, os descendentes machos foram analisados quanto à distância anogenital (AGD) e a separação prepucial (PPS). Para esses parâmetros, a análise foi com todos os filhotes machos de cada ninhada.

4.5.1 Distância anogenital

A distância anogenital (AGD) é uma medida sexualmente dimórfica definida como a distância entre o ânus e a genitália (FIGURA 9) e foi medida em todos os descendentes machos com o auxílio de um paquímetro digital no PND4. A medida foi feita do centro do ânus até a borda posterior da papila genital por um único investigador. Para cada rato foram feitas 3 medidas, utilizando-se a média delas. Foi calculado também o índice anogenital (AGI), que corrige a AGD pela raiz cúbica da massa corporal, normalizando as diferenças do tamanho do animal (MACLEOD et al., 2010; EISENBERG et al., 2011).

FIGURA 9 - DISTÂNCIA ANOGENITAL (AGD) EM RATOS MACHOS E FÊMEAS



4.5.2 Separação prepucial

A separação prepucial (PPS) foi investigada diariamente a partir do PND35, através da retração manual do prepúcio, até que a separação prepucial estivesse completa em todos os descendentes, sendo caracterizada pela exposição da glândula do pênis, redonda e sem a presença de tecido cartilaginoso (FIGURA 10). Possíveis malformações do pênis, como hipospádias, também foram avaliadas nesse período.

FIGURA 10 - SEPARAÇÃO PREPUCIAL (PPS) EM RATOS



Prepúcio não separado (a), separação prepucial incompleta (b) e separação prepucial completa (c).

FONTE: Andrade (2002) (adaptado)

4.6 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR

Após a investigação dos marcadores sexuais (AGD e PPS), quatro machos de cada ninhada foram randomicamente separados para a avaliação reprodutiva em dois períodos: puberdade (65 - 65 dias) e idade adulta (145 - 150 dias). Foram analisados dois animais da ninhada em cada período. Esses ratos foram pesados e eutanasiados por decapitação, após anestesia prévia com isoflurano inalável em câmara saturada. O sangue foi coletado para posterior determinação da concentração plasmática de testosterona. Os órgãos andrógeno-dependentes foram removidos e pesados. Nos animais adultos foram realizados, ainda, a produção espermática diária e a histopatologia do testículo.

4.6.1 Massa de órgãos andrógeno-dependentes

A glândula do pênis, testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, músculo levantador do ânus e glândulas bulbouretrais foram removidos e cuidadosamente dissecados. As massas absoluta e relativa (peso x 100/peso corporal) desses órgãos foram registradas.

4.6.2 Níveis plasmáticos de testosterona

Para a determinação dos níveis plasmáticos de testosterona, o sangue dos animais foi coletado após decapitação, utilizando heparina como anticoagulante. Após centrifugação, o plasma foi separado e mantido a -20°C até o momento da análise. A

concentração de testosterona foi medida por ensaio imunoenzimático utilizando um anticorpo policlonal anti-testosterona (R1556/7) e o respectivo conjugado de testosterona com peroxidase (horseradish peroxidase-testosterone conjugate) obtido de Coralie Munro na Universidade da Califórnia, Davis (Davis, CA, EUA) e de acordo com os procedimentos descritos por Brown et al. (2004). Foi utilizado um tampão de substrato contendo 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal de diamônio (ABTS), e peróxido de hidrogênio da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha). As medidas de absorbância foram realizadas a 405 nm em um leitor de microplacas (BioTek, Winooski, EUA). Os resultados foram expressos em ng/ml e a sensibilidade do ensaio foi de 2,3 pg/poço. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram menores que 10%.

4.6.3 Produção espermática diária

Para a avaliação da produção espermática foram utilizados os testículos direitos dos animais. Após a retirada e pesagem dos testículos, estes foram submetidos à excisão da túnica albugínea e homogeneizados, durante 1 minuto, em 10 mL de salina (solução de cloreto de sódio 0,9%) contendo 0,05% de Triton X-100. A solução obtida foi diluída com salina (1:10) e o número de espermátides resistentes à homogeneização foi contado com um hemocitômetro (Bürker, Alemanha). O número de espermátides diárias por animal corresponde à contagem de espermátides do testículo direito multiplicada pelo fator de correção ($3 \times 0,520833$) e dividido por 6,1. O divisor corresponde ao número de dias em que as espermátides estão presentes nos estágios 17 e 19 do ciclo do epitélio seminífero e que correspondem as espermátides resistentes à homogeneização. Estes estágios, nos ratos, correspondem a 48% de um ciclo completo, o qual tem duração total de 12,75 dias (ROBB, 1978). A produção diária de espermatozóides também foi calculada em relação ao peso do testículo utilizado.

4.6.4 Histologia testicular

Após a eutanásia, o testículo esquerdo de cada animal foi retirado e, após a perfuração da túnica albugínea, fixado em solução de Davidson modificada (50% de

água destilada; 30% de formoldeído 40%; 15% de etanol; 5% de ácido acético glacial) por 24 horas (LATENDRESSE et al., 2002). Os testículos foram então retirados da solução, seccionados transversalmente e mantidos em etanol 70% para posterior desidratação com concentrações crescentes de etanol e xilol: etanol 80% (1 h); etanol 90% (1 h); etanol 95% (1 h); etanol absoluto (4 tempos de 45 min); xilol: etanol (1:1; 12h na geladeira); xilol absoluto (2 tempos de 20 min e um tempo de 5 min). Após a desidratação as peças foram impregnadas em parafina (Paraplast Plus - Sigma) durante 3 horas a 60°C, e subsequentemente emblocadas. Foram realizados cortes transversais de 6 µm de espessura que foram corados com hematoxilina/eosina para posterior análise histológica (BEÇAK e PAULETE, 1976). Em cada testículo foi realizada a medida do diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio germinativo em 20 secções transversais de túbulos apresentando contorno o mais circular possível e que se encontram nos estágios VII e VIII do ciclo do epitélio germinativo. Além disso, 200 secções de túbulos de cada testículo foram analisadas microscopicamente, em aumento de 400x, para determinar a frequência relativa média dos estágios I-VI, VII-VIII, IX-XIII e XIV do ciclo do epitélio germinativo. Um estágio ou associação celular é definido como um conjunto de células germinativas que podem ser observadas numa secção transversal de túbulo. A frequência relativa dos estágios fornece uma estimativa da taxa (ritmo ou duração) do processo espermatogênico (CARVALHO e FAVARETTO, 1993). Além disso, os cortes foram avaliados quanto a possíveis alterações histológicas, particularmente alterações características da síndrome dos ftalatos, como presença de túbulos malformados (áreas disgenéticas), atrofia tubular com depleção de células germinativas e vacuolizações do epitélio germinativo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet ou, alternativamente, pelo teste de Kruskal-Wallis, sempre que os dados não se ajustassem às condições paramétricas. Os dados indicados como índices ou porcentagens foram analisados pelo teste qui-quadrado ou teste de Fisher. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e as ninhadas foram consideradas

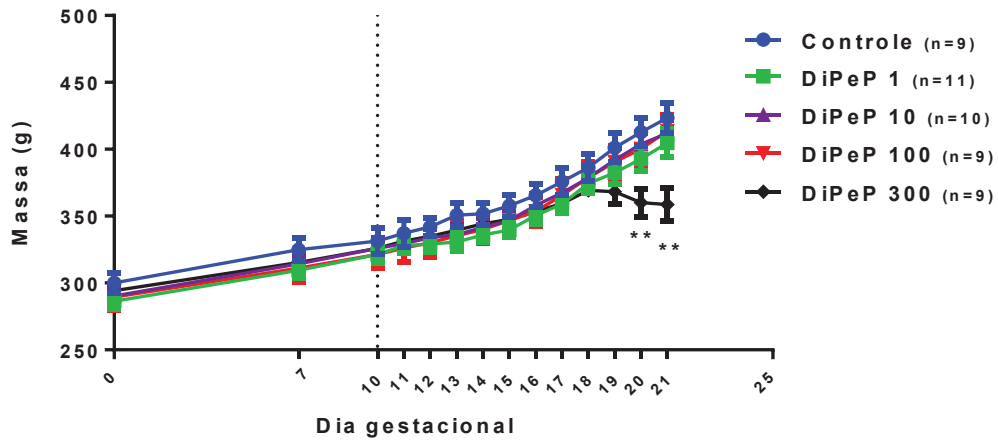
como unidades estatísticas (valores médios dos filhotes das mesmas ninhadas). A maior dose utilizada (DiPeP 300 mg/kg/dia) foi excluída das análises estatísticas de dados pós-natais, devido à perda fetal observada, o que reduziu o tamanho da amostra neste grupo (n = 4 ninhadas). Todas as análises estatísticas e gráficos foram feitos usando o programa Graphpad Prism® e o programa Microsoft Office Excel®.

5 RESULTADOS

5.1 PRENHEZ E LACTAÇÃO

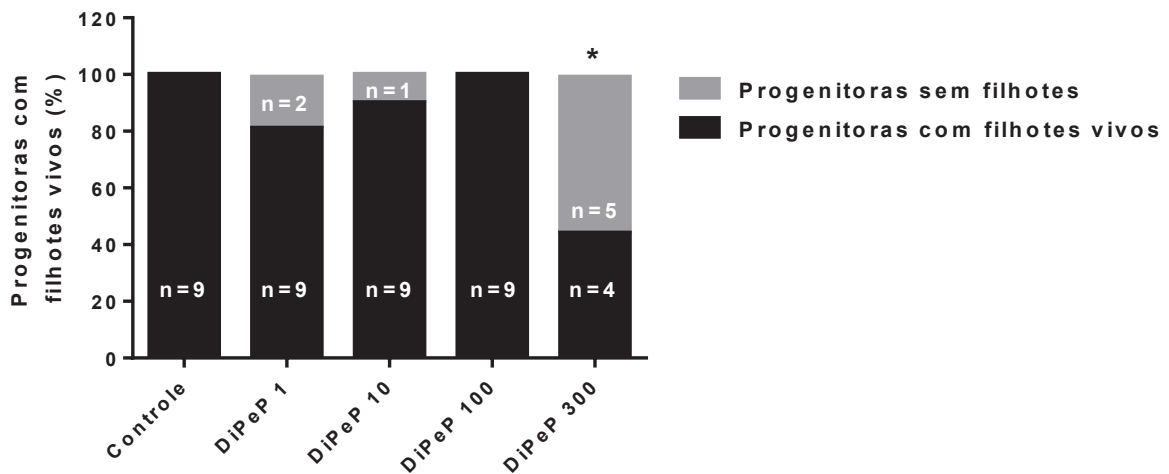
A exposição diária ao DiPeP nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg/dia não alterou o desenvolvimento ponderal das progenitoras na gestação e lactação, porém na maior dose, de 300 mg/kg/dia, mais de 50% das progenitoras apresentou redução do ganho de massa corporal ao final da gestação acompanhado de sangramento vaginal (FIGURA 11) e redução no número de ninhadas com filhotes vivos (FIGURA 12), quando comparados ao grupo controle (TABELA 1). Apenas quatro das nove ratas do grupo 300 mg/kg/dia apresentaram filhotes nascidos vivos e as progenitoras desse grupo apresentaram também índices de viabilidade e desmame significativamente menores quando comparadas ao grupo controle. Os dados da gestação e lactação são mostrados na Tabela 1. Devido à alta taxa de aborto (cinco de nove ratas) e número insuficiente de ninhadas, nenhuma análise estatística adicional foi realizada na maior dose.

FIGURA 11 - EFEITOS DO DIPEP SOBRE O GANHO DE MASSA DURANTE A GESTAÇÃO DAS PROGENITORAS EXPOSTAS DIARIAMENTE VIA GAVAGEM A PARTIR DO GD10



NOTA: Os resultados são expressos como média \pm SEM; **Difere significativamente do grupo controle ($p \leq 0,01$; ANOVA de duas vias).

FIGURA 12 - PERCENTUAL DE PROGENITORAS COM FILHOTES VIVOS (%) APÓS EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA



NOTA: *Difere significativamente do grupo controle ($p \leq 0,05$; Qui-quadrado/Teste exato de Fisher).

TABELA 1 - DADOS DA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO DE RATAS EXPOSTAS AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA DO GD10 AO PND21

Parâmetros	Grupos experimentais				
	Controle	DiPeP 1	DiPeP 10	DiPeP 100	DiPeP 300
Número de progenitoras	9	11	10	9	9
Ganho de massa GD10-21	92,0 ± 6,88	84,5 ± 7,84	86,0 ± 4,09	92,3 ± 6,02	32,8 ± 12,39**
Tamanho das ninhadas	11,1 ± 1,07	9,3 ± 0,84	9,8 ± 0,68	9,4 ± 1,40	3,7 ± 1,65**
Número de implantes	12,6 ± 0,93	12,7 ± 0,44	12,0 ± 0,71	11,8 ± 0,85	9,3 ± 1,89
Perdas pós-implantes (%)	10,5 ± 4,84	26,5 ± 12,04	17,3 ± 10,10	19,3 ± 9,50	61,6 ± 15,53
Índice de viabilidade (%)	99,3 ± 0,74	100 (n=9)	100 (n=9)	95,2 ± 3,73	80,9 ± 10,94 ^a (n=4)
Índice de desmame (%)	99,3 ± 0,74	100 (n=9)	99,0 (n=9) ± 1,01	95,2 ± 3,73	80,9 ± 10,94 ^a (n=4)

NOTA: Os resultados são expressos como média ± SEM; ** Difere significativamente do grupo controle ($p \leq 0,01$; ANOVA - Dunnett/Kruskall Wallis - Dunn) ^aDados excluídos da análise estatística devido ao pequeno tamanho da amostra.

5.2 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES

5.2.1 Peso dos filhotes

O peso ao nascer e ao desmame dos descendentes expostos *in utero* e na lactação ao DiPeP está ilustrado na tabela 2.

TABELA 2 - PESO AO NASCER E AO DESMAME DE FILHOTES EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

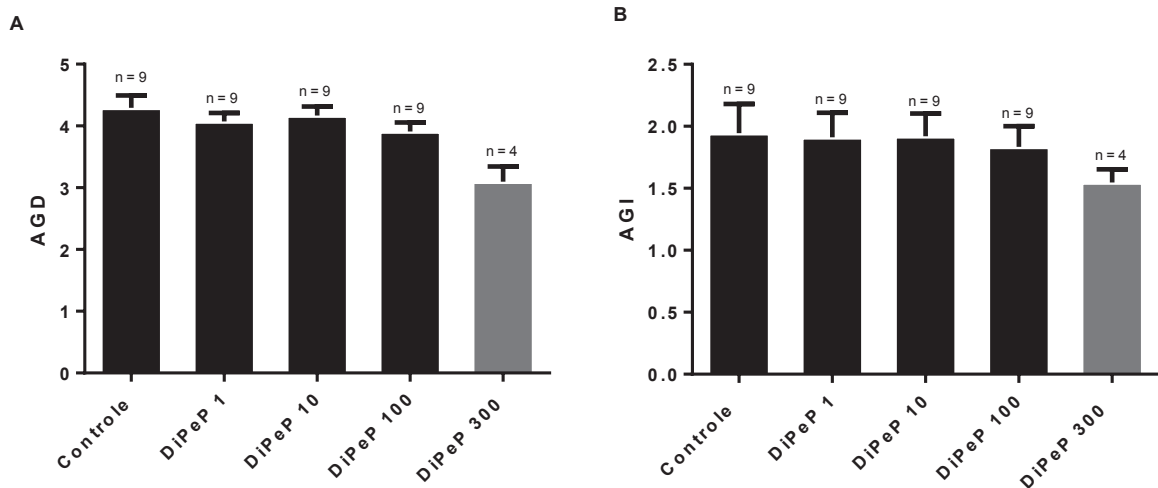
Dose (mg/kg/dia)	Número de ninhadas	Peso ao nascer (g)	Peso ao desmame (g)
Controle	9	6,59 ± 0,20	38,76 ± 3,58
1	9	6,21 ± 0,26	37,95 ± 1,28
10	9	6,61 ± 0,14	39,20 ± 1,53
100	9	6,28 ± 0,14	44,19 ± 4,74
300	4	5,61 ± 0,29	39,91 ± 4,25

NOTA: Os resultados são expressos como média ± SEM (ANOVA - Dunnett). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante.

5.2.2 Distância anogenital (AGD) e separação prepucial (PPS)

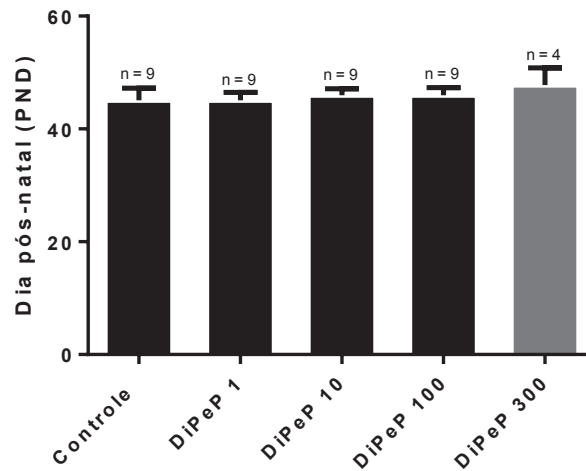
Não foram observados efeitos significativos para a AGD e AGI. No entanto, em ratos expostos a 300 mg/kg, a média de AGD e AGI foram, respectivamente, 27,8% e 20,5% menores do que as observadas no controle (FIGURA 13). Da mesma forma, a idade na SPP, um marcador do início da puberdade em machos, não diferiu entre os grupos, embora tenha sido retardada em aproximadamente 2 dias na maior dose (FIGURA 14).

FIGURA 13 - DISTÂNCIA ANOGENITAL (AGD) E ÍNDICE ANOGENITAL (AGI) DE ANIMAIS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA



NOTA: (A) AGD (mm) e (B) AGI (mm/peso corporal ^{1/3}). Os resultados são expressos como média \pm SEM (ANOVA - Dunnett). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante.

FIGURA 14 - IDADE DE SEPARAÇÃO PREPUCIAL (PPS) DE ANIMAIS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA



NOTA: Os resultados são expressos como média \pm SEM (ANOVA - Dunnett). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante.

5.4 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR

5.4.1 Massa de órgãos andrógeno-dependentes

As massas absoluta e relativa de órgãos andrógeno-dependentes dos animais púberes expostos *in utero* e na lactação ao DiPeP são ilustrados nas tabelas 3 e 4. Não houve diferença significativa entre os grupos. As massas absoluta e relativa de órgãos dos animais adultos expostos *in utero* e na lactação ao DiPeP são ilustrados nas tabelas 5 e 6. A vesícula seminal vazia pareceu ser o órgão mais sensível, com reduções significativas na sua massa absoluta e relativa nos grupos expostos ao DiPeP nas doses de 10 e 100 mg/kg/dia, quando comparados ao grupo controle (FIGURA 15). No geral, os pesos médios da maioria desses órgãos, tanto nos animais púberes quanto adultos, foram consistentemente menores em ratos expostos a 300 mg/kg/dia quando comparados aos animais controles.

TABELA 3 - MASSA ABSOLUTA (g) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES DE RATOS PÚBERES EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

	Grupos Experimentais				
	Controle (n=9)	DiPeP 1 (n=9)	DiPeP 10 (n=9)	DiPeP 100 (n=9)	DiPeP 300 (n=4)
Massa corporal (g)	247	262	264	265	260
Testículos	1,436 ± 0,051	1,356 ± 0,040	1,390 ± 0,042	1,484 ± 0,068	1,432 ± 0,011
Epidídimos	0,256 ± 0,011	0,248 ± 0,008	0,253 ± 0,012	0,248 ± 0,008	0,230 ± 0,029
Glande do pênis	0,070 ± 0,002	0,072 ± 0,003	0,070 ± 0,001	0,070 ± 0,002	0,057 ± 0,004
Próstata	0,157 ± 0,006	0,173 ± 0,013	0,162 ± 0,008	0,170 ± 0,007	0,155 ± 0,023
Vesícula seminal vazia	0,306 ± 0,012	0,340 ± 0,012	0,308 ± 0,013	0,316 ± 0,019	0,267 ± 0,028
Músculo levantador do ânus	0,457 ± 0,021	0,473 ± 0,023	0,469 ± 0,010	0,467 ± 0,017	0,377 ± 0,052
Glândulas bulbouretrais	0,030 ± 0,002	0,031 ± 0,002	0,031 ± 0,001	0,032 ± 0,002	0,027 ± 0,001

NOTA: Os resultados são expressos como média ± SEM (ANOVA - Dunnett). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante.

TABELA 4 - MASSA RELATIVA (%) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES DE RATOS PÚBERES EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

	Grupos Experimentais				
	Controle (n=9)	DiPeP 1 (n=9)	DiPeP 10 (n=9)	DiPeP 100 (n=9)	DiPeP 300 (n=4)
Testículos	0,588 ± 0,035	0,518 ± 0,015	0,529 ± 0,018	0,561 ± 0,016	0,559 ± 0,033
Epidídimos	0,104 ± 0,005	0,095 ± 0,003	0,096 ± 0,004	0,094 ± 0,004	0,089 ± 0,011
Glande do pênis	0,028 ± 0,0005	0,027 ± 0,0008	0,027 ± 0,0005	0,027 ± 0,0015	0,022 ± 0,0007
Próstata	0,063 ± 0,002	0,073 ± 0,004	0,062 ± 0,003	0,064 ± 0,004	0,060 ± 0,007
Vesícula seminal vazia	0,125 ± 0,004	0,130 ± 0,005	0,117 ± 0,005	0,121 ± 0,010	0,103 ± 0,006
Músculo levantador do ânus	0,186 ± 0,005	0,180 ± 0,006	0,178 ± 0,004	0,177 ± 0,009	0,143 ± 0,005
Glândulas bulbouretrais	0,012 ± 0,0006	0,013 ± 0,0009	0,012 ± 0,0005	0,012 ± 0,0011	0,011 ± 0,0009

Nota: Os resultados são expressos como média ± SEM (ANOVA - Dunnett). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante.

TABELA 5 - MASSA ABSOLUTA (g) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES, FÍGADO E RINS DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

	Grupos Experimentais				
	Controle (n=9)	DiPeP 1 (n=9)	DiPeP 10 (n=9)	DiPeP 100 (n=9)	DiPeP 300 (n=4)
Massa corporal (g)	421	421	420	450	446
Testículos	1,748 ± 0,078	1,713 ± 0,052	1,656 ± 0,051	1,878 ± 0,104	1,821 ± 0,168
Epidídimos	0,613 ± 0,020	0,620 ± 0,015	0,596 ± 0,014	0,636 ± 0,025	0,590 ± 0,053
Glande do pênis	0,091 ± 0,002	0,093 ± 0,002	0,091 ± 0,001	0,091 ± 0,002	0,076 ± 0,004
Próstata	0,416 ± 0,030	0,412 ± 0,023	0,420 ± 0,029	0,414 ± 0,020	0,340 ± 0,058
Músculo levantador do ânus	1,109 ± 0,029	1,059 ± 0,022	1,064 ± 0,037	1,092 ± 0,044	0,939 ± 0,121
Glândulas bulbouretrais	0,092 ± 0,005	0,092 ± 0,008	0,082 ± 0,005	0,087 ± 0,005	0,096 ± 0,009
Fígado	12,6 ± 0,633	13,5 ± 0,343	12,8 ± 0,243	13,5 ± 0,908	14,1 ± 1,467
Rins	1,521 ± 0,060	1,530 ± 0,038	1,447 ± 0,036	1,510 ± 0,088	1,447 ± 0,155

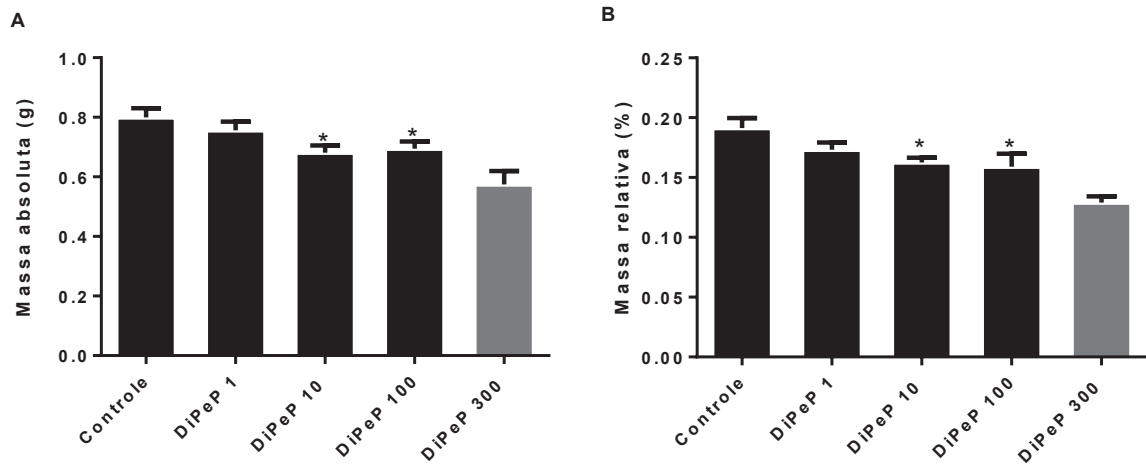
NOTA: Os resultados são expressos como média ± SEM (ANOVA – Dunnet). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante.

TABELA 6 - MASSA RELATIVA (%) DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES, FÍGADO E RINS DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

	Grupos Experimentais				
	Controle (n=9)	DiPeP 1 (n=9)	DiPeP 10 (n=9)	DiPeP 100 (n=9)	DiPeP 300 (n=4)
Testículos	0,417 ± 0,010	0,403 ± 0,009	0,395 ± 0,01	0,422 ± 0,017	0,408 ± 0,009
Epidídimos	0,146 ± 0,002	0,148 ± 0,005	0,142 ± 0,003	0,144 ± 0,007	0,132 ± 0,003
Glande do pênis	0,022 ± 0,0007	0,022 ± 0,0009	0,022 ± 0,0002	0,021 ± 0,0011	0,017 ± 0,0009
Próstata	0,100 ± 0,007	0,098 ± 0,005	0,100 ± 0,006	0,094 ± 0,005	0,075 ± 0,007
Músculo levantador do ânus	0,265 ± 0,006	0,254 ± 0,011	0,254 ± 0,008	0,251 ± 0,021	0,211 ± 0,025
Glândulas bulbouretrais	0,021 ± 0,001	0,022 ± 0,002	0,019 ± 0,0009	0,020 ± 0,002	0,022 ± 0,001
Fígado	2,973 ± 0,053	3,168 ± 0,089	3,055 ± 0,646	3,001 ± 0,033	3,156 ± 0,068
Rins	0,362 ± 0,006	0,365 ± 0,011	0,344 ± 0,007	0,337 ± 0,003	0,330 ± 0,009

NOTA: Os resultados são expressos como média ± SEM (ANOVA – Dunnet). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante.

FIGURA 15 - MASSA ABSOLUTA (A) E RELATIVA (B) DA VESÍCULA SEMINAL VAZIA DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA



NOTA: Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=9); *Difere significativamente do grupo controle ($p \leq 0,05$; ANOVA – Dunnett). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante (n=4).

5.4.2 Níveis plasmáticos de testosterona e produção espermática diária

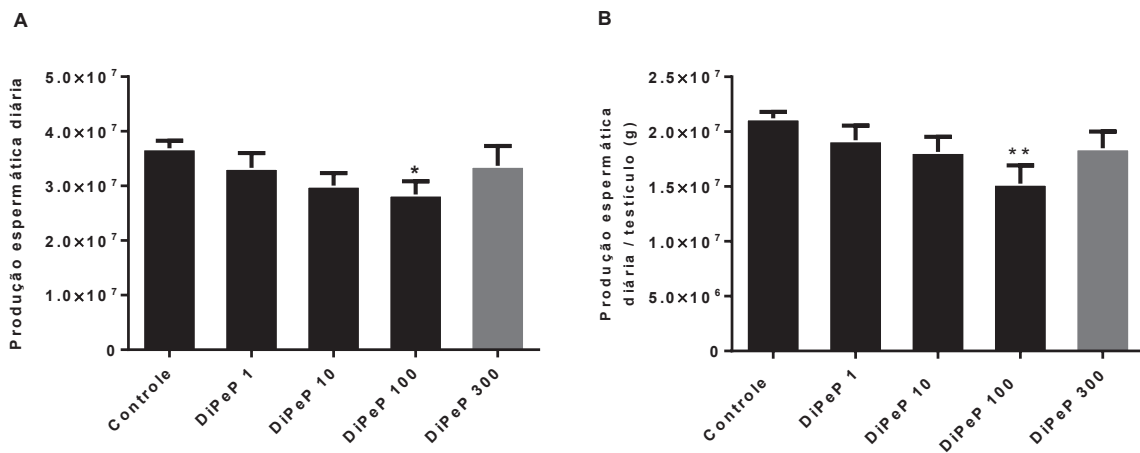
As doses de DiPeP testadas no presente estudo não produziram efeito nos níveis de testosterona plasmática nos animais púberes e adultos (TABELA 7). Quanto à produção espermática diária nos animais adultos, não foram observados efeitos significativos nos animais expostos às doses de 1 e 10 mg/kg/dia de DiPeP. No entanto, houve redução significativa nos animais expostos ao DiPeP na dose de 100 mg/kg/dia, quando comparados aos animais do grupo controle (FIGURA 16).

TABELA 7 - NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA DE ANIMAIS PÚBERES E ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

Níveis plasmáticos de testosterona	Grupos Experimentais				
	Controle (n=9)	DiPeP 1 (n=9)	DiPeP 10 (n=9)	DiPeP 100 (n=9)	DiPeP 300 (n=4)
Animaes púberes	1,002 \pm 0,164	0,822 \pm 0,138	0,804 \pm 0,116	0,823 \pm 0,142	0,818 \pm 0,244
Animaes adultos	1,287 \pm 0,198	1,553 \pm 0,283	1,152 \pm 0,173	1,113 \pm 0,215	1,692 \pm 0,417

NOTA: Os resultados expressam medias \pm SEM das concentrações plasmáticas de testosterona em ng/ml (ANOVA – Dunnett).

FIGURA 16 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

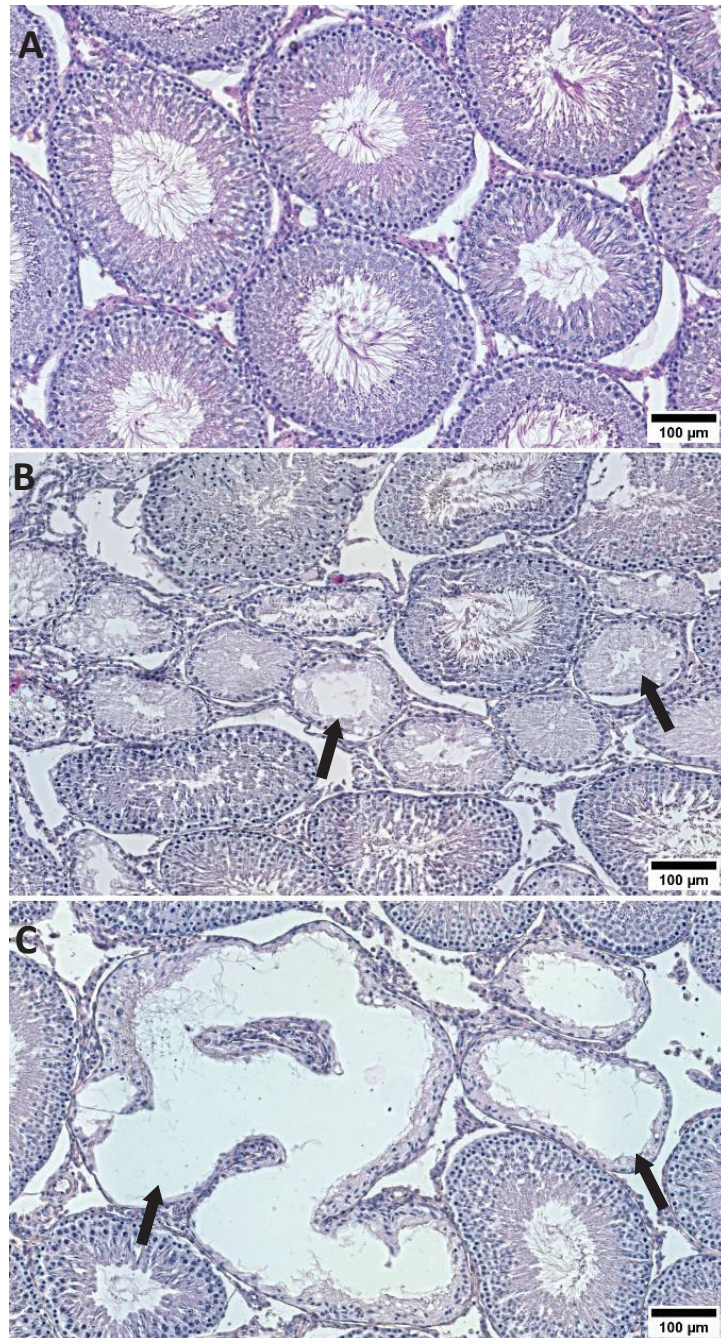


NOTA: (A) Produção espermiática total e (B) produção espermiática em relação ao peso testicular. Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=9). *Difere significativamente do grupo controle (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01/ANOVA - Dunnet). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante (n=4).

5.5.3 Histologia testicular

Na análise histopatológica dos testículos, não foram observadas alterações significativas nos grupos expostos a 1 e 10 mg/kg/dia de DiPeP. No entanto, um dos animais tratados com 100 mg/kg/dia apresentou túbulos atróficos e vacuolizados e um animal que recebeu a maior dose (300 mg/kg/dia) teve a presença de túbulos malformados com áreas disgenéticas (FIGURA 17). Em relação à frequência relativa dos estágios do ciclo do epitélio germinativo, diâmetro tubulare e altura do epitélio germinativo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (TABELA 8).

FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIAS DE SEÇÕES TESTICULARES DE RATOS



Nota: (A) Animal controle, (B) animal exposto a 100 mg/kg/dia de DiPeP, com a presença de túbulos atróficos e vacuolizados (setas) (C) animal exposto a DiPeP a 300 mg/kg/dia, mostrando áreas disgenéticas / túbulos malformados (setas). Aumento de 100x.

TABELA 8 - DADOS DE HISTOLOGIA TESTICULAR DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS *IN UTERO* E LACTAÇÃO AO DIPEP NAS DOSES DE 1, 10, 100 E 300 MG/KG/DIA

Estágios (%)	Grupos experimentais				
	Controle (n=9)	DiPeP 1 (n=9)	DiPeP 10 (n=9)	DiPeP 100 (n=9)	DiPeP 300 (n=4)
I-VI	39,61 ± 1,55	39,66 ± 1,35	39,67 ± 1,59	39,72 ± 1,45	39,62 ± 2,21
VII-VIII	30,72 ± 2,23	29,44 ± 1,23	29,83 ± 1,86	28,94 ± 0,84	29,00 ± 3,14
IX-XIII	25,00 ± 0,83	25,78 ± 1,71	25,55 ± 0,92	26,5 ± 1,20	26,62 ± 1,81
XIV	5,11 ± 0,70	4,83 ± 0,89	4,94 ± 0,84	4,72 ± 0,53	4,75 ± 0,65
Diâmetro tubular (µm)	292,0 ± 11,13	280,4 ± 6,77	285,7 ± 9,18	277,9 ± 4,08	281,7 ± 7,53
Altura do epitélio germinativo (µm)	87,87 ± 4,55	81,03 ± 2,24	84,44 ± 2,91	82,21 ± 1,76	81,87 ± 4,05

NOTA: Os resultados são expressos como média ± SEM (n=9). O grupo DiPeP 300 não foi incluído nas análises estatísticas devido a toxicidade fetal e pequeno tamanho amostral resultante (n=4).

6 DISCUSSÃO

A exposição de organismos a determinados produtos químicos presentes no meio ambiente, como os ftalatos, pode interferir no desenvolvimento de órgãos que respondem aos sinais endócrinos, especialmente se esta exposição ocorrer em períodos críticos do desenvolvimento, como o período intrauterino e pós-natal precoce. O sistema reprodutor é um dos principais alvos desses desreguladores endócrinos, que já foram associados com inúmeras disfunções em animais, principalmente em regiões onde já foi estabelecida a presença de vários produtos químicos sintéticos. Entre os efeitos deletérios já observados estão a diminuição da fertilidade em aves, peixes, moluscos e mamíferos, desmasculinização/feminização de peixes, aves e mamíferos machos assim como defeminização/masculinização das fêmeas (COLBORN et al., 1993).

A exposição de roedores aos ftalatos está relacionada com anormalidades no desenvolvimento e na reprodução devido à sua capacidade em reduzir a produção de testosterona testicular fetal. Existe, portanto, uma preocupação de que esses compostos possam ter efeitos adversos também sobre a saúde reprodutiva humana. O DiPeP é um ftalato de ocorrência única no Brasil, o que resulta em dados escassos

disponíveis na literatura acerca de sua toxicidade reprodutiva. Sendo assim, o presente estudo avaliou os efeitos desse composto sobre o sistema reprodutor de ratos machos expostos *in utero* e durante a lactação.

É importante ressaltar que os efeitos encontrados em estudos com ftalatos são dependentes do composto testado, sua dose, a linhagem de ratos utilizada e o período em que houve a exposição. Também existem diferenças no modo com que as diferentes espécies, incluindo ratos, camundongos, primatas e humanos, respondem a esses compostos, visto que sua organização, estrutura, biologia do tecido intersticial e escala temporal de desenvolvimento do testículo são diferentes (ALBERT E JÉGOU, 2013). Além disso, embora as alterações induzidas em ratos sejam usualmente observadas somente após a exposição a doses muito elevadas de ftalatos quando comparadas às doses de exposição humana, estudos conduzidos por Howdshell e colaboradores (2008) já demonstraram que os ftalatos com atividade antiandrogênica, quando combinados, podem provocar efeitos aditivos sobre a produção de testosterona fetal e a gestação em ratos.

5.1 PRENHEZ E LACTAÇÃO

Nesse estudo, o DiPeP não interferiu no ganho de peso das progenitoras e da progênie bem como não provocou efeitos adversos sobre a prenhez nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg/dia. Porém, no grupo da maior dose (300 mg/kg/dia), foi observada redução no ganho de peso ao final da gestação acompanhado de sangramento vaginal em cinco das nove prenhas, sendo esse um indicativo de aborto espontâneo. Baseando-se nesses resultados, sugerimos que a NOAEL dose para toxicidade fetal neste modelo experimental é estimada em 100 mg/kg/dia.

Hellwig e colaboradores (1997) já demonstraram que a administração oral de DiPeP a ratas prenhes na dose de 1000 mg/kg/dia de GD6-15 foi capaz de causar 100% de embriofetalidade, efeitos muito mais graves do que aqueles observados em mães tratadas com a mesma dose nível de DEHP. No entanto, nenhum efeito foi detectado em mães tratadas com DiPeP a 40 e 200 mg/kg/dia. Da mesma forma, Howdshell e colaboradores (2008) observaram que o DnPeP (isômero do DiPeP) em doses orais maternas de 200 mg/kg/dia ou menores, administradas por 10 dias (GD 8-18), não induzem toxicidade materna e fetal, enquanto que doses de 300, 600 e

900 mg/kg/dia resultam em perda completa de ninhadas. Tomados em conjunto, estes resultados indicam que pentalftalatos são mais potentes do que outros ftalatos antiandrogênicos comuns em relação à embrioletalidade e que outros mecanismos além da inibição androgênica podem ser responsáveis por este efeito. Esses compostos possivelmente prejudicam também sistema endócrino materno, levando a um prejuízo na manutenção da prenhez. De acordo com alguns estudos, a embrioletalidade causada pelos ftalatos parece estar relacionada a uma redução nos níveis de progesterona, prejudicando a manutenção da gestação (GRAY et al., 2006). Curiosamente, em um estudo recente de nosso laboratório, não foi detectada toxicidade materna ou fetal em ratos expostos a DiPeP em uma dose de 500 mg/kg/dia de GD14-18, apesar de reduções severas na produção de testosterona testicular fetal (BERTONCELLO SOUZA et al. 2018). Hannas e colaboradores (2011) também não encontraram nenhum sinal de redução na sobrevivência fetal em ratos após administração única de DnPeP no GD17 em dose de 1200 mg/kg/dia. No presente estudo, uma diminuição no peso corporal materno foi evidente apenas no final da gravidez, aproximadamente 9 dias após a dosagem inicial, indicando que um período de exposição prolongado é necessário para induzir perda fetal em ratos tratados com pentalftalatos.

6.2 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE MASCULINA

Já foi demonstrado que o DiPeP pode reduzir a produção de testosterona testicular fetal de maneira dose-dependente, exibindo uma dose efetiva 50 (ED50) de 93,6 mg/kg/dia, que é menor do que a relatada para o DBP e DEHP e comparável à do DnPeP (BERTONCELLO SOUZA et al., 2018). Tanto em humanos quanto em roedores, a produção de andrógenos testiculares tem um papel essencial na masculinização do trato reprodutivo em homens. Vários estudos demonstraram que a exposição de ratos a ftalatos durante a janela de programação masculina (GD14-18 em ratos) inibe a produção de andrógenos testiculares (HOWDESHELL et al., 2008; BERTONCELLO SOUZA et al., 2018; SHULTZ et al., 2001), resultando em efeitos adversos nos organismos expostos. Esse é o período no qual a distância anogenital e o tamanho e função dos órgãos reprodutivos masculinos seriam permanentemente

determinados, sendo a ação androgênica *in utero* fundamental para esse processo (GRAY et al. 2001; SHARPE et al. 2006).

A distância anogenital (AGD) é uma medida sexualmente dimórfica definida como a distância entre o ânus e a genitália, sendo de 50-100% maior em machos do que em fêmeas. Esse parâmetro tem sido utilizado como um marcador externo que pode indicar alterações no ambiente androgênico pré-natal em animais de laboratório e em humanos e já foi associado com uma maior incidência de outras alterações reprodutivas como criptorquidismo, hipospádias e baixa contagem de espermatozoides (VAN DEN DRIESCHE et al. 2011; GRAY et al. 2001; WELSH et al. 2008). Os andrógenos secretados pelos testículos fetais durante o desenvolvimento induzem o crescimento da AGD nos machos e, portanto, uma redução nesse parâmetro reflete uma redução na ação androgênica pré-natal, embora também possa ser sutilmente responsiva a mudanças no ambiente endócrino durante o desenvolvimento pubertal (MACLEOD et al., 2010; EISENBERG et al., 2011; KITA et al., 2016). Sendo assim, o efeito antiandrogênico dos ftalatos durante a diferenciação sexual em machos pode resultar em diminuição na AGD de roedores (PARKS et al., 2000; EMA et al., 2001; GRAY et al., 2009) e, inclusive, de humanos, onde foi encontrada uma associação entre a exposição materna ao DEHP no primeiro trimestre de gestação e a AGD reduzida nos meninos recém-nascidos (SWAN et al., 2015). Visto isso, parte desse trabalho foi destinada a realizar essa avaliação.

Hannas e colaboradores (2011) demonstraram que o isômero do DiPeP, dipentil ftalato (DnPeP), é o mais potente dos ftalatos estudados em reduzir a produção de testosterona fetal em ratos, sendo cerca de três a oito vezes mais potente que o DBP e o DEHP. Ao comparar a ED50 para os efeitos pós-natais, observaram ainda que o DPeP é aproximadamente duas vezes mais potente que o DEHP em reduzir a AGD. Após 10 dias (GD 8–18) de exposição *in utero*, o DnPeP diminuiu significativamente a AGD dos machos (PND2) a partir da dose de 100 mg/kg/dia. Uma redução de aproximadamente 80% na produção de testosterona (dose de 100 mg/kg/dia) correlacionou-se com um declínio de aproximadamente 20% na AGD na mesma dose. No geral, alterações mais evidentes na AGD em ratos costumam aparecer em exposições a doses mais elevadas de ftalatos. Gray e colaboradores (2009) observaram uma redução na AGD de ratos expostos de GD8-PND17 a 300 mg/kg/dia de DEHP. Mylchreest e colaboradores (2000) observaram redução na AGD

de ratos expostos a 500 mg/kg/dia de DBP de GD12-21. Em ambos os estudos, não foram observadas reduções significativas na AGD na dose de 100 mg/kg/dia, o que corrobora nossos resultados. Em humanos, no entanto, estudos epidemiológicos indicam associações entre AGD reduzida em recém-nascidos do sexo masculino com exposição materna a doses muito mais baixas de ftalato (SWAN et al., 2015), sugerindo uma maior suscetibilidade do testículo fetal humanos.

Na sequência foi realizada a avaliação da separação prepucial (SPP), que é outro marcador dependente de androgênios, sendo considerada um indicador confiável e não invasivo do estado androgênico do rato púbere (GAYTAN et al., 1988). A PPS é o resultado da cornificação do revestimento epitelial do prepúcio, que se destaca da glândula do pênis. Assim como outros marcadores, também é um evento de desenvolvimento sexual dependente de andrógenos e ocorre no início da puberdade, imediatamente antes do aparecimento de espermatozoides maduros na cauda epididimária e do aumento significativo de androgênios circulantes, sendo amplamente utilizada como um índice do desenvolvimento pubertal (LYONS et al., 1942; KORENBROT et al., 1977). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas nesse marcador. Achados semelhantes foram observados em trabalho realizado por Gray e colaboradores (2009), onde o DEHP foi administrado às progenitoras de GD8-PND17. Alguns dos descendentes do sexo masculino, no entanto, continuaram a ser expostos ao DEHP de PND18-63 (grupo PUB), enquanto os machos restantes não foram mais expostos (grupo IUL). Um atraso na PPS na dose de 300 mg/kg/dia de DiPeP foi observado apenas no grupo PUB. Além disso, em outro trabalho realizado por Mylchreest e colaboradores (2000) não observaram atraso na PPS de ratos expostos *in utero* de GD12-21 a diferentes doses de DBP (0-500 mg/kg/dia). Em conjunto, esses dados sugerem que a separação prepucial, embora seja um evento andrógeno-dependente, é menos suscetível a insuficiência androgênica *in utero*, sendo mais responsiva a desregulação endócrina pós-natal. Em nosso modelo experimental, que incluiu a exposição nos períodos gestacional e lactacional, porém não na puberdade, a idade de separação prepucial também não diferiu entre os grupos.

De maneira geral, o DiPeP não causou alterações significativas em marcadores de androgenização pré-natal nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg/dia. No entanto, é importante destacar que, embora a dose de 300 mg/kg/dia de DiPeP tenha

ocasionado toxicidade fetal, com conseqüente redução do número de ninhadas e filhotes, o que impediu a sua inclusão nas análises estatísticas, houve marcante redução na AGD (-27.8%) e AGI (-20.5%) e atraso na separação prepucial (aproximadamente 2 dias) em relação ao controle, indicando insuficiência androgênica pré-natal. Além disso, é possível especular que as ninhadas e filhotes não viáveis nessa dose representem não só uma população mais sensível aos efeitos de toxicidade sistêmica, mas possivelmente também em relação aos efeitos antiandrogênicos, de forma que esses efeitos poderiam ser ainda mais evidentes.

6.3 AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR

6.3.1 Status androgênico pós-natal: massa de órgãos e níveis de testosterona plasmática

O desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos é regulado por hormônios esteroides endógenos, juntamente com outros componentes endócrinos e parácrinos. Portanto, os órgãos que contêm receptores hormonais são os mais susceptíveis aos efeitos da exposição intrauterina aos desreguladores endócrinos, podendo ter o seu desenvolvimento prejudicado (COLBORN et al., 1993). Diversas pesquisas já demonstraram que a atividade antiandrogênica dos ftalatos pode levar a reduções na massa de órgãos dependentes de hormônios, que incluem os testículos, epidídimos, próstata, glândula do pênis, vesícula seminal, músculo levantador do ânus e glândulas bulbouretrais (MYLCHREEST et al., 2000; FISHER et al., 2003; DALSENTER et al., 2006; ANDRADE et al., 2006; GRAY et al., 2009)

Como o DiPeP apresenta uma potente atividade antiandrogênica, sendo capaz de reduzir a produção de testosterona testicular fetal, foi avaliado na sequência o peso de órgãos andrógeno-dependentes. Os ftalatos não atuam como antagonistas do receptor androgênico, mas podem interferir no equilíbrio hormonal, afetando negativamente enzimas esteroideogênicas. Nesse estudo, a vesícula seminal foi o órgão mais sensível, apresentando redução nas massas absoluta e relativa da na idade adulta nos grupos de 10 e 100 mg/kg/dia. Esse resultado não é surpreendente, uma vez que a ação dos andrógenos é essencial para o desenvolvimento normal do sistema reprodutor masculino dos mamíferos. Essa redução indica uma alteração no

'imprinting' hormonal resultando em uma organização anormal desses tecidos, que perdem o seu potencial de resposta máxima aos andrógenos após a puberdade (GRAY et al., 2000; DALSENER et al., 2006). Nesse sentido, é interessante notar que esse efeito ocorreu apesar de concentrações normais de testosterona nos ratos púberes e adultos, evidenciando o potencial do DiPeP em alterar a responsividade desses órgãos na vida pós-natal. Os níveis normais de testosterona plasmática observados corroboram os outros estudos com ftalatos (GRAY et al., 2000; FISHER et al., 2003; DALSENER et al., 2006), indicando uma recuperação do estado androgênico dos animais já na puberdade. Kulin e colaboradores (1984) já demonstraram que, mesmo sob uma condição em que há atraso na puberdade, a secreção das gonadotrofinas FSH e LH não é alterada, mantendo a produção de testosterona.

Assim como evidenciado pelas alterações na AGD e PPS, a exposição materna à dose de 300 mg/kg/dia também induziu alterações marcantes na massa de tecidos andrógeno-dependentes de animais púberes e adultos, incluindo redução na massa da próstata, vesícula seminal, glândula e músculo levantador do ânus. Apesar do pequeno tamanho amostral e das evidências de toxicidade fetal nessa dose, esses dados corroboram os achados de atividade antiandrogênica nas doses mais baixas de 10 e 100 mg/kg/dia, que apresentaram redução na massa da vesícula seminal.

6.3.2 Produção espermática e histologia testicular

Nos últimos anos, tem se detectado uma queda na fertilidade masculina por alterações na contagem e qualidade espermática associada a outras anomalias reprodutivas, incluindo malformações congênitas e câncer testicular em humanos. Problemas semelhantes já foram observados também na vida selvagem. Essa redução na fertilidade têm sido correlacionada em grande parte à exposição a compostos tóxicos presentes no ambiente e em diversos produtos de uso comum (SARADHA e MATHUR., 2006; LEVINE et al., 2017). A redução da produção espermática é um dos principais efeitos observados após exposição aos ftalatos em animais (ANDRADE et al., 2006; DALSENER et al., 2006; GRAY et al., 2009). No presente estudo, essa avaliação mostrou que o DiPeP foi capaz de reduzir

significativamente a produção espermática diária dos animais expostos à dose de 100 mg/kg/dia.

Visto que as células de Sertoli são determinantes essenciais na produção espermática, acredita-se que as alterações observadas na espermatogênese após a exposição aos ftalatos resultem de disfunções ou redução nessas células, que não conseguem fornecer o suporte físico e metabólico de maneira adequada às células germinativas (KAVLOCK et al., 2002). Dostal e colaboradores (1988) já demonstraram que o DEHP é capaz de reduzir a proliferação de células de Sertoli durante os períodos perinatal e pré-puberal. Uma publicação de Fisher e colaboradores (2003) relatou um prejuízo generalizado na maturação das células de Sertoli em ratos púberes e adultos expostos *in utero* (GD 13-21) ao DBP na dose 500 mg/kg/dia. Outros estudos observaram, ainda, uma interferência dos ftalatos com a ação do hormônio folículo estimulante (FSH) sobre as células de Sertoli, sendo um provável componente de toxicidade testicular (LLOYDE e FOSTER, 1988). Esse prejuízo durante estágios críticos pode produzir efeitos irreversíveis na produção de espermatozoides, uma vez que as células de Sertoli apenas se proliferam na sua fase imatura, não se dividindo no rato adulto (ORTH, 1982). No presente estudo, apesar da redução detectada na produção espermática diária na dose de 100 mg/kg/dia, não foi observada nenhuma alteração na massa testicular, o que corrobora dados de Dalsenter e colaboradores (2006) com o DEHP. Esse resultado indica uma redução na eficiência da espermatogênese, o que possivelmente está relacionado à maturação e suporte inadequados das células de Sertoli, mas não à sua quantidade. É interessante ressaltar que os roedores, ao contrário dos humanos, produzem espermatozoides em quantidades bem mais elevadas do que o necessário para fertilidade, portanto, danos gonadais consideráveis podem ser tolerados até certo ponto, sem comprometer a fertilidade do animal (ANDRADE et al., 2006).

A última etapa deste trabalho foi destinada à avaliação histopatológica do testículo, pois já foi demonstrado que ftalatos podem causar lesões testiculares observadas já no período fetal, como presença de áreas disgenéticas, caracterizadas por cordões seminíferos malformados contendo gonócitos multinucleados, e agregados de células de Leydig no espaço intersticial (FISHER et al., 2003). Os sinais hormonais durante o período pré-natal são críticos para o desenvolvimento normal dos testículos, portanto químicos como os ftalatos podem levar a desregulação do

crescimento e diferenciação das células de Leydig e Sertoli. Na prole adulta, os testículos afetados exibem anormalidades que incluem espermatogênese reduzida, perda do epitélio germinativo, degeneração (áreas disgenéticas) e atrofia dos túbulos seminíferos, diâmetro tubular diminuído, vacuolizações do epitélio germinativo, células germinativas multinucleadas aumentadas e hiperplasia de células de Leydig (MYLCHREEST et al., 1999; GRAY et al., 2000; FISHER et al., 2003; ANDRADE et al., 2006).

No geral, as alterações histopatológicas mais proeminentes costumam aparecer nos testículos ectópicos ou macroscopicamente alterados, porém podem estar presentes também em testículos aparentemente normais. Nossos resultados revelaram túbulos atróficos e vacuolizados em um testículo macroscopicamente reduzido de um animal exposto a 100 mg/kg/dia de DiPeP. Na dose mais alta (300 mg/kg/dia), um animal apresentou áreas disgenéticas (malformadas), apesar do tamanho testicular normal. A presença de áreas disgenéticas focais nos testículos é uma característica comum em ratos expostos *in utero* a altas doses de ftalatos antiandrogênicos e também é observada nos testículos de homens com câncer testicular (SHARPE, 2006).

7 CONCLUSÃO

A exposição constante dos seres humanos aos mais diversos ftalatos é um fator preocupante para a saúde humana, uma vez que não estamos expostos a apenas um, mas sim a vários ftalatos e a outros compostos desreguladores endócrinos, que podem se combinar entre si causando efeitos aditivos.

Em resumo, os efeitos observados no presente estudo incluíram redução na distância anogenital, atraso na separação prepucial, alteração no peso de órgãos andrógeno-dependentes, produção espermática reduzida e alterações na histologia testicular. Os dados obtidos demonstram que o DiPeP, um ftalato cuja exposição humana no Brasil é bastante relevante, tem potencial para induzir perda fetal em doses elevadas, com mais de 50% das progenitoras apresentando aborto espontâneo, e pode causar alterações no trato reprodutivo de ratos machos devido à sua ação antiandrogênica.

REFERÊNCIAS

ADHAM, I. M.; EMMEN, J. M.; ENGEL, W. The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. **Mol Cell Endocrinol**, v. 160, n. 1-2, p. 11-6, 2000.

ANVISA – Brazilian Health Surveillance Agency, Brazil, 2016. Resolução No – 83. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2016/rdc0083_17_06_2016.pdf (acesso em 15/04/2018).

AGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 1, n. 2, p. 203-9, 1997.

AGO, Y. et al. The Female Encounter Test: A Novel Method for Evaluating Reward-Seeking Behavior or Motivation in Mice. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 11, p. pyv062, 2015.

ALBERT, O.; JÉGOU, B. A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 2, p. 231-49, 2014.

ANDRADE, A. J. et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. **Toxicology**, v. 228, n. 1, p. 85-97, 2006.

ANKLEY, G. T.; GIESY, J. P. Endocrine disruptors in wildlife: a weight of evidence perspective. In **Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife** (R. Kensall, R. Dickerson, J. Giesy, and W. Suk, Eds). Pensacola, 1998, pps. 349-367.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: MELLO AIRES, M. de. **Fisiologia**, p. 877-917. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

ASHDOWN, R. R.; HANCOCK, J. L. Anatomia funcional da reprodução masculina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, p. 7-31. São Paulo: Manole, 1988.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Di-n-Butyl Phthalate. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 2001. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp135.pdf> (acesso em 8/08/2017)

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl) phthalate. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 2002. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf> (acesso em 8/08/2017)

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. **Toxicol Pathol**, v. 31, n. 4, p. 397-410, 2003.

BEACH, F. A. Hormonal modification of sexually dimorphic behavior. **Psychoneuroendocrinology**. 1,3 – 23, 1975.

Beçak, W. & Paulete, J. 1976. Técnicas de citologia e histologia. Vol. 1 e 2. **Livros Técnicos e Científicos**. Editora S.A, 574 p.

BERTONCELLO SOUZA, M. et al. Unexpected, ubiquitous exposure of pregnant Brazilian women to diisopentyl phthalate, one of the most potent antiandrogenic phthalates. **Environ Int**, v. 119, p. 447-454, 2018.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.3, p.651-666, 2007.

BRINSKO, S. P. Fisiologia reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**, p. 399-405. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

BRISCO 2011. DIAP (Diisoamil ftalato). Disponível em <http://www.brisco.com.br/fichas-tecnicas/diap-diisoamil-ftalato.pdf> (acesso em 20/07/2017)

BROWN J.; WALKER, S. E.; STEINMAIN, K. (2004) Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species. Virginia: Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park Front Royal.

CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ**, v. 305, n. 6854, p. 609-13, 1992.

CARVALHO, T. L.; KEMPINAS, W. G.; FAVARETTO, A. L. Morphometric evaluation of the rat testis, epididymis and vas deferens following chemical sympathectomy with guanethidine. **Ann Anat**, v. 175, n. 5, p. 453-7, 1993.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Updated Tables, 2013. Disponível em <https://www.cdc.gov/exposurereport/> (acesso em 26/07/2017)

CHEN, X. et al. Toxicity and estrogenic endocrine disrupting activity of phthalates and their mixtures. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 3, p. 3156-68, 2014.

COLBORN, T.; CLEMENT, C. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection, Volume XXI. **Advances in Modern Environmental Toxicology**, Princeton Scientific Publishing Co., Inc., Princeton, NJ, 1992.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 5, p. 378-84, 1993.

CUMMINGS, A. M.; KAVLOCK, R. J. Function of sexual glands and mechanism of sex differentiation. **J Toxicol Sci**, v. 29, n. 3, p. 167-78, 2004.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D.; RIBEIRO, T. M.; SETIAN, N. Sexo cerebral: um caminho que começa a ser percorrido. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49 n. 1, p. 37-45, 2005.

DALSENTER, P. R. et al. Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 6, p. 297-303, 2006.

DO NASCIMENTO FILHO, I. et al. Identification of some plasticizers compounds in landfill leachate. **Chemosphere**, v. 50, n. 5, p. 657-63, 2003.

DOSTAL, L. A. et al. Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 95, n. 1, p. 104-21, 1988.

EGGERS, S.; SINCLAIR, A. Mammalian sex determination—insights from humans and mice. **Chromosome Res**, v. 20, n. 1, p. 215-38, 2012.

EISENBERG, M. L. et al. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e18973, 2011.

EMA, M.; MIYAWAKI, E. Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. **Reprod Toxicol**, v. 15, n. 2, p. 189-94, 2001.

European Chemicals Agency (ECHA). Support document for identification of diisopentylphthalate (DIPEP) as a substance of very high concern because of its cmr properties. 2008. Disponível em <https://echa.europa.eu/documents/10162/34d906a5-2558-4faa-ba85-65a765aef016> (acesso em 10/11/2017).

FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biol Reprod**, v. 9, n. 5, p. 500-32, 1973.

FERREIRA, I. D.; Morita, D. M. Ex-situ bioremediation of Brazilian soil contaminated with plasticizers process wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 29, 77-86, 2012.

FISHER, J. S. et al. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. **Hum Reprod**, v. 18, n. 7, p. 1383-94, 2003.

FOSTER, P. M. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **Int J Androl**, v. 29, n. 1, p. 140-7; discussion 181-5, 2006.

FOSTER, P. M. et al. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. **Hum Reprod Update**, v. 7, n. 3, p. 231-5, 2001.

FOSTER, P. M. D. Testicular organization and biochemical function. In: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of Male Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p.7-34.

FURR, J. R. et al. A short-term in vivo screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation. **Toxicol Sci**, v. 140, n. 2, p. 403-24, 2014.

GAYTAN, F. et al. Balano prepuccial separation as an external sign of puberty in the rat: correlation with histologic testicular data. **Andrologia**, v. 20, p. 450-3, 1988.

GORSKI, R. A. Development of the cerebral cortex: XV. Sexual differentiation of the central nervous system. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 38, n. 3, p. 344-6, 1999.

GRAY, L. E. et al. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 129, n. 1, p. 46-52, 1994.

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. **Toxicol Sci**, v. 58, n. 2, p. 350-65, 2000.

GRAY, L. E. et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. **Hum Reprod Update**, v. 7, n. 3, p. 248-64, 2001.

GRAY, L. E.; LASKEY, J.; OSTBY, J. Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. **Toxicol Sci**, v. 93, n. 1, p. 189-95, 2006.

GRAY, L. E. et al. Transgenerational effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in the male CRL:CD(SD) rat: added value of assessing multiple offspring per litter. **Toxicol Sci**, v. 110, n. 2, p. 411-25, 2009.

GUILLETTE, L. J. et al. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **Gen Comp Endocrinol**, v. 101, n. 1, p. 32-42, 1996.

HANNAS, B. R. et al. Dipentyl phthalate dosing during sexual differentiation disrupts fetal testis function and postnatal development of the male Sprague-Dawley rat with greater relative potency than other phthalates. **Toxicol Sci**, v. 120, n. 1, p. 184-93, 2011.

HELLWIG, J.; FREUDENBERGER, H.; JÄCKH, R. Differential prenatal toxicity of branched phthalate esters in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 35, n. 5, p. 501-12, 1997.

HERBST, A. L.; ULFELDER, H.; POSKANZER, D. C. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **N Engl J Med**, v. 284, n. 15, p. 878-81, 1971.

HOLMES, Morgan. *Critical Intersex: Queer interventions*. 1st edition. Ashgate Publishing, Ltd., 2009.

HOWDESHELL, K. L. et al. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. **Toxicol Sci**, v. 105, n. 1, p. 153-65, 2008.

KAVLOCK, R. et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. **Reprod Toxicol**, v. 16, n. 5, p. 529-653, 2002.

KITA, D. H. et al. Manipulation of pre and postnatal androgen environments and anogenital distance in rats. **Toxicology**, v. 368-369, p. 152-161, 2016.

KLIP, H. et al. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1102-7, 2002.

KOCH, H. M. et al. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. **Environ Res**, v. 93, n. 2, p. 177-85, 2003.

KOCH, H. M.; CALAFAT, A. M. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1526, p. 2063-78, 2009.

KOCH, H. M. et al. Phthalate metabolites in 24-h urine samples of the German Environmental Specimen Bank (ESB) from 1988 to 2015 and a comparison with US NHANES data from 1999 to 2012. **Int J Hyg Environ Health**, v. 220, n. 2 Pt A, p. 130-141, 2017.

KORENBROT, C.C; HUHTANIEMI, I.T.; WEINER, R.I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biol Reprod**, v.17, p. 298-303, 1977.

KULIN, H. E. et al. Gonadotropin excretion during puberty in malnourished children. **J Pediatr**, v. 105, n. 2, p. 325-8, 1984.

LATENDRESSE, J. R. et al. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. **Toxicol Pathol**, v. 30, n. 4, p. 524-33, 2002.

LEHMANN, K. P. et al. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. **Toxicol Sci**, v. 81, n. 1, p. 60-8, 2004.

LEVINE, H. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, Oxford University Press, 2017

LIOY, P. J. et al. Assessment of phthalates/phthalate alternatives in children's toys and childcare articles: Review of the report including conclusions and recommendation of the Chronic Hazard Advisory Panel of the Consumer Product Safety Commission. **J Expo Sci Environ Epidemiol**, v. 25, n. 4, p. 343-53, 2015.

LLOYD, S. C.; FOSTER, P. M. Effect of mono-(2-ethylhexyl)phthalate on follicle-stimulating hormone responsiveness of cultured rat Sertoli cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 95, n. 3, p. 484-9, 1988.

LYONS, W.R.; BERLIN, I.; FRIEDLANDER, S. Cornification of balano-preputial epithelium in normal rats and in castrated rats treated with testosterone propionate. **Endocrinology**, v. 31, p. 659-63, 1942.

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

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 1, p. 148-57, 2010.

MCCARTHY, M. M.; ARNOLD, A. P. Reframing sexual differentiation of the brain. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 677-83, 2011.

MCINTYRE, B. S.; BARLOW, N. J.; FOSTER, P. M. 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. **Toxicol Sci**, v. 62, n. 2, p. 236-49, 2001.

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? **Toxicol Sci**, v. 43, n. 1, p. 47-60, 1998.

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. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 156, n. 2, p. 81-95, 1999.

MYLCHREEST, E. et al. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. **Toxicol Sci**, v. 55, n. 1, p. 143-51, 2000.

MYLCHREEST, E. et al. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. **Reprod Toxicol**, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2002.

NEGRO-VILAR, A.; VALENCA, M. M. Male neuroendocrinology and endocrine evaluation of reproductive disorders. In: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of Male Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p. 103-136.

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anat Rec**, v. 203, n. 4, p. 485-92, 1982.

PARKS, L. G. et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. **Toxicol Sci**, v. 58, n. 2, p. 339-49, 2000.

PETROM 2016. DIAP (Diisoamil Ftalato). Disponível em <http://petrom.net.br/> (acesso em 04/06/2017).

RASTRELLI, G.; CORONA, G.; MAGGI, M. Testosterone and sexual function in men. **Maturitas**, v. 112, p. 46-52, 2018.

RIDER, C. V. et al. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl*, v. 33, n. 2, p. 443-62, 2010.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J Reprod Fertil**, v. 54, n. 1, p. 103-7, 1978.

ROCHA, B. A. et al. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. **Sci Total Environ**, v. 586, p. 152-162, 2017.

ROSS, A. J.; CAPEL, B. Signaling at the crossroads of gonad development. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 1, p. 19-25, 2005.

SARADHA, B.; MATHUR, P. P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, n. 1, p. 34-41, 2006.

SATHYANARAYANA, S. et al. First trimester phthalate exposure and male newborn genital anomalies. **Environ Res**, v. 151, p. 777-782, 2016.

SCHARDEIN, J. L. Hormones and hormonal antagonists. In **Chemically Induced Birth Defects**. Marcel Dekker, New York. pp. 271-339, 1993.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, n. 8857, p. 1392-5, 1993.

SHARPE, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 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. **Toxicol Sci**, v. 64, n. 2, p. 233-42, 2001.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana** 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Hum Reprod**, v. 16, n. 5, p. 972-8, 2001.

SWAN, S. H. et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 8, p. 1056-61, 2005.

SWAN, S. H. et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. **Hum Reprod**, v. 30, n. 4, p. 963-72, 2015.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/012**: Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Washington, 1997.

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. **Int J Androl**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. e578-86, 2011.

VENTRICE, P. et al. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 36, n. 1, p. 88-96, 2013.

VOM SAAL, F. S. et al. The plastic world: sources, amounts, ecological impacts and effects on development, reproduction, brain and behavior in aquatic and terrestrial animals and humans. **Environ Res**, v. 108, n. 2, p. 127-30, 2008.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1479-90, 2008.

WELSH, M.; SUZUKI, H.; YAMADA, G. The masculinization programming window. **Endocr Dev**, v. 27, p. 17-27, 2014.

WOLF, C. et al. 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 produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. **Toxicol Ind Health**, v. 15, n. 1-2, p. 94-118, 1999.

WOODRUFF, T. J. et al. Proceedings of the Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive summary. **Fertil Steril**, v. 89, n. 2 Suppl, p. e1-e20, 2008.

WORD, R. A. et al. Testosterone synthesis and adenylate cyclase activity in the early human fetal testis appear to be independent of human chorionic gonadotropin control. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 69, n. 1, p. 204-8, 1989.