

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA CAROLINE VENTURELLI

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL A FTALATOS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO E HOMEOSTASE
GLICÊMICA EM RATOS**

CURITIBA

2018

AMANDA CAROLINE VENTURELLI

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL A FTALATOS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO E HOMEOSTASE
GLICÊMICA EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade.

Curitiba

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939)

Venturelli, Amanda Caroline

Efeitos da exposição *in útero* e lactacional a ftalatos sobre o desenvolvimento reprodutivo e homeostase glicêmica em ratos. / Amanda Caroline Venturelli. – Curitiba, 2018.
80 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Anderson Joel Martino Andrade.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Dibutilftalato. 2. Gravidez. 3. Dietilexilftalato. 4. Reprodução animal. I. Título II. Andrade, Anderson Joel Martino. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 591.16



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



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **Amanda Caroline Venturelli** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à APROVAÇÃO (aprovação/reprovação) da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 24 de setembro de 2018.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
APROVADA	Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre UEPG - Membro Titular	
APROVADA	Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter UFPR - Membro Titular	
APROVADA	Profa. Dra. Fabíola Iagher SBPC/ML - Membro Titular	
APROVADA	Profa. Dra. Maira Valle UFPR - Membro Titular	
APROVADA	Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora	

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem Ele não estaria aqui.

Agradeço aos meus pais, Lurdes e Waldir, por me apresentarem o mundo, me ajudarem durante todo este período sempre com muita prontidão e por me ensinarem a ser curiosa.

Agradeço ao meu irmão, Fernando, por ser meu admirador e torcedor.

Aos meus colegas de laboratório, os de perto e de longe, que sempre me incentivaram e apoiaram. Literalmente, sozinhos não somos capazes de nada.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Anderson Joel Martino Andrade, por não me negar o conhecimento, pela confiança, paciência e oportunidade de aprender.

Agradeço aos técnicos e secretários do departamento e do biotério pela disponibilidade e auxílio.

Agradeço ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente participaram da execução deste estudo, meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

A exposição pré-natal aos ftalatos está fortemente associada a alterações nos sistemas reprodutivos e metabólicos. Nós investigamos os efeitos da exposição *in utero* e lactacional ao Di-(2-etil-hexil) ftalato (DEHP) e ao di-n-butil ftalato (DBP) no sistema reprodutivo e na homeostase glicêmica de descendentes machos e fêmeas. Ratas prenhes foram expostas a doses equimolares (0,018, 0,18 e 1,8 mmol/kg/dia) de DEHP ou DBP, correspondentes a 7, 70 e 700 mg/kg/dia de DEHP e 5, 50 e 500 mg/kg/dia de DBP, tratadas por gavagem, do dia 13 de gestação até o dia 21 pós-natal, usando óleo de canola como controle. Para caracterizar os efeitos tardios na prole, avaliamos o desenvolvimento corporal, marcadores externos de androgenização pré-natal, concentração plasmática de glicose e insulina, tolerância à insulina (ITT), secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) e a expressão de receptores γ ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ) e a proteína pancreática duodenal homeobox 1 (PDX-1). Ratos machos e fêmeas expostas a doses mais elevadas de DEHP e DBP exibiram níveis aumentados de glicose de jejum. Em ratos expostos a DEHP 700 mg/kg/dia, também observamos uma redução na taxa de decaimento da glicose (Kitt) após a administração de insulina e diminuição da secreção de insulina no ensaio GSIS. Descendentes machos expostos a DEHP 700 mg/kg/dia tiveram redução na DAG no DPN 4 e atraso na separação prepucial na puberdade, enquanto as descendentes fêmeas expostas a DEHP 70 e 700 mg/kg/dia e à maior dose de DBP tiveram atraso na abertura do canal vaginal. Nossos resultados sugerem que o tratamento materno com DEHP e DBP pode induzir uma ampla gama de alterações metabólicas e reprodutivas em ratos, com efeitos mais pronunciados após a exposição ao DEHP.

PALAVRAS-CHAVES: ftalatos, desreguladores endócrinos, toxicologia reprodutiva, toxicologia metabólica.

ABSTRACT

Phthalates prenatal exposure is strongly associated with reproductive and metabolic systems alterations. We investigated effects of *in utero* and lactational exposure to Di-(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) and Di-n-butyl phthalate (DBP) on reproductive system and glycemic homeostasis in male and female offspring rats. Pregnant rats were exposed to equimolar doses (0.018, 0.18 and 1.8 mmol/kg/day) of DEHP or DBP corresponding to 7, 70, and 700 mg/kg/day for DEHP and 5, 50, and 500 mg/kg/day for DBP by oral gavage from gestation day 13 to postnatal day 21, using canola oil as vehicle control. In order to characterize the late effects on offspring, we evaluated the body development, prenatal androgenization external markers, plasma concentration of glucose and insulin, insulin tolerance (ITT), glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR γ) and pancreatic and duodenal homeobox 1 protein (PDX-1). Male and female rats exposed to highest doses of DEHP and DBP exhibited increased fasting glucose levels. In rats exposed to DEHP 700 mg/kg/day we also observed a reduced glucose decay rate (Kitt) following insulin administration and decreased insulin secretion in the GSIS assay. Male offspring exposed to DEHP 700 mg/kg/day had reduced AGD on PDN 4 and delayed preputial separation at puberty, while female offspring exposed to DEHP 70 and 700 mg/kg/day and to the highest DBP dose had delayed vaginal opening. Our results suggest that maternal treatment with DEHP and DBP can induce a wide range of metabolic and reproductive alterations in offspring rats, with more pronounced effects following DEHP exposure.

Key-words: phthalates, endocrine disrupters, reproductive toxicology, metabolic toxicology.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1 Estrutura química do DEHP, DBP e seus principais metabólitos ativos, MEHP e MBP.....17
- Figura 2 Mecanismo de ação dos desreguladores endócrinos no sistema reprodutivo masculino.18
- Figura 3 Mecanismo de ativação do receptor γ proliferador de peroxissoma (PPAR- γ) 22
- Figura 4 Redução da proteína pancreática duodenal homeobox-1 (PDX-1) decorrente de um ambiente hiperglicêmico e a deterioração da função da célula β 26
- Figura 5 Delineamento experimental do estudo 29

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figure 1 Effects of developmental DEHP and DBP exposure on the body weight of male and female offspring exposed *in utero* and during lactation45
- Figure 2 Effects of developmental DEHP and DBP exposure on the body weight of male (A) and female (B) offspring exposed *in utero* and during lactation46
- Figure 3 Effects of developmental DEHP and DBP exposure on age at preputial separation and vaginal opening offspring rats exposed *in utero* and during lactation47
- Figure 4 Effects of developmental DEHP and DBP exposure on the insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT)..... 54

Figure 5 Effects of developmental DEHP and DBP exposure on glucose-stimulated insulin secretion ex vivo in male and female offspring on PND 90	55
Figure 6 Western blot analysis of protein expression of PDX-1 and PPAR γ in pancreas.....	57

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 Effects of developmental DEHP and DBP exposure <i>in utero</i> and during lactation on reproductive outcomes.....	44
Table 2 Relative (g%) reproductive organs weight of adult male offspring rats after developmental exposure to DEHP and DBP	49
Table 3 Relative (g%) reproductive organs weight of adult female offspring rats after developmental exposure to DEHP and DBP	50
Table 4 Metabolic profile of male offspring rats after indirect exposure to DEHP and DBP <i>in utero</i> and during lactation.....	52
Table 5 Metabolic profile of female offspring rats after indirect exposure to DEHP and DBP <i>in utero</i> and during lactation.....	53
Table 6 Major reproductive and effects of equimolar doses of DEHP and DBP in offspring rats exposed in utero and during lactation.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGL – Ácidos graxos livres
- AUC – Área sob a curva
- AR – Receptores androgênicos
- BBZP – Butilbenzil ftalato
- CYP17 – 17 α hidroxilase
- DAG – Distância anogenital
- DEHP – Di-(2-etil-hexil) ftalato
- DEs – Desreguladores endócrinos
- DBP – Di-butil-hexil ftalato
- DIBP – Di-iso-butil ftalato
- DIPeP – Di-iso-pentil ftalato
- DM2 – Diabetes mellitus tipo 2
- DPN – Dia pós-natal
- ER – Receptores estrogênicos
- GLUT2 – Transportador de glicose tipo 2
- GK – Glicoquinase
- GSIS – Secreção de insulina estimulada por glicose
- GTT – Teste de tolerância à glicose
- IAPP – Polipeptídeo amiloide da ilhota
- IL-5 – Interleucina 5
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-10 – Interleucina 10
- IPF-1 – Fator promotor de insulina 1
- ITT – Teste de tolerância à insulina
- MEHP – Mono-2-etil-hexil ftalato
- MBP – Mono-n-butil ftalato
- MODY – Maturity-Onset Diabetes of the Young

N-CoR – Receptor nuclear co-repressor

PCBs – Bifenilas policloradas

PDX-1 – Proteína pancreática duodenal homeobox 1

PPARs – Receptores proliferadores de peroxissoma

PPAR- α – Receptores α proliferadores de peroxissoma

PPAR- β – Receptores β proliferadores de peroxissoma

PPAR- γ – Receptores γ proliferadores de peroxissoma

PVC – Policloreto de vinilo

RXR – Receptor X retinóico

RI – Resistência à insulina

SDT – Síndrome da disgenesia testicular

SMRT – Mediador silenciador dos receptores retinóides e tireoidianos

SRC – Coativador do receptor de esteróides

StAR – Proteína reguladora aguda esteroidogênica

TNF- α – Fator α de necrose tumoral

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada em modelo misto, no qual os resultados estão apresentados sob a forma de artigo científico. Após a Introdução, Objetivos e Métodos há uma seção contendo o Artigo em língua inglesa. Em sequência há uma seção de Discussão e de Conclusão, seguidas de todas as referências utilizadas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	13
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS – FTALATOS E ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS.....	15
1.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS – FTALATOS E ALTERAÇÕES METABÓLICAS.....	19
1.4 EXPOSIÇÃO AOS FTALATOS E POSSÍVEL ALTERAÇÃO DE PPAR- γ	21
1.5 EXPOSIÇÃO AOS FTALATOS E POSSÍVEL ALTERAÇÃO DE PDX-1.....	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MÉTODOS.....	28
ANIMAIS, DOSES E TRATAMENTOS.....	28
GRAVIDEZ E DADOS DOS DESCENDENTES.....	29
COLETA DE LEITE MATERNO.....	30
DISTÂNCIA ANOGENITAL (DAG).....	30
SEPARAÇÃO PREPUCIAL E ABERTURA DO CANAL VAGINAL.....	30
TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT).....	31
EUTANÁSIA, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E INSULINA PLASMÁTICA.....	31
SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE (GSIS).....	32
DOSAGEM DE INSULINA.....	33
EXTRAÇÃO PROTEICA E WESTERN BLOT.....	33
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	36
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO.....	69

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. ANEXO 1 - Rato macho (DPN 90) exposto à DEHP 700 mg/kg/dia com criptorquidia unilateral.	78
9. ANEXO 2 - Rato macho (DPN 90) exposto à DEHP 700 mg/kg/dia com prepúcio fendido e hipospadia distal.	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias químicas exógenas ou misturas de compostos que interferem com qualquer aspecto da ação hormonal responsável pela manutenção da homeostase e pela regulação dos processos de desenvolvimento. A pesquisa conduzida no campo dos DEs aumentou consideravelmente nas últimas duas décadas, devido aos efeitos potencialmente danosos ao corpo humano e ao crescente conhecimento nas áreas da biologia do desenvolvimento e toxicologia ambiental. É bem conhecido que compostos com mecanismos de ação de desregulação do sistema endócrino podem afetar gravemente a reprodução humana e vários estudos têm demonstrado associações negativas entre a exposição a DEs e biomarcadores de fertilidade, incluindo a contagem de espermatozoides em populações humanas (Abdollahi *et al.*, 2004; Mehrpour *et al.*, 2014; Sifakis *et al.*, 2017).

Os efeitos tóxicos dos DEs resultaram na restrição de seu uso em países onde há evidências de extensa exposição (Knez, 2013). Por exemplo, em alguns países ocidentais, o uso de certos DEs, tais como bifenilas policloradas (PCBs) e os Éteres Difenílicos Polibromados (retardadores de chamas) foram banidos. No entanto, em alguns casos, a exposição humana aos DEs ainda é inevitável, como em alguns usos ocupacionais ou mesmo pela ampla dispersão no meio ambiente. Um exemplo específico inclui a classe química dos agrotóxicos (Sifakis *et al.*, 2017). Atualmente, as maiores preocupações em relação à exposição de seres humanos e outros animais dizem respeito à identificação das substâncias capazes de causar efeitos deletérios e se tais substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam representar uma ameaça à saúde humana e animal. Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, incluindo substâncias sintéticas, como por exemplo, os alquilfenóis, agrotóxicos, ftalatos, bifenilas policloradas, bisfenol A e também substâncias naturais, como os fitoestrogênios (Elobeid e Allison, 2008; Casals- Casas e Desvergne, 2011). Assim, a crescente preocupação com a exposição aos DEs tem induzido o desenvolvimento e a padronização de ensaios *in vitro* e *in vivo*

para identificar tais substâncias e caracterizar os efeitos biológicos decorrentes da exposição em diferentes condições.

Originalmente, os DEs foram relacionados com substâncias que mimetizam a ação dos estrogênios naturais. A ação clássica em relação ao sistema reprodutivo envolve a interferência dos DEs com a ligação do hormônio ao receptor correspondente, notadamente o receptor androgênico (AR) ou o receptor de estrogênico (ER). Após a ligação a um receptor, o DE pode desencadear dois tipos de respostas: uma resposta hormonal que é denominada um efeito agonístico e/ou uma falta de resposta hormonal que é denominada de ação antagônica (Gaido *et al.*, 2000; Waters, 2001). Porém, nos últimos anos, têm sido descritas substâncias que atuam por meio de uma ampla variedade de outros mecanismos de ação, incluindo a interferência com outros receptores hormonais ou mesmo nos processos que regulam a disponibilidade de hormônios para as suas células-alvo (Casals-Casas e Desvergne, 2011).

Os efeitos dos DEs não dependem somente das suas concentrações no ambiente, mas também de outros fatores, tais como, lipofilicidade, persistência, bioacumulação, janelas e tempo de exposição, e mecanismos de biotransformação e de excreção. Por exemplo, algumas substâncias sofrem biotransformação e geram metabólitos ou subprodutos igualmente ou mais danosos que os compostos originais. A Organização Mundial da Saúde define os desreguladores endócrinos como “substâncias ou misturas exógenas que alteram as funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causam efeitos adversos para a saúde de um organismo intacto, sua descendência ou população” (WHO, 2002).

Outro mecanismo importante de ação dos DEs tem sido explorado: a interferência com eventos de expressão gênica regulados por receptores nucleares (Casals-Casas *et al.*, 2008; Casals-Casas e Desvergne, 2011). A maior parte das pesquisas tem, no entanto, focado nas ações deletérias sobre o desenvolvimento sexual e reprodutivo. No entanto, os DEs também podem afetar outros receptores nucleares, como os envolvidos na função da tireóide ou na sinalização lipídica. Além disso, uma hipótese corrente é que alguns DEs podem atuar como “obesogênicos”, possivelmente contribuindo para a atual epidemia de obesidade e as doenças à ela associadas (Grun e Blumberg, 2006; Newbold *et al.*, 2008; Elobeid e Allison, 2008; Hao *et al.*, 2012; Heindel e Schug, 2014).

1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS – FTALATOS E ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS

Os avanços na ciência e engenharia de materiais nas últimas décadas levaram ao uso generalizado e diversificado de plásticos para fornecer produtos e bens de consumo mais baratos, fortes, seguros, mais duráveis e versáteis que servem para melhorar nossa qualidade de vida. Os plásticos podem ser projetados para manter nossos alimentos mais frescos por longos períodos de tempo, fornecer benefícios terapêuticos por meio de produtos farmacêuticos de liberação controlada e outras aplicações médicas e industriais. (Andrady e Neal, 2009; Thompson, Swan, *et al.*, 2009). No entanto, existem preocupações científicas, governamentais e públicas sobre os potenciais riscos de efeitos adversos à saúde humana relacionados a exposições a aditivos plásticos. A principal hipótese para essas preocupações crescentes é que certos produtos químicos utilizados em plásticos para fornecer qualidades físicas benéficas, também podem atuar como compostos que desregulam o sistema endócrino e que podem, por consequência, levar a efeitos adversos na reprodução e no desenvolvimento do organismo (Kavlock *et al.*, 2002a, 2002b; Meeker *et al.*, 2009).

Dentre as substâncias químicas ambientais que podem desregular o sistema endócrino destacam-se os diésteres de ácido 1,2-benzenodicarboxílico (ácido ftálico), comumente conhecidos como ftalatos, um grupo de produtos químicos artificiais amplamente utilizados em aplicações industriais. Os ftalatos de alto peso molecular, como por exemplo, o Di-(2-etil-hexil) ftalato (DEHP), são utilizados principalmente como plastificantes na fabricação de plásticos a base de policloreto de vinila (PVC) flexível que, por sua vez, é utilizado em produtos de consumo, pavimentos e revestimentos de paredes, aplicações de contato com alimentos e dispositivos médicos (David *et al.*, 2001; ATSDR 2002; Hauser e Calafat, 2005). Por outro lado, os fabricantes utilizam ftalatos de baixo peso molecular, como por exemplo, o Di-butil ftalato (DBP), como solventes em produtos de cuidados pessoais (perfumes, loções, cosméticos) e em vernizes e revestimentos (ATSDR 1995; David *et al.*, 2001; Kavlock *et al.*, 2002b). Assim, tendo em vista a grande diversidade de aplicações industriais dos ftalatos, há ampla exposição humana a essa classe.

Evidências indicam que alguns ftalatos, como o DEHP e o DBP, podem induzir alterações reprodutivas e metabólicas em diversas condições experimentais,

particularmente após a exposição durante fases críticas do desenvolvimento, como a gestação e a lactação (Gray *et al.*, 2000; Akingbemi *et al.*, 2001; Kavlock *et al.*, 2002a; Lottrup *et al.*, 2006; Martino-Andrade *et al.*, 2016; Martino-Andrade e Chahoud, 2010). A exposição pré-natal, fase durante a qual os sistemas de órgãos e os eixos endócrinos são estabelecidos, é particularmente preocupante. Contudo, é importante notar que a exposição durante todo o curso de vida, incluindo a idade adulta, pode potencialmente ter impacto nas concentrações dos hormônios esteroidais circulantes ou outros mecanismos de desregulação endócrina, contribuindo para o surgimento de efeitos adversos ou aumentando a suscetibilidade de indivíduos expostos ao surgimento de doenças (Carlsen *et al.*, 1992; Rocha *et al.*, 2017).

Os ftalatos possuem características lipofílicas, o que aumenta a capacidade de lixiviação e, somada a ausência de ligações covalentes entre ftalatos e a matriz plástica, torna fácil o seu desprendimento e a conseqüente exposição humana e contaminação ambiental. Sua lixiviação aumenta com a exposição ao calor e a solventes orgânicos (Fromme *et al.*, 2002). Uma vez liberados para a atmosfera, eles têm potencial para o transporte de longo alcance, eventualmente entrando na cadeia alimentar, pois podem ser inalados, ingeridos ou absorvidos através da derme (Mankidy *et al.*, 2016). A exposição humana pode ocorrer pelo contato direto com um produto contendo ftalatos, pela lixiviação de um produto para outro ou pela contaminação ambiental. O DEHP é o plastificante mais utilizado e é considerado um poluente ambiental global. O uso do DEHP, assim como do DBP e outros ftalatos, em brinquedos de crianças foi banido na União Europeia desde 1999, enquanto no Brasil, apenas recentemente foram aplicadas regulamentações sobre o uso de ftalatos. DEHP, DBP, diisobutil (DiBP) butilbenzil (BBzP) e diisopentil (DiPeP) ftalato foram banidos dos produtos de cuidados pessoais (ANVISA, 2016). Porém, esses e outros ftalatos continuam a ser comumente usados em outros materiais de consumo, o que faz desse grupo uma das classes mais encontradas na maioria das matrizes ambientais, incluindo ar, água e poeira.

As estruturas químicas dos DEs investigados neste estudo e dos seus principais metabólitos ativos estão demonstradas na Figura 1.

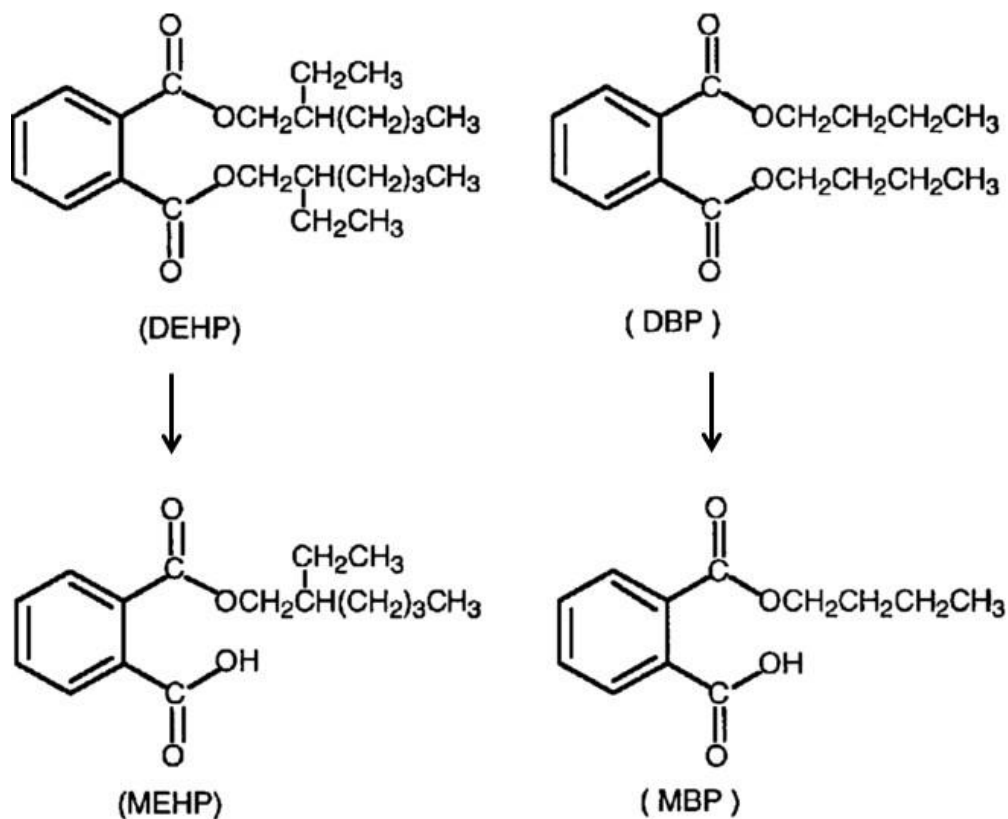


Figura 1 – estrutura química do DEHP, DBP e seus principais metabólitos ativos, MEHP e MBP.

FONTE: adaptado de Lapinskas et al., 2005.

Os metabólitos ativos dos ftalatos como o mono-2-etil-hexil-ftalato (MEHP), um dos metabólitos do DEHP, e o mono-n-butil-ftalato (MBP), um dos metabólitos do DBP, podem induzir alterações nos receptores hormonais, na síntese ou na secreção de andrógenos daqueles expostos direta ou indiretamente (por exemplo, através da ingestão de ftalatos presente no leite materno) e ocasionar múltiplos efeitos anti-androgênicos, inclusive nos descendentes (Sharpe e Stewart Irvine, 2004), inibindo a síntese de testosterona nas células de Leydig, como resultado da inibição direta de enzimas esteroidogênicas (Foster, 2005). Além disso, os ftalatos mostraram a capacidade de inibir a atividade da 5α redutase, que é uma das mais importantes enzimas envolvidas na produção de di-hidrotestosterona a partir da testosterona e, portanto, na regulação da masculinização da genitália externa e da próstata (Fisher *et al.*, 2003). Conforme mostrado no desenho esquemático na Figura 2.

De acordo com essas hipóteses, muitos desses distúrbios podem resultar em falhas no desenvolvimento gonadal, considerando as possíveis alterações, como: baixa contagem de espermatozoides, criptorquidismo (falha na descida dos testículos), hipospádias (abertura da uretra na face ventral do pênis) e redução da distância anogenital (DAG). Em ratos, esses distúrbios inter-relacionados compõem uma síndrome com origem pré-natal conhecida como Síndrome dos ftalatos, a qual possui paralelos com a Síndrome de Disgenesia Testicular Humana (SDT), embora não exista relação de causa e efeito após a exposição dos seres humanos aos ésteres de ftalato (Foster, 2006; Martino-Andrade e Chahoud, 2010; Mankidy *et al.*, 2016). No entanto, os seres humanos são expostos e produzem os críticos metabólitos dos ftalatos, que foram detectados no sangue, na urina, no leite materno da população em geral, em crianças e também no líquido amniótico humano (Zhu *et al.*, 2006; Hatch *et al.*, 2008; Dirtu *et al.*, 2013; Swan *et al.*, 2015; Martino-Andrade *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2017). Os alvos celulares da ação dos ftalatos em ratos são as células de Sertoli, que organizam o desenvolvimento pré-natal da gônada e suportam a espermatogênese na vida adulta, e as células de Leydig, produtoras de testosterona e do fator de crescimento semelhante à insulina-3 (INSL-3), hormônio envolvido na descida do testículo (Martino-Andrade e Chahoud, 2010).

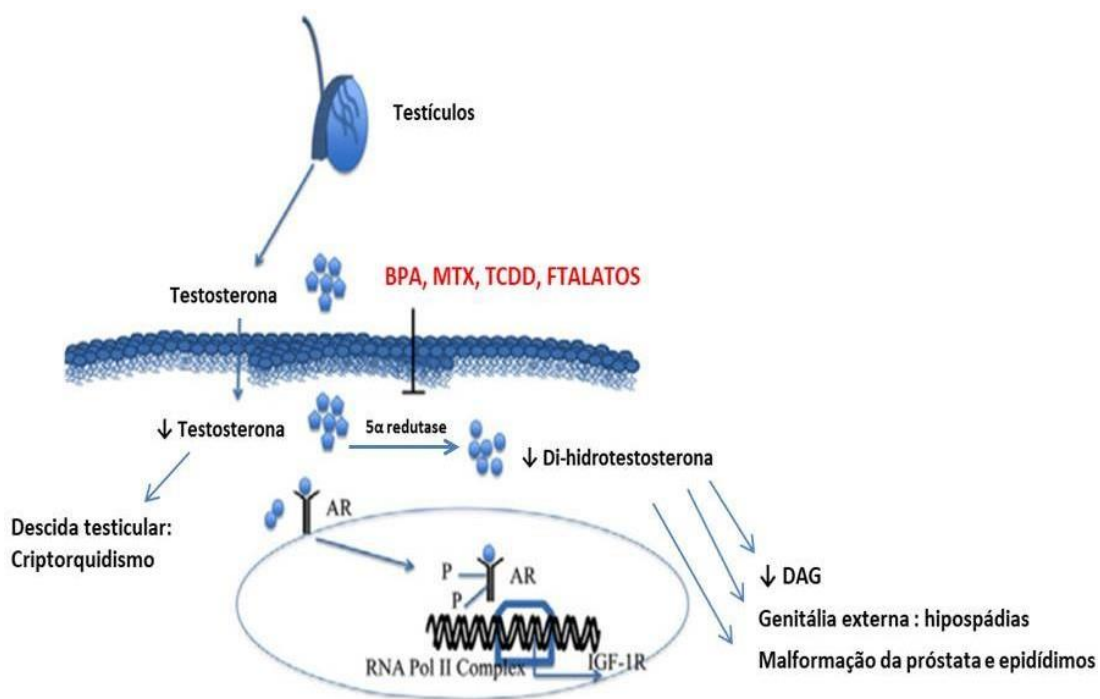


Figura 2 - Mecanismo de ação dos DEs no que diz respeito aos distúrbios do sistema reprodutivo masculino.

FONTE: Adaptado de Sifakis *et al.*, 2017 e Foster, 2005.

NOTA: Animais expostos aos ftalatos podem apresentar redução de genes e enzimas (StAR; CYP17) envolvidos na conversão de colesterol em pregnenolona e progesterona em androstenediona, resultando em uma menor produção de testosterona, necessária para o desenvolvimento reprodutivo normal. Adicionalmente, a inibição da 5 α -redutase por ftalatos interfere com o metabolismo da testosterona em dihidrotestosterona no sistema reprodutor masculino, resultando em prejuízos, inclusive, na transcrição de genes-alvo de andrógenos.

Em relação à exposição aos ftalatos e alterações sexuais e reprodutivas em fêmeas, essas parecem ser mais resistentes aos distúrbios. Em humanos, estudos têm mostrado uma associação entre altos níveis de MEHP e maior ocorrência de perda gestacional (Toft *et al.*, 2012), e redução no tempo de gestação (Whyatt *et al.*, 2009). No entanto, apesar das associações, ambos os estudos utilizaram medições únicas, representativas de uma exposição aguda. Mas quando se observa os estudos com experimentação animal, estes demonstram que os ovários são alvos potenciais da ação dos ftalatos. Ratas expostas ao DEHP mostraram supressão nos níveis de estradiol através da redução na expressão da aromatase nas células da granulosa (Lovekamp e Davis, 2001), enquanto que outros ftalatos, como DBP, reduzem os níveis de estradiol através da regulação positiva das enzimas metabolizadoras do fígado (Lovekamp-Swan e Davis, 2003). A exposição de fêmeas *in utero* ao DEHP está associada a efeitos duradouros, pois os folículos que foram expostos no período intra-uterino permanecem ao longo da vida, ao contrário dos machos que possuem um período de quiescência e divisões mitóticas das células tronco germinativas (Pocar *et al.*, 2012; Martinez-Arguelles *et al.*, 2013).

Apesar dos riscos desses possíveis mecanismos de desregulação e as consequências para a saúde, devido à sua ampla utilidade como plastificantes, solventes e emulsionantes, os ftalatos são produzidos em alto volume, mais de 214 milhões de quilos por ano, apenas para uso em produtos de consumo pessoal geral (USEPA, 2012). Portanto, pode-se inferir que entre as populações industrializadas, a exposição à ftalatos seja praticamente onipresente.

1.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS – FTALATOS E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) são distúrbios metabólicos inter-relacionados cuja prevalência aumentou substancialmente nas últimas duas décadas. A resistência à insulina (RI) ocorre quando quantidades crescentes de insulina são necessárias para regular corretamente o transporte da glicose plasmática para os tecidos periféricos. Embora o mecanismo preciso não seja claro, a

resistência à insulina é comumente acompanhada de obesidade central, que ao elevar os níveis de ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos, pode provocar resistência à insulina e interromper o metabolismo lipídico. Inicialmente, as células β do pâncreas podem compensar totalmente a RI, aumentando a produção de insulina. No entanto, conforme a doença progride, as células β descompensam, resultando em níveis elevados de glicose plasmática e subsequente desenvolvimento do DM2 (Stahlhut *et al.*, 2007).

A testosterona afeta a distribuição de gordura corporal e a sensibilidade à insulina em homens. Estudos experimentais em homens mostraram que a administração de testosterona reduz a absorção lipídica pela gordura intra-abdominal (Marin *et al.*, 1996), reduzindo a gordura visceral e melhorando a sensibilidade à insulina (Mârin *et al.*, 1993). Homens submetidos à terapia de privação androgênica para tratamento de câncer de próstata tiveram aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, de gordura total e prevalência de síndrome metabólica (Sharifi *et al.*, 2005; Braga-Basaria *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudos epidemiológicos têm associado a mensuração de ftalatos na urina à redução na concentração de andrógenos da população, bem como, aumento na circunferência abdominal (Stahlhut *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2017).

A hipótese de que substâncias químicas podem afetar o controle endócrino do metabolismo energético surgiu mais recentemente, a partir de diferentes linhas de investigação. Evidências apontam para efeitos de desregulação metabólica pela exposição a substâncias químicas que interferem na biologia do tecido adiposo, eixos hormonais e/ou em componentes do sistema nervoso central e que, dessa forma, alteram mecanismos homeostáticos envolvidos no controle do peso e na regulação dos níveis glicêmicos (Grun e Blumberg, 2009).

Estudos mais recentes têm discutido a possibilidade de alguns ftalatos, como o DEHP, estarem relacionados com a indução de distúrbios metabólicos por imitarem hormônios lipofílicos naturais e mediar seus efeitos através da interação com membros das superfamílias de receptores nucleares. O conceito de desregulação endócrina está sendo ampliado para outros receptores envolvidos em diferentes aspectos da regulação homeostática (Tabb e Blumberg, 2006).

1.4 EXPOSIÇÃO AOS FTALATOS E POSSÍVEL ALTERAÇÃO DE PPAR- γ

Dado o seu papel central na regulação metabólica, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) constituem alvos potencialmente importantes para substâncias químicas ambientais, como os ftalatos (Kersten *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2004; Campioli *et al.*, 2014). Os PPARs são fatores de transcrição, caracterizados por seu padrão de distribuição em tecidos específicos e por sua função na regulação do metabolismo. De maneira geral, esses receptores funcionam como sensores de lipídios que cooperam em diferentes órgãos a fim de adaptar a expressão de uma série de genes ao estado metabólico do indivíduo (Casals-Casas *et al.*, 2008; Casals-Casas e Desvergne, 2011; Sauer, 2015).

Existem três isoformas conhecidas dos PPARs: PPAR- α , PPAR- β , PPAR- γ . O PPAR- α (NR1C1) é o membro fundador da superfamília e, inicialmente, foi definido como o receptor capaz de induzir a proliferação de peroxissomos hepáticos em roedores em resposta a substâncias químicas sintéticas. No entanto, esta função representa apenas um pequeno subconjunto das funções fisiológicas reguladas por este receptor. PPAR- α e o PPAR- β/δ (NR1C2, referido aqui como PPAR- β) compartilham parcialmente funções sobrepostas no controle do metabolismo catabólico, promovendo a oxidação de ácidos graxos em tecidos com altas taxas metabólicas, tais como o fígado e o músculo (Desvergne *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2004; Feige *et al.*, 2010). Há dados na literatura demonstrando a alta expressão de PPAR- α em células de Leydig e Sertoli de ratos (Schultz, 1999), e que estes exercem um papel funcional durante diferentes fases do ciclo de diferenciação, exercendo um papel expressivo em possíveis alterações do trato reprodutivo (Corton e Lapinskas, 2005).

Em contraste, o PPAR- γ (NR1C3) está envolvido no controle do armazenamento de gordura no tecido adiposo por promover a diferenciação e sobrevivência de adipócitos maduros e também desempenhar papéis importantes no controle da sensibilidade à insulina (Lehrke e Lazar, 2005). O PPAR- γ é predominantemente expresso no tecido adiposo e em torno de 60% das ilhotas pancreáticas (Welters *et al.*, 2004). Visto que nas células β pancreáticas a ativação de PPAR- γ está relacionada com o aumento na expressão da proteína pancreática duodenal homeobox-1 (PDX-1), proteína essencial na regulação da homeostase glicêmica (Jung *et al.*, 2014). Diversas substâncias são capazes de ativar PPAR- γ e regular sua atividade, como a ligação direta

de hormônios esteroides e tireoidianos, vitaminas, metabólitos lipídicos e xenobióticos (Chawla *et al.*, 2001). Para a sua ativação é necessária a ligação do PPAR- γ em sequências específicas do DNA, a qual requer heterodimerização com um segundo membro da família de receptores nucleares, o receptor X retinóico (RXR). A ligação de ligantes agonistas ao PPAR- γ desencadeia uma mudança de conformação que atrai coativadores transcricionais (Figura 3), incluindo membros da família de coativadores de receptores de esteroides (SRC) (McKenna e O'Malley, 2002). Na ausência do ligante, o PPAR- γ tem o potencial de silenciar ativamente os genes aos quais está ligado, por meio do recrutamento de complexos corepressores transcricionais, contendo o corepressor do receptor nuclear (N-CoR) ou SMRT (mediador silenciador dos receptores retinóides e tireoidianos) (Lehrke e Lazar, 2005).

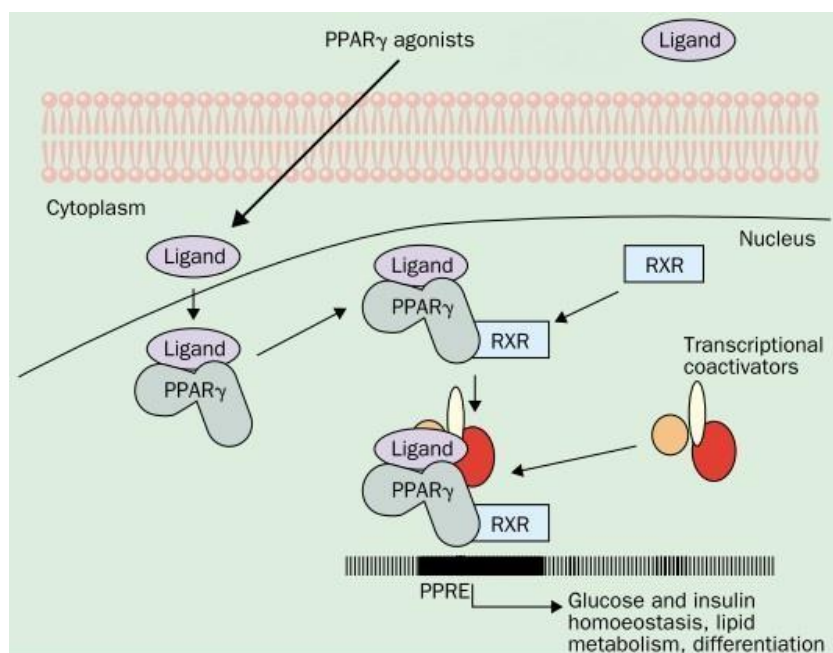


Figura 3 – Via de ativação do PPAR- γ .

FONTE: adaptado de (Grommes *et al.*, 2004).

NOTA: Após a ligação do ligante, PPAR- γ forma heterodímero com o receptor 9 cis - retinóide (RXR) no núcleo da célula. Os heterodímeros PPAR- γ /RXR associam-se a coativadores transcricionais e ligam-se a sequências de elementos responsivos ao PPAR- γ (PPRE), localizados em genes alvo que controlam a homeostase glicose e da insulina, metabolismo lipídico e diferenciação celular.

Recentes e poucos trabalhos têm discutido o papel inflamatório induzido por DEs. Estudos epidemiológicos têm mostrado a associação entre a exposição humana a DEs e alterações no metabolismo lipídico (Heindel e Schug, 2014), bem como estudos conduzidos com linhagens celulares e animais experimentais indicam alterações no

perfil lipídico, decorrente do aumento de citocinas pró-inflamatórias, após exposição a alguns ftalatos (Campioli *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2016; Manteiga e Lee, 2017).

Sabe-se que o MEHP e MBP são capazes de ativar PPAR α - e PPAR- γ e postula-se que a ativação induzida por MBP seja muito fraca ou praticamente nula para PPAR- γ , enquanto que o MEHP possui uma forte ativação. Embora o papel da ativação de PPARs na indução de efeitos tóxicos dos ftalatos seja incerto em muitos aspectos, acredita-se que os efeitos reprodutivos sejam em grande parte independentes dessa ativação. Sabe-se, por exemplo, que o desenvolvimento reprodutivo de camundongos nocautes para receptores PPAR- α é normal e que a toxicidade reprodutiva induzida por DEHP nesses animais permanece (Corton e Lapinskas, 2005). Além disso, como mencionado anteriormente, ftalatos que apresentam um perfil bastante distinto de ativação dos receptores PPARs, como o DEHP e o DBP, induzem efeitos anti-androgênicos e reprodutivos muito similares. Contudo, tem sido postulado que os distúrbios metabólicos induzidos por alguns ftalatos, como o DEHP, dependem, pelo menos em parte, da ativação de receptores PPARs (Casals-Casas e Desvergne, 2011; Campioli *et al.*, 2014; Manteiga e Lee, 2017).

A ligação de PPARs com diferentes agonistas, incluindo alguns xenobióticos, pode resultar em um amplo espectro de efeitos, o que pode ser explicado pelas diferenças nas interações agonista-receptor e na consequente diversidade de respostas em relação à liberação de co-repressores ou recrutamento de co-ativadores desses receptores nucleares.

1.5 EXPOSIÇÃO AOS FTALATOS E POSSÍVEL ALTERAÇÃO DE PDX-1

O metabolismo nas células pancreáticas não é apenas essencial para fornecer energia para a célula, mas também serve como um mecanismo para detectar e reagir aos níveis circulantes de nutrientes, colocando o metabolismo pancreático como o centro para a regulação da homeostase energética. Trabalhos com foco no funcionamento do pâncreas endócrino indicam que um metabolismo lipídico ineficiente pode alterar o controle da secreção de insulina, contribuindo para o desenvolvimento de doenças metabólicas, de forma que a interrupção do metabolismo pancreático é muitas vezes consequência de disfunções em outros órgãos (Jouvet e Estall, 2017). O início da disfunção nas células β ocorre antes da hiperglicemia se desenvolver e níveis excessivos

de glicose, perfil lipídico alterado e inflamação somam-se para promover a disfunção (Kaneto *et al* 2008; Carlessi *et al.*, 2017).

Existem pressupostos necessários para estudar o funcionamento das células β , os quais incluem vias ativas de carboidratos, aminoácidos e lipídeos e a capacidade de resposta das células a variadas concentrações de glicose. Atualmente, a exposição a desreguladores endócrinos também parece contribuir para possíveis alterações na regulação da homeostase glicêmica devido a evidências experimentais que indicam efeitos deletérios no controle do metabolismo energético (Nadal *et al.*, 2009; Newbold *et al.*, 2008; Alonso-Magdalena *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011). Recentes trabalhos têm demonstrado que condições hiperglicemiantes (Shu *et al.*, 2011) e processos inflamatórios estão relacionados com alterações na expressão de proteínas reguladoras do metabolismo, sendo que alguns desreguladores endócrinos, como o DEHP, têm sido apontados como possíveis indutores dessas alterações (Capioli *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2016).

Dentre os múltiplos fatores de transcrição envolvidos na regulação gênica da homeostase glicêmica existe a proteína Pancreática Duodenal Homeobox-1 (PDX-1, pancreatic and duodenal homeobox), também conhecida como Fator Promotor de Insulina (IPF-1, insulin promoter factor), que foi originalmente descoberto como um ativador de genes da insulina (Meulen *et al.*, 2015). Ao longo dos anos tem sido demonstrado que o PDX-1 tem um papel chave no desenvolvimento do pâncreas e que animais e humanos que não possuem PDX-1 apresentam agenesia pancreática (Brissova *et al.*, 2002; Semache *et al.*, 2014). Em humanos, as mutações no gene Pdx-1 estão associadas ao desenvolvimento de diabetes mellitus denominado MODY 4 (Maturity-Onset Diabetes of the Young), caracterizado por manifestação precoce, em geral abaixo dos 25 anos de idade com transmissão autossômica dominante. Outras mutações no Pdx-1 humano foram associadas ao desenvolvimento de formas de DM2 no início da idade adulta (Hansen *et al.*, 2000; Semache *et al.*, 2014).

A proteína foi detectada pela primeira vez por volta do dia 8,5 do desenvolvimento embrionário auxiliando na sinalização para o desenvolvimento do pâncreas e também na regulação da transcrição de outros genes indispensáveis para o funcionamento das ilhotas pancreáticas, tais como GLUT2, glicoquinase (GK) e o polipeptídeo amilóide da ilhota (IAPP) (Ohlsson *et al.*, 1993; Guz *et al.*, 1995; Melloul

et al., 2002; Meulen *et al.*, 2015). Além da importância para a especificidade precoce do pâncreas, várias linhas de evidências mostram que a PDX-1 também é importante para a manutenção da célula β adulta. Camundongos machos e fêmeas com inativação de um alelo de Pdx-1 (Pdx-1 +/-) apresentam valores de glicemia de jejum normalizados, mas quando há aumento nas concentrações de glicose, mimetizando situações pós-prandiais, há prejuízo na absorção de glicose, identificado pelo teste de tolerância à glicose, e prejudicada secreção de insulina, representada por deficiência na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) (Brissova *et al.*, 2002).

Evidências sugerem que, em razão do papel fundamental da PDX-1 na formação da ilhota pancreática e na ativação da transcrição de genes, a deficiência ou alteração de PDX-1 pode reduzir a transcrição do gene da insulina, conseqüentemente, a produção hormonal, principalmente quando há necessidade de incremento na taxa de liberação. Assim, a deficiência na expressão de PDX-1 pode predispor certos indivíduos ao desenvolvimento de diabetes tardia, particularmente no contexto de outras mutações genéticas dentro da cascata de sinalização de insulina, e/ou exposição a substâncias ambientais capazes de interferir na regulação no metabolismo energético (Dor *et al.*, 2004; Meulen *et al.*, 2015).

Estudos em linhagem celular (HIT-T15) indicam que a geração de estresse oxidativo também inibe a transcrição e a expressão de PDX-1 (Kitamura *et al.*, 2002). A transcrição de genes constitui uma pequena parte do mecanismo de regulação da síntese de proteínas e outros mecanismos de controle, em particular a modificação pós traducional de proteínas, podem ser muito importantes na explanação da incidência de alterações metabólicas. Uma série de fatores afeta a expressão de PDX-1 (Figura 4) e, desta forma, o PDX-1 pode ser um importante mediador de outros eventos que prejudicam a secreção de insulina em longo prazo.

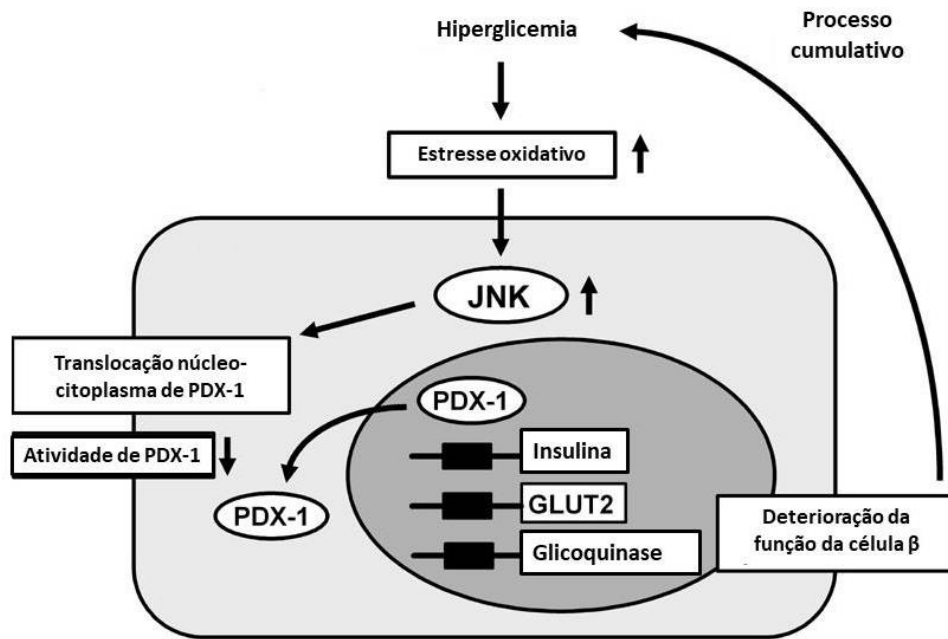


Figura 4 – Redução de PDX-1 decorrente de um ambiente hiperglicêmico e deterioração da função da célula β .

FONTE: adaptado de Kaneto et al, 2008.

NOTA: existem evidências de que a hiperglicemia crônica suprime a secreção e a biossíntese de insulina por provocar estresse oxidativo, acompanhado pela redução na expressão de PDX-1 e/ou sua atividade de ligação ao DNA.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos reprodutivos e metabólicos causados pela exposição *in utero* e lactacional de ratos a dois ftalatos amplamente utilizados, o DEHP e o DBP, particularmente em relação ao desenvolvimento reprodutivo andrógeno-dependente e à homeostase glicêmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se o DEHP e DBP causam toxicidade geral e reprodutiva;
2. Investigar os efeitos da exposição sobre os descendentes machos e fêmeas em relação:
 - a) O crescimento e ganho de massa corporal;
 - b) Androgenização intrauterina e pós-natal;
 - c) Peso de órgãos como marcadores de toxicidade geral e reprodutiva;
3. Avaliar a manutenção da homeostase glicêmica na vida adulta:
 - a) Avaliar a responsividade *in vitro* das ilhotas pancreáticas de animais expostos a ftalatos frente a diferentes estímulos de glicose;
 - b) Investigar a expressão das proteínas PDX-1 e PPAR γ frente à exposição ao DEHP e DBP.
4. Comparar os efeitos da exposição ao DEHP e ao DBP considerando os diferentes perfis de toxicidade obtidos.

3. MÉTODOS

ANIMAIS, DOSES E TRATAMENTOS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) adultos da variedade Wistar, criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (Curitiba). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e receberam água e ração (Nuvilab, Colombo, Brasil) *ad libidum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (número de consentimento 867) e estão de acordo com as orientações nacionais e internacionais de bem-estar animal.

Para a obtenção das progenitoras, as ratas foram acasaladas com ratos machos adultos durante a fase escura do ciclo de luz (3 horas), na proporção de um macho para três fêmeas. Foi realizado lavado vaginal para verificar a presença de espermatozoides e confirmar a cópula. O dia de detecção dos espermatozoides foi considerado como dia zero da gestação (Chahoud e Kwasigroch, 1977). O dia do parto foi considerado como dia 1 pós-natal (DPN 1) e, posteriormente, os descendentes foram desmamados no DPN 21. Um total de 55 ratas grávidas foram mantidas em gaiolas individuais (41 comprimento x 34 largura x 16 cm altura) e pesadas diariamente.

Após a confirmação do espermatozoide no lavado vaginal, as ratas gestantes foram distribuídas aleatoriamente em sete grupos experimentais ($n = 7-8/\text{grupo}$): grupo controle tratado com óleo de canola (CAS 120962-03-0; Sigma Aldrich W530228); grupos tratados com três diferentes doses de DEHP (DEHP, CAS 117-81 -7; Sigma Aldrich 99% D201154) e três diferentes doses de DBP (DBP, CAS 84-74-2; Sigma Aldrich 99% 524980). Foram utilizadas doses equimolares (0,018, 0,18 e 1,8 mmol/kg/dia) de DEHP ou DBP correspondentes a 7, 70 e 700 mg/kg/dia para o DEHP e 5, 50 e 500 mg/kg/dia para o DBP. Essa faixa de doses foi selecionada com base em estudos prévios de toxicologia reprodutiva e de desenvolvimento em ratos e inclui altos níveis de doses conhecidas por induzir efeitos antiandrogênicos (David *et al.*, 2001; Kavlock *et al.*, 2002a, 2002b; Foster, 2006), bem como doses menores, relatadas anteriormente por induzir efeitos metabólicos em ratos (Lin *et al.*, 2011). Além disso, as

menores doses testadas estão próximas das doses que não causam efeitos adversos (No Observed Adverse Effect Level – NOAEL) para a reprodução e que são usadas para o cálculo da ingestão diária aceitável desses ftalatos. A NOAEL dose é de 4,8 mg/kg/dia para o DEHP e de 1,5 - 3,0 mg/kg/dia para o DBP (União Europeia, 2018).

Todos os tratamentos foram administrados por via oral (gavagem) às mães do GD13 ao dia 21 da lactação (DPN 21). DEHP e DBP foram dissolvidos em óleo de canola e a dose foi ajustada diariamente de acordo com o peso corporal materno. O volume de administração foi de 5,0 ml / kg de peso corporal.

A Figura 5 apresenta resumidamente o delineamento experimental do estudo.

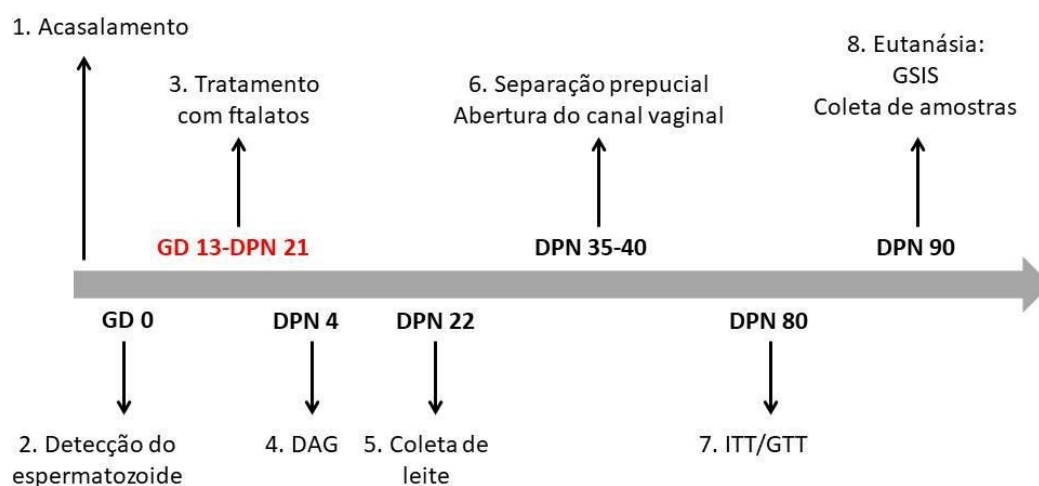


Figura 5. Delineamento experimental. GD = dia gestacional; DPN = dia pós-natal; DAG = distância anogenital; GSIS = teste de secreção de insulina induzida por glicose; ITT = teste de tolerância à insulina; GTT = teste de tolerância à glicose.

GRAVIDEZ E DADOS DOS DESCENDENTES

Após o parto espontâneo, o tamanho da ninhada e o peso dos filhotes ao nascer foram registrados. Ninhadas contendo menos de seis filhotes foram descartadas do estudo, enquanto ninhadas contendo onze ou mais filhotes tiveram seu tamanho ajustado à dez filhotes, excluindo aleatoriamente os animais excedentes no quarto dia pós-natal (DPN 4), de modo a manter cinco filhotes machos e cinco fêmeas por ninhada, sempre que possível. Assim, a partir do DPN 4, o tamanho da ninhada variou de 6 a 10 filhotes/ninhada. Filhotes e mães ($n = 7-8$ ninhadas/grupo) foram pesados diariamente do DPN 4 ao DPN 21, sem distinção entre filhotes machos e fêmeas dentro de ninhadas.

Os filhotes foram desmamados no DPN 21, separados por sexo e mantidos em no máximo cinco ratos por caixa, todos da mesma ninhada. Ao longo do desenvolvimento foi registrada a massa corporal dos descendentes machos e fêmeas semanalmente até a idade adulta (DPN 78).

COLETA DE LEITE

Um dia após o desmame (DPN 22), amostras de leite materno foram coletadas. A coleta de leite foi realizada por meio de ordenha manual e para tanto, as progenitoras foram anestesiadas, por via intramuscular, com a mistura de 0,2 mg/g de xilasina e 0,5 mg/g de quetamina. Em seguida, os animais receberam ocitocina sintética (UCBVET - 10 UI/ML, Brasil) via intraperitoneal, administrada na dose de 5 UI/Kg de peso corporal, a fim de estimular a ejeção do leite. Aproximadamente 500 µl de leite por lactante foi coletado (Cancian et al., 2016). As amostras armazenadas em microtubos foram congeladas a -20° C para posterior quantificação de carboidratos e lipídeos, bem como, para medir a concentração de metabólitos de ftalatos presentes. Todas as progenitoras foram eutanasiadas por decapitação. O útero foi removido para contagem dos locais de implantação. A perda pós-implantação (número de implantes - número de descendentes vivos) x 100/número de implantes) e o índice de desmame (número de descendentes vivos no DPN 21/número de descendentes vivos nascidos x 100) foram avaliados (Muller *et al.*, 2013).

DISTÂNCIA ANOGENITAL (DAG)

A DAG foi medida em todos os descendentes com o auxílio de um paquímetro digital (Carrera Precision, Guangdong, China). A medida consiste em medir a distância entre o centro do ânus à borda posterior da papila genital. Todas as medidas foram feitas por um único investigador, usando uma lente de aumento (ampliação 4,0x). A DAG foi medida no DPN 4 e para cada animal foram feitas três medidas e a média utilizada. Para normalizar as diferenças do tamanho corporal calculou-se, a seguir, o índice anogenital (IAG), dividindo-se o valor da DAG pela raiz cúbica da massa corporal (Gallavan et al., 1999; Kita et al., 2016).

SEPARAÇÃO PREPUCIAL E ABERTURA DO CANAL VAGINAL

A idade de separação prepucial e abertura do canal vaginal foram monitoradas diariamente. A separação prepucial foi avaliada pela retração manual do prepúcio a

partir do DPN 33. O marco utilizado para definir a obtenção da separação prepucial foi a exposição da glândula do pênis, que deveria ser redonda e livre de tecido cartilaginoso que caracteriza o pênis imaturo. Também investigamos possíveis malformações genitais, incluindo a ocorrência de hipospádia (abertura da uretra na face ventral do pênis) e fenda de prepúcio (prepúcio formado incompletamente com a glândula exposta do pênis). O peso corporal no dia da separação prepucial também foi registrado. Nos descendentes do sexo feminino, avaliamos a abertura do canal vaginal com início no DPN 33. O dia da abertura do canal vaginal completo e o peso corporal naquele dia também foram registrados.

TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Os filhotes machos e fêmeas foram submetidos ao ITT e ao GTT entre o DPN 80 e 88. Para a realização do ITT, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, com livre acesso à água. Esses animais receberam a administração de insulina intraperitoneal, Humalog (Lispro), correspondente a 1 unidade por kg de peso corporal. Cerca de 50 µL de sangue foram coletados da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 20 e 25 minutos após a sobrecarga de insulina. A concentração de glicose no sangue foi medida imediatamente após cada coleta com um medidor portátil de glicose (Accu-check, Roche). Os dados são apresentados como porcentagem de glicose em relação ao tempo zero. A taxa de decaimento da glicose (Kitt) foi calculada pela inclinação da curva de regressão linear do logaritmo natural da concentração de glicose no sangue em função do tempo e expressa em porcentagem por minuto. Para a realização do GTT, os filhotes foram mantidos em jejum por 12 h, com livre acesso à água, e receberam glicose na dose de 2,0 g/kg de peso corporal por injeção intraperitoneal. A concentração de glicose no sangue foi medida com medidor portátil de glicose (Accu-check, Roche) em amostras de cerca de 50 µL coletadas da cauda em vários momentos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) após a administração de glicose. A resposta à sobrecarga de glicose durante o GTT foi calculada pela área sob a curva (AUC) usando o método trapezoidal (Brissova *et al.*, 2005).

EUTANÁSIA, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E INSULINA PLASMÁTICA

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, com livre acesso à água e eutanasiados por decapitação para coleta de sangue e de órgãos no DPN 90 (\pm 3 dias) de

forma aleatória, alternando entre os grupos controle e tratados. Na sequência foram coletados e pesados o fígado, baço, rins, adrenais, tecido adiposo (retroperitoneal, mesentérico, epididimal e ovariano) e órgãos e tecidos reprodutivos (próstata ventral, vesícula seminal, testículo, músculo levantador do ânus/bulbocavernoso (LABC), ovários, útero). Os pesos dos órgãos foram corrigidos pelo peso corporal e expressos em g% ou mg%. Além disso, o plasma foi removido após a centrifugação do sangue (1000 g por 15 min) e mantido a -20°C até que as análises bioquímicas de glicose, triglicérides e colesterol fossem realizadas com kits colorimétricos comerciais da Linha Bioliquid - Laborclin (Pinhais, Brasil). A insulina no plasma foi determinada por radioimunoensaio (RIE), como descrito anteriormente por Berson e Yalow, 1968.

SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE (GSIS)

O isolamento das ilhotas pancreáticas foi realizado através da técnica da colagenase com modificações, como previamente descrito por Lacy e Kostianovsky (1967) e adaptado por Grassioli et al., (2006). No DNP 90 ± 3 dias (n = 6-12 ratos/sexo/grupo) após 12 horas de jejum, os animais foram decapitados e, em seguida, submetidos à laparotomia para localização do ducto pancreático comum. Posteriormente foi realizada a oclusão da porção final do ducto pancreático para a perfusão. A perfusão foi realizada com aproximadamente 8 mL de solução Hank's (em mM: 1,3 Cloreto de cálcio (CaCl₂); 0,8 Sulfato de Magnésio (MgSO₄); 5,4 Cloreto de Potássio (KCL); 0,4 de Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄); 4,3 Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃); 5,6 mM de glicose (C₆H₁₂O₆), pH 7,4, contendo colagenase do tipo XI (CAS 9001-12-1; Sigma Aldrich C9263). Após a perfusão, fez-se a retirada e transferência do órgão para o tubo falcon contendo 5 mL Hank's, sendo, em seguida, transferido para banho-maria à 37°C, por aproximadamente 6-8 minutos, filtradas e lavadas em solução Hank's sob banho de gelo. Posteriormente as ilhotas foram manualmente coletadas com auxílio de lupa (Edulab, UK) e pipetas. Grupos de 4 ilhotas obtidas de 2 ratos do mesmo sexo e ninhada foram pré-incubados em poços de placa de cultivo de 24 poços, para adaptação ao meio *in vitro*, por 1 hora em 1 mL de solução de Krebs, pH 7,4, suplementado com albumina bovina a 0,1% (fração V), glicose (5,6 mM) e arejados com uma mistura gasosa (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico). A secreção da pré-incubação foi descartada e, em seguida, substituída pelas soluções teste.

Para avaliar a responsividade das ilhotas pancreáticas à glicose, os diferentes grupos de ilhotas foram incubadas em poços de placas de cultivo de 24 poços contendo 1 mL de solução Krebs e glicose nas seguintes concentrações: 5,6; 8,3 e 16,7 mM durante 1 hora. Alíquotas dos conteúdos secretados foram coletados e armazenados em freezer -80°C para posterior análise pela técnica de radioimunoensaio (RIE), como descrito anteriormente por Berson e Yalow, 1968.

DOSAGEM DE INSULINA

O método de Radioimunoensaio (RIE) para dosagens de insulina consiste na ligação competitiva de moléculas de insulina humana marcadas com o isótopo radioativo de iodo 125 (I^{125}) (Perkin Elmer, USA), e de moléculas de insulina não radioativas, provenientes das amostras experimentais, que competem pelo mesmo anticorpo específico contra insulina (anti-rato). Moléculas ligadas ao anticorpo em solução, ao serem centrifugadas permanecem sobrenadantes, enquanto as livres acumulam-se ao fundo do tubo de ensaio. A leitura da radiação é realizada por um contador de cintilação GAMA, que detecta a quantidade de radiação emitida por cada amostra. Baseando-se na curva padrão com quantidade de radiação e de insulina conhecidas em cada amostra, quanto maior a radioatividade, maior será a quantidade de insulina não radioativa.

Pelo método de competição, a maior concentração de insulina das amostras permitirá o maior número de ligações com o anticorpo, predominando a interação insulina-anticorpo livre no sobrenadante, resultando em um maior acúmulo de insulina radioativa no fundo da solução, a qual emitirá determinada radioatividade lida em cpm/min e, em seguida, este valor é convertido para o log da concentração final de insulina em ng/mL (Berson and Yalow, 1968).

EXTRAÇÃO PROTEICA E WESTERN BLOT

Para determinar as concentrações de PDX-1 e PPAR γ foi utilizado o método de Western Blot. As porções caudais do pâncreas dos descendentes machos e fêmeas foram coletadas e homogeneizadas em solução tampão (Uréia 7M; tiuréia 2M; EDTA 5 mM; triton X-100 1%; fluoreto de sódio 100 mM; ortovanato de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 100 mM; aprotinina 1mg/mL e PMSF 1 mmol/L) para extração de proteína total. Primeiramente, os tecidos foram lisados e homogeneizados (homogeneizador

automático – Biospec products, Canada) utilizando 300 µL de tampão de lise e coquetel inibidor de proteases (Santa Cruz Biotechnology, USA, sc- 24948). Após a extração proteica, os tubos foram centrifugados à 13000 rpm durante 10 minutos e a quantidade de proteínas foi determinada usando o método de Bradford (1976).

As amostras foram diluídas em tampão de lise a fim de se obter a quantidade de 50 µg, que foram desnaturadas à 100°C e aplicada às canaletas do gel de poliacrilamida à 15% para fracionamento. Em um dos poços foram aplicados 10 µL de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ BIO-RAD, 1610375). O Tampão de corrida foi preparado com trisma (25 mmol/L), glicina (0,2 mol/L) e SDS (0,1%), as proteínas foram separadas através de aplicação de 300 volts durante 1 hora e 40 minutos no sistema MINI-PROTEIN BIO-RAD®. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência gelado contendo trisma (25 mmol/L), glicina (0,2%) e metanol (10%) durante 1 hora à 100 volts.

A membrana foi então incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados durante 1 hora à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituída a base de ovoalbumina em TBS-T (tampão trisma-salina com tween 20 à 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram incubadas “overnight” com os seguintes anticorpos primários: β-actin (Santa Cruz Biotechnology, USA, sc- 47778), PDX-1 (Abcam, UK, 98298) and PPARγ (Abcam, UK, 41928). Posteriormente foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: HRP-linked anti-rabbit IgG (1:5000) and HRP-linked anti-mouse IgG (1:10000). Os anticorpos secundários eram da Santa Cruz Biotechnology, USA. Os complexos proteína-anticorpo foram detectados usando o substrato quimioluminescente de acordo com as instruções do fabricante e a luz emitida capturada usando o Amersham™ Imager 600 - GE Healthcare UK Limited. A intensidade de cada banda foi quantificada por densitometria óptica pelo ImageJ Analysis Software para confirmar reduções ou aumentos (dados não mostrados).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade entre as variâncias foram analisadas pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio do teste de Bonferroni. Os testes de ganho de peso e tolerância à insulina/glicose foram analisados por ANOVA two-way. Todas as análises foram realizadas separadamente para DEHP e DBP. O nível de significância estatística empregado foi de 5% ($p < 0,05$). Para a análise estatística e desenho dos gráficos foram utilizados os programas Graphpad Prism® versão 6.0 e SPSS versão 13.0.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Effects of *in utero* and lactational exposure to phthalates on reproductive development and glycemic homeostasis in rats

Amanda Caroline Venturelli *, Katlyn Barp Meyer *, Stefani Valéria Fischer *, Diogo Henrique Kita *, Rafaela Adams Philipsen *, Rosana Nogueira Morais *, Anderson Joel Martino Andrade *¹

*Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-980, Brazil.

¹*Correspondence: Anderson Joel Martino Andrade, Federal University of Paraná, Biological Sciences, Department of Physiology, PO Box 19.031, Curitiba-PR, 81.530-990, Brazil. Fax: 55-41-3316-1714. E-mail: anderson.andrade@ufpr.br*

NOTA: Manuscrito em processo de submissão à revista TOXICOLOGY.

Abstract

Prenatal exposure to phthalates is associated with reproductive and metabolic alterations, but little is known about the toxicity profile of different phthalates in this regard. We investigated the effects of *in utero* and lactational exposure to Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and Di-n-butyl phthalate (DBP), representative of high and low molecular weight phthalates, respectively, on reproductive development and glycemic homeostasis in male and female offspring rats. Pregnant rats were exposed to equimolar doses (0.018, 0.18 and 1.8 mmol/kg/day) of DEHP or DBP corresponding to 7, 70, and 700 mg/kg/day for DEHP and 5, 50, and 500 mg/kg/day for DBP by oral gavage from gestation day 13 to postnatal day 21, using canola oil as vehicle control. In order to characterize the late effects on offspring, we evaluated the body weight development, external markers of prenatal androgenization, plasma concentration of glucose and insulin, insulin tolerance (ITT), glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and pancreatic expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and pancreatic and duodenal homeobox 1 protein (PDX-1). Male and female rats exposed to highest doses of DEHP and DBP exhibited increased fasting glucose levels. In rats exposed to DEHP 700 mg/kg/day we also observed a reduced glucose decay rate (Kitt) following insulin administration and decreased insulin secretion in the GSIS assay. Male offspring exposed to DEHP 700 mg/kg/day had reduced AGD on PDN 4 and delayed preputial separation at puberty, while female offspring exposed to DEHP 70 and 700 mg/kg/day and to the highest DBP dose had delayed vaginal opening. Our results suggest that maternal treatment with DEHP and DBP can induce a wide range of metabolic and reproductive alterations in offspring rats, with more pronounced effects following DEHP exposure.

Introduction

Science and materials engineering's breakthroughs in the last decades have led to a widespread use of a variety of plastics that provide cheaper, harder and long-lasting products (Andrady and Neal, 2009; Thompson, *et al.*, 2009^a; Thompson, *et al.*, 2009^b). Nevertheless, there are growing scientific and government-related concerns regarding potential human adverse health consequences caused by exposure to plastic additives. One of the major concerns refers to the fact that certain chemical products responsible for giving plastic its beneficial physical properties are also able to act as endocrine disrupting chemicals, hence leading to adverse reproductive effects and also, as it was recently reported, problems in the organism's energy metabolism (Kavlock *et al.*, 2002b; Manteiga e Lee, 2017; Meeker *et al.*, 2009). Phthalates are mainly used as plasticizers to increase the flexibility, transparency and durability of polyvinyl chloride (PVC) plastic materials. While high molecular weight phthalates, such as di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), are mainly used as PVC plasticizers, low molecular weight compounds, including di-n-butyl phthalate (DBP), are used as additives in many industrial products, as for instance, stickers, paints, personal hygiene products, air purifiers and pharmaceuticals. Epidemiologic studies suggest positive associations between maternal phthalate exposure and human reproductive abnormalities, including reductions in the anogenital distance in male infants, an external marker of prenatal androgenization (Lottrup *et al.*, 2006; Meeker *et al.*, 2009; Swan *et al.*, 2015). Consequences of fetal exposure to phthalates on the reproductive system have already been demonstrated and are well established in animal rodent models. Common phthalate adverse effects appear to be caused by their interference with steroid hormones signaling pathways, in particular inhibition of testosterone production by the fetal testis. Male offspring rats exposed *in utero* to high doses of certain phthalates display genital malformations, reduced anogenital distance, and abnormal testicular function (Foster, 2006; Martino-Andrade e Chahoud, 2010).

In recent years, studies have shown that exposure to phthalates can also cause alterations in lipid and glucose metabolism in both humans and animal models. This may point to a possible association between this kind of exposure and a series of health conditions, such as heart problems, diabetes and obesity (Chen *et al.*, 2017; Darbre, 2017; Jia *et al.*, 2016). A couple of studies in animal models raise the hypothesis that inflammatory processes may also be induced by endocrine disruptors, including DEHP (Campioli *et al.*, 2014; Manteiga e Lee, 2017). As a consequence, transcriptional control

of proteins that are key to metabolic homeostasis may be altered due to phthalate exposure (Kawamori *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2016). The mechanisms involved in metabolic disruption may be different from those associated with reproductive toxicity, resulting in phthalates with different toxicity profiles. For instance, there are indications that metabolites of high molecular weight phthalates, with longer side chains, are more potent agonists of some peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), important targets in the control of lipid metabolism and insulin sensitivity in peripheral tissues, which may result in higher potential for metabolic disruption (Desvergne *et al.*, 2009; Corton and Lapinskas, 2005; Hurst and Waxman, 2003). However, there are no *in vivo* studies comparing the spectrum of metabolic effects induced by different phthalate esters.

Here, we examined the profile of reproductive and metabolic changes induced by equimolar doses of DEHP and DBP, representative of high and low molecular weight phthalates, respectively, and which are already known to be toxic to the reproductive system. In particular, we investigated endpoints related to reproductive development and glycemic homeostasis.

Materials and Methods Animals,

dosage and treatments

Wistar rats were obtained from the Federal University of Parana, after due approval of the local ethical committee for the use of animals (CEUA) (Certificate 867/2015). Animals were maintained under controlled temperature, humidity, and a 12:12h light-dark cycle, with *ad libitum* access to food (NUVILAB-CR1; Quimtia, Colombo/PR) and water (except when indicated).

To obtain the dams, adult female rats were mated with male rats in the dark phase of the light cycle. Three nonpregnant female rats were mated with one male for 3 h and the day of sperm detection in the vaginal smear was considered day 0 of gestation (GD 0). The day of delivery was considered as postnatal day 1 (PND 1) and the offspring was weaned on PND 21. A total of 55 pregnant rats were kept in individual standard cages (41 length x 34 width x 16 height cm) and weighed daily. Dams were divided into seven experimental groups (n = 7-8/group): vehicle control treated with canola oil (CAS 120962-03-0; Sigma Aldrich W530228), three dose levels of DEHP (DEHP, CAS 117-

81-7; Sigma Aldrich 99% D201154) and three dose levels of DBP (DBP, CAS 84-74-2; Sigma Aldrich 99% 524980). We used equimolar doses (0.018, 0.18 and 1.8 mmol/kg/day) of DEHP or DBP corresponding to 7, 70, and 700 mg/kg/day for DEHP and 5, 50, and 500 mg/kg/day for DBP. This range of doses was selected based on previous developmental rat studies and include high dose levels known to induce antiandrogenic effects (Kavlock *et al.*, 2002b; David *et al.*, 2001; Foster, 2006) as well as lower doses previously reported to induce metabolic effects in rats (Lin *et al.*, 2011). All treatments were given via oral route (gavage) to the dams from the GD13 to lactation day 21 (PND 21). DEHP and DBP were dissolved in canola oil, and dosage was adjusted daily according to maternal body weight. The administration volume was 5.0 ml/kg body weight.

Pregnancy and offspring data

After spontaneous delivery, litter size and birth weight of offspring were recorded. Litters containing less than six pups were discarded from the study, while litters containing eleven or more pups had their size adjusted to ten pups by randomly excluding the exceeding animals on postnatal day four (PND 4), so as to keep five male and five female pups per dam, whenever possible. Thus, from PND 4 onwards our litter size ranged from 6 to 10 pups/litter. Pups and dams (n = 7-8 dams/group) were weighed daily from PND 4 to 21, without distinction between male and female pups within litters. Pups were weaned on PND 21 and had their weights recorded weekly by sex until adulthood (PND 78). One day after weaning (PND22) all dams were euthanized by decapitation and the liver, spleen, kidney, adrenal, adipose tissue (retroperitoneal and ovarian) were removed and weighed. The uterus was removed for counting of implantation sites. Post-implantation loss ($[\text{number of implants} - \text{number of live offspring}] \times 100 / \text{number implants}$) and the weaning index ($[\text{number of live offspring on PND 21} / \text{number of live offspring delivered}] \times 100$) were evaluated (Muller, *et al.*, 2013).

Anogenital distance (AGD)

The AGD was measured on all offspring with a digital caliper from the center of the anus to posterior edge of the genital papilla by a single investigator (DHK) using a head magnifier lens (4.0x magnification). The AGD was measured on PND 4 and for each animal, three measures were made and the average used. All anogenital distance

measurements were corrected by cubic root of body weight (Anogenital index = AGI) (Gallavan *et al.*, 1999; Kita *et al.*, 2016).

Preputial Separation and Vaginal Opening

The age at preputial separation and vaginal opening was monitored daily. Preputial separation was assessed by manual retraction of the prepuce starting on PND 33. The landmark used to define the achievement of preputial separation was the exposure of the glans penis, which should be round and free of cartilaginous tissue that characterizes the immature penis. We also investigated possible genital malformations, including the occurrence of hypospadias (opening of urethra in the ventral side of penis) and cleft prepuce (incompletely formed prepuce with exposed glans penis). Body weight at the day of preputial separation was recorded. In the female pups we evaluated the vaginal opening beginning on PND 33. The day of complete vaginal opening and body weight at that day were recorded.

Insulin Tolerance Test (ITT) and Glucose Tolerance Test (GTT)

The male and female offspring was submitted to ITT and GTT between PNDs 80 and 88. For the ITT, the animals were fasted for 12 h, with free access to water. These animals received the administration of intraperitoneal insulin, Humalog (Lispro), corresponding to 1 unit per kg of body weight. Around 50 μ L blood was collected from the tail at times 0 (basal), 5, 10, 20 and 25 min after the insulin overload. The blood glucose concentration was measured immediately after each collection through a glucose meter (Accu-chek, Roche). Data are presented as percentage of glucose on time zero. The glucose decay rate (Kitt) was calculated through the slope of the linear regression line of the natural logarithm of the blood glucose concentration versus time, and expressed in percentage per minute. For the GTT test, offspring were fasted for 12 h, with free access to water, and administered 2.0 g/kg body weight glucose by intraperitoneal injection. Blood was collected from the tail and glucose levels were determined at various time points (0, 15, 30, 60, and 120min) after glucose administration. The response to glucose overload during the GTT was calculated by the area under the curve (AUC) using the trapezoidal method (Brissova *et al.*, 2005).

Euthanasia, biochemical parameters and plasma insulin

The animals were fasted for 12 hours, with free access to water, and euthanized by decapitation for the collection of blood and organs on PND 90 (\pm 3 days) in a random fashion, alternating between control and treated groups. We excised and weighed the liver, spleen, kidneys, adrenals, adipose tissue (retroperitoneal, mesenteric, epididymal and ovarian) and reproductive organs and tissues (ventral prostate, seminal vesicle, testis, levator ani/bulbocavernosus muscle (LABC), ovaries, uterus). Organ weights are reported relative to body weight (g or mg %). In addition, the plasma was removed after blood centrifugation and kept at -20°C until the glucose, triglycerides and cholesterol biochemical analyses were carried out with commercial colorimetric kits from Line Bioliquid – Laborclin (Pinhais, Brazil). The plasma insulin was determined by radioimmunoassay (RIA), as previously described by Sutton et al., 1986.

Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)

Pancreatic islets were obtained from male and female offspring on PND 90 \pm 3 days ($n=6-12$ rats/sex/group). This was carried out using type XI collagenase (CAS 9001-12-1; Sigma Aldrich C9263), pancreas perfusion via hepatic duct and manual collection of Langerhans islets, as previously described by Lacy and Kostianovsky (1967) and adapted by Grassioli *et al.* (2006). Groups of 4 islets obtained from 2 rats of the same sex and litter were pre-incubated for 1 hour in 1 mL Krebs solution, pH 7.4, supplemented with bovine albumin 0,1% (fraction V), glucose (5.6mM) and aired with a gaseous mixture (95% oxygen and 5% carbon gas). This solution was then discharged and substituted by the incubation solutions with the same conditions described above, but containing glucose at three different concentrations: 5.6, 8.3 and 16.7 mM. The insulin secreted after incubation with these different glucose concentrations was quantified in the medium through radioimmunoassay (RIA), as previously described by Sutton et al., 1986.

Protein extract and Western Blot

Determinations of PDX-1 and PPAR γ were assessed using western blot. Proteins were extracted from pancreas. The concentration of protein in the samples was determined by the Bradford (1976) procedure. The proteins were separated by 15% SDS-PAGE gel, and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with

primary antibodies against β -actin (Santa Cruz Biotechnology, USA, sc- 47778), PDX-1 (Abcam 98298) and PPAR γ (Abcam 41928). The membranes were further incubated with HRP-linked anti-rabbit IgG (1:5000) and HRP-linked anti-mouse IgG (1:10000). Secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. The protein-antibody complexes were detected by using the chemiluminescent substrate according to the manufacturer's instructions and the emitted light captured using Amersham Image 600. The intensity of each band was analyzed using „histogram analyses“ in the ImageJ Analysis Software to confirm reductions or increases (data not shown).

Statistical analysis

The variables that presented normal distribution and homogeneity between variances were analyzed by analysis of variance (ANOVA). The differences between groups were determined through the Bonferroni test. The weight gain and insulin/glucose tolerance tests were analyzed by two-way-ANOVA. Analyses were performed separately for DEHP and DBP. The statistical significance level employed was 5% ($p < 0.05$). For the statistical analysis and graph design, the programs Graphpad Prism® version 6.0 and SPSS version 13.0 were used.

Results

Pregnancy and offspring data and anogenital index

At the dose levels tested, DEHP and DBP had no effect on body weight gain and organs weight of dams (data not show). There were no significant differences between groups in relation to litter size, postimplantation loss, and weaning index. However, the anogenital distance, expressed as anogenital distance index (AGI), was reduced by exposure to DEHP at the highest dose (Table 1).

Table 1 - Effects of developmental DEHP and DBP exposure *in utero* and during lactation on reproductive outcomes.

Parameters	Vehicle	DEHP (mg/kg/day)			DBP (mg/kg/day)		
		7	70	700	5	50	500
Number of litters	8	7	8	8	8	8	7
Body weight dams	239.60±13.47	246.80±15.43	246.20±15.81	246.40±12.98	251.0±12.65	247.50±13.41	250.20±14.52
Uterine Implantation (n)	9.37±0.91	10.14±1.06	11.0±1.06	10.88±1.12	10.50±1.30	9.62±0.91	10.43±1.51
Post-implantation loss¹ (%)	10.07±11.50	5.45±7.71	19.41±18.59	21.15±12.29	24.83±17.57	4.34±6.00	5.05±8.73
Litter size (n)	8.25±1.58	9.0±1.29	7.37±1.30	7.0±1.51	7.75±1.83	8.87±1.55	9.28±1.38
Weaning index² (%)	97.48±4.70	94.31±10.61	85.85±16.74	94.46±8.78	98.86±3.21	96.05±10.95	94.67±10.38
AGI male³ (PND 4)	1.86±0.11	1.84±0.16	1.88±0.20	1.61±0.11*	1.93±0.15	1.88±0.15	1.74±0.13
AGI female³ (PND 4)	0.93±0.06	0.99±0.14	0.98±0.13	0.91±0.04	1.03±0.05	0.99±0.09	0.98±0.08

All data are shown as mean ± standard deviation of litter means. Asterisks superscripts indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni).

¹ Body weight on day 22 of lactation.

² Post-implantation loss ([number of implants – number of live offspring] x 100/number implants).

³ Weaning index ([number of live offspring on PND 21/number of live offspring delivered] x 100).

⁴ AGI (anogenital index) = $AGD/\sqrt[3]{\text{body weight}}$.

Postnatal growth

Regarding the body weight gain of male and female offspring during lactation, there was an increase in body weight from PND 16 to the end of lactation in the groups exposed to DEHP 700 mg and DBP 5 mg. Data are shown on Figure 1. After weaning, especially during puberty (PND 29-53), there was an increase in body weight gain in offspring exposed to DEHP 70 and 700 mg (male and female, respectively). In the groups exposed to DBP there were some occasional increases in body weight at 5 mg/kg/day and reductions at 50 mg/kg/day, mainly in males. However, the weight variations found during growth were not seen at adulthood. Data are shown on Figure 2.

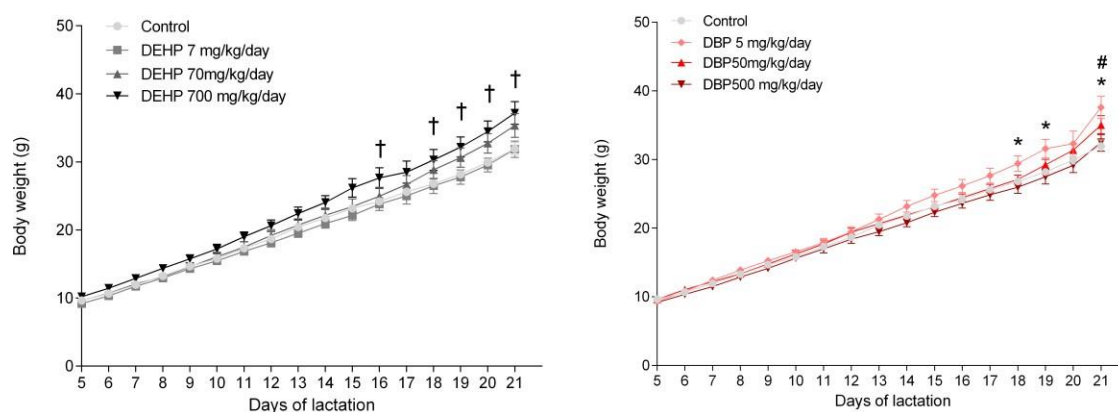


Figure 1 - Effects of developmental DEHP and DBP exposure on the body weight of male and female offspring exposed *in utero* and during lactation. PND 5 – 21 corresponding to lactation. (n = 6 – 8 litters/group). The respective area under the curve (AUC) is shown in inserts.

* $p < 0.05$, for DEHP 7 mg and DBP 5 mg vs. control (ANOVA 2way/Bonferroni).

$p < 0.05$, for DEHP 70 mg and DBP 50 mg vs. control (ANOVA 2 way/Bonferroni).

† $p < 0.05$, for 700 mg/kg/day vs. control (ANOVA 2 way/Bonferroni).

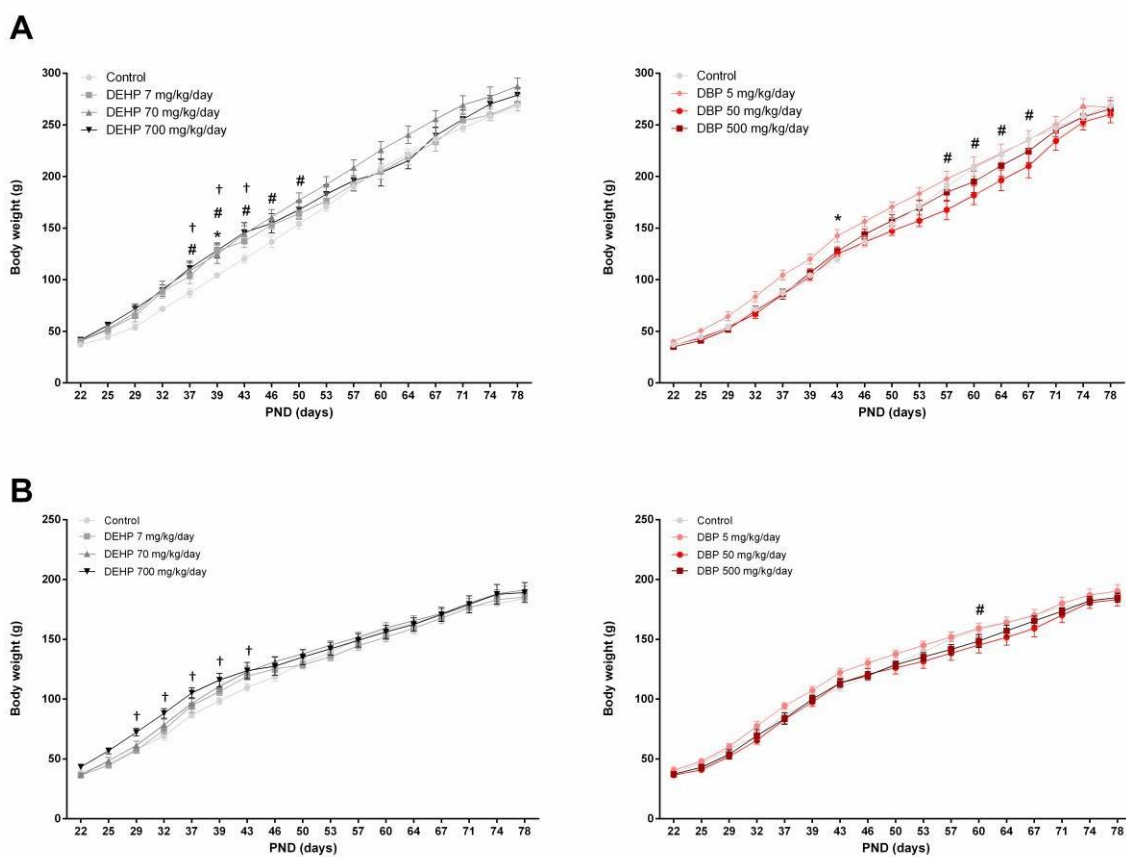


Figure 2 - Effects of developmental DEHP and DBP exposure on the body weight of male (A) and female (B) offspring exposed *in utero* and during lactation ($n = 6 - 8$ litters/group). The respective area under the curve (AUC) is shown in inserts. Asterisks superscripts in AUC indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni).

* $p < 0.05$, for DEHP 7 mg and DBP 5 mg vs. control (ANOVA 2way/Bonferroni).

$p < 0.05$, for DEHP 70 mg and DBP 50 mg vs. control (ANOVA 2 way/Bonferroni).

† $p < 0.05$, for DEHP 700 mg/kg/day vs. control (ANOVA 2 way/Bonferroni).

Preputial separation and vaginal opening

The preputial separation and vaginal opening, external markers of puberty in rats, were examined daily in all animals from PND 33. *In utero* and lactational exposure to the highest DEHP dose (700 mg/kg/day) significantly delayed the age at preputial separation, while vaginal opening was delayed in animals exposed to DEHP at 70 and 700 mg/kg/day and to the highest DBP dose (500 mg/kg/day). Data are shown on Figure 3.

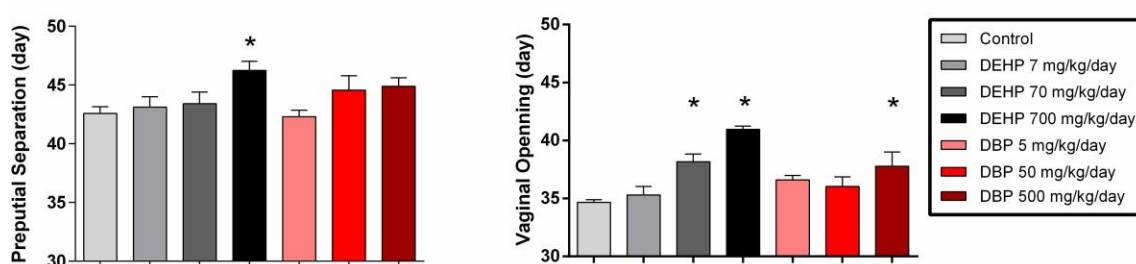


Figure 3 - Effects of developmental DEHP and DBP exposure on age at preputial separation and vaginal opening offspring rats exposed *in utero* and during lactation. Bars indicate mean \pm S.E.M. Statistical. Asterisks superscripts indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni). (n = 6 – 8 litters/group).

Evaluation of male and female reproductive tract development

Hypospadias were observed in four rats, all of the same litter, out of twenty-eight animals exposed to DEHP 700 mg/kg/day and cryptorchidism was seen in one animal from this same dose group. None of these alterations were seen in control rats. The reproductive and endocrine sensitive organs were collected and weighed on PND 90. Reproductive organ weights of male and female offspring were not affected and are shown in Tables 2 and 3, respectively. The weight of non-reproductive organs and tissues, including retroperitoneal, mesenteric, epididymal and ovarian fat tissue, were also unaffected by the phthalate treatment (data not shown).

Table 2 - Relative (g%) reproductive organs weight of adult male offspring rats after developmental exposure to DEHP and DBP. Data are mean \pm SE.

Parameters	Vehicle	DEHP (mg/kg/day)			DBP (mg/kg/day)		
		7	70	700	5	50	500
Body weight (g)	294.4 \pm 6.002	304.0 \pm 13.29	310.5 \pm 22.12	316.6 \pm 30.1	310.0 \pm 32.38	315.2 \pm 24.09	308.7 \pm 32.2
Prostate (%)	0.091 \pm 0.014	0.092 \pm 0.017	0.092 \pm 0.017	0.080 \pm 0.009	0.087 \pm 0.015	0.085 \pm 0.014	0.084 \pm 0.028
Seminal Vesicle (%)	0.171 \pm 0.022	0.163 \pm 0.030	0.178 \pm 0.017	0.159 \pm 0.025	0.165 \pm 0.023	0.166 \pm 0.022	0.176 \pm 0.027
LABC¹ (%)	0.278 \pm 0.009	0.289 \pm 0.028	0.290 \pm 0.028	0.255 \pm 0.019	0.288 \pm 0.037	0.284 \pm 0.032	0.264 \pm 0.022
Penis (%)	0.090 \pm 0.007	0.092 \pm 0.010	0.090 \pm 0.010	0.083 \pm 0.014	0.089 \pm 0.010	0.089 \pm 0.007	0.088 \pm 0.007
Epididymis (%)	0.159 \pm 0.011	0.167 \pm 0.012	0.154 \pm 0.034	0.162 \pm 0.026	0.170 \pm 0.011	0.164 \pm 0.014	0.163 \pm 0.010
Testes (%)	0.521 \pm 0.037	0.519 \pm 0.033	0.526 \pm 0.043	0.525 \pm 0.065	0.514 \pm 0.033	0.516 \pm 0.025	0.527 \pm 0.051
Bulboretral (%)	0.028 \pm 0.006	0.033 \pm 0.007	0.033 \pm 0.003	0.031 \pm 0.008	0.031 \pm 0.006	0.029 \pm 0.005	0.028 \pm 0.010

Relative weight = [organ weight (g)/body weight (g)*100].

Scrotal testes and epididymis weight are shown as mean of paired weights. (n = 7 – 8 litter/group). (p < 0.05, ANOVA/Bonferroni).

¹ LABC - levator ani/bulbocavernosus muscle.

Table 3 - Relative (g%) reproductive organs weight of adult female offspring rats after developmental exposure to DEHP and DBP. Data are mean \pm SE.

Parameters	Vehicle	DEHP (mg/kg/day)			DBP (mg/kg/day)		
		7	70	700	5	50	500
Body weight (g)	193.3 \pm 11.48	195.9 \pm 9.073	197.4 \pm 12.52	204.4 \pm 20.59	205 \pm 15.11	195.1 \pm 12.93	199.5 \pm 15.97
Ovaries (%)	0.056 \pm 0.007	0.059 \pm 0.007	0.061 \pm 0.007	0.053 \pm 0.008	0.055 \pm 0.006	0.056 \pm 0.005	0.057 \pm 0.004
Uterus (%)	0.212 \pm 0.019	0.208 \pm 0.034	0.209 \pm 0.019	0.201 \pm 0.008	0.197 \pm 0.025	0.191 \pm 0.039	0.231 \pm 0.033
Vagina (%)	0.080 \pm 0.011	0.083 \pm 0.014	0.089 \pm 0.016	0.082 \pm 0.017	0.080 \pm 0.009	0.078 \pm 0.004	0.094 \pm 0.017

Relative weight = [organ weight (g)/body weight (g)*100].

Ovaries are shown as mean of paired weights. (n = 7 – 8 litter/group). (p < 0.05, ANOVA/Bonferroni).

Effect of DEHP and DBP on blood biochemistry profile and organ weight

Data on metabolic profile of male and female offspring are shown on Tables 4 and 5, respectively. In male and female rats exposed to the highest doses of DEHP and DBP an increase in the fasting plasma glucose concentration was observed when compared to control. In relation to lipid profile, we observed an increase in the concentration of plasma cholesterol in males exposed to DEHP 700 mg/kg/day and DBP 5 mg/kg/day (Table 4). In females, there was an increase in triglyceride concentrations at the highest DBP dose group (Table 5).

Table 4 – Metabolic profile of male offspring rats after indirect exposure to DEHP and DBP *in utero* and during lactation. Data are mean \pm SE.

Parameters	Vehicle	DEHP (mg/kg/day)			DBP (mg/kg/day)		
		7	70	700	5	50	500
Basal glucose (mg/dL)	78.20 \pm 14.17	63.50 \pm 39.41	76.01 \pm 15.33	108.50 \pm 14.15*	99.55 \pm 22.59	98.89 \pm 25.65	101.0 \pm 29.58*
Basal insulin (ng/mL)	0.379 \pm 0.191	0.336 \pm 0.254	0.409 \pm 0.234	0.579 \pm 0.712	0.422 \pm 0.380	0.599 \pm 0.361	0.501 \pm 0.281
Cholesterol (mg/dL)	37.88 \pm 6.822	43.45 \pm 8.310	34.45 \pm 5.828	50.12 \pm 16.70*	48.24 \pm 8.804*	44.38 \pm 5.017	42.25 \pm 5.706
Triglycerides (mg/dL)	102.7 \pm 25.05	106.0 \pm 24.01	80.57 \pm 14.34	110.9 \pm 41.34	121.1 \pm 21.25	103.1 \pm 18.98	108.9 \pm 28.59

The blood samples were collected after 12-hour fasting on the PND 90 (n =10 rats/group). Asterisks superscripts indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni).

Table 5 – Metabolic profile of female offspring rats after indirect exposure to DEHP and DBP *in utero* and during lactation. Data are mean \pm SE.

Parameters	Vehicle	DEHP (mg/kg/day)			DBP (mg/kg/day)		
		7	70	700	5	50	500
Basal glucose (mg/dL)	85.55 \pm 14.95	117.8 \pm 30.95	101.3 \pm 44.64	122.3 \pm 22.57*	111.2 \pm 32.23	114.3 \pm 31.54	129.5 \pm 39.18*
Basal insulin (ng/mL)	0.372 \pm 0.236	0.534 \pm 0.392	0.332 \pm 0.170	0.404 \pm 0.291	0.392 \pm 0.558	0.659 \pm 0.483	0.613 \pm 0.671
Cholesterol (mg/dL)	38.02 \pm 4.709	50.81 \pm 21.45	38.90 \pm 12.04	38.26 \pm 6.066	47.36 \pm 16.58	38.74 \pm 5.842	42.58 \pm 14.27
Triglycerides (mg/dL)	51.57 \pm 15.35	47.79 \pm 14.09	45.54 \pm 16.52	40.88 \pm 11.90	53.94 \pm 13.30	55.27 \pm 10.37	79.42 \pm 43.96*

The blood samples were collected after 12-hour fasting on the PND 90 (n =10 rats/group). Asterisks superscripts indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni).

Effect of DEHP and DBP on peripheral insulin resistance

Insulin sensitiveness was evaluated through the insulin tolerance test and glucose tolerance test. Male and female rats exposed to DEHP 700 mg/kg/day presented reductions in glucose uptake in response to insulin overload (Figure 4, A and B), as indicated by the reduced slope of glucose decay (K_{it}). However, no significant differences were observed in the responses to glucose overload in the GTT (Figure 4, C and D).

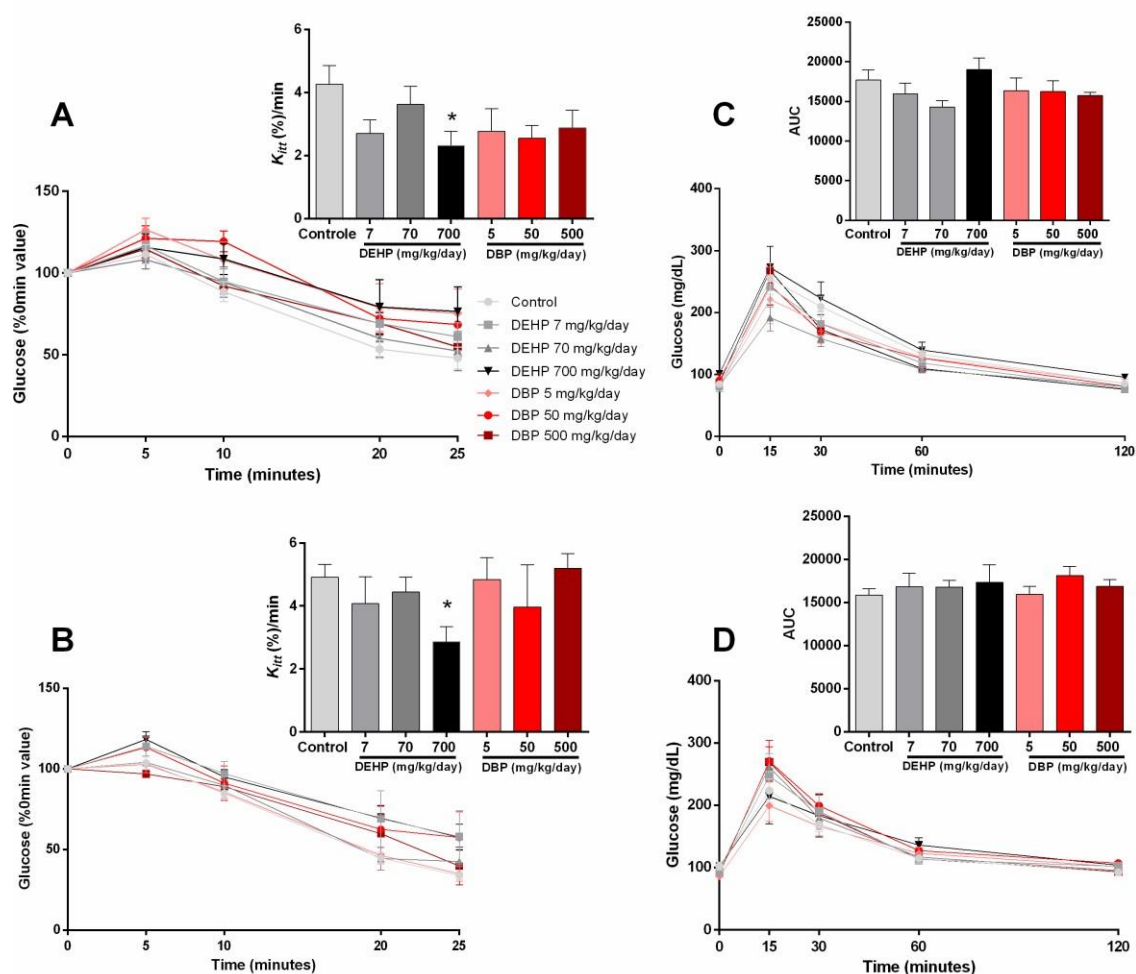


Figure 4 - Effects of developmental DEHP and DBP exposure on the insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT). The graphs A (males) and B (females) represent the glucose concentrations at different times before and after the insulin was administered (ITT) and the glucose decay rate (K_{it}). Blood glucose levels were normalized to those at $t = 0$ min (100%). The graphs C (males) and D (females) represent the glucose concentrations at different times before and after administration of glucose (GTT). The integrated area under the curve (AUC) was determined using the trapezoidal method. All samples were collected on PND 80 (n 6-10 rats/group). Asterisks superscripts indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni).

Effects of DEHP and DBP on β -cells islets function measured by Glucose-stimulated insulin secretion

Islets isolated from male offspring exposed to DEHP 700 mg/kg/day displayed normal insulin secretion in response to 5.6 or 8.3 mmol/liter glucose stimulus, but exhibited a diminished ability to secrete insulin in response to 16.7 mmol/liter glucose (Figure 5, A). In addition, insulin secretion was increased in the group exposed to 70 mg/kg/day DEHP in response to 5.6 mmol/liter glucose. In contrast, female offspring exposed to DEHP did not show any reductions in glucose-stimulated insulin secretion (Figure 5, C). Likewise, no effects were observed in the insulin secretory response of male and female offspring exposed to DBP (Figure 5, B and D).

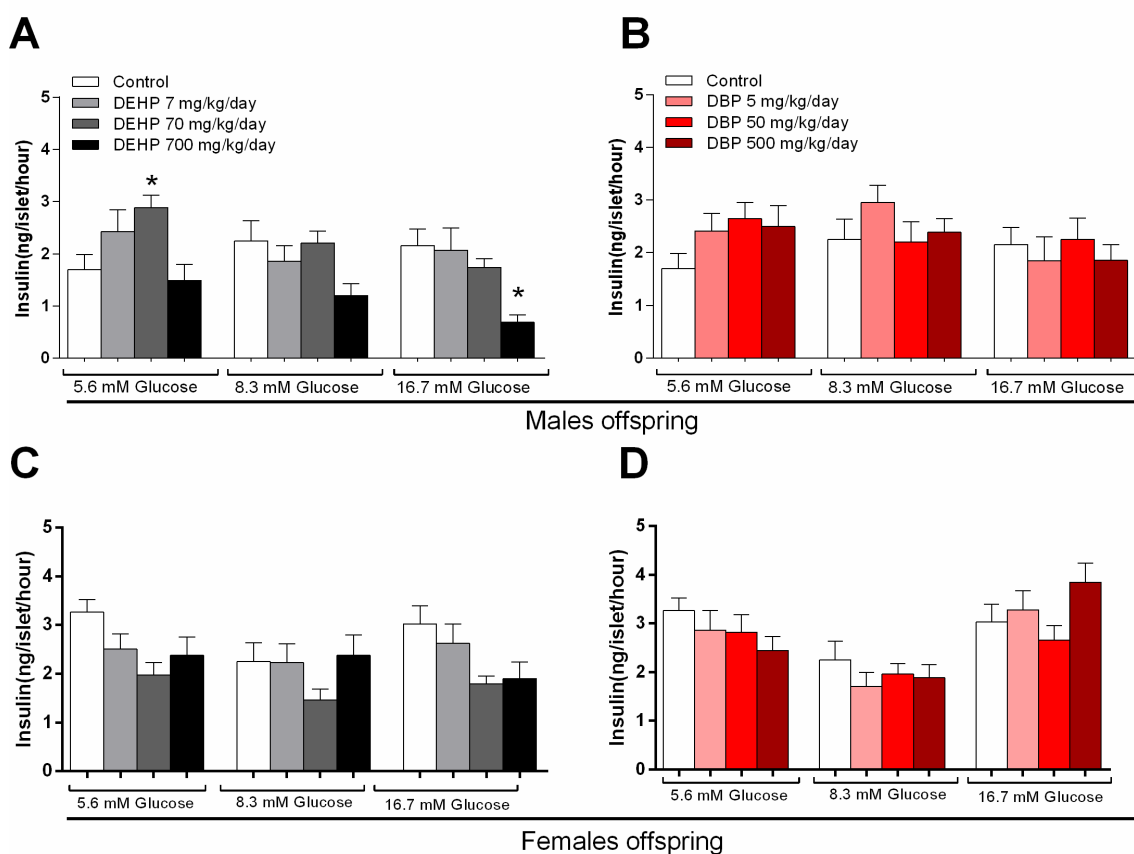


Figure 5 - Effects of developmental DEHP and DBP exposure on glucose-stimulated insulin secretion ex vivo in male and female offspring on PND 90. Islets were cultured in the presence of 5.6, 8.3, and 16.7 mM glucose for 1 h, and the accumulated amount of insulin was determined. Levels of insulin were expressed as $\text{ng} \cdot \text{islet}^{-1} \cdot \text{times}^{-1}$. Values are given as means \pm SEM of 2 male and 2 female offspring from 3-6 litters. Asterisks superscripts indicate significant differences between groups ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni).

Expression of proteins essential to the development of pancreas/ β -cell function and lipid metabolism

Due to the evidence that exposure to phthalates may alter glycemc homeostasis, we evaluated the expression of two essential proteins for energy balance. Developmental exposures to DEHP and DBP induced a moderate, non-significant, reduction in the expression of PDX-1 protein in the total pancreas extract, particularly in males (Figure 6, A and B). Likewise, expression of pancreatic PPAR γ seems to be reduced in phthalate exposed rats, particularly at DEHP 700 mg/kg/day and at DBP 5 mg/kg/day, although not significantly so (Figure 6, C and D).

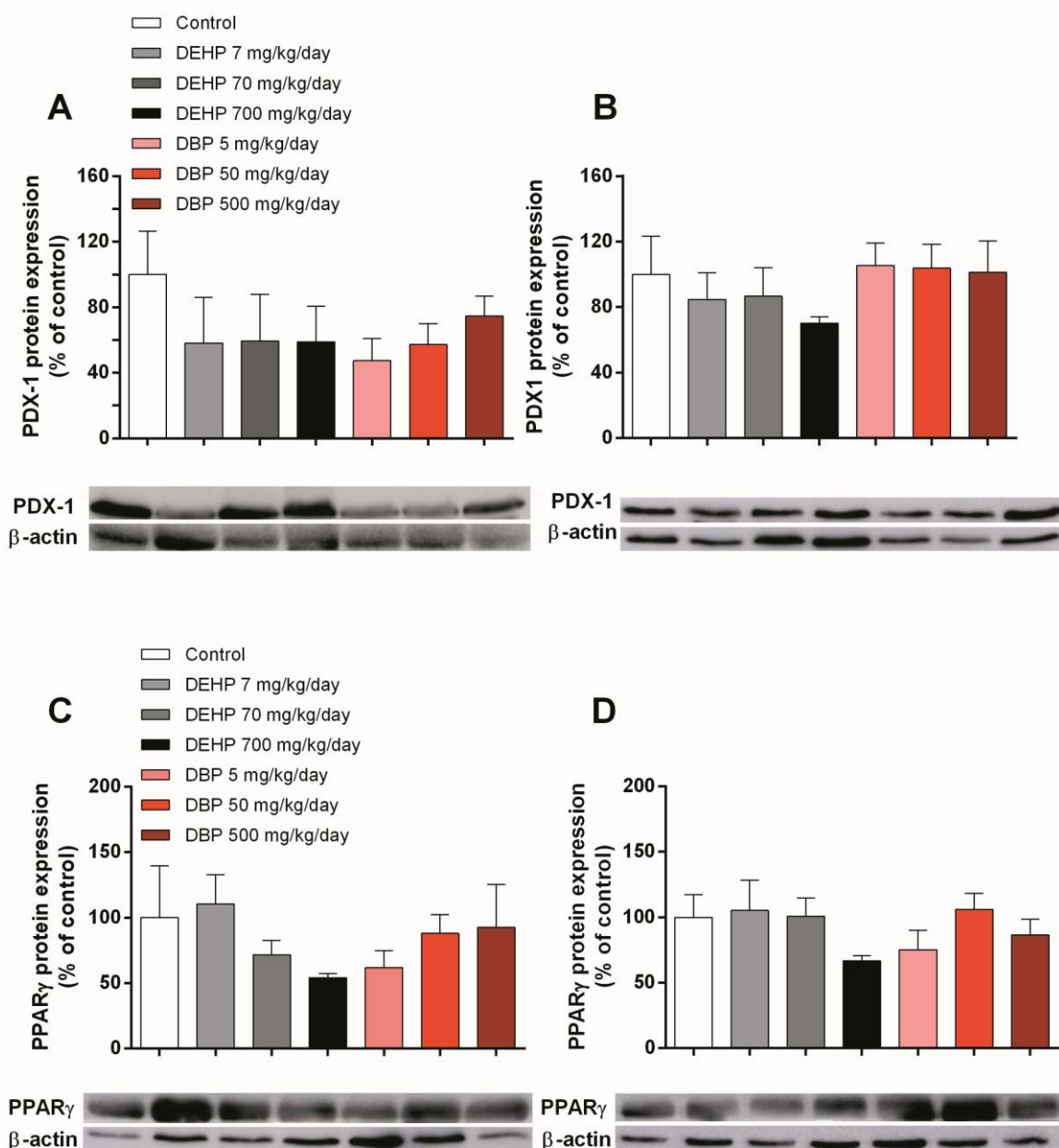


Figure 6 - Western blot analysis of protein expression in pancreas lysed. The graphs represent the mean \pm SE of the densitometric scans for protein bands from each group and normalized to β -actin. The graphs A (males) and B (females) represent protein expression of PDX-1 and the graphs C (males) and D (females) represent protein expression of PPAR γ . The samples were collected on PND 90 (n = 5 rats/group). ($p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni).

Summary of major metabolic and reproductive effects following DEHP or DBP exposures

Table 6 lists the major reproductive and metabolic effects induced by *in utero* and lactational exposure to DEHP or DBP in offspring rats in this study.

Table 6 – Major reproductive and effects of equimolar doses of DEHP and DBP in offspring rata exposed in utero and during lactation

	DEHP			DBP		
	7	70	700	5	50	500
AGI male	↔	↔	↓	↔	↔	↔
AGI female	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Day of preputial separation	↔	↔	↑	↔	↔	↔
Day of vaginal opening	↔	↑	↑	↔	↔	↑
Hypospadias	-	-	+ (one litter)	-	-	-
Cryptorchidism	-	-	+ (one litter)	-	-	-
Fasting glucose males	↔	↔	↑	↔	↔	↑
Fasting glucose females	↔	↔	↑	↔	↔	↑
ITT males	↔	↔	↓	↔	↔	↔
ITT females	↔	↔	↓	↔	↔	↔
GSIS males	↑	↔	↓	↔	↔	↔
GSIS females	↔	↔	↔	↔	↔	↔

Discussion

Perinatal exposure to some endocrine disrupting chemicals might contribute to metabolic disorders, including impaired glucose tolerance, weight gain, and obesity (Darbre, 2017; Grune Blumberg, 2006). In our study, *in utero* and lactational exposure to DEHP and DBP induced alterations in glycemic homeostasis of adult offspring. Fasting glucose concentrations were increased in male and female rats exposed to the highest doses of DEHP and DBP. In the insulin tolerance test (ITT), no effects were observed in any experimental group, except for a reduction in glucose decay rate (Kitt) in animals exposed to DEHP 700 mg/kg/day, which indicates reduction in insulin sensitivity. On the other hand, glucose tolerance test (GTT) was not affected by DEHP or DBP exposure. In addition, we assessed insulin secretion in isolated pancreatic islets stimulated by glucose. In this assay, islets from males exposed to DEHP 700 mg/kg/day had normal response when stimulated with 5.6 and 8.3 mM glucose, but decreased insulin secretion when challenged with 16.7 mM glucose, suggesting a possible β cell dysfunction associated with insulin resistance. Lin *et al* (2011) demonstrated that 7-months old rats exposed *in utero* and during lactation to DEHP at 1.25 and 6.25 mg/kg/day presented hyperglycemia/hypoinsulinemia during a fasting period and progressive glucose intolerance. Considering that the production of new cells during adulthood is low and kept by an auto-replication mechanism (Dor *et al.*, 2004), some alterations occurred in early life might cause cellular dysfunction at adulthood. Progression of glucose metabolism disorders is not exclusively associated with β cells dysfunctions, and several other conditions, such as chronic inflammatory processes, have been implicated with insulin resistance (IR) and impaired glucose tolerance (Chen *et al.*, 2017; Newsholme *et al.*, 2014).

We also investigated expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 protein (PDX-1), an important transcription factor involved in the development of pancreas endocrine portion and β cells function. PDX-1 is important during pancreas perinatal development and is involved in regulation of insulin expression, GLUT2 and glucokinase (Meulen *et al.*, 2015). We observed reductions of up to 50% in protein levels of PDX-1 in DEHP and DBP exposed rats, with more prominent effects in males, although the results were not statistically significant. PDX-1 alterations in humans (Hansen *et al.*, 2000) and rodents (Brissova *et al.*, 2002) are related to impaired insulin secretion, and exposure to phthalates has also been associated with a reduction of PDX-1 mRNA transcripts (Lin *et al.*, 2011). High glucose conditions might negatively regulate PDX-1 expression in post-translational level, even when there is no

alteration in mRNA levels (Shu *et al.*, 2011). Chronic hyperglycemia or “glucose toxicity” impairs insulin secretion and is associated with PDX-1 decreased levels (Brissova *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2011; Semache *et al.*, 2014; Shu *et al.*, 2011). Therefore, alterations in PDX-1 expression may be a direct consequence of phthalate exposures and/or a secondary change induced by hyperglycemia. In our study, animals were followed approximately up to 90 days and it is possible that hyperglycemia may persist and worsen with aging, leading to more severe changes in PDX-1 expression and insulin deficiency.

Another mechanism implicated in the metabolic disorders following exposure to phthalates and other metabolic disruptors is the interference with peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). PPARs play a critical role on adipogenesis and lipid metabolism (Grun and Blumberg, 2009) and PPAR γ is described as an important regulator of insulin sensitivity, adipocytes development and maturation (Darbre, 2017; Lehrke e Lazar, 2005). DEHP and DBP are PPAR γ agonists (Hurst and Waxman, 2003) and are associated with weight gain in rodents (Hatch *et al.*, 2010) and with inflammatory mechanisms induced through PPAR γ activation (Campioli *et al.*, 2014). In our results, non-significant reductions in PPAR γ pancreatic protein expression were observed in phthalate exposed animals, in particular at DEHP 70 and 700 mg/kg/day and DBP 5 mg/kg/day. Interestingly, PPAR γ agonists, such as thiazolidinediones, have been used clinically to increase insulin sensitivity and enhance β cell function. However, phthalates might be acting as selective modulators of PPAR γ , inducing selective coregulatory interactions and target gene expression and, hence, causing different effects (Feige *et al.*, 2007a). It is also interesting to note that some effects reported in the current study, such as reduced insulin sensitivity in ITT and decreased insulin secretion in isolated islets, were only seen in rats exposed to DEHP, whose main metabolite, MEHP, is considered a more potent PPAR γ agonist than that of DBP (Hurst and Waxman, 2003). Recent studies suggest that activation of PPAR γ is partially responsible for the inflammatory effects induced by treatment with MEHP and that sustained stimulation of PPAR γ by MEHP may result in its protein degradation due to stimulation of inhibitory factors as result of the dysregulation of lipid metabolism (Manteiga e Lee, 2017).

In addition to changes in glucose homeostasis, the two highest DEHP doses and the lowest DBP dose induced slight increases in body weight during lactation and puberty. Although body weight at adulthood did not differ between control and phthalate exposed animals, previous studies demonstrated that adult or perinatal phthalate exposures aggravate body

weight gain and induce other metabolic changes when experimental animals receive high fat diet (Chen *et al.*, 2016; Strakovsky *et al.*, 2015). Therefore, it is possible that developmental exposures to phthalates like DEHP and DBP may increase the susceptibility to obesity and other metabolic disorders by interacting with other environmental and life style factors.

In our rat model, we also confirmed the potential of DEHP and DBP to induce changes in the reproductive system. Male offspring exposed to DEHP 700 mg/kg/day had reduced AGD on PND 4 and delayed preputial separation at puberty, while female offspring exposed to DEHP 70 and 700 mg/kg/day and to the highest DBP dose (500 mg/kg/day) had delayed vaginal opening. Studies using comparable exposure conditions demonstrated similar alterations (Andrade *et al.*, 2006^a; Andrade *et al.*, 2006^b; Grande *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2004). It is well known that active phthalates like DEHP and DBP are capable of reducing the expression of steroidogenic enzymes and the consequent production of steroids critical for sexual differentiation, such as testosterone (Akingbemi *et al.*, 2001; Martinez-Arguelles *et al.*, 2013). Reduced AGD and delayed preputial separation in male rats exposed to DEHP indicates reduced androgenization in reproductive tissues. It was previously demonstrated that AGD is influenced by androgens exposure during prenatal life in humans (Swan *et al.*, 2015) and in experimental animals (Kita *et al.*, 2016) and that preputial separation seems to be more influenced by postnatal androgenization (Kita *et al.*, 2016). The lack of effects on AGD and preputial separation following exposure to equimolar doses of DBP may indicate that, in our rat strain, DEHP may be a more potent antiandrogen and reproductive toxicant. In support to this view, hypospadias and cryptorchidism were only seen at the highest DEHP dose. Also, it is important to recognize that, in general, the effects of phthalates on AGD are less prominent than those induced by other antiandrogens, such as flutamide. However, testosterone suppression is only one of the multiple alterations induced by active phthalates, which may also include disruption of other hormonal systems (e.g., insl-3 and thyroid hormones) and changes in developmental processes across different life periods. In addition to changes in biomarkers of androgen exposure, we also observed increased plasma cholesterol levels in males exposed to DEHP 700mg/kg/day. It is known that alteration of steroidogenic enzymes might result in inefficient transport of cholesterol through mitochondrial membrane. In addition, Lee and collaborators (2016) reported an increased concentration of serum cholesterol in offspring exposed to DEHP resulting from reduced hepatic capacity of cholesterol depuration.

In general, female rats are regarded as more resistant than males to phthalate effects on sexual development. Nonetheless, previous data also demonstrate delays in vaginal opening in rats exposed *in utero* and during lactation to DEHP doses higher than 15 mg/kg/day (Grande *et al.*, 2006). Age in which vaginal opening occurs is mainly dependent on the increase of estradiol levels during puberty and delay in such processes can suggest anti-estrogenic effects of tested compounds (Grande *et al.*, 2006; Klötting *et al.*, 2015). However, in addition to imbalances in steroid hormones, other mechanisms may underlie phthalate effects on pubertal onset in males and females, including disruption of central mechanisms controlling sexual maturation (Grande *et al.*, 2006).

Overall, our results suggest that *in utero* and lactational DEHP and DBP exposures can induce a wide range of metabolic and reproductive alterations in offspring rats, characterized by antiandrogenic effects, delayed pubertal development and hyperglycemia/insulin resistance. We used equimolar doses of these phthalates and for some endpoints DEHP seemed to be more effective in the induction of both reproductive and metabolic changes, as demonstrated by the significant alterations in AGD, insulin resistance (ITT), and decreased insulin secretion in isolated islets. Although most metabolic and reproductive effects were induced at high dose levels, which are not environmentally relevant, it is important to note that humans are exposed to multiple chemicals and lifestyle factors that may have cumulative effects. Additional research is needed to understand molecular targets involved in the induction of reproductive and metabolic effects by different phthalates. Further studies are also needed to unveil metabolic consequences of developmental phthalate exposures in aging rats, as well as the interaction between phthalate exposures and environmental, inflammatory and lifestyle factors associated with metabolic disorders.

Funding

This work was supported in part by the Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES/Brazil) and Postgraduate Support Program (PROAP). Research fellowships for graduate (A.C.V., K.B.M., S.V.F.; D.H.K) and undergraduate (R.A.P.) students were provided by CAPES (REUNI). A.J.M.A. was a scholarship recipient from CNPQ/Brazil.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos os efeitos metabólicos e reprodutivos resultantes da exposição *in utero* e lactacional a dois dos principais ftalatos de uso industrial, o DEHP e o DBP. Os ftalatos são produtos químicos industriais produzidos em alto volume (*high production volume chemicals*) e presentes em uma ampla variedade de produtos de uso cotidiano. Apesar de apresentarem baixa toxicidade aguda, estudos de toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento conduzidos nos últimos 20 anos têm demonstrado que muitos ftalatos são capazes de atuar como desreguladores endócrinos e, conseqüentemente, causar distúrbios reprodutivos em modelos animais (Martino-Andrade e Chahoud, 2010). Alguns desses efeitos são corroborados por estudos epidemiológicos que apontam para associações entre a exposição a ftalatos e diversos desfechos negativos na saúde reprodutiva de populações expostas (Swan *et al.*, 2015). Mais recentemente, dados experimentais e epidemiológicos também indicam que a exposição a alguns ftalatos está associada com distúrbios metabólicos, como obesidade e desregulação da homeostase glicêmica (Stahlhut *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017). Assim como para os efeitos reprodutivos, os efeitos metabólicos parecem ser mais intensos e permanentes quando a exposição ocorre em períodos críticos para o desenvolvimento, como a gestação e a lactação (Stahlhut *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011; Araki *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017). Contudo, apesar do acúmulo de evidências acerca da toxicidade reprodutiva e metabólica de alguns ftalatos, ainda há pouco conhecimento sobre os alvos moleculares envolvidos. Além disso, a despeito do conhecimento sobre a relação estrutura-atividade relacionada a toxicidade reprodutiva, que indica que ftalatos com cadeias laterais entre 3 e 8 carbonos são desreguladores endócrinos anti-androgênicos, pouco se sabe sobre a relação estrutura-atividade relacionada a desregulação metabólica. Assim, no presente estudo, comparamos de forma inédita o perfil de toxicidade do DEHP e do DBP, agentes representativos dos ftalatos de alto e baixo peso molecular, respectivamente, em relação a parâmetros reprodutivos e metabólicos.

Em nosso estudo, a exposição *in utero* e lactacional ao DEHP e ao DBP induziu alterações na homeostase glicêmica de descendentes adultos. As concentrações de glicose de jejum foram aumentadas em ratos machos e em fêmeas expostas às maiores doses de DEHP e DBP. No teste de tolerância à insulina (ITT), nenhum efeito foi observado em nenhum grupo experimental, exceto pela redução na taxa de decaimento da glicose (Kitt) em animais

expostos a DEHP 700 mg/kg/dia, o que indica redução na sensibilidade à insulina. Por outro lado, o teste de tolerância à glicose (GTT) não foi afetado pela exposição DEHP ou DBP.

Adicionalmente, avaliamos a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas estimuladas por glicose. Neste ensaio, as ilhotas de ratos machos expostos a DEHP 700 mg/kg/dia tiveram resposta normal quando estimuladas com 5,6 e 8,3 mM de glicose, mas diminuíram a secreção de insulina quando desafiadas com 16,7 mM de glicose, sugerindo uma possível disfunção das células β associada à resistência à insulina. Lin e colaboradores (2011) demonstraram que ratos com 7 meses de idade expostos *in utero* e durante a lactação ao DEHP a 1,25 e 6,25 mg/kg/dia apresentaram hiperglicemia e hipoinsulinemia durante o período de jejum e também progressiva intolerância à glicose. Considerando que a produção de novas células β durante a idade adulta é baixa e mantida por um mecanismo de auto-replicação (Dor *et al.*, 2004), algumas alterações ocorridas no início da vida podem resultar em células falhando com a idade e talvez a idade jovem-adulta seja um período de manifestação da desregulação. A progressão dos distúrbios do metabolismo da glicose não está exclusivamente associada às disfunções das células β , e várias outras condições, como processos inflamatórios crônicos, têm sido implicadas na resistência à insulina e intolerância à glicose (Newsholme *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017). Inflamação crônica de baixo grau está claramente ligada a doenças metabólicas. A conexão obesidade / DM2 e inflamação foram firmemente estabelecidas quando, em 1993, um relato foi publicado demonstrando que a expressão de TNF- α no tecido adiposo em camundongos estava aumentada durante o desenvolvimento da obesidade, mas ao bloquear o TNF- α , a IR foi atenuada (Hotamisligil *et al.*, 1993). Posteriormente, determinou-se que o TNF- α suprimia a sinalização da insulina, inibindo a atividade da tirosina quinase do receptor de insulina (Hotamisligil *et al.*, 1996), atenuando, assim, as mudanças na função e no metabolismo celular induzidas pela insulina. Experimentos posteriores mostraram que os ácidos graxos competem com a glicose pela oxidação do substrato e foi especulado, então, que um aumento na oxidação de gordura pode ser responsável pelo acúmulo de glicose e pela resistência à insulina.

Nós também investigamos a expressão da proteína PDX-1, um importante fator de transcrição envolvido no desenvolvimento da porção endócrina do pâncreas e da função das células β . A PDX-1 é importante durante o desenvolvimento perinatal do pâncreas e está envolvida na regulação da expressão do gene da insulina, GLUT2 e da glicocinase (Meulen

et al., 2015). Observamos reduções de até 50% nos níveis proteicos de PDX-1 em ratos expostos ao DEHP e ao DBP, com efeitos mais proeminentes no sexo masculino, embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos. Alterações de PDX-1 em humanos (Hansen *et al.*, 2000) e roedores (Brissova *et al.*, 2002) estão relacionadas à secreção de insulina prejudicada, e a exposição a ftalatos também foi associada a uma redução nos transcritos de mRNA de PDX-1 (Lin *et al.*, 2011). Condições de hiperglicemia podem regular negativamente a expressão da PDX-1 ao nível pós-traducional, mesmo quando não há alteração nos níveis de mRNA (Shu *et al.*, 2011). Atualmente evidências sugerem que a glicose pode agir como estímulo para a expansão de massa da célula β , o que é um importante mecanismo adaptativo em situações de alta demanda de insulina, mas também pode agir como um fator de estresse, culminando em disfunção e morte celular (Carlessi *et al.*, 2017). A hiperglicemia crônica ou “toxicidade da glicose” prejudica a secreção de insulina e está associada a níveis reduzidos de PDX-1 (Brissova *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2011; Semache *et al.*, 2014). Portanto, alterações na expressão da PDX-1 podem ser uma consequência direta das exposições ao ftalato e/ou uma alteração secundária induzida pela hiperglicemia. Em nosso estudo, os animais foram acompanhados por aproximadamente até 90 dias e é possível que a hiperglicemia persista e se agrave com o envelhecimento, levando a mudanças mais severas na expressão da PDX-1 e na deficiência de insulina.

Existe uma grande probabilidade de que os produtos finais da glicação avançada (AGES) reduzam a estabilidade da proteína PDX-1. Um trabalho realizado por Shu, et al (2011), demonstrou que AGES podem diretamente alterar a função de células β por inibição da síntese de insulina e esses efeitos foram atribuídos à redução na expressão do principal fator de transcrição do gene da insulina, PDX-1. Neste trabalho foi concluído que a redução na expressão da proteína PDX-1 não se deve à inibição da sua transcrição como é fortemente estudada, mas sim à redução da estabilidade da sua proteína via Forkhead box protein O1 (FOXO1), um importante fator de transcrição envolvido na regulação da sinalização de insulina.

Outro mecanismo de ação implicado na exposição aos ftalatos e outros desreguladores metabólicos é a interferência com os receptores PPARs. PPARs desempenham um papel crítico na adipogênese e metabolismo lipídico (Grun e Blumberg, 2009) e o PPAR γ é descrito como um importante regulador da sensibilidade à insulina, desenvolvimento e maturação de

adipócitos (Lehrke e Lazar, 2005; Darbre, 2017). O DEHP e o DBP são agonistas do PPAR γ (Hurst e Waxman, 2003) e estão associados ao ganho de peso em roedores (Hatch *et al.*, 2010) e a mecanismos inflamatórios induzidos pela ativação do PPAR γ (Campioli *et al.*, 2014). Em nossos resultados, reduções não significativas na expressão de PPAR γ foram observadas em animais expostos aos ftalatos, em particular ao DEHP 70 e 700 mg/kg/dia e ao DBP 5 mg/kg/dia. Curiosamente, os agonistas do PPAR γ , como as tiazolidinedionas, têm sido utilizados clinicamente para aumentar a sensibilidade à insulina e melhorar a função das células β . No entanto, os ftalatos podem estar atuando como moduladores seletivos do PPAR γ , induzindo interações co-regulatórias seletivas e/ou alterando a expressão de genes alvo e, portanto, causando diferentes efeitos (Feige *et al.*, 2007). Também é interessante notar que alguns efeitos relatados no presente estudo, como redução da sensibilidade à insulina no ITT e diminuição da secreção de insulina em ilhotas isoladas, foram observadas apenas em ratos expostos ao DEHP, cujo metabólito principal, MEHP, é considerado mais potente agonista de PPAR γ do que o de DBP (Hurst e Waxman, 2003). Estudos recentes sugerem que a ativação de PPAR γ é parcialmente responsável pelos efeitos inflamatórios induzidos pelo tratamento com MEHP e que a estimulação sustentada de PPAR γ por MEHP pode resultar em degradação proteica devido à estimulação de fatores inibitórios como resultado da desregulação do metabolismo lipídico (Manteiga e Lee, 2017).

A teoria de que o MEHP é capaz de interferir com vias regulatórias endógenas é recentemente baseada na hipótese de promoção de um estado inflamatório no organismo, interrompendo principalmente a regulação metabólica em adipócitos. Essa desregulação resulta no aumento do efluxo de AGL, ativando macrófagos residentes localmente e assim aumentando o ambiente pró-inflamatório (Suganami *et al.*, 2005). Adicionalmente a isso, Manteiga e colaboradores (2017) demonstraram aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e quimiocinas em células tratadas com MEHP, bem como, aumento nos níveis de AGL, como ácido palmítico (o que é similarmente encontrado em células tratadas com TNF- α). De forma complementar, o mesmo estudo demonstra que antagonistas de PPAR γ atenuam a expressão dos produtos pró-inflamatórios gerados.

In vivo é de se supor que eventos autócrinos e parácrinos entre adipócitos e células inflamatórias se somariam ao ambiente de citocinas, sustentando uma realimentação pró-inflamatória sistêmica. Desta forma, a exposição prolongada ao MEHP poderia definir o

cenário para a inflamação crônica. Testar este resultado potencial justifica um estudo mais aprofundado, e provavelmente requererá experiências de exposição em longo prazo usando doses baixas e avaliando os marcadores de inflamação, bem como levando em consideração mecanismos de alterações epigenéticas como a metilação do DNA promovida por desreguladores endócrinos.

Além das alterações na homeostase da glicose, as duas doses mais elevadas de DEHP e a menor dose de DBP induziram discreto aumento no peso corporal durante a lactação e na puberdade. Embora o peso corporal na idade adulta não diferisse entre animais expostos aos ftalatos e os animais controle, estudos prévios demonstraram que exposições aos ftalatos na idade adulta ou perinatal agravam o ganho de peso corporal e induzem outras alterações metabólicas quando animais experimentais recebem dieta rica em gordura (Strakovsky *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). Portanto, é possível que exposições a ftalatos como o DEHP e DBP durante os períodos de desenvolvimento aumentem a suscetibilidade à obesidade e a outros distúrbios metabólicos, juntamente com fatores ambientais e de estilo de vida.

Em nosso modelo experimental, também confirmamos o potencial do DEHP e do DPB em induzir mudanças no sistema reprodutivo. Descendentes machos expostos a DEHP 700 mg/kg/dia apresentaram redução na DAG no DPN 4 e atraso na separação prepucial na puberdade, enquanto as descendentes fêmeas expostas a DEHP 70 e 700 mg/kg/dia e as expostas a maior dose de DBP (500 mg/kg/dia) tiveram atraso na abertura do canal vaginal. Estudos utilizando condições semelhantes de exposição demonstraram alterações parecidas (Lehmann *et al.*, 2004; Andrade, Grande, Talsness, Gericke, *et al.*, 2006; Andrade, Grande, Talsness, Grote, *et al.*, 2006; Grande *et al.*, 2006). De acordo com estes estudos, os ftalatos ativos, como o DEHP e o DBP, são capazes de reduzir a expressão das enzimas esteroidogênicas (Akingbemi *et al.*, 2001; Martinez-Arguelles *et al.*, 2013). A redução na DAG e o atraso na separação prepucial em ratos machos expostos ao DEHP indicam uma redução da androgenização dos tecidos reprodutivos. Previamente já foi demonstrado em humanos (Swan *et al.*, 2015) e em animais experimentais (Kita *et al.*, 2016), que a DAG é influenciada pela exposição aos androgênios durante a vida pré-natal, e a separação prepucial parece ser mais influenciada pela androgenização pós-natal, no entanto, como sugerido por Martinez-Arguelles (2013), a exposição aos ftalatos durante o período fetal pode ter marcado as células-tronco das células de Leydig adultas, que posteriormente podem afetar a formação

de testosterona. A falta de efeitos sobre DAG e a separação prepucial após a exposição a doses equimolares de DBP pode indicar que, em nossa linhagem de ratos, o DEHP pode ser um anti-androgênico e tóxico reprodutivo mais potente. Em apoio a esta visão, hipospádia e criptorquidismo foram vistos apenas com a maior dose de DEHP (imagens em ANEXO). Além disso, é importante reconhecer que, em geral, os efeitos dos ftalatos na DAG são menos proeminentes do que aqueles induzidos por outros antiandrogênicos, como a flutamida. No entanto, a supressão de testosterona é apenas uma das múltiplas alterações induzidas por ftalatos ativos, que também podem incluir a interrupção de outros sistemas hormonais (por exemplo, insl-3 e hormônios da tireoide) e mudanças nos processos de desenvolvimento em diferentes períodos da vida.

Em geral, as ratas fêmeas são consideradas mais resistentes que os machos aos efeitos dos ftalatos no desenvolvimento sexual. No entanto, outros estudos também relataram atrasos na abertura do canal vaginal em ratas expostas a doses de DEHP superiores a 15 mg/kg/dia *in utero* e durante a lactação. A idade em que ocorre a abertura do canal vaginal é principalmente dependente do aumento dos níveis de estradiol durante a puberdade e o atraso em tais processos pode sugerir efeitos anti-estrogênicos dos compostos testados (Grande *et al.*, 2006; Klötting *et al.*, 2015). Entretanto, além dos desequilíbrios nos hormônios esteroides, outros mecanismos podem estar por trás dos efeitos dos ftalatos no início da puberdade de ratos machos e fêmeas, incluindo a interrupção dos mecanismos centrais que controlam a maturação sexual (Grande *et al.*, 2006). Outro parâmetro alterado observado foi o aumento do colesterol plasmático em machos expostos a DEHP 700 mg/kg/dia. Sabe-se que a alteração das enzimas esteroidogênicas pode resultar no ineficiente transporte de colesterol através da membrana mitocondrial. Além disso, Lee e colaboradores (2016) relatam o aumento do colesterol sérico em descendentes expostos ao DEHP em decorrência da reduzida capacidade hepática de depuração do colesterol.

Uma importante contribuição do presente estudo está relacionada à investigação do perfil de toxicidade endócrina e metabólica do DEHP e do DBP em condições experimentais uniformes, incluindo a mesma linhagem de animais, período e doses de exposição e procedimentos experimentais. Em geral, há grande dificuldade na comparação do perfil de toxicidade de ftalatos, pois existe uma grande variabilidade na resposta de animais experimentais em diferentes condições laboratoriais (Wilson *et al.*, 2008; Martino- Andrade *et al.*, 2009). Por exemplo, enquanto Fisher *et al.* (2003) relataram uma incidência de

100% de criptorquidismo em ratos Wistar machos expostos *in utero* a DBP 500 mg/kg/dia, Mylchreest *et al.*, (1999) encontraram uma incidência de apenas 10% em ratos Sprague-Dawley expostos ao mesmo nível e período de dosagem. Em um estudo realizado por (Culty *et al.*, 2008) nenhum caso de criptorquidismo foi observado em ratos Sprague-Dawley expostos *in utero* ao DEHP em doses de até 750 mg/kg/dia. No nosso estudo, também observamos uma baixa incidência de malformações genitais em animais expostos aos dois ftalatos testados. Contudo, a utilização de três níveis de doses para cada um dos ftalatos e a avaliação de um grande número de marcadores anatômicos e fisiológicos de toxicidade em condições padronizadas, permite uma melhor comparação dos perfis de toxicidade. Nesse contexto, o DEHP apresentou efeitos mais tóxicos em relação a parâmetros reprodutivos e metabólicos, quando comparado ao DBP. Estudos adicionais são necessários para desvendar os alvos moleculares e as relações estrutura-atividade de ftalatos para diferentes tipos de efeitos tóxicos.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral, nossos resultados sugerem que as exposições *in utero* e durante a lactação ao DEHP e ao DBP podem induzir uma ampla gama de alterações metabólicas e reprodutivas em ratos, caracterizados por efeitos antiandrogênicos, atraso no desenvolvimento puberal e hiperglicemia e resistência à insulina. Usamos doses equimolares desses ftalatos e, para alguns parâmetros, o DEHP pareceu ser mais efetivo na indução de alterações reprodutivas e metabólicas, como demonstrado pelas alterações significativas na DAG, resistência à insulina (ITT) e diminuição da secreção de insulina em ilhotas isoladas. Embora a maioria dos efeitos metabólicos e reprodutivos tenham sido induzidos em altas doses, que não são ambientalmente relevantes, é importante observar que os seres humanos estão expostos a múltiplos fatores químicos e de estilo de vida que podem ter efeitos cumulativos. Pesquisas adicionais são necessárias para entender os alvos moleculares envolvidos na indução de efeitos reprodutivos e metabólicos por diferentes ftalatos. Além disso, outros estudos são necessários para revelar as consequências metabólicas das exposições aos ftalatos durante o envelhecimento, bem como a interação entre exposições ao ftalato e fatores ambientais, inflamatórios e estilo de vida associados a distúrbios metabólicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIEE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v. 10, n. 6, p. 141–147, 2004.
- AKINGBEMI, B. T.; YOUKER, R. T.; SOTTAS, C. M.; et al. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1252–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566751>>. .
- ALONSO-MAGDALENA, P.; ROPERO, A. B.; SORIANO, S.; QUESADA, I.; NADAL, A. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? **Hormones (Athens, Greece)**, v. 9, n. 2, p. 118–26, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687395>>. .
- ANDRADE, A. J. M.; GRANDE, S. W.; TALSNESS, C. E.; GROTE, K.; et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 64–74, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806631>>. Acesso em: 15/1/2014.
- ANDRADE, A. J. M.; GRANDE, S. W.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16996189>>. Acesso em: 15/1/2014.
- ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1977–1984, 2009. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2008.0304>>. .
- ARAKI, A.; MITSUI, T.; MIYASHITA, C.; et al. Association between Maternal Exposure to di (2- ethylhexyl) Phthalate and Reproductive Hormone Levels in Fetal Blood : The Hokkaido Study on Environment and Children ' s Health. **PloS one**, v. 9, n. 10, 2014.
- BILITY, M. T.; THOMPSON, J. T.; MCKEE, R. H.; et al. Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) by Phthalate Monoesters. **Toxicological Science**, v. 182, p. 170–182, 2004.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.
- BRAGA-BASARIA, M.; DOBS, A. S.; MULLER, D. C.; et al. Metabolic syndrome in men with prostate cancer undergoing long-term androgen-deprivation therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 24, p. 3979–3983, 2006.
- BRISSOVA, M.; BLAHA, M.; SPEAR, C.; et al. Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 288, n. 4, p. E707–E714, 2005.
- BRISSOVA, M.; SHIOTA, M.; NICHOLSON, W. E.; et al. Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 13, p. 11225–11232, 2002.
- CAMPIOLI, E.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; PAPADOPOULOS, V. In utero exposure to the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate promotes local adipose and systemic inflammation in adult male offspring. **Nutrition & Diabetes**, v. 4, n. 5, p. e115, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nutd.2014.13>>. .

CARLESSI, R.; KEANE, K. N.; MAMOTTE, C.; NEWSHOLME, P. Nutrient regulation of β -cell function: what do islet cell/animal studies tell us? **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 7, p. 890–895, 2017. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ejcn.2017.49>>. .

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **Bmj**, v. 305, p. 609–613, 1992.

CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual review of physiology**, v. 73, p. 135–62, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21054169>>. Acesso em: 2/6/2013.

CASALS-CASAS, C.; FEIGE, J. N.; DESVERGNE, B. Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. **International journal of obesity (2005)**, v. 32 Suppl 6, p. S53-61, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079281>>. Acesso em: 25/5/2013.

CHAWLA, A.; REPA, J. J.; EVANS, R. M.; et al. Nuclear Receptors and Lipid Phy Opening the X-Files. , v. 294, n. 5548, p. 1866–1870, 2001.

CHEN, H.; ZHANG, W.; RUI, B. BEI; et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate exacerbates non-alcoholic fatty liver in rats and its potential mechanisms. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 38–44, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.12.016>>. .

CHEN, S.; HWANG, J.; SUNG, F.; et al. Mono-2-ethylhexyl phthalate associated with insulin resistance and lower testosterone levels in a young population *. **Environmental Pollution** , v. 225, p. 112–117, 2017.

CORTON, J. C.; LAPINSKAS, P. J. Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 83, n. 1, p. 4–17, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496498>>. Acesso em: 15/1/2014.

CULTY, M.; THUILLIER, R.; LI, W.; et al. In Utero Exposure to Di- (2-ethylhexyl) Phthalate Exerts Both Short-Term and Long-Lasting Suppressive Effects on Testosterone Production in the Rat 1. , v. 1028, n. March 2008, p. 1018–1028, 2008.

DARBRE, P. D. Endocrine Disruptors and Obesity. **Curr Obes Rep**, v. 225, p. 18–27, 2017. Current Obesity Reports.

DAVID, R. M.; MOORE, M. R.; FINNEY, D. C.; GUEST, D. Reversibility of the Chronic Effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 4, p. 430–439, 2001. Disponível em: <<http://tpx.sagepub.com/cgi/doi/10.1080/01926230152500040>>. Acesso em: 3/2/2014.

DESVERGNE, B.; FEIGE, J. N.; CASALS-CASAS, C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? **Molecular and cellular endocrinology**, v. 304, n. 1–2, p. 43–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433246>>. Acesso em: 25/5/2013.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Be Fit or Be Sick: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Are Down the Road. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 6, p. 1321–1332, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2004-0088>>. .

DIRTU, A. C.; GEENS, T.; DIRINCK, E.; et al. Phthalate metabolites in obese individuals undergoing weight loss: Urinary levels and estimation of the phthalates daily intake. **Environment international**, v. 59C, p. 344–353, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892227>>. Acesso em: 7/8/2013.

DOR, Y.; BROWN, J.; MARTINEZ, O. I.; MELTON, D. A. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. **Nature**, v. 429, n. 6987, p. 41–46, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02520>>. .

ELOBEID, M.; ALLISON, D. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. ... **in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 15, n. 5, p. 403–408, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2566897/>>. Acesso em: 27/9/2013.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 355–361, 2004.

FEIGE, J. N.; GELMAN, L.; ROSSI, D.; et al. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 26, p. 19152–66, 2007a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468099>>. Acesso em: 17/7/2013.

FEIGE, J. N.; GELMAN, L.; ROSSI, D.; et al. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 26, p. 19152–66, 2007b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468099>>. Acesso em: 17/7/2013.

FEIGE, J. N.; GERBER, A.; CASALS-CASAS, C.; et al. The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 2, p. 234–41, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2831923&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/7/2013.

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

FOSTER, P. M. D. Mode of action: Impaired fetal leydig cell function - Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 8–9, p. 713–719, 2005.

FOSTER, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International journal of andrology**, v. 29, n. 1, p. 140- 7; discussion 181–5, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102138>>. Acesso em: 23/5/2014.

FROMME, H.; KÜCHLER, T.; OTTO, T.; et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1429–1438, 2002.

GAIDO, K. W.; MANESS, S. C.; MCDONNELL, D. P.; et al. Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor alpha and beta, and androgen receptor: structure-activity studies. **Molecular pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 852–858, 2000.

GALLAVAN, R. H.; HOLSON, J. F.; STUMP, D. G.; KNAPP, J. F.; REYNOLDS, V. L. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. , v. 13, p. 383–390, 1999.

GRANDE, S. W.; ANDRADE, A. J. M.; TALSNESS, C. E.; GROTE, K.; CHAHOUD, I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: effects on female rat reproductive development. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 247–54, 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476687>>. Acesso em: 9/11/2013.

GRAY, L. E.; OSTBY, J.; FURR, J.; et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 58, n. 2, p. 350–65, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099647>>. .

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. **The Lancet. Oncology**, v. 5, n. 7, p. 419–29, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204504015098%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231248>>. .

GRUN, F.; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 50–55, 2006.

GRUN, F.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupters as obesogens. , v. 304, p. 19–29, 2009.

GUZ, Y.; MONTMINY, M. R.; STEIN, R.; et al. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. **Development (Cambridge, England)**, v. 121, n. 1, p. 11–18, 1995.

HANSEN, L.; URIOSTE, S.; PETERSEN, H. V; et al. Missense mutations in the human insulin promoter factor-1 gene and their relation to maturity-onset diabetes of the young and late-onset type 2 diabetes mellitus in caucasians. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 3, p. 1323–6, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720084>>. .

HAO, C.; CHENG, X.; XIA, H.; MA, X. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. **Bioscience reports**, v. 32, n. 6, p. 619–29, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3497724&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11/7/2013.

HATCH, E. E.; NELSON, J. W.; QURESHI, M. M.; et al. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. **Environmental health: a global access science source**, v. 7, p. 27, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2440739&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/5/2013.

HATCH, E. E.; NELSON, J. W.; STAHLHUT, R. W.; WEBSTER, T. F. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. **International journal of andrology**, v. 33, n. 2, p. 324–32, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3005328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16/6/2013.

HAUSER, R.; CALAFAT, A. M. Phthalates and human health. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 62, n. 11, p. 806–818, 2005.

HEINDEL, J. J.; SCHUG, T. T. The Obesogen Hypothesis: Current Status and Implications for Human Health. **Current Environmental Health Reports**, v. 1, n. 4, p. 333–340, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40572-014-0026-8>>. .

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; et al. IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α -and Obesity-Induced Insulin Resistance White and Bruce M . Spiegelman Published by: American Association for the Advancement of

Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stab.> , v. 271, n. 5249, p. 665–668, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HURST, C. H.; WAXMAN, D. J. Activation of PPAR α and PPAR γ by environmental phthalate monoesters. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 74, n. 2, p. 297–308, 2003c. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805656>>. Acesso em: 27/9/2013.

JIA, Y.; LIU, T.; ZHOU, L.; et al. Effects of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate on lipid Metabolism by the JAK/STAT Pathway in Rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 11, 2016.

JOUVET, N.; ESTALL, J. L. The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis. **Experimental Cell Research**, , n. March, 2017.

JUNG, K. Y.; KIM, K. M.; LIM, S. Therapeutic approaches for preserving or restoring pancreatic beta-cell function and mass. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 38, n. 6, p. 426–436, 2014. Disponível em: <<http://e-dmj.org/Synapse/Data/PDFData/2004DMJ/dmj-38-426.pdf%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed12&AN=2015641909>>. .

KANETO, HIDEAKI; MATSUOKA, TAKA-AKI; MIYATSUKA, TAKESHI; KAWAMORI, DAN; KATAKAMI, NAOTO; YAMASAKI, YOSHIMITSU; MATSUHISA, M. PDX-1 functions as a master factor in the pancreas. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 6406–6420, 2008.

KAVLOCK, R.; BOEKELHEIDE, K.; CHAPIN, 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-n-butyl phthalate.** 2002a.

KAVLOCK, R.; BOEKELHEIDE, K.; CHAPIN, 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.** 2002b.

KAWAMORI, D.; KANETO, H.; NAKATANI, Y.; et al. The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 1091–1098, 2006.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 421–424, 2000.

KITA, D. H.; MEYER, K. B.; VENTURELLI, A. C.; et al. Manipulation of pre and postnatal androgen environments and anogenital distance in rats. **Toxicology**, v. 368–369, p. 152–161, 2016. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.08.021>>. .

KITAMURA, T.; NAKAE, J.; KITAMURA, Y.; et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth Rapid Publication. **The journal of clinical investigation**, v. 110, n. 12, p. 1839–1847, 2002.

KLÖTING, N.; HESSELBARTH, N.; GERICKE, M.; et al. Di- (2-Ethylhexyl) -Phthalate (DEHP) Causes Impaired Adipocyte Function and Alters Serum Metabolites. **PLoS one**, p. 1–19, 2015.

KNEZ, J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 26, n. 5, p. 440–448, 2013. Reproductive Healthcare Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.005>>. .

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M.; LOUIS, S. Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas. **Diabetes**, v. 16, p. 35–39, 1967.

LAPINSKAS, P. J.; BROWN, S.; LEESNITZER, L. M.; et al. Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. **Toxicology**, v. 207, n. 1, p. 149–63, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590130>>. Acesso em: 6/6/2014.

LEHMANN, K. P.; PHILLIPS, S.; SAR, M.; FOSTER, P. M. D.; GAIDO, K. W. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 60–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141095>>. Acesso em: 24/6/2014.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPAR γ . **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993–999, 2005.

LIN, Y.; WEI, J.; LI, Y.; et al. Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 301, n. 3, p. E527-38, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673306>>. Acesso em: 10/7/2013.

LOTTRUP, G.; ANDERSSON, A-M.; LEFFERS, H.; et al. Possible impact of phthalates on infant reproductive health. **International journal of andrology**, v. 29, n. 1, p. 172- 80; discussion 181–5, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16466537>>. Acesso em: 27/9/2013.

LOVEKAMP-SWAN, T.; DAVIS, B. J. Mechanisms of Phthalate Ester Toxicity in the Female Reproductive System. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 2, p. 139–145, 2003. Disponível em: <<http://www.ehponline.org/ambra-doi-resolver/10.1289/ehp.5658>>. Acesso em: 29/5/2012.

LOVEKAMP, T. N.; DAVIS, B. J. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 172, n. 3, p. 217–224, 2001.

MANKIDY, R.; WISEMAN, S.; MA, H.; JP, G. Biological impact of phthalates . **PubMed Commons** , v. 217, n. 1, p. 1–2, 2016.

MANTEIGA, S.; LEE, K. Monoethylhexyl phthalate elicits an inflammatory response in adipocytes characterized by alterations in lipid and cytokine pathways. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 4, p. 615–622, 2017.

MÅRIN, P.; HOLMTÄNG, S.; GUSTAFSSON, C.; et al. Androgen Treatment of Abdominally Obese Men. **Obesity Research**, v. 1, n. 4, p. 245–251, 1993.

MARIN, P.; LONN, L.; ANDERSSON, B.; et al. Assimilation of Triglycerides in Subcutaneous and Intraabdominal Adipose Tissues in Vivo in Men: Effects of Testosterone*. **Endocrinology And Metabolism** , n. 18, 1996.

MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; CAMPIOLI, E.; CULTY, M.; ZIRKIN, B. R.; PAPADOPOULOS, V. Fetal origin of endocrine dysfunction in the adult: The phthalate model. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, p. 5–17, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.007>>. .

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 1, p. 148–57, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19760678>>. Acesso em: 5/2/2014.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; LIU, F.; SATHYANARAYANA, S.; et al. Timing of prenatal

phthalate exposure in relation to genital endpoints in male newborns. **Andrology**, v. 4, n. 4, p. 585–593, 2016.

MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 465–474, 2002.

MEEKER, J. D.; SATHYANARAYANA, S.; SWAN, S. H. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2097–113, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/9/2013.

MEHRPOUR, O.; KARRARI, P.; ZAMANI, N.; TSATSAKIS, A. M.; ABDOLLAHI, M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: A review. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 146–156, 2014. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.029>>. .

MELLOUL, D.; MARSHAK, S.; CERASI, E. Regulation of pdx-1 Gene Expression. , v. 51, n. December, p. 320–325, 2002.

MEULEN, T. VAN DER; HUISING, M. O.; AVENUE, O. S.; BIOLOGY, M.; AVENUE, S. The role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. **J Mol Endocrinol**, v. 54, n. 2, p. 1–24, 2015.

MULLER, J. C., BOARETO, A. C., LOURENÇO, E. L. B., ZAIA, R. M., KIENAST, M. F., SPERCOSKI, K. M., MORAIS, R. N., MARTINO-ANDRADE, A. J., DALSENTER, P. R. In Utero and Lactational Exposure to Fluoxetine in Wistar Rats : Pregnancy Outcomes and Sexual Development. , p. 132–140, 2013.

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

NADAL, A.; ALONSO-MAGDALENA, P.; SORIANO, S.; QUESADA, I.; ROPER, A. B. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 304, n. 1–2, p. 63–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433249>>. Acesso em: 30/9/2013.

NEWBOLD, R. R.; PADILLA-BANKS, E.; JEFFERSON, W. N.; HEINDEL, J. J. Effects of endocrine disruptors on obesity. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 201–207, 2008.

NEWSHOLME, P.; CRUZAT, V.; ARFUSO, F.; KEANE, K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 3, 2014.

POCAR, P.; FIANDANESE, N.; SECCHI, C.; et al. Exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in Utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. **Endocrinology**, v. 153, n. 2, p. 937–948, 2012.

ROCHA, B. A.; ASIMAKOPOULOS, A. G.; BARBOSA, F.; KANNAN, K. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 152–162, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.193>>. .

SAUER, S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Gamma. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 10, p. 688–704, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.06.010>>. .

SCHULTZ, R. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Messenger Ribonucleic Acid and Protein in Human and Rat Testis. **Endocrinology**, v. 140, n. 7, p. 2968–2975, 1999. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/en.140.7.2968>>. .

SEMACHE, M.; GHISLAIN, J.; ZARROUKI, B.; TREMBLAY, C.; POITOUT, V. Pancreatic and duodenal homeobox-1 nuclear localization is regulated by glucose in dispersed rat islets but not in insulin-secreting cell lines. , p. 1–9, 2014.

SHARIFI, N.; GULLEY, J.; DAHUT, W. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 10, p. e567, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204517306708>>. .

SHARPE, R. M.; STEWART IRVINE. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? **BMJ**, v. 328, n. August, p. 284–289, 2004.

SHU, T.; ZHU, Y.; WANG, H.; et al. Ages decrease insulin synthesis in pancreatic β -cell by repressing pdx-1 protein expression at the post-translational level. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

SIFAKIS, S.; ANDROUTSOPOULOS, V. P.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 56–70, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>>. .

STAHLHUT, R. W.; VAN WIJNGAARDEN, E.; DYE, T. D.; COOK, S.; SWAN, S. H. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 6, p. 876–82, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1892109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/9/2013.

STRAKOVSKY, R. S.; LEZMI, S.; SHKODA, I.; et al. In utero growth restriction and catch-up adipogenesis after developmental di (2-ethylhexyl) phthalate exposure cause glucose intolerance in adult male rats following a high-fat dietary challenge. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1208–1220, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.012>>. .

SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor ?? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2062–2068, 2005.

SWAN, S. H.; SATHYANARAYANA, S.; BARRETT, E. S.; et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. , v. 30, n. 4, p. 963–972, 2015.

TABB, M. M.; BLUMBERG, B. New Modes of Action for Endocrine-Disrupting Chemicals. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 3, p. 475–482, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2004-0513>>. .

THOMPSON, R. C.; MOORE, C. J.; VOM SAAL, F. S.; SWAN, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2153–2166, 2009. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2009.0053>>. .

THOMPSON, R. C.; SWAN, S. H.; MOORE, C. J.; VOM SAAL, F. S. Our plastic age. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p.

1973–1976, 2009. Disponível em: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2009.0054>. .

TOFT, G.; JÖNSSON, B. A. G.; LINDH, C. H.; et al. Association between pregnancy loss and urinary phthalate levels around the time of conception. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 3, p. 458–463, 2012.

WATERS, K. M. Differential Gene Expression in Response to Methoxychlor and Estradiol through ERalpha, ERbeta, and AR in Reproductive Tissues of Female Mice. **Toxicological Sciences**, v. 63, n. 1, p. 47–56, 2001. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/63.1.47>. .

WELTERS, H. J.; MCBAIN, S. C.; TADAYYON, M.; et al. Expression and functional activity of PPARgamma in pancreatic beta cells. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 7, p. 1162–1170, 2004.

WHYATT, R. M.; ADIBI, J. J.; CALAFAT, A. M.; et al. Prenatal Di(2-ethylhexyl)Phthalate Exposure and Length of Gestation Among an Inner-City Cohort. **Pediatrics**, v. 124, n. 6, p. e1213–e1220, 2009. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2009-0325>. .

ZHU, J.; PHILLIPS, S. P.; FENG, Y.-L.; YANG, X. Phthalate esters in human milk: concentration variations over a 6-month postpartum time. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 17, p. 5276–81, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16999099>.

ANEXO 1

Rato macho (DPN 90) exposto à DEHP 700 mg/kg/dia com criptorquidia unilateral.



ANEXO 2

Rato macho (DPN 90) exposto à DEHP 700 mg/kg/dia com prepúcio fendido e hipospádia distal.

