

CLAUDIA BELESKI CARNEIRO



**EFEITOS ADVERSOS DA EXPOSIÇÃO AO DI (2-ETILHEXIL)  
FTALATO (DEHP) NA PRÉ-PUBERDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

CURITIBA

2003

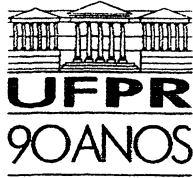
CLAUDIA BELESKI CARNEIRO

**EFEITOS ADVERSOS DA EXPOSIÇÃO AO DI (2-ETILHEXIL)  
FTALATO (DEHP) NA PRÉ-PUBERDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto  
Dalsenter

CURITIBA  
2003



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



## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “**EFEITOS REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO AO DI (2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP) NA PRÉ-PUBERDADE EM RATOS**”, de autoria da Pós-Graduanda **CLÁUDIA BELESKI CARNEIRO**, e composta pelos Professores Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente), Dr<sup>a</sup> Eliane Dallegrave (UFRGS), Dr. Herbert Arlindo Trebien (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela coordenadora. Em Curitiba, 05 de dezembro de 2003.

Dr. Paulo Roberto Dalsenter

Dr.<sup>a</sup> Eliane Dallegrave

Dr. Herbert Arlindo Trebien

"De tudo ficaram três coisas: A certeza de que estaremos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar, e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. Devemos fazer da interrupção, um novo caminho; da queda, um passo de dança; do medo, uma ponte; da procura, um encontro."

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela graça da vida, presença permanente ao meu lado e por todas as oportunidades de crescimento.

Ao Prof. Paulo Roberto Dalsenter, por sua orientação, paciência e otimismo.

Aos professores da banca, pelas valiosas sugestões que enriqueceram o trabalho.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFPR, pela seriedade e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR: Nair, Linda, Mara, Sérgio, Rosângela, Adriana, Cris e Silvia.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

À querida amiga Kenia, pelo companheirismo e agradável convivência.

Aos amigos de laboratório Anderson, Gladys, Lilian, Tony, Samanta e aos estagiários Diogo e Diego.

Ao Professor Herbert, por sua amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da UEPG Vitoldo, Denise, Gislaine, Carlos e William pelo incentivo à pesquisa.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Professora Maria Consuelo, pelo empenho na manutenção de um curso com qualidade.

À minha família, meus pais Paulo e Eliana e minha irmã Caroline, pelas orações e incentivo.

Ao CNPq e FUNPAR pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>II</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1      PLASTIFICANTES.....	3
2.2      ÉSTERES DE FTALATO.....	3
2.2.1    Toxicologia dos ésteres de ftalato.....	6
2.3      DI (2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP).....	7
2.4      LIBERAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO DEHP.....	10
2.5      EFEITOS TÓXICOS RELACIONADOS À EXPOSIÇÃO AO DEHP.....	13
2.5.1    Efeitos em humanos.....	13
2.5.2    Efeitos em animais.....	16
2.6      FARMACOCINÉTICA DO DEHP.....	18
2.7      LEGISLAÇÃO DO DEHP.....	21
2.8      TOXICOLOGIA REPRODUTIVA.....	23
2.9      DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	25
2.9.1    Protocolos de avaliação dos desreguladores endócrinos para mamíferos.....	28
2.9.1.1    Testes <i>in vivo</i> .....	28
2.9.1.1.1    Teste uterotrófico.....	29
2.9.1.1.2    Teste de Hershberger.....	29
2.9.1.1.3    Protocolo de puberdade em fêmeas.....	29
2.9.1.1.4    Protocolo de puberdade em machos.....	30
2.9.1.1.5    Protocolo de exposição <i>in utero</i> e na lactação.....	30

2.9.1.1.6	Protocolo de várias gerações.....	30
2.9.1.2	Ensaio <i>in vitro</i> .....	31
2.9.1.2.1	Ensaio do gene repórter.....	32
2.9.1.2.2	Ensaio de ligação ao receptor.....	32
2.9.1.2.2.1	Ensaio de ligação ao receptor de estrógeno.....	32
2.9.1.2.2.2	Ensaio de ligação ao receptor de andrógeno.....	33
2.9.1.2.2.3	Ensaio de proliferação celular.....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1	ANIMAIS.....	35
4.2	SUBSTÂNCIA UTILIZADA.....	35
4.3	DOSES E TRATAMENTO.....	35
4.4	PROTOSCOLOS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	36
4.4.1	Protocolo de fêmeas expostas na pré-puberdade.....	36
4.4.1.1	Desenho experimental.....	36
4.4.1.2	Parâmetros avaliados.....	37
4.4.1.2.1	Ganho de massa corporal.....	37
4.4.1.2.2	Abertura do canal vaginal.....	37
4.4.1.2.3	Determinação do primeiro estro e regularidade do ciclo estral.....	37
4.4.1.2.4	Massa absoluta e relativa de órgãos.....	39
4.4.2	Protocolo de machos expostos na pré-puberdade.....	39
4.4.2.1	Desenho experimental.....	39
4.4.2.2	Parâmetros avaliados.....	40
4.4.2.2.1	Ganho de massa corporal.....	40
4.4.2.2.2	Separação prepucial.....	40
4.4.2.2.3	Massa absoluta e relativa de órgãos.....	41
4.4.2.2.4	Contagens espermáticas.....	42
4.4.2.2.5	Níveis plasmáticos de testosterona.....	43

4.4.3	Protocolo de machos expostos na pré-puberdade e avaliados na idade adulta..	43
4.4.3.1	Desenho experimental.....	43
4.4.3.2	Parâmetros avaliados.....	43
4.4.3.2.1	Parâmetros do teste do campo aberto.....	43
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
5.1	PROTOCOLO DE FÊMEAS EXPOSTAS NA PRÉ-PUBERDADE.....	46
5.1.1	Ganho de massa corporal.....	46
5.1.2	Abertura do canal vaginal, primeiro estro e regularidade do ciclo estral.....	47
5.1.3	Massa absoluta e relativa de órgãos.....	47
5.2	PROTOCOLO DE MACHOS EXPOSTOS NA PRÉ-PUBERDADE.....	48
5.2.1	Ganho de massa corporal.....	48
5.2.2	Separação prepucial.....	50
5.2.3	Massa absoluta e relativa de órgãos.....	50
5.2.4	Contagens espermáticas e níveis plasmáticos de testosterona.....	51
5.3	PROTOCOLO DE MACHOS EXPOSTOS NA PRÉ-PUBERDADE E AVALIADOS NA IDADE ADULTA.....	52
5.3.1	Ganho de massa corporal.....	52
5.3.2	Parâmetros do teste do campo aberto.....	54
5.3.3	Massa absoluta e relativa de órgãos.....	54
5.3.4	Contagens espermáticas e níveis plasmáticos de testosterona.....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
6.1	PARÂMETROS AVALIADOS NAS FÊMEAS.....	58
6.1.1	Ganho de massa corporal.....	58
6.1.2	Abertura do canal vaginal, primeiro estro e regularidade do ciclo estral.....	58
6.1.3	Massa de órgãos reprodutivos.....	60
6.1.4	Massa de órgãos metabolizadores e excretores.....	63
6.2	PARÂMETROS AVALIADOS NOS MACHOS.....	63
6.2.1	Ganho de massa corporal.....	64
6.2.2	Avaliação do dia da ocorrência da separação prepucial.....	64

6.2.3	Massa de órgãos metabolizadores e excretores.....	64
6.2.4	Massa de órgãos sexuais.....	66
6.2.5	Contagens espermáticas.....	68
6.2.6	Níveis plasmáticos de testosterona.....	70
6.2.7	Campo aberto.....	72
6.3	Limitações do protocolo de puberdade.....	73
6.4	Vantagens do protocolo de puberdade.....	74
6.5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	74
6.5.1	Comparação dos resultados obtidos com a exposição de animais ao DEHP na fase gestacional e lactacional, com a fase pré-púbere.....	75
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 -</b> ESTRUTURAS MOLECULARES DO DEHP (1), ESTRADIOL (2), TESTOSTERONA (3) E PGF <sub>2</sub> $\alpha$ (4).....	8
<b>FIGURA 2 -</b> MATERIAIS DE PVC QUE CONTÊM DEHP.....	9
<b>FIGURA 3 -</b> METABOLISMO DO DEHP.....	19
<b>FIGURA 4 -</b> MECANISMO DE AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	27
<b>FIGURA 5 -</b> ESTRUTURA MOLECULAR DO DEHP.....	35
<b>FIGURA 6-</b> CITOLOGIA VAGINAL-FASES DO CICLO ESTRAL (pró-estro e estro).....	38
<b>FIGURA 7 -</b> SEPARAÇÃO PREPUCIAL.....	40
<b>FIGURA 8 -</b> CÁLCULO DO NÚMERO DE ESPERMÁTIDES E ESPERMATOZÓIDES.....	42
<b>FIGURA 9 -</b> ARENA DO CAMPO ABERTO.....	44
<b>FIGURA 10 -</b> GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO DE RATAS TRATADAS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.....	46
<b>FIGURA 11 -</b> GANHO DE MASSA CORPORAL RELATIVO DE RATAS TRATADAS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.....	46
<b>FIGURA 12 -</b> GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO DE RATOS PÚBERES TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.....	49
<b>FIGURA 13 -</b> GANHO DE MASSA CORPORAL RELATIVO DE RATOS PÚBERES TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.....	49
<b>FIGURA 14 -</b> GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO DE RATOS ADULTOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.....	53
<b>FIGURA 15 -</b> GANHO DE MASSA CORPORAL RELATIVO DE RATOS ADULTOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 -</b>	DEHP EM PRODUTOS MÉDICOS COM E SEM PVC, PROVENIENTES DE 12 PAÍSES.....	4
<b>TABELA 2 -</b>	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DEHP.....	7
<b>TABELA 3 -</b>	AÇÕES E INICIATIVAS GOVERNAMENTAIS REFERENTES A BRINQUEDOS FEITOS EM PVC.....	22
<b>TABELA 4 -</b>	EFEITOS DO DEHP SOBRE A ABERTURA DO CANAL VAGINAL, PRIMEIRO ESTRO E REGULARIDADE DO CICLO ESTRAL DE RATAS EXPOSTAS NA FASE PRÉ-PÚBERE.....	47
<b>TABELA 5 -</b>	EFEITOS DO DEHP SOBRE A MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DE ÓRGÃOS DE RATAS PÚBERES (58 A 70 DIAS DE VIDA).....	48
<b>TABELA 6 -</b>	IDADE PARA A OCORRÊNCIA DA SEPARAÇÃO PREPUCIAL E MASSAS CORPORAIS RELACIONADAS AO FENÔMENO, EM RATOS PÚBERES....	50
<b>TABELA 7 -</b>	EFEITOS DO DEHP SOBRE A MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DE ÓRGÃOS DE RATOS PÚBERES (70 A 78 DIAS DE VIDA).....	51
<b>TABELA 8 -</b>	PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES, TAXA DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA DE RATOS PÚBERES (70 A 78 DIAS DE VIDA) .....	52
<b>TABELA 9 -</b>	EFEITOS DO DEHP SOBRE OS PARÂMETROS: LEVANTAR, CONGELAMENTO, AUTO-LIMPEZA, LOCOMOÇÃO E NÚMERO DE BOLOS FECAIS DE RATOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO (87-88 DIAS DE VIDA) .....	54
<b>TABELA 10 -</b>	EFEITOS DO DEHP SOBRE A MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DE ÓRGÃOS DE RATOS ADULTOS (91 A 95 DIAS DE VIDA).....	55
<b>TABELA 11 -</b>	PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES, TAXA DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA DE RATOS ADULTOS (91 A 95 DIAS DE VIDA).....	56

## LISTA DE SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
BBP	- Butilbenzilftalato
CAS RN	- Chemical Abstract Services- Registry Number
CERHR	- Center of the Evaluation of Risks to Human Reproduction
DDE	- Diclorodifeniltricloroetano
DBP	- Di-butilftalato
DHP	- Di-hexilftalato
DnOP	- Di-n-octilftalato
DiNP	- Di-iso-nonilftalato
DiDP	- Di-iso-decilftalato
DEHP	- Di (2-etilhexil) ftalato
DEP	- Di-etilftalato
DES	- Dietilestibestrol
EDSTAC	- Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisory Committee
2-EH	- 2- hidroxietanol
FDA	- Food and Drug Administration
FSH	- Follicle Stimulating Hormone
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial
LH	- Luteinizing hormone
LOAEL	- Low observed adverse effect level
MEHP	- Mono- etilhexilftalato
NOAEL	- No observed adverse effect level
NTP	- National Toxicology Program
OECD	- Organization for Economic Coopertaiton and Development
ONGs	- Organizações não- governamentais
PVC	- Poli Cloreto de Vinila
SSBG	- Globulina de ligação aos hormônios esteroidais sexuais
US EPA	- United States Environmental Protection Agency
WWFCANADA	- World Wildlife Fund Canada

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DL <sub>50</sub>	- dose letal 50%
epm	- erro padrão da média
g	- grama
h	- horas
ip	- intraperitoneal
kg	- quilograma
mg	- miligrama
min	- minutos
mL	- mililitro
mm	- milímetro
n	- tamanho da amostra
n <sup>o</sup>	- número
p	- nível de significância estatístico
PPAR	-receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PPAR $\alpha$	-receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (subtipo $\alpha$ )
PPAR $\beta$	-receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (subtipo $\beta$ )
ppb	- parte por bilhão
sc	- subcutânea
vo	- via oral
$\mu$ L	- microlitro
$\mu$ m	- micrômetro
$\mu$ g	- micrograma
<sup>14</sup> C	- carbono 14
°C	- graus Celcius
®	- marca registrada

## RESUMO

O composto di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) é um plastificante do PVC (cloreto de polivinila) utilizado na fabricação de embalagens, mordedores infantis, brinquedos, materiais médicos e odontológicos. O plastificante não se liga quimicamente ao plástico, podendo ser liberado e contaminar as substâncias que entram em contato com ele. O DEHP pertence à lista de triagem de agências ambientais regulatórias para estudo da atividade desreguladora endócrina, pois causa efeitos adversos ao sistema reprodutor, resultando em efeitos deletérios consideráveis à população e ao ecossistema. O presente trabalho avaliou os efeitos do DEHP sobre a função reprodutiva de ratas e ratos Wistar expostos na pré-puberdade. Foram utilizadas três doses de DEHP: 100, 250 e 500 mg/kg (via oral), além do grupo controle (veículo óleo de canola). As ratas foram tratadas diariamente, do 21º ao 42º dia de vida, avaliando-se o ganho de peso corporal semanal, abertura do canal vaginal, idade para a ocorrência do primeiro estro, regularidade do ciclo estral, peso de fígado, rins, útero e ovários. Os ratos foram tratados diariamente por via oral do 21º ao 70º de vida, avaliando-se ganho de peso corporal, idade para a ocorrência da separação prepucial, peso de fígado, rins, testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal; produção espermática diária, número de espermatozóides e taxa de trânsito espermático. Os ratos adultos foram avaliados quanto aos mesmos parâmetros avaliados nos ratos púberes, além de testes comportamentais no campo aberto. Os resultados evidenciaram que os pesos corporais semanais, a idade para abertura do canal vaginal, primeiro estro ou regularidade do ciclo estral não sofreram alterações nas fêmeas, mas houve aumento no peso de fígado, rins, útero e ovários. Nos ratos púberes, biologicamente a separação prepucial e o ganho de peso corporal não sofreram alterações, mas houve redução nos pesos de testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal; produção espermática diária, número de espermatozóides e aumento na taxa de trânsito espermático, peso de fígado e rins. Os ratos adultos não sofreram alterações nos pesos corporais semanais, mas houve redução nos pesos de testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, produção espermática diária, número de espermatozóides e aumento na taxa de trânsito espermático e peso de fígado e rins. Modificações comportamentais (aumento no número de levantamentos e tempo de

congelamento; redução na auto-limpeza, locomoção e número de bolos fecais) foram constatadas nos ratos adultos. Os resultados indicam que a exposição de ratos pré-púberes ao DEHP pode induzir efeitos adversos irreversíveis sobre o sistema reprodutor e saúde geral dos animais, quando estes são expostos em períodos críticos de desenvolvimento, como a pré-puberdade. Assim sendo, podemos concluir que o DEHP apresenta atividade estrogênica fraca, manifestando toxicidade reprodutiva em ratos expostos na fase pré-púbere.

**Palavras-chaves: DEHP, toxicologia reprodutiva, desreguladores endócrinos, pré-puberdade, ratos Wistar, ftalatos.**

## ABSTRACT

Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a plasticizer used in PVC (polyvinyl chloride), used in many products such packaging of food, medical products, teethers and dental materials. The plasticizer did not bound to the plastic matrix, it can leaches from plastic matrix, contaminating substances that get in touch with it. American Regulatory Agencies put DEHP on the list of suspected substances of having endocrine disruptor properties, inducing adverse effects on reproductive system, in any phase of the development, causing deleterious effects to the population and ecosystems levels. The present study evaluated the DEHP's effects in the reproductive function of male and female Wistar rats exposed during prepubertal phase. Thus, three doses of DEHP were used: 100, 250 and 500 mg/kg body weight/day (oral route), besides control group (vehicle canola oil). The female rats were treated daily, from 21 to 42 day of life, evaluating corporal weight gain, day for vaginal opening, day for the first estrus, estrus regularity and weights of uterus, ovaries, liver and kidneys. Male rats were treated daily (oral route), from 21 to 70 day of life, evaluating corporal weight gain, preputial separation, weights of liver, kidneys and sexual organs, daily spermatic production, spermatic transit tax and number of spermatozoa. The adult male rats were evaluated according the same parameters used to evaluate the pubertal male, and behavioral parameters in the open field test. The results showed that female rats treated with DEHP had no changes in weekly corporal weight gain, day for vaginal opening, day for first estrus or estrus regularity. Nevertheless, there was an increase in liver, kidney, uterus and ovaries weights. The pubertal male rats treated with DEHP showed no biological changes in corporal weekly corporal weight gain and preputial separation, but testis, epididymis, prostate and seminal vesicle weights, daily spermatic production and number of spermatozoa decreased, and the spermatic transit tax, liver and kidney weights increased. The adult male rats treated with DEHP showed no changes in weekly corporal weight gain, but there was a reduction in testis, epididymis, prostate and seminal vesicle weights, daily spermatic production and number of spermatozoa. The spermatic transit tax, liver and kidney weights increasased. Adult male rats showed behavioral changes (increase in rearing,

freezing, decrease on grooming, locomotion and number of feces). Thus, these results showed that DEHP exposure of rats in prepubertal phase could induce irreversible adverse effects in the reproductive system and general health of the animals, suggesting that DEHP has weak estrogenic activity. So, we can conclude that DEHP has weak estrogenic activity, showing its reproductive toxicity in rats exposed during prepubertal phase.

**Key words: DEHP, phthalate, reproductive toxicology, prepubertal phase, endocrine disruptors, Wistar rats.**

## 1 INTRODUÇÃO

No último século, o homem dominou vários processos químicos que lhe permitiram criar novas substâncias como medicamentos, detergentes, polímeros sintéticos, etc. Com a industrialização, um grande número de moléculas sintéticas é continuamente lançado no meio ambiente. Muitas destas substâncias químicas podem afetar a saúde dos animais e de seres humanos. O comprometimento da função reprodutiva de várias espécies tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. A toxicologia reprodutiva preocupa-se com o estudo de fatores como a exposição humana/animal às substâncias químicas, capazes de interferir no potencial reprodutivo (levando à infertilidade, alterações hormonais e estruturais). Os agentes químicos que interferem na fertilidade podem causar desregulação endócrina, por atuarem como antiandrogênicos, androgênicos, estrogênicos ou antiestrogênicos, por exemplo.

As glândulas endócrinas produzem hormônios que coordenam órgãos e tecidos, mantendo sua harmonia fisiológica e homeostase. Os desreguladores endócrinos, substâncias químicas com potencial de interferir no sistema endócrino, podem mimetizar (agonista), bloquear (antagonista), interferir com a síntese, liberação, transporte, eliminação e ligação dos hormônios naturais. Estes compostos podem modificar temporariamente ou permanentemente a função de retroalimentação do cérebro, hipófise, gônadas, glândula tireóide e outros órgãos (WWF, 2002). Uma desregulação hormonal em etapas sensíveis do desenvolvimento pode ocasionar danos permanentes com conseqüências irreversíveis (WWF, 2002; EERTMANS et al., 2003).

Os plastificantes utilizados para fabricar produtos de PVC (policloreto de vinila) flexíveis são exemplos de desreguladores endócrinos. Os ftalatos estão entre os plastificantes mais utilizados, pois tornam materiais de PVC maleáveis e transparentes, sem perder a resistência. Um dos principais representantes da classe dos ftalatos é o DEHP (MARCILLA et al., 2003). O DEHP e outros ftalatos não se ligam quimicamente ao plástico (WHO, 1992; BOUMA et al., 2002), podendo ser facilmente liberados do material, por lixiviação, contaminando as substâncias que estão em contato com o recipiente de PVC. Deste modo, representam um risco toxicológico ao homem, devido à grande aplicação de plásticos destinados à embalagem e armazenamento de alimentos, produtos médicos hospitalares, expondo os seres humanos ao contato diário com este tipo de plastificante. As substâncias capazes de desregular o sistema reprodutivo, como o DEHP, podem causar toxicidade em

qualquer etapa do desenvolvimento, da fase fetal ao organismo adulto (STEINBERGER et al., 1992).

A puberdade é uma fase integrante dos protocolos indicados pelo EDSTAC (*Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee*), comitê científico instituído pela US EPA (*United States Environmental Protection Agency*), para avaliar as substâncias suspeitas de desregularem o sistema endócrino. Muitas modificações endócrinas e metabólicas interativas ocorrem na fase pubertal dos mamíferos. Por este motivo, o desenvolvimento dos animais pré-púberes pode ficar comprometido quando são expostos a compostos com atividade hormonal. Os efeitos potenciais dos desreguladores endócrinos vêm sendo questionados há alguns anos, destacando-se a presença do EDSTAC. Esse comitê reconheceu a necessidade de desenvolver uma padronização no protocolo para avaliar o impacto dos desreguladores endócrinos em ratos púberes, indicando a realização de protocolos de exposição de animais na fase pré-púbere (US EPA, 1997).

O protocolo de puberdade em machos objetiva detectar alterações no desenvolvimento púbere e na maturação peripubertal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, provocadas por compostos androgênicos, antiandrogênicos ou inibidores da aromatase. De modo semelhante, o protocolo de puberdade em fêmeas objetiva detectar alterações no desenvolvimento púbere, provocadas por compostos como os inibidores da aromatase, agentes estrogênicos, antiestrogênicos ou outros agentes capazes de interferir com o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Desta forma, é inquestionável a importância da avaliação da toxicidade reprodutiva do DEHP sobre organismos em desenvolvimento, como foi realizado com ratos expostos na fase pré-púbere, no presente estudo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PLASTIFICANTES

Os plastificantes são pequenas moléculas orgânicas adicionadas ao PVC (policloreto de vinila), agindo como lubrificantes entre as camadas do polímero, numa proporção variável de acordo com o objetivo da aplicação. O polímero de PVC pode ser rígido ou flexível, opaco ou transparente, brilhante ou fosco, colorido ou não, dependendo da presença de plastificantes, estabilizantes, pigmentos e outros aditivos em sua formulação. Na indústria do PVC, encontram-se vários tipos de plastificantes, como os ftalatos, adipatos, sebacatos, citratos, poliésteres, benzoatos, ésteres de alquilsulfonatos e organofosfatos (MARCILLA et al., 2003). Os plastificantes conferem maleabilidade, flexibilidade aos materiais de PVC, permitindo que sejam moldados em diferentes formatos, sem quebrar. São adicionados aos plásticos durante o processo de transformação, formando um produto resistente e de fácil manuseio, garantindo um comportamento importante para os materiais utilizados na prática médica. Dentre os procedimentos médicos que utilizam materiais de PVC, destaca-se a hemodiálise, transfusão de sangue, oxigenação extracorporeal, administração de fluidos intravenosos, alimentação enteral, parenteral e terapia respiratória (FERRUTI et al., 2003). Com o crescimento da produção de plastificantes e desenvolvimento de outros produtos que utilizam a flexibilidade e maleabilidade destes materiais, houve um aumento no número de estudos sobre a avaliação dos efeitos adversos de plastificantes na saúde humana e animal (KAVLOCK et al., 2002).

### 2.2. ÉSTERES DE FTALATO

Os ésteres de ftalato constituem um grupo de compostos industriais líquidos, incolores, inodoros, que apresentam baixa solubilidade em água e volatilidade, utilizados principalmente como plastificantes em materiais de PVC, conhecidos tecnicamente por ésteres dialquil ou alquilaril de ácidos-1,2-benzenodicarboxílicos. Esses compostos melhoram as propriedades dos materiais de PVC, garantindo flexibilidade, resistência, disponibilidade para uso em várias temperaturas, facilidade de esterilização e claridade óptica (MIHOVEC-GRDIC et al., 2002). Alguns exemplos de ésteres de ftalatos são o DBP, BBP, DHP, DnOP, DiNP, DiDP, DEHP e DEP. Os ésteres de ftalato conferem versatilidade

aos materiais de PVC, sendo utilizados na produção de vernizes, goma, adesivos, lubrificantes e cosméticos. Globalmente estima-se que o consumo mundial de ftalatos gira em torno de 3,25 milhões de toneladas por ano, sendo que o DEHP está entre os mais utilizados, representando cerca de 2,1 milhões de toneladas (JOBILING et al., 1995; HARRIS et al., 1997).

Os ésteres de ftalato não se ligam ao PVC, permanecendo como uma fase móvel e migrante do plástico, podendo sofrer lixiviação. Desta forma, podem ser liberados continuamente da matriz polimérica do recipiente plástico, contaminando as substâncias com as quais estão em contato (WHO, 1992). O contato e a pressão tais como aqueles aplicados por bebês durante a erupção dos dentes ou quando brincam com objetos plásticos, podem aumentar as taxas nas quais estas substâncias químicas migram do plástico. As crianças em contato com PVC flexível podem ingerir quantidades substanciais de ésteres de ftalato durante o uso normal do produto, especialmente de mordedores (WHO, 1992; BOUMA et al., 2002). Essas substâncias representam um risco toxicológico ao homem, por serem muito utilizadas. Os dados da Tabela 1 referem-se a uma pesquisa realizada pelo grupo Greenpeace, que revelou a presença amplamente disseminada de DEHP em uma amostra de 46 produtos médicos em PVC comercializados em 12 países (DI GIANGI, 1998).

TABELA 1- DEHP EM PRODUTOS MÉDICOS COM E SEM PVC, PROVENIENTES DE 12 PAÍSES.

País	Item	PVC	DEHP (%)
Áustria	Bolsa IV; 1000 ml; fabr. sem PVC: Modenplast, Itália	Não	0,05
	Bolsa de nutrição parenteral Dimix, 1 L fabr. Diffuplast; Itália	Não	0,02
	Tubulação; bolsa de nutrição parenteral, Dimix, 1 L, Itália	Sim	46
	Tubulação; bolsa IV sem PVC; Fabr. Modenplast; Itália	Sim	41
	Tubulação; 150 cm Sistema Intrafix Air Neutrapur sem PVC; Fabr. B. Braun; Alemanha	Não	ND
	Tubulação, 150 cm Intrafix Air IV equipo para infusão por gravidade. Fabr: B. Braun; Germany	Sim	46
	Tubulação; 180 cm Tutoplus sem PVC, EVA fabr: Plasti Medical S.P.A.; Itália	Não	ND
Brasil	Frasco; NaCl; 0,9% 125 ml; Aster Produtos Médicos.	Não	ND
	Bolsa IV; NaCl 0,9% 1000 ml; Aster Produtos Médicos.	Não	NT
	Bolsa IV; NaCl 0,9% 1000 ml; Baxter Helthcare, Brasil	Sim	36
Dinamarca	Seringa; equipo para administração de sangue Sangofix	Não	ND
	Tubulação; equipo para administração de sangue Sangofix	Não	41

País	Item	PVC	DEHP (%)
Dinamarca	Tubulação; catéter de sucção- Maersk Medical- Alemanha	Não	38
França	Bolsa IV; Tuliflex 250 ml NaCl 0,9%; Laboratoire Aguettant	Sim	35
	Bolsa IV; Tuliflex 1000 ml NaCl 0,9% Laboratoire Aguettant	Sim	37
Alemanha	Bolsa IV; 2500 ml; Ecobolsa; fabr: B. Braun; Alemanha	Não	ND
Grécia	Tubulação; equipo-solutran; fabr: Lovero Valtellino; Itália	Sim	43
	Tubulação, sonda duodenal Pharmaplast; Maersk Medical	Sim	36
	Tubulação, sonda duodenal Levin; fabr.: Uroplast A/S	Sim	41
Índia	Seringa; Equipo para infusão Hema-Flo- Hemant Surgical	Sim	16
	Tubulação; tubo de Ryle 105 cm; Romsons Sci & Surg.	Sim	41
	Tubulação; tubo de Ryle 105 cm; Romsons Sci & Surg.	Sim	41
	Tubulação; Equipo para infusão JMS tipo 220; Japan Medical Supply; Singapura	Sim	44
Países Baixos	Bolsa IV; Urias A Séries 1500 ml; fabr: Urias; Dinamarca	Sim	36
	Tubulação; catéter de Foly Bardia PTFE; Bard Limited;	Não	ND
Filipinas	Tubulação; Equipo para infusão Codan Med; GmbH & Co	Sim	46
	Tubulação; sonda duodenal Medichoice; Fabr: Indoplas	Sim	31
	Tubulação; Equipo IV McDrip; Fabr: Cosmo Medical Inc.	Sim	28
	Tubulação; Equipo de infusão por gravidade Intrafix IV; Fabr: B. Braun; Alemanha	Sim	35
	Tubulação; equipo de transfusão sangüínea McVein; Globe Medical Prod. E.U.A	Sim	36
Espanha	Bolsa IV; 750 ml; fabr: Hollister Iberica, SA; Espanha	Sim	27
	Seringa; Sistema de Infusão IntrasetI10 Luer; fabr: Intraven	Sim	26
	Tubulação; Sistema de Infusão IntrasetI10 Luer; Intraven	Sim	23
	Tubulação; Catéter de sucção; Dahlihausen MedTech	Sim	29
	Tubulação; Sonda Duodenal Izasa fabr: Maersk Medical	Sim	31
Reino Unido	Bolsa IV; Macoflex 50 ml NaCl 0.9%; Maco Pharma	Sim	36
	Bolsa IV; bolsa EVA 500 ml; Fab.: Pharmacia & Upjohn	Não	ND
	Bolsa de nutrição parenteral 1 L EVA Clintec Nutrition.	Não	0.03
	Bolsa de nutrição parenteral; Miramed 1 L: Baxter; Itália	Não	ND
	Tubulação; bolsa de nutrição parenteral EVA: Clintec Nutrition; Reino Unido	Sim	40
	Tubulação; bolsa de nutrição parenteral Miramed; Baxter	Sim	80
	Tubulação; Sonda dupla de transferência: Pharmacia; Irlanda	Sim	40
	Bolsa de alimentação enteral; 500 ml Polar: Corpak;	Não	ND
	Bolsa de alimentação enteral; 500 ml; Sherwood Medical	Sim	12
	Tubulação; para bolsa de alimentação enteral; 500 ml Polar; fabr: Corpak; E.U.A	Sim	32
Tubulação; para bolsa de alimentação enteral; 500 ml; Fabr: Sherwood Medical; E.U.A.	Sim	35	

Abreviações: fabr: fabricante; ND, abaixo do limite de detecção de 0,01%; NT, não testado.

### 2.2.1 Toxicologia dos ésteres de ftalato

Os ésteres de ftalato e seus metabólitos são suspeitos de interferirem no sistema endócrino, podendo apresentar atividade estrogênica fraca (DEHP, BBP) e anti-androgênica (AKINGBEMI et al., 2001; OKUBO et al., 2003; ZACHAREWSKI et al., 1998). A maioria dos ftalatos tem atividade estrogênica, interagindo de modo fraco com receptores de estrógeno, iniciando efeitos específicos celulares e teciduais inferiores aos induzidos pelo 17- $\beta$ -estradiol (OKUBO et al., 2003). Entretanto, podem também apresentar outros mecanismos de ação, como o DEHP, que pode apresentar atividade estrogênica fraca e anti-androgênica, por meio da supressão da enzima aromatase (DAVIS et al., 1994 a, b; POON et al., 1997; AKINGBEMI et al., 2001). Estes compostos podem desregular a homeostasia do sistema endócrino e reprodutivo. Altas doses de ftalatos podem causar alterações na fertilidade, contagens espermáticas e atrofia de órgãos reprodutivos (EERTMANS et al., 2003; KASAHARA et al., 2002; DALGAARD et al., 2001). Há relatos de que animais expostos aos ftalatos por via oral, na fase gestacional ou lactacional, sofreram redução nas contagens de espermatozóides, produção espermática diária e massa da próstata e vesícula seminal, quando avaliados na fase púbere e adulta (SANTANA et al., 2002). A exposição de animais a baixas doses de ftalatos, por períodos prolongados, pode causar efeitos tóxicos metabólicos, hepatocarcinogênicos, alterações renais e em outros órgãos (DOULL et al., 1999; AKINGBEMI et al., 2001; KAVLOCK et al., 2002).

Nas últimas décadas, a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (US EPA) vem pesquisando a toxicidade da administração de baixas doses de ftalatos durante períodos críticos do desenvolvimento, comprovando o potencial destes compostos afetarem a saúde humana (DOULL et al., 1999). Dentre os efeitos tóxicos causados por ftalatos em animais destacam-se redução de fertilidade, aborto, defeitos congênitos, atrofia testicular e de epidídimo, alterações nos níveis de hormônios sexuais, patologias ovarianas, rins policísticos, hipertrofia hepática, anemia, modificações histológicas na glândula tireóide e atrofia do timo (DAVIS et al., 1994 a, b; POON et al., 1997).

### 2.3 DI (2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP)

O DEHP é o composto mais utilizado para plastificação do PVC e outras resinas. Esse plastificante é estável, têm baixa volatilidade, resistência ao calor e à luz ultravioleta, baixa solubilidade em água e alta eficácia. É compatível com a maioria das resinas sintéticas, inclusive polímeros vinílicos, ésteres celulósicos, borrachas naturais e sintéticas (MIHOVEC-GRDIC et al., 2002). O DEHP (CAS 117-81-7) tem fórmula molecular de  $C_{24}H_{38}O_4$ , sendo produzido pela esterificação do anidrido ftálico com o álcool 2-etilhexílico, sob catálise ácida ou metálica a altas temperaturas. Apresenta-se sob a forma de óleo, incolor e inodoro, com 99,86% de pureza e densidade de 0,98g/ml. Suas propriedades físico-químicas estão relatadas na Tabela 2.

TABELA 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DEHP.

Fórmula Química	$C_{24}H_{38}O_4$
Peso Molecular	390,62
Pressão de Vapor	$1,0 \times 10^{-7}$ mm Hg a 25°C
Ponto de Fusão	- 47°C
Ponto de Ebulição	386°C
Pressão de vapor a 23°C	$3,4 \times 10^{-7}$ - $6,4 \times 10^{-6}$ mm Hg
Meia vida de volatilização na água	15 anos
Meia vida de hidrólise química a 25°C e pH 7	2000 anos
Meia vida de degradação em águas naturais	2-15 dias
Solubilidade em água	insolúvel

Fonte: CMA (1999)

O composto deve ser mantido em local escuro e de baixa temperatura (NTP-CERHR, 2000). Há várias denominações comerciais para o DEHP, como Dioctil Ftalato, DOP, Eviplast 80, Bioflex Dop e Vestinol (NTP-CERHR, 1982). A estrutura molecular deste ftalato apresenta certa analogia estrutural com a molécula do estradiol (Figura 1). O anel benzênico do MEHP e DEHP podem mimetizar o anel esteroidal do estradiol. Assim, estes compostos podem interagir de modo fraco com o receptor de estrógeno, modificações na transcrição gênica. Até as substâncias químicas com pequena analogia estrutural com o

estradiol e fraca afinidade de ligação ao receptor de estrógeno, podem desregular o sistema endócrino, quando administradas em altas concentrações (ASAI et al., 2000). Pela semelhança molecular entre DEHP e a prostaglandina ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), autores como OIE et al., (1997), sugerem que o metabólito do DEHP (MEHP) pode mimetizar as ações das prostaglandinas, induzindo asma (OIE et al., 1997).

Desreguladores endócrinos como o DEHP, podem mimetizar a ação do estrógeno e/ou antagonizar a ação da testosterona, por meio de mecanismos indiretos, além de alterar níveis hormonais de LH e FSH, prejudicando a fertilidade. Também podem inibir enzimas envolvidas na esteroidogênese (aromatase) ou ativar o mecanismo de catabolismo dos hormônios sexuais, facilitando suas eliminações (MASSAAD et al., 2002; EAGON et al., 1994).

As resinas de PVC que contêm DEHP são amplamente utilizadas. Entram na composição de produtos médico-hospitalares (constituindo de 40 a 60 % em massa destes), como bolsas de sangue (sendo o material que melhor conserva o sangue), tubos para transfusão e hemodiálise, dispositivos flexíveis para administrar soluções parenterais, luvas, artigos cirúrgicos e embalagens para medicamentos (NTP-CERHR, 1982). Essas resinas podem constituir até 50% da massa de produtos infantis como brinquedos para bebês, mordedores e chupetas. Este valor representa um risco significativo para crianças que podem sofrer exposição aos ftalatos. Estudos realizados por agências ambientais de governos europeus mostraram que as crianças, ao colocarem brinquedos flexíveis de vinil na boca, podem ingerir doses tóxicas de ftalatos (KAVLOCK et al., 2002).

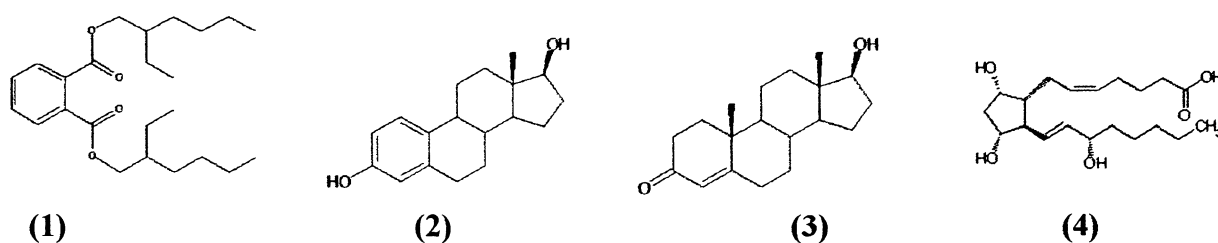
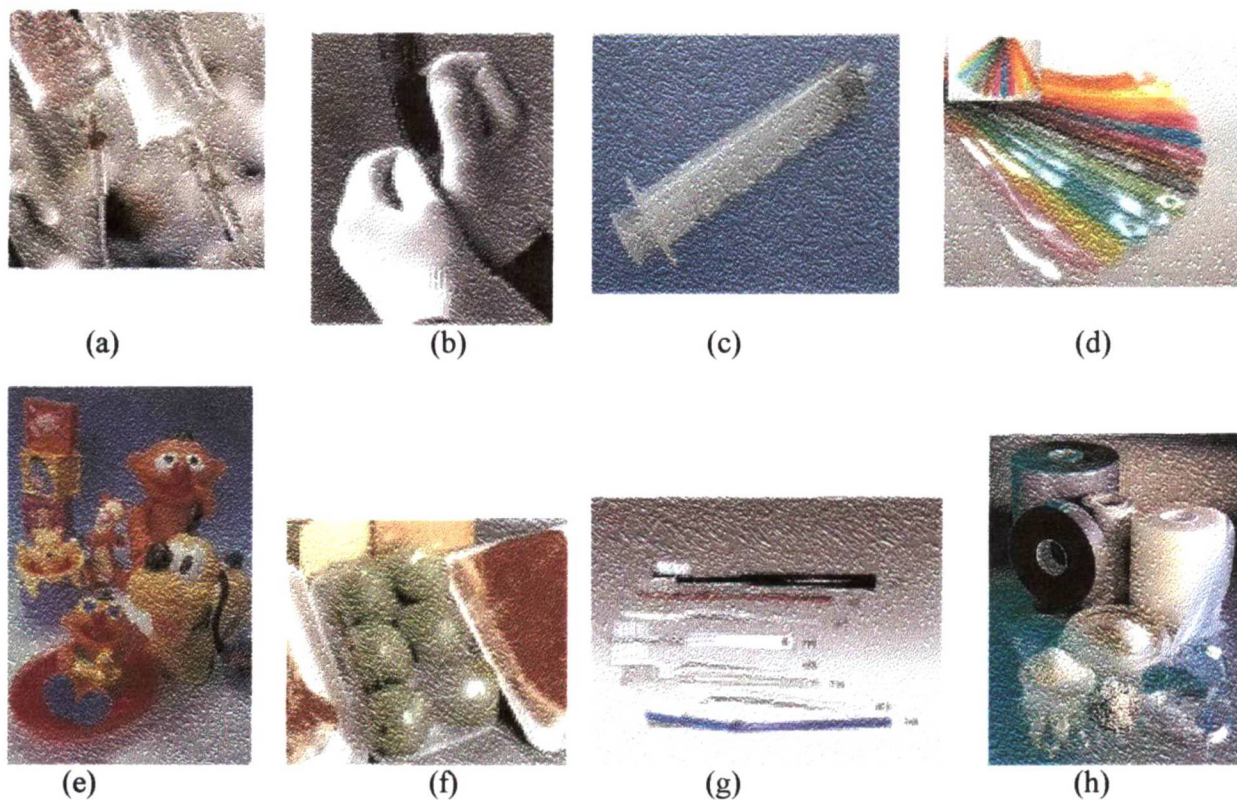


FIGURA 1- ESTRUTURAS MOLECULARES DO DEHP (1), ESTRADIOL (2), TESTOSTERONA (3) E  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (4).

O DEHP também entra na composição de produtos de uso doméstico (Figura 2), toalhas de mesa, cortinas de chuveiro, embalagens para alimentos, cosméticos, materiais impermeáveis, adesivos, colas, componentes de papel, solventes, lubrificantes de superfície, materiais usados na construção (assoalhos, revestimentos), tapetes, revestimentos

poliméricos, papel de parede, tubos e embalagens, cabos, isolamentos, produtos automotivos (estofados e partes em vinil), vestuário (sapatos, capas de chuva), materiais de higiene pessoal e luvas (NTP-CERHR, 1982).



**FIGURA 2- MATERIAIS DE PVC QUE CONTÊM DEHP**

NOTAS: (a) bolsa de plástico para armazenamento de soro fisiológico; (b) luvas; (c) seringa; (d) espátulas de plástico; (e) brinquedos; (f) embalagens para alimentos; (g) escovas dentais; (h) fitas adesivas e filmes.

FONTE: Internet- busca por imagens ([www.google.com.br](http://www.google.com.br)). Acesso: out., 2003

Por imposições legais, a fabricação de produtos infantis com DEHP tem sido reduzida nos últimos anos. Nos Estados Unidos e Canadá, o DEHP não é mais utilizado em brinquedos infantis que podem ser levados à boca (chupetas, chocalhos, bicos de mamadeiras, mordedores), mas ainda é encontrado em brinquedos usados por crianças mais velhas (NTP-CERHR, 1982).

Em 1999, o uso de ftalatos em produtos de uso infantil (que podem ser levados à boca) foi proibido na Europa. Nos últimos anos, embalagens plásticas que envolvem alimentos e produtos infantis anteriormente constituídos por DEHP, têm sido fabricadas com outros tipos de ésteres de ftalato (como os sebacatos e citratos) que apresentam maior

dificuldade em migrar da matriz polimérica de PVC (MARCILLA et al., 2003). Entretanto, muitos produtos ainda apresentam altos teores de DEHP, colocando em risco a saúde humana. Um exemplo é a garrafa térmica para mamadeira, que apresenta 20% do seu massa do ftalato DEHP. Assim, organismos imaturos estão sofrendo exposição contínua ao DEHP, podendo manifestar toxicidade reprodutiva. A conscientização da responsabilidade de eliminar o uso deste éster de ftalato na composição de materiais de PVC compete aos legisladores, produtores e fabricantes da indústria de plásticos.

## 2.4 LIBERAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO DEHP

Os animais e os seres humanos são expostos ao DEHP de várias formas. Os ftalatos foram encontrados em peixes, no tecido adiposo humano e na água (WHO, 1992). Uma das primeiras observações da liberação de ftalatos no meio ambiente, foi a identificação do DEHP em componentes lipídicos de produtos derivados do leite (KAVLOCK et al., 2002).

MIHOVEC-GRDIC et al. (2002) quantificaram a ingestão diária de DEHP na água potável da cidade de Zagreb (Iugoslávia). Menos de 2µg/dia de DEHP é ingerido juntamente com a água, um valor que provavelmente não causa toxicidade humana. Entretanto, como os ftalatos são lipofílicos, podem sofrer bioacumulação, tornando-se biodisponíveis especialmente em pessoas com desnutrição ou debilidade orgânica. Nestas situações clínicas, as reservas de tecido adiposo do organismo podem ser mobilizadas, aumentando a concentração plasmática dos metabólitos tóxicos do DEHP. Além da participação metabólica na toxicidade desencadeada pelos ftalatos, a ingestão adicional destas substâncias, originária de fontes como alimentos, cosméticos, dispositivos médicos ou brinquedos, não pode ser negligenciada.

O comportamento migratório dos plastificantes como o DEHP não está completamente estabelecido. Nos artigos plásticos que contêm o DEHP, este aparece na matriz de PVC, pobremente vinculado à resina, em uma estrutura semelhante a gel ou semi-sólida. Como o plastificante não é ligado quimicamente à matriz polimérica, libera-se com facilidade quando o produto médico entra em contato com fluidos como plasma, sangue, soluções de drogas, podendo ainda ser liberado durante o aquecimento (KAVLOCK et al., 2002; MARCILLA et al., 2002). A quantidade de DEHP que se libera do material depende das condições de estocagem (temperatura e quantidade do fluido que está contido na embalagem, tempo de contato, movimentação do conteúdo ou taxa de escoamento) e da

lipossolubilidade do fluido. Altas temperaturas, ou a movimentação durante procedimentos como autoclavagem e irradiação, aumentam a migração dos plastificantes. Como o DEHP é hidrofóbico, dissolve-se facilmente no sangue total, concentrado de plaquetas, soluções de nutrição parenterais e fluidos contendo lipídios (KAVLOCK et al., 2002).

Grande parte das exposições médicas é intravenosa, por meio da infusão de sangue e hemodiálise. Nesses casos, os pacientes são expostos ao mono-etilhexil ftalato (MEHP), metabólito formado pelo metabolismo do DEHP durante a armazenagem do sangue. A exposição ao DEHP também pode ocorrer por inalação (ventiladores) e ingestão (tubos nasogástricos), em países que não utilizam tubulação de polietileno para tais finalidades. As exposições podem ser curtas, moderadas (como numa única transfusão sangüínea) ou crônicas (hemodiálise) (KAVLOCK et al., 2002). Pacientes adultos que realizam transfusão sangüínea, freqüentemente recebem 36 µg/kg/dia de DEHP (DOULL et al., 1999). Bebês recém-nascidos, sob transfusão sangüínea, estão expostos durante uma única sessão deste procedimento, a concentrações de DEHP e MEHP compreendidas entre 0,8-3,3 e 0,05-0,20 mg/kg, respectivamente. A maior exposição de neonatos ao DEHP decorre da imaturidade de seu sistema metabólico e excretor, favorecendo a acumulação orgânica do ftalato, com possibilidade de toxicidade sistêmica. Altos níveis do DEHP foram encontrados no trato gastrintestinal de bebês prematuros com enterocolite necrozante, e no plasma de neonatos que recebiam transfusões sangüíneas (SJOBERG et al., 1985). A liberação do DEHP das bolsas de sangue pode ser maior que 11,5 mg/100 ml. Em pacientes adultos, altos níveis do ftalato são encontrados no baço, fígado, pulmões, gordura abdominal. Em neonatos, o composto foi encontrado no coração (níveis de 0,66 até 1,27 µg/g) e trato gastrintestinal (de 0,10 até 0,41 µg/g). Pacientes que sofrem hemodiálise são expostos a elevadas concentrações de DEHP e seus metabólitos (maior que 3,1 mg/kg/dia) (KAVLOCK et al., 2002). A exposição ao DEHP pode variar de décimos de miligramas por quilograma de massa corporal (numa única transfusão sangüínea) a dezenas de gramas/ano, nos pacientes de hemodiálise crônica. O DEHP é um potente ativador do complemento. Assim, em pacientes sob tratamentos médicos intensivos (hemodiálise), pode estar ocorrendo a ativação do sistema complemento, pois o DEHP lixiviado dos artigos plásticos médicos pode entrar em contato com o sangue humano (KAVLOCK et al., 2002).

Apesar da importância toxicológica da contaminação humana com o DEHP lixiviado de artigos utilizados em procedimentos médico-odontológicos, a rota de exposição mais provável dos seres humanos ao DEHP ocorre por meio de alimentos. Alimentos de

panificadoras, acondicionados em embalagens contendo entre 16 e 17% de DEHP, apresentam concentrações de 1,7 a 4,5 mg/kg. Os produtos alimentares contêm DEHP na média de 0,25 mg/dia, que migra dos recipientes plásticos durante o processamento e armazenagem dos alimentos (ATSDR, 1993).

MEEK et al. (1994) avaliaram as ingestões diárias de DEHP, em pessoas de diferentes faixas etárias na população do Canadá, constatando que as crianças de 0,5 a 4 anos são expostas às maiores taxas de ingestão diária de DEHP (19 µg/kg/dia), estando sujeitas a efeitos toxicológicos em vários órgãos. A exposição pela dieta pode variar de um País para outro, pois há variabilidade nas técnicas de empacotamento e processamento dos alimentos, modificando o teor de DEHP incorporado nas embalagens. As exposições alimentares decorrem do acúmulo do ftalato por lixiviamento, durante o processamento, empacotamento e armazenamento de alimentos gordurosos como leite e óleos, ricos em DEHP. Como as crianças e adolescentes consomem mais alimentos desta natureza, a exposição ao plastificante pode ser desproporcionalmente alta para eles. O DEHP também pode estar presente em cosméticos (níveis de 0,1% até 28,6%) e repelentes para insetos. Nestes casos, as crianças e adolescentes estariam expostos a níveis diferentes dos adultos. A média da exposição da população em geral, originária de várias fontes, excluindo a ingestão não dietética, médica e ocupacional, varia entre 3 e 30 µg/kg/dia (DOULL et al., 1999).

O DEHP é lançado no meio ambiente durante a produção, distribuição, incorporação na resina de PVC; disposição em aterro industrial e municipal; dejetos de incineração, lixiviamento de produtos durante o uso ou depois de descartado. O lançamento atmosférico possivelmente é o modo mais importante de contaminação ambiental, provocado pelo ftalato (NTP-CERHR, 1982). Devido à sua baixa pressão de vapor e solubilidade limitada na água, as concentrações de DEHP no ar e água são baixas. No ar ambiental, a média de concentração do ftalato é baixa (inferior a 0,002 ppb em áreas urbanas). No ar caseiro, em uma sala recém-pintada ou com piso reformado, o DEHP pode estar presente em níveis elevados (ATSDR, 1993). Apesar da identificação de baixos teores de DEHP no ar, ainda é difícil afirmar se estes valores representam ou não um risco toxicológico para os seres humanos.

O DEHP pode rapidamente sofrer adesão às partículas do solo, sofrendo decomposição por organismos aquáticos, além de ser incorporado por sedimentos e partículas de aerossol, bioacumulando-se em invertebrados, peixes e plantas. A

biodegradação do ftalato ocorre com êxito (durante semanas) em ambientes aeróbios e ricos em nutrientes, mas pode ser lento (durante anos) sob condições anaeróbicas (MEEK et al., 1994).

## 2.5 EFEITOS TÓXICOS RELACIONADOS À EXPOSIÇÃO AO DEHP

### 2.5.1 Efeitos em humanos

Em humanos, a identificação de DEHP em fluidos e tecidos corporais permite avaliar a toxicidade do ftalato. Em adultos, a quantidade de DEHP liberada em cada sessão de hemodiálise pode não ser significativa, mas quando os pacientes sofrem de 100 a 150 tratamentos anuais, é provável que haja acúmulo do ftalato no organismo (KAVLOCK et al., 2002). Casos de rins policísticos em pacientes de hemodiálise foram relacionados ao DEHP. Apesar de uma relação causa-efeito entre estes fenômenos não ser encontrada, a exposição prolongada ao DEHP pode causar cistos renais em humanos e animais (KOBAYASHI et al., 2002; LOFF et al., 2000).

Recentemente, LATINI et al. (2003) detectaram DEHP e MEHP em 88% das amostras de cordões umbilicais de recém-nascidos (concentração média de  $1,19 \pm 1,15$   $\mu\text{g/ml}$  e  $0,52 \pm 0,61$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente). Os neonatos com presença de MEHP no cordão umbilical sofreram partos prematuros, em relação aos neonatos sem o metabólito. Desta forma, a exposição das gestantes ao DEHP pode estar associada a partos prematuros e suas consequências para a saúde do neonato.

Além de efeitos sobre organismos imaturos, o DEHP pode reduzir a mobilidade de espermatozóides, aumentar a peroxidação lipídica de hemácias (com conseqüente hemólise), causar danos oxidativos e alterações imunológicas em humanos (WONG et al., 2002; SEO et al., 2003). Outros estudos mostram casos de distúrbios gastrintestinais, redução no teor de vitaminas no sangue, polineurite, polineuropatias sensoriais e motoras, com redução na quantidade de trombócitos, leucócitos e hemoglobina em trabalhadores expostos ao DEHP (US EPA, 1996). Muitos efeitos tóxicos do DEHP podem ser relacionados à indução de proliferação de peroxissomos. Os peroxissomos são organelas celulares envolvidas na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, produção de radicais hidroxil e superóxido, patofisiologia de lesões causadas por radicais livres. As enzimas antioxidantes (catalase,

superóxido dismutase e glutathione peroxidase) estão presentes nos peroxissomos, protegendo-os de danos oxidativos (WONG et al., 2002; SEO et al., 2003).

Na condição patológica de hiperóxia ou injúria de isquemia-reperfusão, há excesso de geração de radicais livres, agentes ativos na patogenia de doença crônica pulmonar, retinopatia, síndrome da dificuldade respiratória em bebês prematuros, muitas vezes responsáveis pela morte dos bebês. Como o DEHP é lipossolúvel e a maior parte do surfactante pulmonar é constituída de lipídios, o ftalato pode se solubilizar na membrana surfactante da parede dos alvéolos, interferindo na secreção e trocas de surfactante, dificultando a respiração em organismos prematuros. O DEHP pode ativar o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR), induzindo a proliferação de peroxissomos, que é acompanhada pela superprodução de espécies reativas de oxigênio e redução na produção de enzimas antioxidantes. Desta forma, há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a detoxificação celular, causando estresse oxidativo nas células (DOULL et al., 1999; CORTON et al., 1997; SEO et al., 2003). Os proliferadores de peroxissomos são hepatocarcinógenos para os roedores, mas a responsividade humana aos efeitos hepatotóxicos dos proliferadores peroxissomais é baixa. Os efeitos destas substâncias são mediados pelo PPAR, que podem estar inativos ou encontrados em quantidade reduzida nos seres humanos (ROBERTS et al., 1999; DOULL et al., 1999). Apesar da baixa probabilidade dos seres humanos desenvolverem cânceres hepáticos induzidos pelo DEHP, podem sofrer alterações imunológicas, pulmonares (hiperresponsividade brônquica), relacionadas aos danos oxidativos causados pelo DEHP (WONG et al., 2002; SEO et al., 2003). A semelhança molecular existente entre DEHP e prostaglandinas pode explicar os efeitos do MEHP na patogenia da asma, pois o metabólito mimetiza prostaglandinas nos pulmões, aumentando a possibilidade de reações inflamatórias nas vias aéreas (OIE et al., 1997).

O DEHP causa baixa toxicidade aguda, pois sua  $DL_{50}$  (dose capaz de causar morte em 50% dos organismos expostos) por via oral, tópica ou intraperitoneal, em animais experimentais, varia de 14 a 50 g/kg. Quando administrado por via intravenosa, a  $DL_{50}$  é inferior (200 mg/kg). O DEHP, administrado por via intravenosa não sofre passagem pelo fígado (metabolismo de primeira passagem responsável pela redução na biodisponibilidade do composto quando é administrado pela via oral, por exemplo). Os pacientes sob cuidados médicos podem apresentar sinais tóxicos relacionados à exposição ao DEHP (LATINI, 2000).

Os bebês neonatos têm deficiências nos processos metabólicos e excretores, como reações de oxidação e glicuronidação, devido à imaturidade hepática. A ação tóxica do DEHP é dose e idade-dependente. O risco potencial de exposição é maior para crianças (fase sensível de desenvolvimento) e mulheres grávidas. As diferenças metabólicas explicam a maior sensibilidade das crianças em relação aos adultos, diante da exposição ao DEHP. Nos humanos, cerca de 60% da dose de DEHP administrada é excretada como glicuronídeos, originários das reações metabólicas de conjugação sofridas pelo ftalato. A reduzida capacidade metabólica infantil, via glicuronidação, facilita a manifestação de toxicidade pelo ftalato (WITORSK et al., 2002). No organismo infantil, há um atraso na excreção de DEHP e seus metabólitos, podendo afetar o fígado (colestase).

As diferenças enzimáticas nas crianças também estão envolvidas com a toxicidade causada pelo DEHP. A atividade da lipase gástrica (facilitadora da digestão lipídica), atinge pico entre 28 e 33 semanas de idade. Desta forma, organismos imaturos podem converter DEHP em MEHP mais eficientemente do que as crianças mais velhas ou adultos. A produção de enzimas hepáticas pode estar ausente, reduzida ou aumentada em vários estágios do desenvolvimento. O sistema nervoso central, o trato gastrointestinal, o sistema imunológico e sistemas enzimáticos microssomais, também sofrem alterações anatômicas e fisiológicas na infância. Deste modo, a imaturidade orgânica pode permitir uma elevada exposição ao DEHP em relação ao organismo adulto (WITORSK et al., 2002). A maior permeabilidade intestinal infantil, facilita a absorção de grandes quantidades de DEHP do trato gastrointestinal, relacionando-se também com a toxicidade. Em humanos, a barreira hemato-testicular infantil forma-se pouco antes puberdade. Pela elevada permeabilidade desta barreira nas fases iniciais de desenvolvimento, as crianças podem sofrer toxicidade testicular (WITORSK et al., 2002).

A exposição de seres humanos e animais ao DEHP, em qualquer etapa do desenvolvimento, desde a fase gestacional até o organismo adulto, pode causar efeitos tóxicos (LATINI et al., 2003; STEINBERGER et al., 1992). Considerando as informações da Organização Mundial da Saúde, sobre os possíveis efeitos carcinogênicos do ftalato em seres humanos, a exposição prolongada, ao longo da vida, a baixas concentrações de desreguladores endócrinos como o DEHP não deve ser ignorada, mesmo que os níveis de ftalatos identificados em amostras de alimentos (ou água potável) sejam insuficientes para causar toxicidade humana.

Apesar de existirem evidências sobre as concentrações de DEHP em fluidos corporais humanos, é difícil avaliar a toxicidade orgânica decorrente da presença tecidual do DEHP. Mesmo que os resultados obtidos em estudos com animais mostrem toxicidade, a extrapolação das informações de uma espécie para outra não é confiável. São necessários mais estudos sobre a toxicidade humana causada pelo DEHP, pelo aprimoramento dos métodos de quantificação do ftalato e seus metabólitos em fluidos orgânicos (GRAY et al., 2002). Desta forma, é inquestionável a importância da avaliação da toxicidade do DEHP, devido à contaminação ambiental provocada por este plastificante, além das suas características moleculares relacionadas à toxicidade.

### 2.5.2 Efeitos em animais

Estudos de toxicidade, com doses administradas a roedores (por via oral), demonstram que os principais órgãos-alvo do ftalato são fígado, rins e testículos. Em roedores, há relatos de manifestações tóxicas como hiperreatividade brônquica, asma, constrição e edema pulmonar, teratogênese e toxicidade reprodutiva, causadas pelo DEHP (DAVIS et al., 1994 a; OIE et al., 1997; DALGAARD et al., 2001). Dentre as alterações pulmonares, destaca-se a infiltração e degranulação de leucócitos polimorfonucleares, originando lesões histologicamente semelhantes às patologias pulmonares induzidas por proteases. Alterações em macrófagos alveolares, provocadas pelo DEHP, também foram documentadas. Em experimentos *in vivo*, o DEHP aumenta a liberação de enzimas lisossomais a partir de macrófagos alveolares, produção e liberação de espécies reativas de oxigênio por estas células, podendo causar danos pulmonares e enfizema (BALLY et al., 1980; SEO et al., 2003). Além da toxicidade sobre o sistema imunológico, foram relatados efeitos adversos causados pelo DEHP nos testículos e fígado, durante a gestação e lactação (ARCADI et al., 1998; PARMAR et al., 1986), criptorquidismo (exposição pré-natal ao DEHP) e reatividade comportamental acima do normal, relacionada a alterações na tireóide. Nos rins, o DEHP está relacionado à doença policística, nefrite, redução na função e na viabilidade das células formadoras do epitélio renal, indução de proliferação de peroxissomos renais, aumento no massa do órgão e alterações enzimáticas (POON et al., 1997; KAVLOCK et al., 2002).

Camungongos mais que receberam DEHP pela água (doses de 325 µL/L; 32,5 µL/L) na fase gestacional e lactacional, tiveram sua progênie avaliada quanto aos possíveis

efeitos tóxicos do ftalato. Os descendentes apresentaram alterações renais (glomerulonefrite, dilatação de túbulos renais, fibrose), hepáticas (edema da veia centrolobular e espaço porta hepático), testiculares (desorganização do epitélio dos túbulos seminíferos, morfologia celular alterada, lúmen tubular com depósitos celulares, atrofia unilateral e bilateral) (ARCADI et al., 1998). Sobre o sistema cardiovascular de roedores, o DEHP pode agir como estressor, causando redução no débito cardíaco e hipotensão (WONG et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2002).

Os monoésteres formados *in vivo*, pela ação de esterases não-específicas na mucosa intestinal e outros tecidos, podem causar reduções no conteúdo de zinco das gônadas (elemento essencial ao correto funcionamento dos órgãos), induzem toxicidade reprodutiva (KAVLOCK et al., 2002). O DEHP e o MEHP podem contribuir na toxicidade testicular em roedores por meio da inibição da fosfolipase A<sub>2</sub>, depleção do ferro testicular e alteração no *status* antioxidante. Desta forma, os efeitos tóxicos testiculares vistos em roedores expostos ao DEHP, podem ocorrer nos pacientes expostos ao ftalato (NTP-CERHR, 1982).

Os ftalatos causadores de toxicidade testicular produzem alterações na ultra-estrutura e função das células de Sertoli (RICHBURG et al., 2002; AKINGBEMI et al., 2001). Algumas funções destas células são mediadas pela interação de FSH com receptores da membrana. RICHBURG et al. (2002), demonstraram que o MEHP desregula a interação do FSH no receptor localizado na célula de Sertoli. Como nos animais púberes o FSH é importante para o início do processo espermatogênico, a exposição ao DEHP pode reduzir a responsividade da célula de Sertoli testicular aos estímulos de FSH, hormônio essencial para a iniciação e manutenção da espermatogênese. Desta forma, com relação à toxicidade testicular de ésteres de ftalatos específicos, os ratos em idade pré-púbere são mais sensíveis do que os sexualmente maduros. Analogia semelhante pode ser realizada com crianças e adolescentes enfermos do sexo masculino, expostos a altos níveis do DEHP ao sofrerem procedimentos médicos intensivos (transusão de sangue ou hemodiálise).

O DEHP apresenta baixa toxicidade quando administrado por via oral. Alguns indicadores de toxicidade são a LOEL e NOEL-dose. A *Low Observed Effect Level* (LOEL) é a dose na qual os efeitos adversos são observados primeiramente, e a *No Observed Effect Level* (NOEL) corresponde à maior dose que ainda não produz sinais de toxicidade. Para ratos, a NOEL-dose do DEHP é de 0,06 % de massa corporal/dia, administrado em dois anos. Porém, não foram observadas modificações no tempo médio de vida de ratos

alimentados com doses 10 vezes maiores que o valor da NOEL. Nos ratos, a LOEL-dose do ftalato é de 0,02% massa corpora/dia, administrada em 2 anos (KAVLOCK et al., 2002).

A toxicidade aguda do DEHP em humanos é provavelmente baixa, mas as conseqüências da exposição crônica ainda não foram investigadas (LATINI et al., 2003). Entretanto, estudos crônicos com animais caracterizam o desenvolvimento de carcinomas hepáticos celulares, efeitos complexos nas atividades das enzimas hepáticas e alterações no metabolismo de lipídios, causados pelo DEHP e seus metabólitos. A toxicidade hepática causada pelo DEHP manifesta-se por meio do aumento na massa do órgão, carcinomas e adenomas, nódulos neoplásicos e alterações enzimáticas, em ratos expostos a altas doses de DEHP (NTP-CERHR, 1982).

Não há informações disponíveis dos efeitos crônicos do DEHP nos humanos, ou sobre os efeitos carcinogênicos deste composto em seres humanos. Animais expostos ao DEHP por meio da inalação, não mostraram toxicidade reprodutiva ou no desenvolvimento. Entretanto, após administração via oral, o composto causa defeitos congênitos nos roedores, redução na fertilidade, na proporção de filhotes vivos ao nascimento, além de atrofia nos túbulos seminíferos (MOORE et al., 2001).

O DEHP e seus metabólitos podem atuar como promotores tumorais, causando alterações genéticas características do processo carcinogênico induzido pelo ftalato (KAVLOCK et al., 2002). Os ratos jovens são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do DEHP e seus metabólitos do que os ratos adultos, pelas diferenças farmacocinéticas que aumentam a biodisponibilidade dos compostos tóxicos, nos animais imaturos (AKINGBEMI et al., 2001). Apesar do crescente número de estudos sobre a toxicidade animal do DEHP, seus efeitos não podem simplesmente ser transferidos para os seres humanos.

## 2.6 FARMACOCINETICA DO DEHP

Ftalatos como o DEHP podem elicitar ações hormonais devido às elevadas concentrações em que são encontrados no organismo (acumulação no tecido adiposo), aumentando sua biodisponibilidade (ASAI et al., 2000). Muitos ftalatos são metabolizados em monoésteres, após administração via oral. A absorção do DEHP por seres humanos é menor em relação aos ratos, sendo semelhante à taxa de absorção de macacos. Assim, pela semelhança existente entre o organismo de humanos e macacos, os eventos tóxicos

evidenciados nestes animais podem servir de referência e alerta aos humanos, no estudo da toxicidade do DEHP (KAVLOCK et al., 2002). A metabolização do DEHP, em seres humanos, produz os compostos MEHP, 2-EH (álcool 2-etil hexílico) e ácido ftálico, detectados na urina (Figura 3).

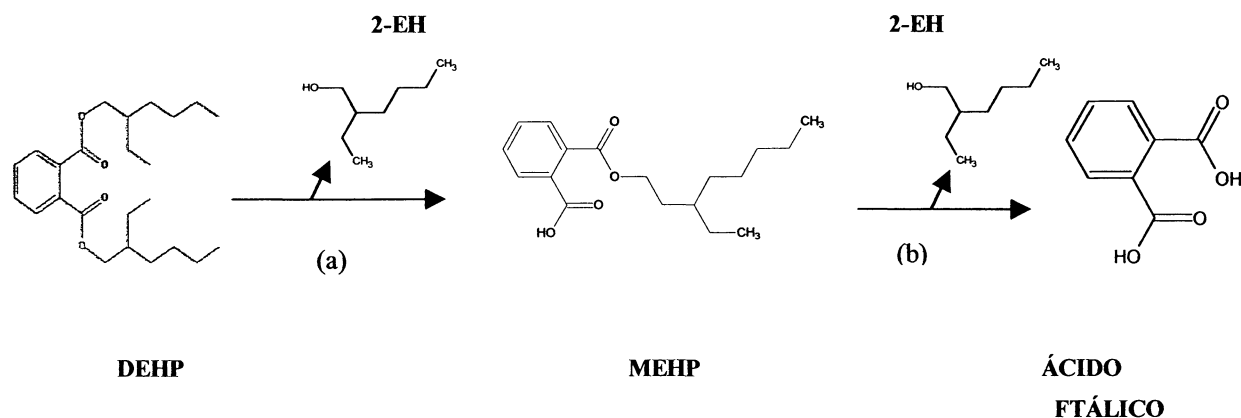


FIGURA 3- METABOLISMO DO DEHP

NOTAS: (a) hidrólise do DEHP em MEHP, pela ação de lipases gástricas, liberando o álcool 2-etil hexílico; (b) hidrólise do MEHP em ácido ftálico, novamente liberando o álcool 2-etil hexílico

O DEHP tem meia-vida de 12 horas, após uma dose única (US EPA, 1987). Em seres humanos saudáveis, os metabólitos do DEHP são rapidamente excretados (24 horas), pelos rins (90%), como produtos de oxidação conjugados (glicuronídeo) de MEHP nas fezes (10%).

A hidrólise do MEHP é catalisada pelo sistema do citocromo P<sub>450</sub> e ocorre nos microsomas hepáticos (em roedores) (DOULL et al., 1999). O MEHP é o principal metabólito produzido em pessoas com saúde normal, mas nos pacientes com insuficiência renal, altos níveis de ácido ftálico podem ser identificados na urina (devido à alta solubilidade do metabólito em água), indicando que o principal metabólito excretado é o ácido ftálico. Os pacientes saudáveis provavelmente não sofrem toxicidade. Entretanto, os pacientes com função renal alterada submetidos à hemodiálise, ou bebês de baixa massa corporal ao nascimento, sofrem exposição aumentada ao DEHP e seus metabólitos, excretados na urina, após sofrerem reações metabólicas de conjugação. Em crianças, há redução na eliminação do MEHP, facilitando a manifestação de efeitos tóxicos advindos da bioacumulação deste metabólito, devido à imaturidade dos mecanismos responsáveis pela eliminação (SJOBERG et al., 1985).

Após administração por via oral, o DEHP e seus metabólitos são distribuídos primeiramente para o plasma, fígado, rins, trato gastrointestinal e tecido adiposo. As maiores concentrações de DEHP e MEHP foram encontradas no sangue e tecidos, 6-24 horas após uma dose única oral de 9,8 g/kg (US EPA, 1987). Estudos em ratos indicam que o DEHP é removido rapidamente dos tecidos em relação ao monoéster, com meia vida de 1,5 horas para o tecido pulmonar, 28,4 horas para o fígado e 156 horas para o tecido adiposo do epidídimo. O MEHP tem meia-vida de 32 horas no fígado, 68 horas no tecido adiposo do epidídimo e 50 horas no testículo, em comparação ao DEHP, que tem meia-vida de 8,3 horas no testículo (US EPA, 1987). O composto é encontrado em alta concentração nos testículos de animais. Como o DEHP é lipossolúvel, não sofre metabolização no tecido adiposo, ficando retido por mais tempo neste tecido, o que causar efeitos tóxicos (US EPA 1987). O tecido testicular não metaboliza o MEHP, havendo acumulação testicular do metabólito em animais tratados com DEHP por via oral (OISHI et al., 1990).

Nas reações de biotransformação do DEHP no organismo, não há evidência da transformação da parte aromática da molécula de DEHP, ou da oxidação das cadeias laterais do DEHP intacto. A formação de monoéster a partir do diéster original é provocada por lipases localizadas principalmente no fígado, pulmões, intestino e pâncreas (KAVLOCK et al., 2002).

Uma diferença existente entre hormônios esteroidais naturais e desreguladores endócrinos pode explicar os efeitos tóxicos cumulativos do DEHP. Os hormônios esteroidais naturais ligam-se às proteínas plasmáticas como a SSBG (globulina de ligação aos hormônios esteroidais). Estas proteínas são necessárias para o transporte de hormônios (hidrofóbicos) e determinam as concentrações biodisponíveis dos hormônios livres. Os desreguladores endócrinos como o DEHP e seus metabólitos ligam-se fracamente à SSBG. Assim, a concentração disponível dos desreguladores endócrinos, em estado livre, fica relativamente elevada, favorecendo a manifestação de efeitos tóxicos no organismo. A meia-vida dos hormônios esteroidais é limitada pelo eficiente metabolismo mediado pelo citocromo P<sub>450</sub>. Os desreguladores endócrinos têm estabilidade maior, sendo eliminados em nível inferior aos hormônios esteroidais. Desta forma, exposições crônicas de animais ao DEHP podem causar efeitos tóxicos cumulativos (MASSAAD et al., 2002).

Em bebês recém-nascidos, o DEHP pode ser redistribuído para vários tecidos, sendo encontrado em altas concentrações no coração e trato gastrintestinal de neonatos prematuros que receberam transfusões sanguíneas. O tempo necessário para que a

concentração do DEHP se reduza à metade (meia-vida) no sangue humano é de 28 minutos (KAVLOCK et al., 2002). Estudos realizados com a marcação do DEHP com  $^{14}\text{C}$ , mostram a distribuição tecidual do ftalato (exceto no cérebro). Em ratos expostos ao composto por via oral, altas concentrações foram detectadas nos pulmões, fígado e rins. Estudos em ratos (KAVLOCK et al., 2002) indicam que 80% do DEHP marcado com  $^{14}\text{C}$  foi excretado na urina e fezes dentro de 5 a 7 dias. O total de  $^{14}\text{C}$  na urina foi maior que nas fezes, sendo que cerca de 5% da dose foi excretada na bile. Em ratos que receberam DEHP marcado com  $^{14}\text{C}$ , por via oral (100 mg/kg massa corporal), a excreção foi coletada por 6 dias e 62% foi excretado nas fezes, 30% na urina 4% pelo ar (KAVLOCK et al., 2002). Menos que 2% da dose permaneceu nos tecidos. No plasma, o DEHP tem meia vida de 10 a 18 horas, enquanto o MEHP de 3 a 6 horas (DOULL et al., 1999). Após administração (por via oral) em ratos, o pico plasmático do MEHP ocorreu em 1 a 3 horas. O DEHP é rapidamente hidrolisado a MEHP pelas lipases intestinais, sendo absorvido como monoéster e 2-EH. Em primatas, incluindo humanos, uma pequena fração do DEHP é hidrolisada e absorvida como monoéster, aparentemente pela menor atividade da lipase no intestino dos primatas. Os humanos excretam o monoéster como glucuronídeo, e os roedores metabolizam estes intermediários (SJOBERG et al., 1985). A retenção do composto em órgãos e tecidos não é significativa nos animais, com menos de 1% da dose retida após poucos dias de administração. O DEHP pode ser hidrolisado a monoéster e álcool por lipases no fígado e pulmão, podendo atravessar a placenta, sendo secretado no leite de ratas na lactação (DOULL et al., 1999). A farmacocinética de organismos imaturos é deficiente, pois os mecanismos de glicuronidação são imaturos até os 3 meses de vida (KAVOLCK et al., 2002). Esta evidência científica pode explicar a maior vulnerabilidade destes organismos diante da toxicidade dos ésteres de ftalato. Neste exemplo de farmacocinética, pode-se compreender a importância do estudo da farmacocinética do DEHP, para facilitar o entendimento da toxicidade.

## 2.7 LEGISLAÇÃO DO DEHP

Há um Projeto de Lei nº 4.290, de 2001 (proposto pela Deputada Iara Bernardi PT/SP), que proíbe a importação, fabricação e comercialização de artigos infantis de PVC maleável que contenham DiNP ou DEHP. O artigo 1º trata da proibição da importação, fabricação e comercialização, em todo o território nacional, de produtos destinados ao

público infantil confeccionados em PVC maleável que contenham DiNP e DEHP. O artigo 2º esclarece que a desobediência ao disposto, no artigo primeiro, sujeita o infrator a multas a serem estipuladas quando da regulamentação desta lei. O artigo 3º discorre sobre a lei, que entraria em vigor da data de sua publicação. Entretanto, o projeto de lei foi rejeitado na Comissão de Economia, Indústria e Comércio (CEIC), em 2002, com parecer do relator Chico Sardelli (PFL- SP).

Diversas organizações ambientalistas vêm alertando a população mundial sobre os riscos do uso do PVC. A utilização do material é perigosa pela liberação de dioxina, mas também pelo emprego de ftalatos na produção de PVC maleáveis. Atualmente, a União Européia considera o DEHP como um composto potencialmente carcinogênico, capaz de prejudicar a fertilidade, causar danos fetais, irritar os olhos, sistema respiratório e a pele humana. Nos Estados Unidos, os fabricantes já eliminaram estes ftalatos encontrados em mordedores, chocalhos e chupetas, produtos que podem ser levados à boca. A proibição do uso de ftalatos deve ser mais ampla, abrangendo o DiNP além do DEHP, para evitar seus usos em artigos destinados ao público infantil. Até que novas pesquisas científicas comprovem a ausência, ou não, de toxicidade humana associada a esses compostos, a proibição do uso destes ésteres de ftalato deveria ser mais rígida. Como 90% da produção brasileira de brinquedos utiliza materiais plásticos, e desse total, 40% é PVC, é inadmissível que as crianças brasileiras fiquem expostas a tais compostos com potenciais efeitos tóxicos. As ações e as iniciativas governamentais, referentes a brinquedos feitos em PVC estão apresentadas na Tabela 3 (DI GANGI et al., 1998).

TABELA 3- AÇÕES E INICIATIVAS GOVERNAMENTAIS REFERENTES A BRINQUEDOS FEITOS EM PVC.

País	Ação
Áustria	O uso de ftalatos em brinquedos infantis foi proibido em 1998.
Bélgica	Em 1997 o Ministro da Saúde Pública proibiu a fabricação de brinquedos com PVC destinados à mastigação infantil.
Canadá	A autoridade <i>Health</i> Canadá advertiu os pais a descartarem brinquedos feitos em PVC que poderiam ser sugados ou mastigados por crianças, devido ao potencial risco para a saúde infantil.
Dinamarca	Em 1999, o uso de ftalatos presentes em brinquedos e artigos destinados a crianças com menos de três anos foi proibido.
Finlândia	O governo finlandês proibiu o uso de cinco aditivos contendo ftalato, em brinquedos e produtos feitos em PVC, destinados ao uso infantil.
França	Em 1999, foi proibida a venda, importação e exportação de artigos infantis (confeccionados com PVC contendo ftalatos), que podem ser levados à boca.

País	Ação
Alemanha	Em 1999, o Ministro de Saúde da Alemanha, notificou à Comissão Europeia sobre a proibição do uso de ftalatos em chupetas e brinquedos infantis.
Grécia	Em 1999, foi proibida a importação e venda de brinquedos feitos em PVC, destinados a crianças.
Itália	Em 1998, resoluções contrárias ao uso de PVC em brinquedos foram aprovadas. Em 1999 foi proibido o uso dos ftalatos em brinquedos infantis.
México	Em 1998, o Ministério da Saúde interrompeu a importação de brinquedos feitos com PVC.
Filipinas	Em 1997, foi recomendado o uso de produtos alternativos ao PVC, evitando a comercialização de artigos infantis contendo ftalatos.
Noruega	Em 1998 a Agência de Proteção Ambiental Norueguesa proibiu o uso de ftalatos em brinquedos infantis
Suécia	Em 1998, a Suécia notificou a Comissão Europeia sobre a proibição do uso de ftalatos e outros aditivos químicos em brinquedos infantis.
EUA	Em 1998, a Comissão de Segurança de Produtos de Consumo (CPSC) interrompeu a fabricação de brinquedos para mastigação contendo ftalatos, solicitando a retirada destes produtos do mercado.
Países Baixos	Em 1997, o Ministro do país intimou os fabricantes de artigos infantis feitos com PVC, a abandonarem comércio de brinquedos que contivessem PVC, para evitar a exposição desnecessária de bebês aos ftalatos.

## 2.8 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA

A toxicologia reprodutiva é uma área de atuação que investiga a possibilidade de danos no aparelho reprodutor, causados por diferentes agentes químicos. Os efeitos adversos promovidos por tais substâncias podem ser induzidos diretamente, por meio de alterações na produção de sêmen ou indiretamente, por interferências na homeostase de hormônios sexuais.

Muitos eventos críticos, dependentes da influência de andrógenos, ocorrem durante o desenvolvimento inicial do sistema reprodutivo em machos. Uma possível desregulação endócrina nesta fase, causada por agentes antiandrogênicos, por exemplo, pode resultar em disfunções ou efeitos irreversíveis, como a feminização de organismo do sexo masculino. As alterações fisiológicas da fase pré-púbere evidenciam sua importância, no estudo dos efeitos de substâncias que podem desregular o sistema endócrino (AKINGBEMI et al., 2001).

As substâncias com potencial desregulador endócrino também podem afetar o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino. Muitos processos essenciais para o desenvolvimento das fêmeas podem ser alterados pela exposição a substâncias com potencial

estrogênico fraco como o DEHP, prolongando a duração dos ciclos estrais e alterando o período natural de ocorrência da ovulação em fêmeas (DAVIS et al., 1994 a).

A saúde reprodutiva humana sofreu modificações nos últimos 30-50 anos. A contagem espermática humana, por exemplo, sofreu redução de 35-50% (CARLSEN et al., 1992). Estas mudanças podem estar relacionadas ao aumento da exposição aos estrógenos ambientais, durante a vida fetal ou infância, causando efeitos adversos (KAVLOCK et al., 2002). Além de realizar estudos epidemiológicos em várias espécies animais, as agências regulatórias nacionais e internacionais têm interesse em pesquisar substâncias químicas na toxicologia reprodutiva. Estas organizações procuram identificar os efeitos e prováveis mecanismos de ação das substâncias com atividade hormonal. Utilizando experimentos toxicológicos, descritos e padronizados em protocolos propostos por estas organizações, os efeitos de muitos compostos suspeitos de apresentarem atividade desreguladora endócrina podem ser avaliados. Nestes experimentos, os animais podem ser expostos ao composto suspeito por meio de ração, água ou gavagem (KAVLOCK et al., 2002). Nos estudos de toxicologia reprodutiva, os coelhos e roedores são os animais mais utilizados, pelo curto período de gestação e à facilidade de criação e manutenção nas condições de laboratório. Dentre os roedores, os ratos são preferencialmente utilizados pelo seu adequado tamanho, processos reprodutivos bem estabelecidos e uso geral em estudos toxicológicos (AMANN et al., 1982; ZENICK e CLEGG, 1989). A exposição de animais nas fases gestacional e lactacional, por exemplo, permite avaliar efeitos tóxicos de desreguladores endócrinos sobre o desenvolvimento pós-natal da progênie, avaliando-se massa corporal de órgãos, histologia de órgãos sexuais, morfologia espermática e comportamento sexual.

Neste contexto, muitas agências regulatórias internacionais têm proposto várias modalidades de protocolos para a detecção de substâncias interferentes no sistema endócrino. A Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (US EPA), estabeleceu um comitê para desenvolvimento de um programa de triagem e teste de substâncias desreguladoras endócrinas (EDSTAC, 1998). O comitê, em seu último relatório, recomenda a realização de baterias de triagem (para detectar substâncias com potencial de interferência endócrina) e de testes (para avaliar os riscos associados à exposição a tais substâncias) (EDSTAC, 1998; GRAY, 1998).

Os ensaios *in vivo* e *in vitro* compõem a bateria de triagem. Os ensaios *in vitro* são úteis na detecção de substâncias que têm ação direta nos receptores hormonais, mas não consideram os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos orgânicos. Os ensaios *in vivo*

podem detectar substâncias atuantes por mecanismos não relacionados diretamente aos receptores, como a interferência na síntese, metabolismo e liberação hormonal (EDSTAC, 1998; BAKER et al., 2001). O teste uterotrófico e o teste de Hershberger são os dois principais ensaios *in vivo* de curta duração, utilizados para triar substâncias desreguladoras endócrinas. O teste uterotrófico detecta a capacidade de um composto químico estimular ou inibir as respostas estrogênicas do útero. O teste de Hershberger detecta a capacidade de uma substância química estimular ou inibir as respostas androgênicas de órgãos como próstata e vesícula seminal (EDSTAC, 1998; BAKER et al., 2001).

É importante seguir as orientações das organizações nacionais e internacionais que regulamentam os procedimentos de avaliação toxicológica. Seguindo as recomendações dos protocolos propostos por organizações governamentais, ou até mesmo pelas ONGs, podem ser obtidos resultados mais facilmente aceitáveis pela comunidade científica. Os resultados de investigações de toxicidade, em animais expostos em apenas uma das fases do desenvolvimento corporal ou reprodutivo, não podem ser considerados conclusivos, pois uma substância pode não ser tóxica para a progenitora, mas causar efeitos adversos sobre a prole (SANTANA et al., 2002). Desta forma, é essencial observar a existência ou não de analogia estrutural entre estruturas químicas dos compostos desreguladores endócrinos e hormônios naturais, pois permite entender os prováveis mecanismos de ação dos compostos tóxicos. Assim, a toxicidade reprodutiva de muitas substâncias suspeitas de desregular o sistema hormonal pode ser estudada.

## 2.9 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os agentes químicos capazes de interferir pelos mais variados mecanismos no sistema endócrino, são chamados de desreguladores endócrinos (Figura 4). A Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (US EPA), define-os como agentes exógenos capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (US EPA, 1997).

Nos Estados Unidos, a associação entre contaminação química do meio ambiente e a gênese de doenças, alterações reprodutivas e morte em animais selvagens, existe desde 1947. Nesta época, os ornitologistas associaram o fenômeno do declínio da população da águia americana com alterações comportamentais no acasalamento. A partir de então, um

número crescente de casos sobre a contaminação de rios com bisfenispolioclorados (PCBs), na região dos Grandes Lagos (década de 60), DDT (Lago Ontário, década de 70) e dioxinas (Lago Apopka, década de 80) foi relacionado a problemas reprodutivos e no desenvolvimento de animais (MARKEY et al., 2003). Recentemente foi determinada a toxicidade materna do glifosato (herbicida), quando administrado (via oral) a ratas na fase gestacional, além de alterações esqueléticas e teratogenia na progênie exposta (DALLEGRAVE et al., 2003).

O desenvolvimento tecnológico nos países em industrialização muitas vezes é realizado às custas de agressões ao meio ambiente. As questões ambientais estão assumindo uma nova importância, pois as mulheres grávidas, crianças e adolescentes podem estar sofrendo exposição a muitos poluentes ambientais, manifestando toxicidade (WITORSH et al., 2002). As exposições ocupacionais aos desreguladores endócrinos podem causar infertilidade, subfertilidade, abortos espontâneos, teratogenia e malformações congênitas, mutagênese e defeitos hereditários, cânceres do tipo genital ou de mama, em seres humanos (COLBORN et al., 1993; SONNENSCHNEIN et al., 1998). A exposição humana acidental aos pesticidas, organoclorados, dioxinas e PCBs pode causar dificuldades no aprendizado, problemas comportamentais, supressão do sistema imune e ginecomastia (MASSAAD et al., 2002; EERTMANS et al., 2003). Apesar de muitas evidências serem identificadas em animais, é difícil estabelecer uma relação causal entre a exposição a um contaminante químico ambiental específico e efeitos adversos na saúde reprodutiva humana (SHARPE et al., 1994; BAKER et al., 2001). Muitas anormalidades no desenvolvimento do sistema reprodutor podem ocorrer com compostos que se ligam aos receptores estrogênicos, interferentes na produção ou ação de estrogênios (OKUBO et al., 2003; EERTMANS et al., 2003). Nos humanos, a exposição a compostos estrogênicos (fase gestacional), causou sérios problemas reprodutivos. Vários casos de adenocarcinomas vaginais foram relatados nas filhas das mulheres grávidas que utilizaram o dietilestribestrol (DES) na década de 50 a 70 para evitar abortos. O DES também foi responsável por malformações testiculares, cistos no epidídimo e espermatozóides anormais na progênie masculina (EERTMANS et al., 2003). A partir destes exemplos, fica evidente a sensibilidade (tanto de seres em formação, quanto de recém-nascidos) aos compostos com atividade hormonal.

Algumas substâncias capazes de desregular o sistema endócrino incluem pesticidas (endossulfano, dicofol, vinclozolin), esteróides (17- $\beta$ -estradiol), fito-estrógenos (genisteína, sitosterol, coumestrol), substâncias químicas industriais e poluentes (PCBs, bisfenol-A,

clorofórmio, ftalatos como DEHP, DBP, BBP, DiNP) (DAMGAARD et al., 2002; SONNENSCHNEIN et al., 1998). Mais de 80.000 substâncias químicas são suspeitas de desregular o sistema endócrino. Entretanto, apenas uma fração delas deve passar por um processo de triagem, pois as substâncias priorizadas são aquelas que interagem com receptores hormonais (GRAY et al., 2002). Nos homens, os estrógenos ambientais podem afetar o desenvolvimento de células de Sertoli testiculares (secretam hormônios reguladores de produção espermática), interferindo na época da descida dos testículos e no desenvolvimento da uretra (EERTMANS, 2003; GRAY et al., 2002). A exposição humana aos estrógenos ambientais, nas fases críticas do desenvolvimento, pode causar aumento na incidência de câncer de próstata e testículo, redução nas contagens espermáticas e volume espermático. Os seres humanos são expostos aos desreguladores endócrinos, a níveis semelhantes aos relacionados com toxicidade em animais experimentais. Um exemplo é a identificação de níveis altos de ftalatos na urina e soro de mulheres jovens, cujos valores aproximavam-se dos níveis tóxicos para o desenvolvimento do sistema reprodutivo de ratos machos. Desta forma, é importante limitar o uso de substâncias desreguladoras endócrinas, pois podem causar redução em contagens espermáticas, aumento na incidência de cânceres testiculares, prostáticos, e outras desordens reprodutivas (COLBORN et al., 1993; SONNENSCHNEIN et al., 1998).

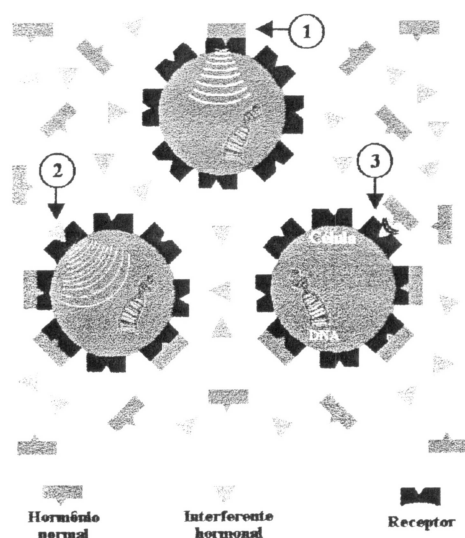


FIGURA 4- MECANISMOS DE AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS

NOTAS: (1) O hormônio natural liga-se ao receptor nuclear, levando à transcrição gênica. (2) O interferente hormonal age como agonista do hormonal, ligando-se ao receptor intranuclear, levando à desregulação na transcrição gênica celular. (3) O interferente hormonal age como antagonista hormonal, bloqueando a ligação do hormônio natural ao receptor, desregulando a célula.

A hipótese de que os desreguladores endócrinos podem estar afetando a saúde humana, criou um novo debate entre os toxicologistas. Em seres humanos, muitos efeitos tóxicos (relacionados à fertilidade e carcinogênese) podem ocorrer, devido à exposição às baixas doses de desreguladores endócrinos, por períodos prolongados (EERTMANS et al., 2003). Os efeitos dos desreguladores endócrinos em seres humanos poderão ser melhor compreendidos por meio do desenvolvimento de novos métodos para detectar redução da capacidade reprodutiva humana. Esta questão é importante porque a infertilidade é um assunto de grande preocupação, com repercussão psicológica e econômica.

### 2.9.1 Protocolos de avaliação dos desreguladores endócrinos para mamíferos

Há necessidade de instrumentos rápidos, eficazes e econômicos, para triagem e caracterização de agentes com atividade hormonal. Atualmente, estão disponíveis muitos bioensaios *in vitro* e *in vivo*, para triar agentes com potencial atividade desreguladora endócrina (ASHBY et al., 1997b). Estes bioensaios baseiam-se em metodologias variadas, englobando desde experimentos sofisticados, como os estudos de ligação ao receptor, até ensaios *in vivo*.

#### 2.9.1.1 Testes *in vivo*

No animal, os desreguladores endócrinos podem interagir de modo mais complexo, pois há participação do sistema endócrino durante a realização de estudos *in vivo*. Os compostos com atividade hormonal podem se ligar às proteínas plasmáticas, alterando suas concentrações a nível tecidual. Este é um motivo para a realização dos estudos *in vivo*, pela presença da farmacocinética e farmacodinâmica do organismo envolvido. Os testes *in vivo* são realizados para analisar efeitos mais complexos dos desreguladores endócrinos, permitindo a extrapolação dos resultados para a população humana, para estimar os riscos de exposição populacional. Estes ensaios estão incluídos na bateria de testes de triagem da US EPA, para detectar compostos com atividade hormonal. Testes toxicológicos mais complexos, como estudos de toxicidade de duas gerações em mamíferos, também são propostos pela agência, sendo que os resultados obtidos podem ser utilizados para definir as doses que não causam efeitos adversos (NOAEL) (GRAY et al., 2002).

#### 2.9.1.1.1 Teste uterotrófico

Este teste *in vivo* foi introduzido na década de 30, para avaliar a ligação de compostos estrogênicos ao receptor de estrógeno. O teste é confiável na detecção de compostos com propriedades estrogênicas ou antiestrogênicas. Compostos estrogênicos são capazes de induzir hipertrofia uterina em ratas imaturas e fêmeas maduras ovariectomizadas. O teste tem curta duração (três dias consecutivos), servindo como indicador da ação estrogênica de uma substância, pela determinação do crescimento uterino em ratas imaturas (ODUM et al., 1997). O bloqueio do efeito uterotrófico do estradiol serve como indicador de antiestrogenicidade (ANDRADE et al., 2002).

#### 2.9.1.1.2 Teste de Hershberger

O teste de Hershberger (HERSHBERGER, 1953) é um teste *in vivo*, recomendado pelo EDSTAC (1998), para triar substâncias androgênicas ou antiandrogênicas. O teste baseia-se no crescimento de tecidos andrógenos dependentes (próstata e vesícula seminal) em ratos machos castrados, e no bloqueio da ação da testosterona sobre os tecidos (antiandrogenicidade). Substâncias androgênicas podem aumentar a massa destes órgãos, enquanto que a característica antiandrogênica de outras substâncias reduz a massa de órgãos andrógeno-dependentes.

#### 2.9.1.1.3 Protocolo de puberdade em fêmeas

O Protocolo de puberdade em fêmeas tem por objetivo analisar os efeitos dos desreguladores endócrinos sobre a tireóide, eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, e níveis hormonais de estrógenos, detectáveis pela administração do composto suspeito por via oral, durante 21 dias. Este protocolo está sendo submetido à validação e padronização pela US EPA (GRAY et al., 2002; MARTY et al., 1999). Os animais são expostos por via oral à substância suspeita, do 21º ao 42º dia de vida. No decorrer do experimento, muitas variáveis reprodutivas são analisadas, para investigação do potencial toxicológico da substância sobre este período crítico de desenvolvimento.

#### 2.9.1.1.4 Protocolo de puberdade em machos

Este protocolo tem o objetivo de detectar compostos com atividade androgênica ou antiandrogênica, em um único teste realizado *in vivo*. Assim como no protocolo de puberdade em fêmeas, este protocolo também está sendo submetido à validação e padronização pela US EPA (GRAY et al., 2002; MARTY et al., 2001). Os animais são expostos por via oral, à substância suspeita, do 21º ao 70º dia de vida. No decorrer do experimento, vários variáveis reprodutivos são analisados para investigação do potencial toxicológico da substância, sobre este período crítico de desenvolvimento.

#### 2.9.1.1.5 Protocolo de exposição *in utero* e lactação

Neste protocolo, os roedores são expostos durante o desenvolvimento pré e pós-natal, a compostos suspeitos de serem desreguladores endócrinos, para detectar efeitos tóxicos mediados por alterações nos níveis de estrógeno, andrógeno e hormônios da tireóide. O protocolo permite avaliar os efeitos do composto sobre a organogênese, diferenciação sexual e puberdade. A utilização de um organismo em desenvolvimento para a realização do protocolo permite avaliar os mecanismos de ação mediados por hormônios, envolvidos na indução de toxicidade do composto (GRAY et al., 2002).

#### 2.9.1.1.6 Protocolo de várias gerações

O EDSTAC recomenda este protocolo para avaliar os efeitos de compostos químicos sobre a reprodução e viabilidade dos animais estudados em duas gerações. Os efeitos causados por desreguladores endócrinos podem ser detectados por meio de alterações no comportamento, fertilidade, duração da gestação, tamanho da ninhada, viabilidade dos descendentes, variáveis de desenvolvimento e reprodutivos (histopatologia de órgãos reprodutivos, período de início da puberdade, dia da ocorrência da separação prepucial e abertura do canal vaginal, regularidade do ciclo estral) nos descendentes F1 (1ª geração) expostos inicialmente como gametas (originários dos progenitores F0), na gestação (fêmeas expostas F0), lactação (fêmeas expostas F0) e diretamente, por meio da exposição na fase adulta e reprodução, para formar a geração F2 (EDSTAC, 1998).

### 2.9.1.2 Ensaios *in vitro*

Os testes *in vitro* são sensíveis, permitem a identificação de compostos suspeitos de desregularem o sistema endócrino, elucidando os mecanismos de ação destas substâncias. Entretanto, os resultados obtidos nestes testes não consideram a complexidade fisiológica dos animais e humanos, sendo de valor limitado. Por exemplo, compostos que não são estrogênicos *in vitro*, podem ser transformados em metabólitos estrogênicos ativos no teste *in vivo*. Assim, os ensaios *in vivo* são necessários para analisar o metabolismo destes compostos, pois o metabolismo *in vivo* é complexo e depende de muitos fatores, como absorção, ligação a proteínas plasmáticas, distribuição tecidual e eliminação (GRAY et al., 2002).

Para o EDSTAC, a inclusão destes testes pode contribuir para reduzir o número de resultados falso-negativos. Estes experimentos não contam com variáveis tais como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, apesar de incorporarem variáveis endócrinas específicos (EDSTAC, 1998).

Os experimentos realizados *in vivo* podem ser mais específicos, se acompanhados de dosagem de metabólitos biologicamente ativos da substância tóxica testada, nos órgãos ou células-alvo. Os resultados obtidos de experimentos *in vitro* são aprimorados quando a concentração destes compostos químicos é determinada no órgão lesionado pelo composto. Desta forma, podem ser comparados aos resultados obtidos com animais. A associação de experimentos *in vivo* e *in vitro* é necessária para detectar alterações que ocorrem via receptores de andrógeno, estrógeno e tireóide, inibição de síntese de esteróides, e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas ou hipotálamo-hipófise-tireóide.

Os ensaios *in vitro* são utilizados para identificar e avaliar a possível atividade hormonal de um composto suspeito, por serem rápidos e permitirem uma redução no número de animais, mas devem ser completados por testes *in vivo*, já que os testes anteriores não reproduzem a complexidade do sistema endócrino (GRAY et al., 2002; KAMINUMA et al., 2000).

Provavelmente após a padronização e validação dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, eles possam ser incluídos na bateria de testes para avaliar a atividade endócrina e testar os efeitos adversos mediados por hormônios. Cabe então, à comunidade científica, reunir evidências para confirmar (ou rejeitar) os efeitos adversos suspeitos de ocorrerem no sistema reprodutor humano e identificar potenciais desreguladores endócrinos.

### 2.9.1.2.1 Ensaio do gene repórter

O princípio deste ensaio é a medição da indução da transcrição de um gene, mediada por hormônio, após a ativação de um receptor. Este experimento utiliza linhagens de células de mamíferos (MCF7, COS1) ou linhagens de leveduras, que são transfectadas com um plasmídeo repórter. O plasmídeo consiste em um HRE (elemento responsivo ao hormônio), acoplado a um gene repórter, como luciferase ou  $\beta$ -galactosidase (EDSTAC, 1998).

### 2.9.1.2.2 Ensaio de ligação ao receptor

Este experimento é utilizado para detectar agentes que interagem diretamente com um receptor hormonal, como os receptores subtipos  $\alpha$  e  $\beta$  de estrógeno (humano) ou receptores de andrógeno. Baseia-se na competição entre um composto não-radioativo e um hormônio radioativo, como ocorre com o estrógeno e os receptores de estrógeno que estão presentes em extratos celulares ou nucleares (como um tecido-alvo contendo o receptor), quantificando a afinidade de ligação de ligantes selecionados ao receptor. Entretanto, estes experimentos não diferenciam as ações agonistas e antagonistas de uma substância específica (EDSTAC, 1998).

#### 2.9.1.2.2.1 Ensaio de ligação ao receptor de estrógeno

Este experimento quantifica a capacidade de substâncias químicas competirem com o estradiol, pelo receptor de estrógeno. Os animais expostos a uma substância química servem como fonte tecidual para a obtenção de homogenados, e posteriormente, de extratos. Os níveis do receptores de estrógeno em extratos obtidos de homogenados teciduais, são quantificados, assim como a habilidade de um composto em competir com o estradiol marcado, pela ligação ao receptor de estrógeno. Da mesma forma, o experimento pode identificar os possíveis efeitos de um composto suspeito de apresentar atividade endócrina, sobre o número e distribuição dos receptores de estrógeno. Apesar destas vantagens, não faz distinção entre agonistas e antagonistas do receptor de estrógeno (EDSTAC, 1998; SOTO et al., 1995).

#### 2.9.1.2.2.2 Ensaio de ligação ao receptor de andrógeno

É usado para determinar a habilidade de substâncias químicas em competir com ligantes exógenos pela ligação ao receptor de andrógeno. Quantifica a capacidade de substâncias químicas competirem com a testosterona, pelo receptor de andrógeno. Os níveis do receptor de andrógeno, em extratos de homogenados teciduais de animais expostos a uma substância química, podem ser quantificados. Além disso, pode quantificar a habilidade de um composto em competir com a testosterona marcada, pela ligação ao receptor de andrógeno, identificando os possíveis efeitos de um composto suspeito de apresentar atividade endócrina sobre o número e distribuição dos receptores de andrógeno. Entretanto, o experimento não permite diferenciar compostos agonistas de antagonistas do receptor de andrógeno (EDSTAC, 1998).

#### 2.9.1.2.3 Ensaio de proliferação celular

A proliferação de células específicas, induzida por compostos com atividade hormonal, é avaliada neste ensaio. O experimento *E-Screen* é um exemplo de ensaio de proliferação celular que utiliza a linhagem de células de câncer de mama (MCF-7), as quais proliferam em resposta a compostos com atividade estrogênica ou diante do estrógeno natural. Devido à alta responsividade das células aos estrógenos, o *E-Screen* é um dos experimentos mais sensíveis para analisar a estrogenicidade de compostos químicos (SOTO et al., 1995). Além disso, permite distinguir entre agonistas e antagonistas de estrógeno. Entretanto, devido à sensibilidade das condições de cultura (subclones diferentes), a variabilidade de resultados interlaboratorial é elevada (ZACHAREWSKI et al., 1998).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos adversos do DEHP sobre o sistema reprodutor de ratos por meio de protocolos sugeridos pelo EDSTAC.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicação de protocolos do EDSTAC.
- Avaliação dos efeitos reprodutivos em ratos expostos ao DEHP durante a pré-puberdade.
- Comparar os resultados da exposição de animais ao DEHP durante a pré-puberdade com os resultados obtidos com animais expostos ao composto durante a gestação e lactação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*), criados e mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais receberam água e ração comercial Nuvilab CR-1 (Nuvital, Colombo/PR) *ad libitum*, sendo mantidos em temperatura ambiente  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas.

### 4.2 SUBSTÂNCIA UTILIZADA

A substância utilizada no tratamento foi o plastificante DEHP, com 99,86% de pureza, densidade 0,981g/mL fornecida pela Ciquine Companhia Petroquímica, São Paulo-SP, cuja estrutura molecular aparece na Figura 5.

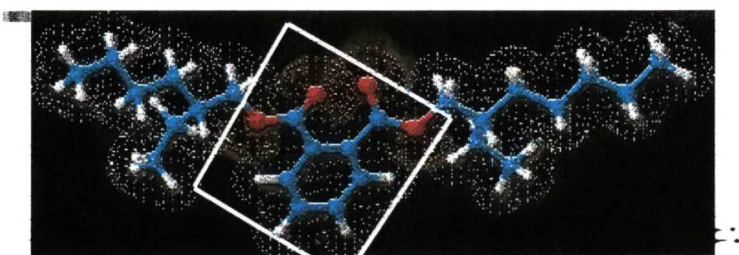


FIGURA 5- ESTRUTURA MOLECULAR DO DEHP.

NOTA: A região da molécula contornada em branco pode mimetizar o anel esteroidal do 17- $\beta$ - estradiol e interagir com o receptor de estrógeno(atividade estrogênica fraca)

### 4.3 DOSES E TRATAMENTO

O DEHP foi dissolvido em óleo de canola (veículo) nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/kg para a formulação das soluções de trabalho. As doses foram estabelecidas a partir de estudos relacionados com a toxicidade materna e reprodutiva, estabelecendo-se a NOEL-dose (*no observed effect level*), a maior dose de DEHP que não causa toxicidade e LOEL-dose (*lowest observed effect level*), a menor dose que provoca efeitos adversos

(NAROTSKY e KAVLOCK, 1995; SANTANA et al., 2002). A exposição de animais por via oral ao DEHP, na fase *in utero* e lactacional, foi realizada por SANTANA et al. (2002). Os autores encontraram toxicidade reprodutiva na progênie (redução da massa de órgãos sexuais masculinos). Para o efeito antiandrogênico, determinaram a LOEL-dose de 100 mg/kg de DEHP e a NOEL-dose de 20 mg/kg de DEHP. Desta forma, escolhemos a dose de 100 mg/kg, uma dose intermediária (250 mg/kg) e a de 500 mg/kg para administração por via oral.

#### 4.4 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a realização dos experimentos, foram utilizados protocolos de experimentação durante a fase pré-púbere, sugeridos pelo EDSTAC, para comparações dos resultados obtidos com protocolos realizados com animais expostos ao plastificante nas fases gestacional e lactacional.

##### 4.4.1 Protocolo de fêmeas expostas na pré-puberdade

O protocolo de puberdade em fêmeas utiliza ratos, com a finalidade de avaliar os efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos de substâncias suspeitas de apresentarem atividade hormonal. O protocolo examina anormalidades associadas com o desenvolvimento de órgãos sexuais femininos e características sexuais secundárias. A Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (US EPA) está padronizando e validando este protocolo (US EPA, 1996).

###### 4.4.1.1 Desenho experimental:

Ratas recém desmamadas (21 dias de vida), foram tratadas diariamente por via oral por meio de sonda gástrica, durante 21 dias (até o 42º dia de vida). O grupo controle foi composto por 11 animais, que receberam 5 ml/kg de óleo de canola (veículo). Os outros três grupos foram compostos por 19 animais cada e receberam respectivamente doses de 100, 250 e 500 mg/kg de DEHP.

#### 4.4.1.2 Variáveis avaliadas

##### 4.4.1.2.1 Ganho de massa corporal

Os efeitos do DEHP sobre o crescimento dos animais são determinados pela observação da massa corporal. No protocolo de fêmeas expostas na idade pré-púbere, os animais foram pesados diariamente, para acompanhamento do ganho de massa corporal, variável importante na determinação do estado geral de saúde e desenvolvimento dos animais.

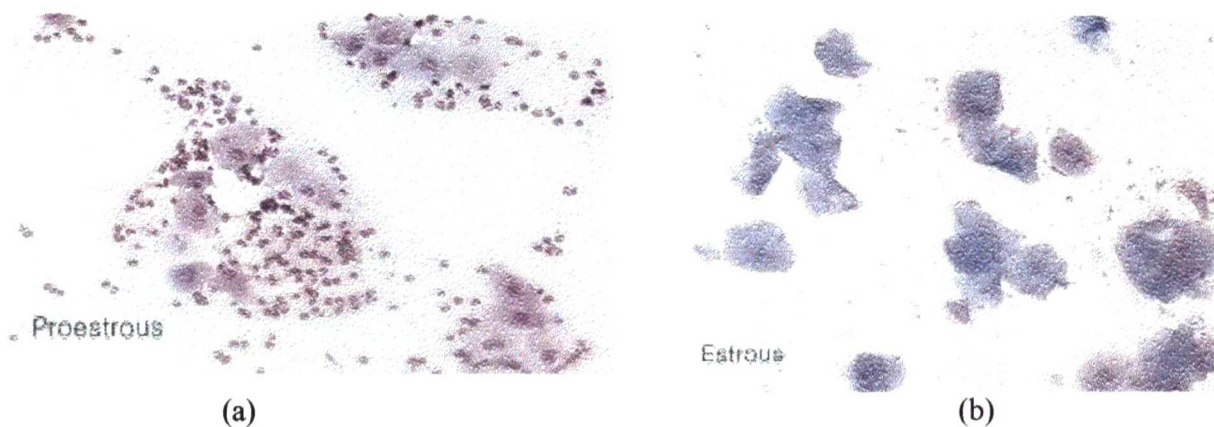
##### 4.4.1.2.2 Abertura do canal vaginal

A abertura do canal vaginal é uma variável sensível para detectar o início da puberdade nas fêmeas, sendo observado a partir do 33º dia de vida. Pela avaliação desta variável podem ser identificadas substâncias estrogênicas ou antiestrogênicas. Se uma substância induz atraso no dia para a abertura do canal vaginal, pode apresentar ação antiestrogênica, mas se a substância induz adiantamento no dia para a abertura do canal vaginal, pode apresentar ação estrogênica.

##### 4.4.1.2.3 Determinação do primeiro estro e regularidade do ciclo estral

A caracterização diária da citologia vaginal em ratas é um método não invasivo e confiável para avaliar a regularidade do ciclo estral. As amostras de esfregaço podem ser lidas em lâminas (a fresco) ou fixadas e coradas. Na fêmea pós-púbere, modificações temporais que ocorrem no aspecto das células presentes no esfregaço vaginal, refletem diretamente alterações nos níveis séricos de estradiol e progesterona. As modificações citológicas podem indicar alterações induzidas por compostos tóxicos, na função reprodutiva dos animais. Geralmente, após 7 a 10 dias da ocorrência da abertura do canal vaginal, ocorre o primeiro ciclo estral completo (com duração de 4 a 5 dias). Em animais não tratados, este ciclo se repete de modo regular, indicando a maturação e liberação de folículos ovarianos e corpos lúteos. O ciclo estral é separado em quatro fases distintas, o pró-estro, estro, diestro e metaestro (Figura 6). A fase do proestro dura 12 horas, caracterizada pela proliferação do epitélio vaginal. O esfregaço vaginal contém células epiteliais ovais, sendo raramente

encontrados leucócitos e muco. Na fase do estro, as fêmeas estão receptivas aos machos. Nesta fase (duração de 14 horas), as células epiteliais são queratinizadas, anucleadas, sendo ausentes os leucócitos e o muco. A fase do diestro dura cerca de 57 horas e caracteriza-se por mucosa vaginal fina, abundância de tipos de células epiteliais, muco e leucócitos. Um aumento nos níveis de estradiol ocorre nesta fase. A fase do metaestro tem duração de 21 horas, ocorrendo logo após a ovulação (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977).



**FIGURA 6- CITOLOGIA VAGINAL- FASES DO CICLO ESTRAL**

NOTAS: (a) fase do pró- estro, apresentando células epiteliais ovas e nucleadas; (b) fase do estro, com células queratinizadas anucleadas.

A ovulação ocorre durante as primeiras horas da manhã seguinte do estro, em resposta à estimulação hormonal ocorrida pelo surto de LH do último pró-estro. As células epiteliais respondem às alterações cíclicas nos níveis de estradiol. No ciclo estral, os níveis séricos elevados de estradiol causam aumento na massa uterina no dia do pró-estro, pelo aumento do conteúdo de fluido e atividade de proliferação celular. Uma variedade de compostos estrogênicos causa efeitos similares (ASHBY et al., 1997a). Assim, é necessário conhecer a fase do ciclo estral em que os animais foram sacrificados e relacioná-la às alterações celulares e fisiológicas determinadas pelas variações cíclicas hormonais.

Para a determinação do primeiro estro e regularidade do ciclo estral, os animais foram submetidos a esfregaços vaginais diários, a partir do dia da abertura do canal vaginal. Utilizando-se pipetas e ponteiras, os esfregaços vaginais foram efetuados com auxílio de soro fisiológico. O material vaginal foi coletado, sendo posteriormente preparadas lâminas para leitura em microscópio (aumento de 400 x), para determinar as diferentes fases que compõem o ciclo estral.

#### 4.4.1.2.4 Massa absoluta e relativa de órgãos

A determinação da massa de órgãos permite uma caracterização mais completa da toxicidade do composto testado. A toxicidade sistêmica causada por uma substância pode ser avaliada por meio da determinação das massas relativas de órgãos, que por sua vez estão relacionadas aos efeitos na massa corporal do animal (GOLDMAN et al., 2000). A massa absoluta dos órgãos indica possíveis efeitos tóxicos morfo-funcionais, causados pelo composto suspeito. As ratas foram acompanhadas diariamente quanto ao ganho de massa corporal, até completaram três ciclos estrais. No estro seguinte, as ratas foram sacrificadas por decapitação entre 8 e 9 horas da manhã, para a retirada e determinação da massa dos órgãos (balança analítica Gehaka BG 40, São Paulo/SP). Desta forma, foram identificadas as massas absolutas e relativas (expressos percentualmente em relação à massa corporal) do útero, ovários, fígado e rins. Para os órgãos pares (ovários e rins), foi utilizada a média entre o lado esquerdo e direito.

#### 4.4.2 Protocolo de machos expostos na pré-puberdade

O protocolo examina anormalidades associadas com o desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos e características sexuais secundárias. A Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana está em processo de padronização e validação do protocolo de exposição de ratos machos na fase pré-púbere (US EPA, 1996).

##### 4.4.2.1 Desenho experimental

Para a realização deste protocolo foram utilizados 64 animais, que a partir do desmame (21º dia de vida), foram tratados diariamente por via oral, utilizando-se sonda gástrica, com três doses de DEHP (100, 250, 500 mg/kg) durante 49 dias. O grupo controle recebeu o veículo 5ml/kg (óleo de canola), sendo composto por 16 animais. O grupo que recebeu 100 mg de DEHP apresentava 16 animais, enquanto que os demais grupos foram compostos por 14 animais cada. A partir do 70º dia de vida, os animais foram sacrificados, para a retirada e determinação da massa dos órgãos. A decapitação foi utilizada para evitar o estresse, pois os níveis plasmáticos da testosterona são afetados diretamente por esta perturbação fisiológica. O sangue foi coletado em tubos de ensaio, centrifugado para a coleta

do plasma, congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo mantido nesta temperatura até o momento das análises hormonais.

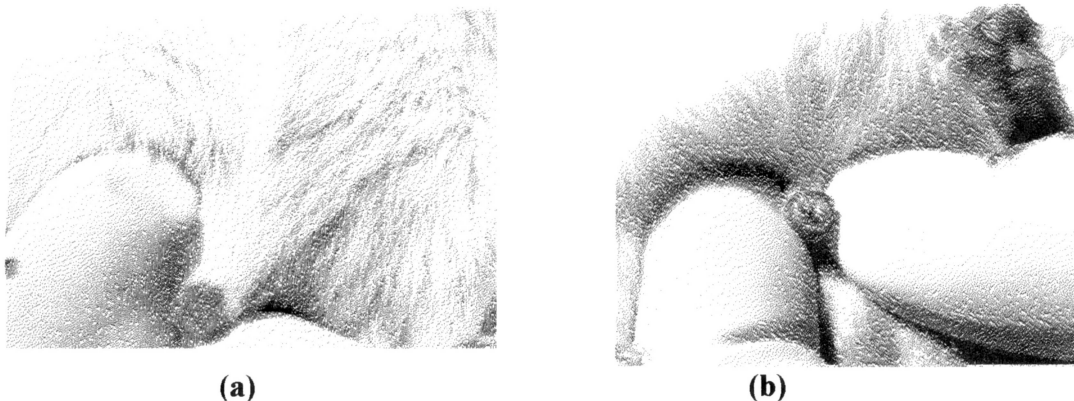
#### 4.4.2.2 Variáveis avaliadas

##### 4.4.2.2.1 Ganho de massa corporal

Os machos foram pesados diariamente, para acompanhamento do ganho de massa corporal, sendo esta variável importante para determinação do estado geral de saúde e desenvolvimento dos animais.

##### 4.4.2.2.2 Separação prepucial

Esta variável permite determinar alterações provocadas pelo DEHP sobre o desenvolvimento sexual dos animais. A separação prepucial é dependente de andrógenos, sendo um processo que leva à clivagem do epitélio por meio da queratinização no prepúcio do pênis (Figura 7).



**FIGURA 7- SEPARAÇÃO PREPUCIAL**

NOTAS: (a) separação incompleta; (b) separação completa.

Se uma substância provoca atraso na observação desta variável, pode apresentar ação antiandrogênica, enquanto se ela provocar adiantamento, pode apresentar ação androgênica (STOKER et al., 2000). Esta variável é essencial para o desenvolvimento do processo ejaculatório, além de confiável e não-invasivo, para monitorar o desenvolvimento pubertal e as alterações neste processo.

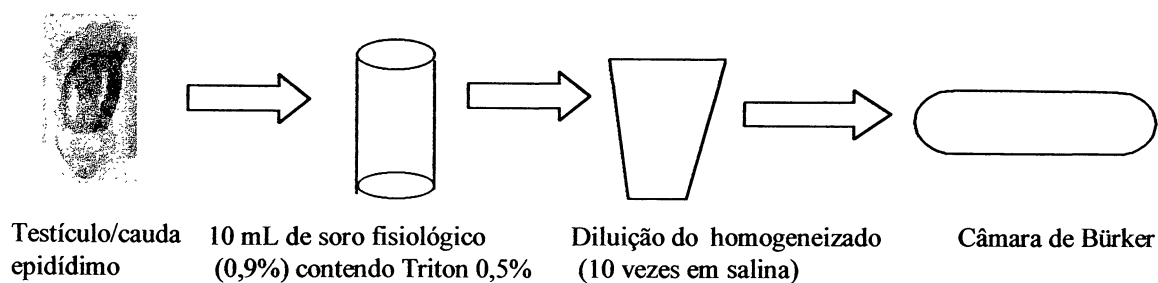
#### 4.4.2.2.3 Massa absoluta e relativa de órgãos

A determinação das massas de órgãos permite avaliar o estado de saúde do animal e da função de cada órgão. Desta forma, foram identificados as massas absolutas e relativas (expressos percentualmente em relação à massa corporal) dos testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, fígado e rins. Para os órgãos pares (testículos, epidídimos, rins) foi utilizada a média entre o lado esquerdo e direito. Após o sacrifício dos animais por decapitação, os órgãos foram retirados e pesados (balança analítica Gehaka BG 40, São Paulo/SP). A próstata foi pesada juntamente com a cápsula prostática, enquanto a determinação da massa da vesícula seminal foi realizada após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem.

#### 4.4.2.2.4 Contagens espermáticas

Foram realizadas as contagens de células espermáticas no testículo e a de espermatozoides na cauda do epidídimo. Após a remoção da túnica albugínea, cada um dos testículos foi triturado e homogeneizado em 10 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (salina) contendo 0,5% de Triton X-100 em homogeneizador de tecidos (FISATOM 720) por um minuto. O homogeneizado foi diluído 10 vezes em salina para a contagem microscópica do número de espermátides resistentes a homogeneização, em câmara de Bürker (Bürker, Alemanha). A duração de um ciclo espermatogênico completo é de 12, 75 dias. O procedimento da homogeneização faz com que apenas as células resistentes ao processo sobrevivam, correspondendo às células dos estágios IV a VIII (tipos 17 e 19). As células encontradas nestes estágios compreendem 49% das células no epitélio dos túbulos seminíferos, correspondendo a 6, 1 dias. Desta forma, o número de espermátides por animal, obtido pela soma das contagens do testículo direito e esquerdo, foi dividido por 6,1 para conversão em produção espermática diária (ROBB, 1978).

Para a contagem dos espermatozoides, as caudas dos epidídimos foram cortadas em pequenos pedaços, homogeneizadas e processadas da mesma forma que os testículos (Figura 8). A taxa de trânsito espermática foi obtida por meio da divisão do número de espermatozoides pela produção espermática diária (AMANN et al., 1982).



Nº de células contadas (lado direito + esquerdo) —  $5,76 \times 10^{-4}$  mL (volume da câmara)

Y — 1 mL

Valor obtido (Y) x 100 (fator de diluição) = nº de células por animal.

#### FIGURA 8- CÁLCULO DO NÚMERO DE ESPERMÁTIDES E ESPERMATOZOÍDES

##### 4.4.2.2.5 Níveis plasmáticos de testosterona

Os hormônios podem atuar como indutores ou repressores de síntese protéica, regulam a taxa de produção enzimática, influenciam a atividade de vários mecanismos metabólicos. Podem afetar a atividade metabólica, por regularem mecanismos de transporte inter e intracelulares, controlando a disponibilidade de muitos substratos. A determinação de níveis hormonais pode fornecer informações adicionais para avaliar alterações funcionais induzidas pelo composto tóxico.

Neste protocolo, para determinar os níveis plasmáticos de testosterona, os animais foram decapitados (entre 7 e 8 horas da manhã), sendo coletado o sangue, utilizando heparina como anticoagulante. Após centrifugação, o plasma foi separado e mantido a  $-20^{\circ}$  C até o momento da análise. Foi utilizado o Enzimaimunoensaio, para determinação quantitativa de testosterona (Testosterona Genzyme Diagnostics). Desta forma, foram pipetados 10  $\mu$ L de padrões e amostras nos poços apropriados, adicionando-se 100  $\mu$ L de conjugado em todos os poços; 50  $\mu$ L de Anti-Testosterona em todos os poços, homogeneizando durante 30 minutos, colocando a placa no envoltório de plástico. Os reagentes foram incubados durante 90 minutos em  $37^{\circ}$  C; os poços foram lavados 5 vezes com água destilada ou deionizada, invertendo o papel absorvente para retirar o excesso de líquido. Foram pipetados 100  $\mu$ L de

TMB em todos os poços e homogeneizados por 5 segundos. Posteriormente, foi feita incubação por 20 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Também foram dispensados 100 µL de Solução de Parada em todos os poços, homogeneizando cuidadosamente por 30 segundos. As densidades ópticas foram lidas a 450 nm no espectrofotômetro.

#### 4.4.3 Protocolo de machos expostos na pré-puberdade e avaliados na idade adulta

Animais expostos ao DEHP na fase pré-púbere (do 21 ao 70º dia de vida), foram avaliados na idade adulta (entre o 90º e 100º dia de vida). Neste protocolo, um dos objetivos foi determinar a possível reversibilidade dos efeitos reprodutivos adversos causados pelo DEHP.

##### 4.4.3.1 Desenho experimental

Para a realização deste protocolo foram utilizados 59 animais. Cada um dos grupos tratados com DEHP, nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg, foi composto por 15 animais, e o grupo controle foi composto por 14 animais, que receberam óleo de canola como veículo (5ml/kg). Todos os ratos utilizados foram tratados diariamente a partir do desmame (21º dia de vida), por via oral, durante 49 dias, avaliando-se o ganho de massa corporal (até o 100º dia de vida) e variáveis comportamentais (teste do campo aberto). Após a realização do teste, os ratos foram sacrificados por decapitação, para retirada e determinação da massa dos órgãos. O sangue foi coletado em tubos de ensaio (contendo heparina como anticoagulante), centrifugado e o plasma foi congelado - 20º C para análises hormonais de testosterona.

##### 4.4.3.2. Variáveis avaliadas

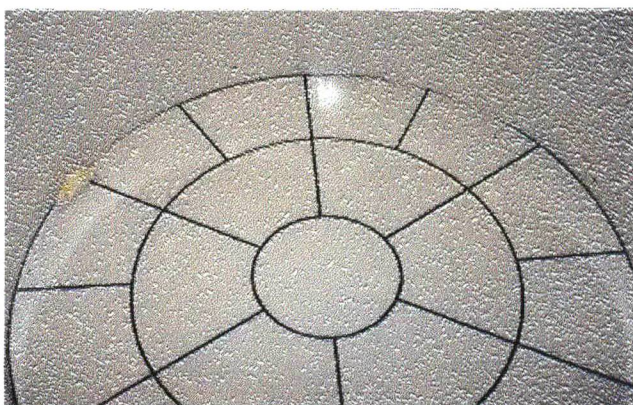
Algumas das variáveis avaliadas no protocolo estão descritas no item 4.4.2.2, referentes ao protocolo de machos expostos na pré-puberdade.

##### 4.4.3.2.1 Variáveis de teste do campo aberto

As variáveis avaliadas no teste do campo aberto permitem identificar alterações no comportamento geral do animal. O teste foi realizado com animais entre o 87º e o 88º dia de vida, para observar o comportamento geral (atividade locomotora, exploratória, auto-limpeza,

quantidade de bolos fecais). A atividade exploratória do animal corresponde às atividades relacionadas à obtenção de informação sobre o ambiente. Os diferentes comportamentos do rato incluem correr em círculos, cheirar, levantar-se nas patas posteriores (*rearing*), movimentar as vibrissas e direcionar-se a um estímulo em particular. O assoalho da arena é dividido em retas, utilizadas para quantificar a atividade do animal (Figura 9). O número de retas pelas quais o rato passa, num intervalo de tempo (cronometrando 5 minutos no presente estudo), permite quantificar sua atividade locomotora. O registro realizado foi manual ou em programas computacionais associados a uma filmadora.

Após serem removidos da gaiola e transportados para o local do teste, cada um dos ratos foi colocado no centro da arena do teste. A defecação foi quantificada pelo número de bolos fecais produzidos por sessão experimental. Foi cronometrado o tempo de paralização dos animais (congelamento ou *freezing*), o tempo de auto-limpeza (*grooming*), ambulações (número de retas invadidas) e os levantamentos (número de vezes que o animal assume a posição vertical), com um cronômetro manual simples (HANAS, 1999)



**FIGURA 9- ARENA DO TESTE DE CAMPO ABERTO**

NOTA: Ambulação do animal na arena do teste

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis com medidas intervalares e que apresentaram distribuição normal foram analisadas por meio da análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste Tukey. As variáveis com medidas ordinais ou aquelas que não apresentam distribuição normal ou homogeneidade entre os grupos foram analisadas utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunns, como ocorreu com a taxa de trânsito espermático, avaliada na puberdade e idade adulta. Foram citados os níveis de significância alcançados de acordo com o teste estatístico realizado (quando  $P < 0,05$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PROTOCOLO DE FÊMEAS EXPOSTAS NA FASE PRÉ-PÚBERE

#### 5.1.1 Ganho de massa corporal

Na avaliação do protocolo de fêmeas expostas na pré-puberdade, a massa corporal absoluta e relativa das ratas tratadas com DEHP não sofreu alteração, em relação ao grupo controle (Figuras 10 e 11).

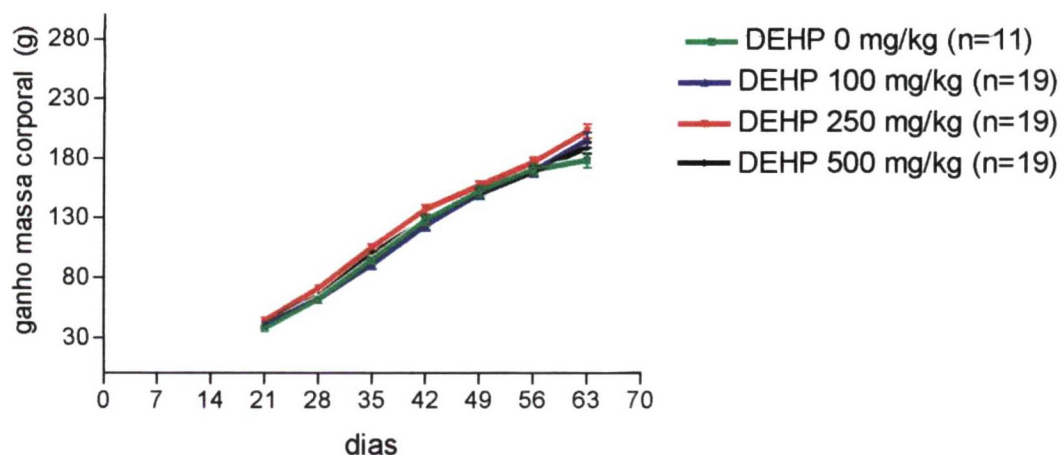


FIGURA 10- GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO DE RATAS DOS GRUPOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.

NOTAS: O DEHP não alterou o ganho de massa corporal absoluto das ratas, em relação ao grupo controle. n = número de animais investigados.  $P > 0,05$  (ANOVA).

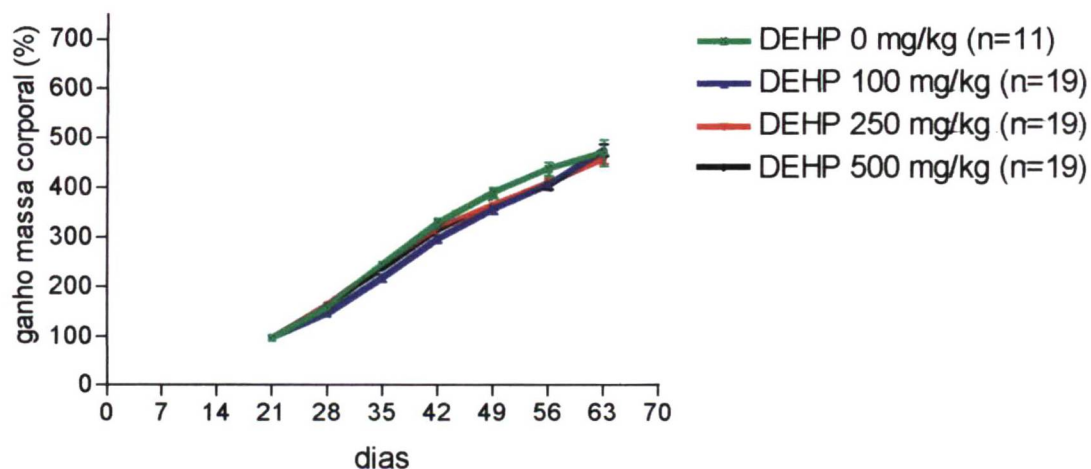


FIGURA 11- GANHO DE MASSA CORPORAL RELATIVO DE RATAS DOS GRUPOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.

NOTAS: O DEHP não alterou o ganho de massa corporal relativo das ratas, em relação ao grupo controle. Os dados expressam as médias percentuais em relação à massa no 21º dia de idade  $\pm$  epm. n = número de animais investigados.  $P > 0,05$  (ANOVA).

### 5.1.2 Abertura do canal vaginal, primeiro estro e regularidade do ciclo estral

A exposição de ratas na idade púbere, ao DEHP nas doses de 100, 250 ou 500 mg/kg não alterou variáveis como abertura do canal vaginal, idade de ocorrência do primeiro estro, bem como as massas corporais absolutas nos dias da ocorrência destes eventos. A regularidade do ciclo estral também não sofreu alteração nos animais que receberam as diferentes doses de DEHP, com relação ao grupo controle (Tabela 4).

TABELA 4 - EFEITOS DO DEHP SOBRE A ABERTURA DO CANAL VAGINAL, PRIMEIRO ESTRO E REGULARIDADE DO CICLO ESTRAL DE RATAS EXPOSTAS NA PRÉ- PUBERDADE.

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)			
	0 (n=11)	100 (n=19)	250 (n=19)	500 (n=19)
Abertura do canal vaginal (dias)	37,4 ± 0,51	37,1 ± 0,30	36,1 ± 0,43	37,7 ± 0,20
Massa corporal no dia da abertura do canal vaginal (g)	106 ± 2,65	101 ± 3,46	112,1 ± 3,67	110 ± 3,02
Primeiro estro (dias)	42,3 ± 0,51	42,3 ± 0,59	41,4 ± 0,73	43,1 ± 0,44
Massa corporal no dia do primeiro estro (g)	131 ± 4,26	126 ± 4,32	137 ± 5,35	133 ± 3,74
Regularidade do ciclo estral (dias)	5,5 ± 0,22	5,4 ± 0,24	5,8 ± 0,22	5,4 ± 0,17

NOTAS: O DEHP não alterou os variáveis de abertura do canal vaginal, primeiro estro, massas corporais nos dias de ocorrência dos fenômenos e regularidade do ciclo estral das ratas, em relação ao grupo controle. Os resultados expressam as médias ± epm (ANOVA). n = número de animais investigados.  $P > 0,05$  (ANOVA).

### 5.1.3 Massa absoluta e relativa de órgãos

A exposição de ratas ao DEHP (dose de 500 mg/kg) não alterou a massa absoluta do útero, mas as demais doses causaram aumento na massa absoluta do órgão. A exposição de ratas ao DEHP (doses de 100 e 500 mg/kg) não alterou a massa relativa do útero, mas a dose intermediária causou aumento na massa relativa do órgão. As fêmeas expostas às três diferentes doses do ftalato apresentaram aumento nas massas relativas e absolutas de ovários, fígado e rins (Tabela 5).

TABELA 5- EFEITOS DO DEHP SOBRE A MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DE ÓRGÃOS DE RATAS PÚBERES (58 A 70 DIAS DE VIDA).

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)				
	0 (n=11)	100 (n=19)	250 (n=19)	500 (n=19)	
Massa corporal (g)	189 ± 5,69	196 ± 4,79	202 ± 4,95	196 ± 3,61	
Útero (mg)	absoluta	356 ± 16,5	479 ± 27,0*	663 ± 27,3**	387 ± 17,9
	relativa	0,19 ± 0,010	0,25 ± 0,014	0,33 ± 0,017**	0,20 ± 0,009
Ovários (mg)	absoluta	14,9 ± 0,80	46,5 ± 1,87**	46,3 ± 2,54 **	39,3 ± 1,16**
	relativa	0,008 ± 0,001	0,024 ± 0,001**	0,023 ± 0,001**	0,020 ± 0,001**
Fígado (g)	absoluta	6,32 ± 0,15	9,48 ± 0,11**	10,0 ± 0,26**	10,5 ± 0,24**
	relativa	3,29 ± 0,091	5,09 ± 0,192**	5,09 ± 0,109**	5,37 ± 0,122**
Rins (g)	absoluta	0,61 ± 0,012	0,86 ± 0,024**	0,88 ± 0,020**	0,84 ± 0,021**
	relativa	0,32 ± 0,007	0,45 ± 0,022**	0,45 ± 0,015**	0,43 ± 0,001**

NOTAS: Os resultados absolutos expressam as médias ± epm e os resultados relativos expressam a média percentual em relação à massa corporal ± epm. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$  difere significativamente quando comparados ao controle (ANOVA-Tukey). n = número de animais investigados.

## 5.2 PROTOCOLO DE MACHOS EXPOSTOS NA PRÉ-PUBERDADE

### 5.2.1 Ganho de massa corporal

Na puberdade de machos, a massa corporal absoluta e relativa dos ratos tratados com DEHP não sofreu alteração com relação ao grupo controle, em nenhuma das doses (Figuras 12 e 13, respectivamente).

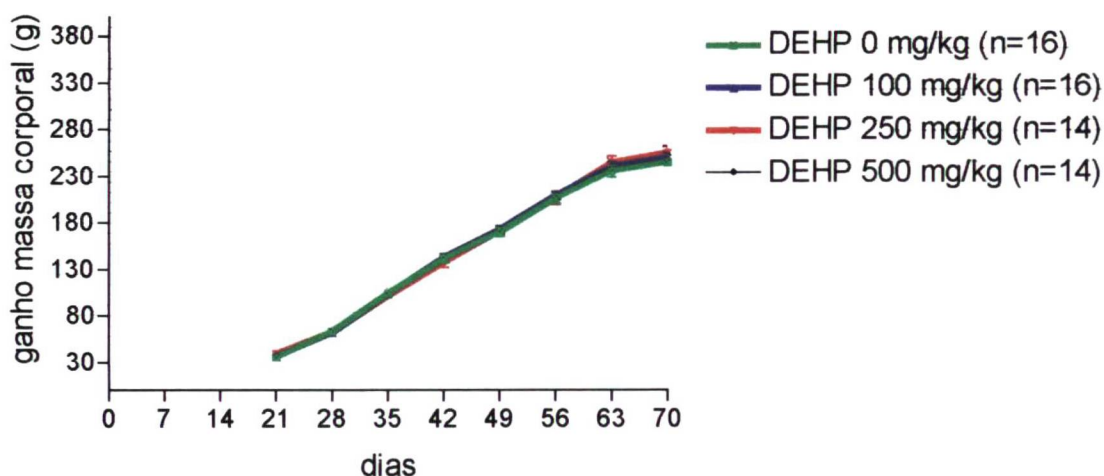


FIGURA 12- GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO DE RATOS PÚBERES DOS GRUPOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.

NOTAS: O DEHP não alterou o ganho de massa corporal absoluto dos ratos, em relação ao grupo controle. n= número de animais investigados.  $P > 0,05$  (ANOVA).

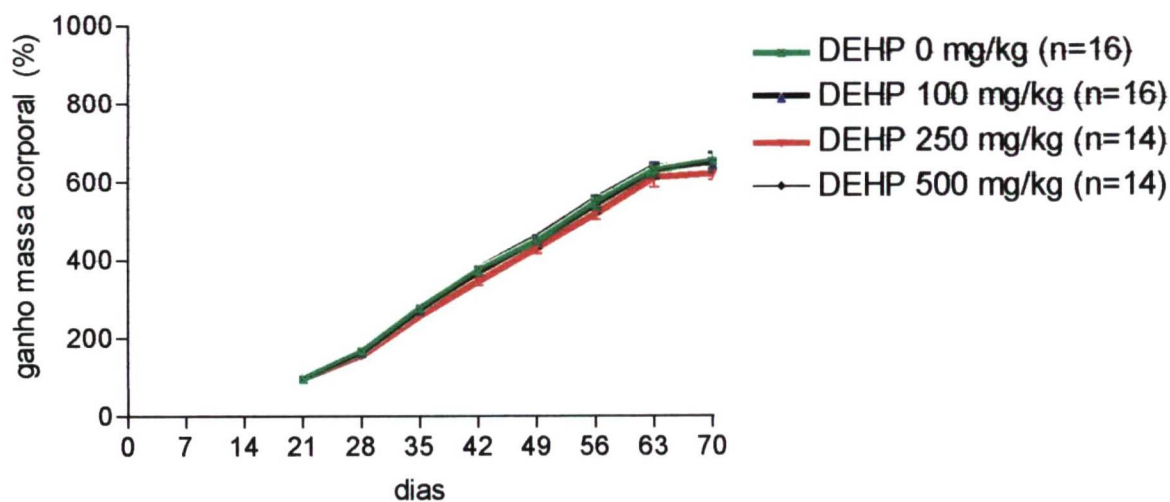


FIGURA 13- GANHO DE MASSA CORPORAL RELATIVO DE RATOS PÚBERES DOS GRUPOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.

NOTAS: O DEHP não alterou o ganho de massa corporal relativo dos ratos, em relação ao grupo controle. Os dados expressam as médias percentuais em relação à massa no 21º dia de idade  $\pm$  epm. n = número de animais investigados.  $P > 0,05$  (ANOVA).

### 5.2.2 Separação prepucial

Houve atraso ( $\pm 1$  dia) no dia da separação prepucial, porém este retardo não apresenta significância em nível biológico, pois ficou dentro da variabilidade para a espécie. A massa corporal no dia da separação prepucial não sofreu alterações nos animais tratados com DEHP (Tabela 6).

TABELA 6 – IDADE PARA A OCORRÊNCIA DA SEPARAÇÃO PREPUCIAL E MASSAS CORPORAIS RELACIONADAS AO FENÔMENO, EM RATOS PÚBERES.

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)			
	0 (n=30)	100 (n=31)	250 (n=29)	500 (n=29)
Idade de ocorrência da separação prepucial (dias)	34,6 $\pm$ 0,092	35,4 $\pm$ 0,087**	35,3 $\pm$ 0,10**	35,3 $\pm$ 0,090**
Massa corporal no dia da separação prepucial (g)	104 $\pm$ 2,34	109 $\pm$ 1,96	107 $\pm$ 1,44	107 $\pm$ 2,09

NOTAS: Os resultados expressam as médias  $\pm$  epm (Anova-Tukey), \*\*  $P < 0,001$  diferem significativamente do controle (ANOVA-Tukey). n= número de animais investigados.

### 5.2.3 Massa absoluta e relativa de órgãos

As massas corporais absolutas ou relativas, no dia do sacrifício, não sofreram alterações significativas com relação ao grupo controle. Porém, todas as doses de DEHP utilizadas causaram aumento na massa absoluta do fígado. A dose de 250 mg/kg não alterou a massa relativa do fígado, mas as outras doses provocaram aumento na massa relativa. As duas maiores doses de DEHP não alteraram a massa absoluta dos rins, mas a dose de 100 mg/kg aumentou a massa do órgão. As três diferentes doses de DEHP não modificaram a massa relativa dos rins em relação ao controle. A dose de 100 mg/kg não alterou a massa absoluta e relativa dos testículos e epidídimos, mas as duas maiores doses causaram redução na massa absoluta e relativa dos órgãos. As três doses de DEHP causaram redução na massa absoluta (próstata e vesícula seminal) e relativa da próstata. As doses de 250 e 500 mg/kg reduziram a massa relativa da vesícula seminal, enquanto que a menor dose não causou alteração nesta variável, em relação ao grupo controle (Tabela 7).

TABELA 7 - EFEITOS DO DEHP SOBRE A MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DE ÓRGÃOS DE RATOS PÚBERES (70 A 78 DIAS DE VIDA)

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)				
		0 (n=16)	100 (n=16)	250 (n=14)	500 (n=14)
Massa corporal (g)		274 ± 7,25	272 ± 3,90	275 ± 8,03	268 ± 7,45
Fígado (g)	absoluta	11,4 ± 0,27	13,6 ± 0,31**	13,2 ± 1,45**	13,3 ± 0,40**
	relativa	4,33 ± 0,070	5,00 ± 0,11**	4,80 ± 0,14	5,00 ± 0,19**
Rins (g)	absoluta	0,99 ± 0,025	1,09 ± 0,032*	1,04 ± 0,028	1,00 ± 0,028
	relativa	0,37 ± 0,006	0,40 ± 0,013	0,38 ± 0,006	0,38 ± 0,006
Testículo (g)	absoluta	1,21 ± 0,039	1,23 ± 0,035	1,01 ± 0,060**	0,35 ± 0,010**
	relativa	0,46 ± 0,016	0,45 ± 0,010	0,37 ± 0,025**	0,13 ± 0,003**
Epidídimo (mg)	absoluta	342 ± 4,95	339 ± 5,50	292 ± 9,77**	188 ± 9,57**
	relativa	0,13 ± 0,004	0,13 ± 0,003	0,11 ± 0,006**	0,07 ± 0,004**
Próstata (mg)	absoluta	157 ± 4,13	124 ± 2,64**	97,3 ± 1,71**	108 ± 1,91**
	relativa	0,060 ± 0,002	0,050 ± 0,006**	0,040 ± 0,001**	0,040 ± 0,002**
Ves. sem. (mg)	absoluta	270 ± 2,02	259 ± 2,99**	218 ± 1,17**	213 ± 1,90**
	relativa	0,100 ± 0,03	0,100 ± 0,002	0,080 ± 0,002**	0,080 ± 0,002**

NOTAS: Ves. sem (corresponde à vesícula seminal). Os resultados expressam as médias ± epm e os resultados relativos expressam média percentual em relação à massa corporal ± epm. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,001$  diferem significativamente quando comparados ao controle (ANOVA- Tukey). n = número de animais investigados.

#### 5.2.4 Contagens espermáticas e níveis plasmáticos de testosterona

Os ratos pré-púberes avaliados na puberdade, expostos às duas menores doses de DEHP, não apresentaram alterações na produção espermática diária ou número de espermatozóides. Entretanto, a maior dose utilizada causou redução em ambos as variáveis avaliadas nos animais, em relação ao grupo controle. As diferentes doses de DEHP não alteraram a taxa de trânsito espermático dos animais em relação ao grupo tratado apenas com veículo (Tabela 8).

TABELA 8 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES, TAXA DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA DE RATOS PÚBERES (70 A 78 DIAS DE VIDA).

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)			
	0 (n=16)	100 (n=16)	250 (n=14)	500 (n=14)
Produção espermática diária (x 10 <sup>6</sup> )	46,7 ± 1,81	43,0 ± 1,65	41,6 ± 2,00	36,4 ± 1,19**
Número de espermatozóides (x 10 <sup>6</sup> )	105 ± 3,68	101 ± 4,54	95,0 ± 4,10	82,5 ± 6,02**
Taxa de trânsito espermático (dias) (a)	2,29 ± 0,10	2,41 ± 0,15	2,46 ± 0,17	2,31 ± 0,20
Níveis plasmáticos de testosterona (ng/mL)	1,44 ± 0,30	1,03 ± 0,24	1,77 ± 0,69	1,05 ± 0,14

NOTAS: Os resultados expressam as médias ± epm. (a) Kruskal-Wallis- Dunn's ( $P > 0,05$ ); \*\*  $P < 0,001$  diferem significativamente do controle (ANOVA-Tukey). n= número de animais investigados.

### 5.3 PROTOCOLO DE MACHOS EXPOSTOS NA PRÉ-PUBERDADE E AVALIADOS NA IDADE ADULTA

#### 5.3.1 Ganho de massa corporal

As massas corporais absolutas dos ratos tratados com o DEHP, e avaliados na idade adulta, não sofreram alterações com relação ao grupo controle (Figura 14).

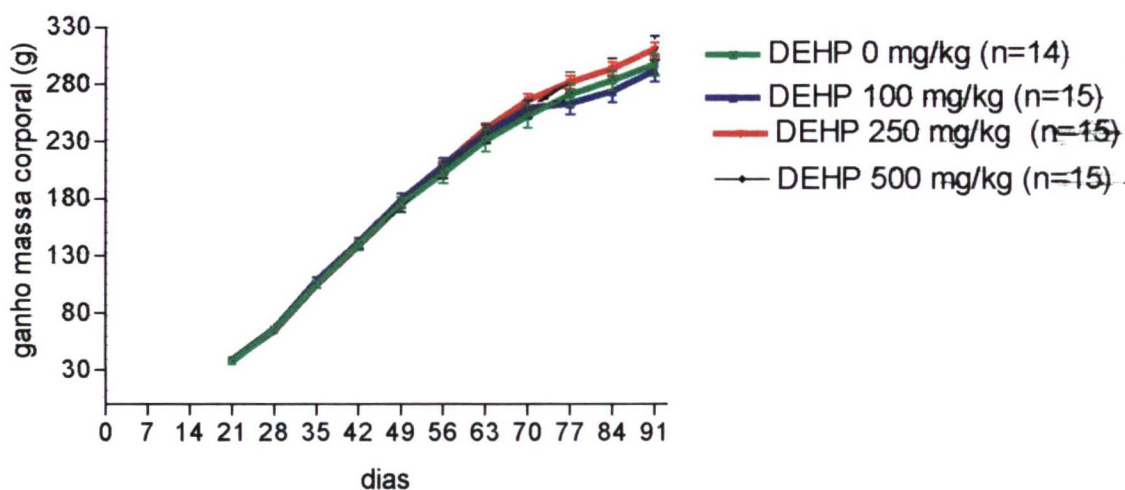


FIGURA 14- GANHO DE MASSA CORPORAL ABSOLUTO DE RATOS ADULTOS DOS GRUPOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.

NOTAS: O DEHP não alterou o ganho de massa corporal absoluto dos ratos, em relação ao grupo controle. n= número de animais utilizados.  $P>0,05$  (ANOVA).

As massas corporais relativas, dos ratos tratados com o DEHP, e avaliadas na idade adulta, não sofreram alterações com relação ao grupo controle (Figura 15).

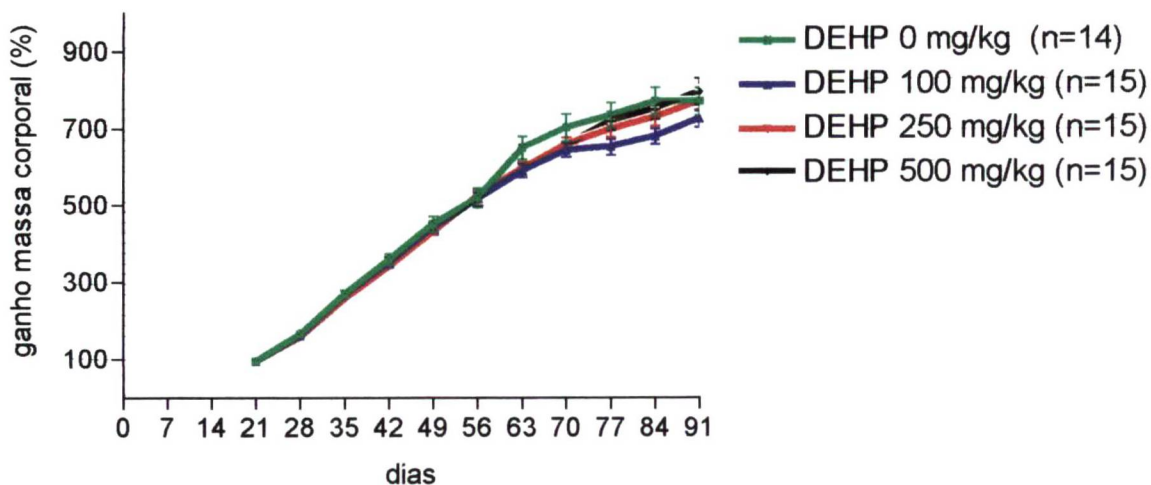


FIGURA 15- GANHO DE MASSA CORPORAL RELATIVO DE RATOS ADULTOS TRATADOS COM VEÍCULO OU DEHP DURANTE A PRÉ-PUBERDADE.

NOTAS: O DEHP não alterou o ganho de massa corporal relativo dos ratos, em relação ao grupo controle. Os dados expressam as médias das massas absolutas corporais dos ratos em relação ao massa no 21º dia de idade  $\pm$  epm. n= número de animais investigados.  $P>0,05$  (ANOVA).

### 5.3.2 Variáveis do teste do campo aberto

O número de levantamentos realizados pelos ratos expostos às doses de 250 e 500 mg/kg não sofreu alterações. A dose de 100 mg/kg aumentou o número de levantamentos. O tempo de congelamento dos ratos expostos à dose de 250 mg/kg não sofreu alteração, mas as outras doses aumentaram a duração deste fenômeno. A dose de 100 mg/kg não alterou o tempo de auto-limpeza dos ratos, mas as duas maiores doses reduziram esta variável. As duas menores doses de DEHP não alteraram a locomoção dos animais, mas a maior dose reduziu o número de vezes que o animal cruzou as retas do campo aberto. Quanto ao número de bolos fecais, a dose de 250 mg/kg não alterou, mas as outras doses reduziram esta atividade realizada pelos ratos (Tabela 9).

TABELA 9 - EFEITOS DO DEHP SOBRE VARIÁVEIS: LEVANTAR, CONGELAMENTO, AUTO-LIMPEZA, LOCOMOÇÃO E NÚMERO DE BOLOS FECAIS, DE RATOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO (87-88 DIAS DE VIDA).

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)			
	0 (n=14)	100 (n=15)	250 (n=15)	500 (n=15)
levantamentos (l)	21,2 ± 1,48	31,6 ± 2,62**	27,7 ± 2,43	18,7 ± 1,69
congelamento (s)	20,2 ± 3,98	99,0 ± 10,1**	27,8 ± 2,28	64,5 ± 14,7**
auto-limpeza (s)	12,1 ± 2,14	8,40 ± 1,44	2,42 ± 0,23**	3,67 ± 0,48**
locomoção (v)	41,8 ± 1,68	42,9 ± 3,18	36,0 ± 1,06	19,6 ± 1,24**
número de bolos fecais	6,46 ± 0,42	2,36 ± 0,36**	4,17 ± 0,72	3,36 ± 0,65**

NOTAS: Os resultados expressam as médias ± epm. \*\*  $P < 0,001$  diferem significativamente em relação ao controle (ANOVA- Tukey). n= número de animais utilizados; s = segundos; v = n° de vezes que o animal cruzou as retas desenhadas no campo aberto; l = n° de vezes que o animal se levantou nas patas traseiras na arena do campo aberto.

### 5.3.3 Massa absoluta e relativa de órgãos

Nos ratos adultos, as três doses de DEHP aumentaram a massa absoluta do fígado, não alterando a massa relativa. Nenhuma das doses de DEHP alterou a massa dos rins. A dose de 100 mg/kg não alterou a massa absoluta ou relativa dos testículos e epidídimos, mas as duas maiores doses de DEHP reduziram a massa absoluta e relativa destes órgãos. As três

diferentes doses de DEHP causaram redução na massa absoluta e relativa de próstata e vesícula seminal, em relação ao grupo controle (Tabela 10).

TABELA 10 - EFEITOS DO DEHP SOBRE A MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DE ÓRGÃOS DE RATOS ADULTOS (91 A 95 DIAS DE VIDA)

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)				
		0 (n=14)	100 (n=15)	250 (n=15)	500 (n=15)
Massa corporal (g)		314 ± 11,03	318 ± 6,50	328 ± 7,63	333 ± 9,71
Fígado (g)	absoluta	12,6 ± 0,45	13,4 ± 0,23**	13,2 ± 0,43 **	14,0 ± 0,17**
	relativa	4,05 ± 0,13	4,23 ± 0,089	4,03 ± 0,14	4,25 ± 0,17
Rins (g)	absoluta	1,15 ± 0,031	1,18 ± 0,019	1,12 ± 0,029	1,19 ± 0,025
	relativa	0,37 ± 0,011	0,37 ± 0,010	0,34 ± 0,010	0,36 ± 0,011
Testículo (g)	absoluta	1,35 ± 0,030	1,24 ± 0,043	1,06 ± 0,090*	0,48 ± 0,072**
	relativa	0,44 ± 0,017	0,39 ± 0,013	0,32 ± 0,028**	0,15 ± 0,023 **
Epidídimo (mg)	absoluta	438 ± 9,41	391 ± 12,5	322 ± 20,9**	232 ± 17,4**
	relativa	0,14 ± 0,0061	0,12 ± 0,0042	0,098 ± 0,006**	0,071 ± 0,006**
Próstata (mg)	absoluta	275 ± 9,20	201 ± 13,80**	170 ± 8,90**	188 ± 15,65**
	relativa	0,09 ± 0,054	0,063 ± 0,0035**	0,052 ± 0,0026**	0,057 ± 0,0042**
Ves.sem. (mg)	absoluta	433 ± 15,3	364 ± 5,96**	343 ± 10,3**	298 ± 10,9**
	relativa	0,14 ± 0,006	0,12 ± 0,002**	0,11 ± 0,004**	0,090 ± 0,004**

NOTAS: (Ves. sem) corresponde à vesícula seminal. Os resultados expressam as médias ± epm e os resultados relativos expressam média percentual em relação à massa corporal ± epm. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,001$  diferem significativamente quando comparados ao controle (ANOVA- Tukey). n = número de animais investigados.

### 5.3.4 Contagens espermáticas e níveis plasmáticos de testosterona

Ratos machos foram expostos ao DEHP na pré-púbere, sendo avaliados na idade adulta quanto à produção espermática diária. As duas menores doses de DEHP não alteraram a produção espermática diária ou o número de espermatozóides dos ratos. Entretanto, a maior dose utilizada causou redução em ambos as variáveis avaliadas nos animais, em relação ao grupo controle. As diferentes doses de DEHP não alteraram a taxa de trânsito espermático dos ratos adultos em relação ao grupo tratado apenas com veículo (Tabela 11).

TABELA 11 -PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES, TAXA DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA DE RATOS ADULTOS (91 A 95 DIAS DE VIDA)

Variáveis	DEHP (mg/kg/dia)			
	0 (n= 14)	100 (n= 15)	250 (n= 15)	500 (n= 15)
Produção espermática diária (x 10 <sup>6</sup> )	54,7 ± 3,12	51,5 ± 2,10	50,4 ± 2,55	43,5 ± 1,38**
Número de espermatozóides (x 10 <sup>6</sup> )	246 ± 4,60	236 ± 3,91	234 ± 3,95	215 ± 4,74**
Taxa de trânsito espermático (dias)	4,71 ± 0,32	4,66 ± 0,18	4,82 ± 0,26	5,02 ± 0,16
Níveis de testosterona plasmática (ng/mL)	1,15 ± 0,30	1,27 ± 0,26	0,50 ± 0,046	0,67 ± 0,12

NOTAS: Os resultados expressam as médias ± epm. (a) Kruskal-Wallis- Dunns ( $P > 0,05$ ); \*\*  $P < 0,001$  diferem significativamente do controle (ANOVA-Tukey). n = número de animais investigados.

## 6 DISCUSSÃO

A função reprodutiva em animais depende da integração de muitos sistemas e órgãos. Os organismos imaturos, em desenvolvimento, são mais sensíveis às substâncias químicas com atividade endócrina, podendo manifestar efeitos tóxicos. A exposição de animais (particularmente na fase pré-púbere) aos ftalatos, pode causar alterações no sistema nervoso central, reprodutor e modificações funcionais que se tornam aparentes posteriormente, na idade adulta. Desta forma, a exposição de ratos nas fases *in utero*, lactacional e pré-púbere (críticas para o desenvolvimento de órgãos reprodutores), pode ser utilizada no estudo dos possíveis efeitos adversos causados por substâncias suspeitas de desregularem o sistema hormonal (NEUBERT e CHAHOUD, 1995; GRAY e OTSBY, 1998).

Entretanto, para a maioria das substâncias químicas, não há dados suficientes para estabelecer uma relação entre os níveis de exposição e os efeitos adversos sobre a saúde humana. Informações obtidas de exposições ocupacionais são imprecisas, sendo difícil documentar os níveis de exposição na população em geral. Os estudos toxicológicos em animais são importantes, mas não consideram as diferenças interespecíficas como a maior sensibilidade do sistema reprodutivo masculino humano em relação aos outros mamíferos, diante dos desreguladores endócrinos (ZENICK e CLEGG, 1989).

As substâncias químicas com potencial de desregular o sistema endócrino podem causar toxicidade especialmente em organismos imaturos, interferindo no desenvolvimento normal dos órgãos sexuais, tecidos responsivos aos estímulos hormonais e sistema nervoso central (EERTMANS et al., 2003; GRAY et al., 2002). Muitos estudos apontam para as características antiandrogênicas do DEHP como sendo responsáveis por alterações no sistema reprodutivos de animais expostos em fases críticas de desenvolvimento (KAVLOCK et al.; 2002; SANTANA et al., 2002). Desta forma, baseando-se em normas e protocolos propostos pelo Comitê Consultivo da Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana, para avaliação dos riscos de toxicidade reprodutiva (US EPA, 1997; EDSTAC, 1998), os possíveis efeitos tóxicos do DEHP sobre o sistema reprodutor de ratos expostos na fase pré-púbere foram investigados. O experimento realizado representa um modelo biológico útil para o conhecimento da toxicidade de ftalatos, incluindo efeitos mediados pelo sistema endócrino.

## 6.1 VARIÁVEIS AVALIADAS NAS FÊMEAS

### 6.1.1 Ganho de massa corporal

Dentre as variáveis avaliadas, a redução da massa corporal pode fornecer informações sobre o estado geral de saúde dos animais, dado importante para a interpretação de efeitos tóxicos da substância testada (US EPA, 1996). O DEHP não interferiu no ganho de massa corporal relativo ou absoluto das fêmeas tratadas durante a pré-puberdade (do 21º ao 42º dia de vida). Desta forma, para as condições experimentais e variáveis investigadas no presente estudo, a NOEL-dose de toxicidade geral foi de 500 mg de DEHP/kg.

### 6.1.2 Abertura do canal vaginal, primeiro estro e regularidade do ciclo estral

Nos mamíferos, o período pós-desmame é uma fase de ocorrência de integração progressiva de processos neuro-endócrinos, levando à maturação fisiológica do sistema reprodutor das fêmeas. Os processos fisiológicos que ocorrem no início da puberdade tornam esta fase sensível às desregulações hormonais. Muitas substâncias tóxicas podem desregular o desenvolvimento normal da puberdade, por exemplo, atrasando ou adiantando a maturação orgânica. Os mecanismos envolvidos na desregulação fisiológica e hormonal dependem da natureza do composto suspeito e da sensibilidade do organismo. Esta sensibilidade pode variar entre as espécies e linhagens dos animais utilizados nos experimentos (SONNENSCHNEIN et al., 1998; US EPA, 1997).

O sistema reprodutor das ratas assemelha-se em muitos aspectos ao sistema reprodutor feminino dos humanos. Ambas têm ciclos regulares, ovulações espontâneas e surtos de gonadotrofinas no meio do ciclo, que levam à maturação folicular semelhante. Por este motivo, estes animais têm sido utilizados com frequência em estudos laboratoriais, para elucidar mecanismos envolvidos na função reprodutora dos mamíferos. A exposição ocupacional de mulheres ao DEHP pode causar alterações ovarianas, modificações hormonais, pela semelhança existente na fisiologia de roedores e humanos, pois foram encontradas altas concentrações de ftalatos em mulheres que apresentaram ciclos hipoestrogênicos e anovulatórios (DAVIS et al., 1994b).

O início da puberdade na fêmea é um processo transicional, relacionado à abertura do canal vaginal e à primeira ovulação (GOLDMAN et al., 2000). A abertura do canal

vaginal ocorre entre o 30º e 37º dia de vida, mas ocorrem variações entre as linhagens e colônias da mesma linhagem. O crescimento folicular é estimulado por volta de 8 dias anteriores à primeira ovulação, podendo ocorrer até mesmo na época da abertura do canal vaginal. A partir de então, as fêmeas mostram um padrão de citologia vaginal e hormônios circulantes, que se repetem a cada 4-5 dias. Entretanto, foram relatados na literatura muitos casos de ciclos irregulares durante o período imediatamente após a pós-puberdade. A avaliação de variáveis reprodutivas mediadas pelo estrógeno, como a abertura do canal vaginal, idade para o primeiro cio (estro) e regularidade do ciclo estral, permite monitorar o funcionamento do sistema reprodutivo das fêmeas. A realização de esfregaços vaginais permite o estudo da citologia do epitélio vaginal, indicativa das diferentes fases do ciclo estral (GOLDMAN et al., 2000).

Em fêmeas, os estágios iniciais (abertura do canal vaginal) e final (o estabelecimento de *feedback* positivo e ovulação) da maturação sexual são regulados pelo estrógeno. A formação de estrógeno a partir dos andrógenos é necessária para induzir a puberdade nos animais. A liberação de LH em fêmeas Wistar está associada com a abertura do canal vaginal. Os hormônios FSH e LH atuam sobre as células granulosas ovarianas e tecais, estimulando a produção de estradiol, maturação de folículos/ovócitos e ovulação, respectivamente. Um aumento nos níveis de prolactina é essencial para a aquisição da abertura do canal vaginal e transição para a maturidade sexual. Porém, o período da ocorrência deste evento pode ser influenciado por alterações endócrinas ocorridas no período púbere (GUYLTON et al., 2002; DOUGLAS, 2002).

No presente estudo, os animais que receberam DEHP (100, 250 ou 500 mg/kg) por via oral, não sofreram alterações nas variáveis de abertura do canal vaginal, idade de ocorrência do primeiro cio, regularidade do ciclo estral e massas corporais absolutas nos dias da ocorrência destes eventos, com relação ao grupo controle. O tempo de duração do ciclo estral está de acordo com o que foi descrito na literatura. Esses resultados sugerem a ausência de efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos para o DEHP. Apesar do protocolo realizado permitir a detecção de substâncias químicas capazes de alterar a função endócrina por meio de vários mecanismos, mais dados são necessários para determinar a validade do experimento na triagem de substâncias com atividade endócrina desconhecida (MARTY et al., 1999). Dependendo do experimento, a idade da ocorrência da abertura do canal vaginal é variável e uma relação entre massa corporal e abertura do canal vaginal parece ser constante. Quanto maior o grau de redução na massa corporal, mais provável é a ocorrência de um

atraso no início da puberdade (MARTY et al., 1999). Apesar da citologia vaginal ser compatível com um ciclo estral normal, pode haver toxicidade ovariana e alterações hormonais nos animais tratados com DEHP (DAVIS et al., 1994 a,b). Desta forma, a regularidade do ciclo estral não pode ser a única variável indicadora de toxicidade ovariana.

### 6.1.3 Massa de órgãos reprodutivos

Alterações nas massas absolutas ou relativas de órgãos reprodutivos constituem claras evidências para classificar um agente como potencialmente prejudicial ao sistema reprodutivo (ZENICK e CLEGG, 1989). A massa de órgãos reprodutivos femininos é uma medida estabelecida de estrogenicidade de uma substância química. Porém, a sensibilidade dos experimentos que avaliam esta ainda é questionável, pois a detecção de mudanças na expressão genética pode não estar aparente em respostas teciduais ou orgânicas imediatas.

Dentre as variáveis avaliadas, a determinação da massa de órgãos caracteriza qualitativamente o funcionamento de cada órgão e o estado de saúde do animal. Em nossa investigação, observamos que a exposição ao DEHP induziu aumento de massa ovariana e uterina nos animais. DAVIS et al., 1994 observaram que o DEHP causou redução nos níveis de estradiol plasmáticos, levando à supressão na ovulação e ao desenvolvimento de ovários policísticos. O aumento na massa do ovário dos animais tratados com DEHP pode estar relacionado à presença de múltiplos cistos ovarianos, induzidos pelo composto, porém estes dados não foram avaliados no presente estudo. O DEHP também pode estar atuando como agente estressor nas fêmeas, causando alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (WONG et al., 2002).

O aumento na massa uterina, após a exposição a compostos estrogênicos, pode ocorrer pelo aumento da recaptção de líquidos, aumento do tamanho das células (hipertrofia), e/ou aumento no número de células (hiperplasia). O DEHP pode estar causando retenção de líquido nos órgãos sexuais femininos, como ocorreu no útero, pela capacidade de provocar edema tecidual relacionada à liberação de glicocorticóides do córtex adrenal (WONG et al., 2002). No útero, o DEHP pode causar toxicidade sem necessitar da ligação do flutato com receptores de estrógeno locais. Contudo, o DEHP pode causar toxicidade por interagir com receptores de estrógenos no útero e ovários, atuando como agonista parcial (PARKER et al., 2003; OKUBO et al., 2003). Entretanto, estudos prévios demonstraram que o DEHP não causou respostas estrogênicas significativas (teste

uterotrófico) ou de queratinização vaginal em ratas (ZACHAREWSKI et al., 1998). O aumento da massa ovariana e uterina causado pelo DEHP pode estar relacionado à hiperplasia ou hipertrofia, embora a análise histológica do útero e ovário das ratas não tenha sido avaliada neste protocolo, para confirmar a presença de hipertrofia/ hiperplasia tecidual.

MOORE et al. (2000) discutem que o DEHP pode causar toxicidade sem necessitar interagir com receptores de estrógeno, ou relacionar-se com eventos moleculares mediados por estrógeno nos ratos. Porém, há evidências de que o DEHP desregula o metabolismo do estrógeno, *in vivo*, interagindo de modo fraco com o receptor de estrógeno (OKUBO et al., 2003). As alterações causadas pelo DEHP nos níveis séricos de estrógeno podem ser influenciadas pelo gênero do animal, pois em fêmeas, o ftalato causa uma redução nos níveis do estrógeno, mas nos machos causa um aumento nos níveis séricos deste hormônio (DAVIS et al., 1994a). Estas diferenças ocorrem pelo processo de metabolismo do estrógeno, dependente do gênero. A redução do estradiol plasmático em fêmeas, e o aumento em machos, pode ser uma resposta secundária à toxicidade hepática e ovariana resultantes da desregulação na síntese e mecanismos de sinalização. Nas fêmeas, a redução do estradiol pode relacionar-se à produção reduzida ou degradação aumentada do hormônio. Nos machos, podem ocorrer alterações como aumento na produção e redução na degradação do estrógeno (CORTON et al., 1997; DAVIS et al., 1994a). Outros estudos demonstram que o DEHP, em culturas de células de granulosa, inibe a enzima aromatase, conseqüentemente inibindo a síntese de estradiol (DAVIS et al., 1994b). Se o DEHP reduz os níveis de estrógeno no plasma, o aumento na massa de útero e ovários do presente estudo pode ser explicado por fibrose dos órgãos, induzida pela ação dos andrógenos no organismo das ratas. Assim, a redução nos níveis plasmáticos de estrógeno (desregulação na homeostasia) pode ter sido compensada com o aumento dos níveis plasmáticos de andrógenos. Estes hormônios estariam relacionados ao aumento de fibras colágenas e elásticas teciduais (fibrose), evidenciando outro mecanismo responsável pelo aumento da massa do útero e ovários (FISHER et al., 1977).

ZACHAREWSKI et al. (1998) utilizaram doses de 20, 200 ou 2000 mg/kg de DEHP e outros ftalatos por via oral, administradas a ratas Sprague-Dawley, no teste uterotrófico. O ftalato não ativou a transcrição genética do elemento responsivo ao estrógeno, mas pode ser que o DEHP ligue-se ao receptor de estrógeno e induza expressão genética. É importante considerar que muitos desreguladores endócrinos dotados de atividade estrogênica também são anti-estrogênicos. Os compostos que mimetizam

hormônios podem apresentar muitos mecanismos de ação, sendo difícil interpretar seus efeitos tóxicos *in vivo* (OKUBO et al., 2003).

O DEHP pode ser tóxico para o sistema reprodutivo feminino, pois seu potencial de atuar no ovário foi recentemente demonstrado. DAVIS et al. (1994a), tratando ratas Sprague-Dawley, diariamente com 2 g/kg de DEHP (por gavagem, durante 12 dias), investigaram a morfologia ovariana, níveis plasmáticos de FSH e LH, progesterona e estradiol. Neste estudo, o DEHP prolongou a duração dos ciclos estrais e suprimiu a ovulação. A exposição ao ftalato causou ciclos anovulatórios hipoestrogênicos e ovários policísticos em fêmeas adultas. Em ratas que receberam o DEHP por via oral, o mecanismo de formação dos cistos foliculares pode envolver alteração na secreção LH, não envolvendo uma ação direta do ftalato sobre as células granulosas ovarianas (DAVIS et al., 1994 a). A policistose ovariana estaria relacionada ao aumento de massa e alteração funcional. Mesmo que o potencial estrogênico do DEHP seja cerca de um milhão de vezes mais fraco que o potencial do 17- $\beta$ -estradiol, a acumulação de DEHP em tecidos pode chegar a concentrações maiores que a concentração do 17- $\beta$ -estradiol, acrescida dos níveis normais, circulantes do hormônio no organismo. Assim, a acumulação do DEHP no organismo das ratas pode ter sido ser suficientemente elevada para causar alterações no sistema reprodutivo, manifestadas pelas formações tumorais ovarianas, edema tecidual (reações inflamatórias) ou disfunções resultantes do estresse oxidativo induzido pelo ftalato (WONG et al., 2002; SEO et al., 2003).

Muitos compostos antiandrogênicos também são dotados de atividade estrogênica fraca. OKUBO et al. (2003), cultivaram células do câncer de mama humano (MCF-7), que proliferam diante de compostos estrogênicos, observando que o DEHP (concentração de  $10^{-3}$  M) estimulou a proliferação celular. Os autores sugeriram que o DEHP interage de modo fraco com o receptor de estrógeno. Desta forma, os efeitos do DEHP observados nas fêmeas avaliadas no protocolo pubertal indicam presença de atividade estrogênica reduzida do composto, manifestada por meio do aumento na massa de órgãos responsivos ao estrógeno. A ação do DEHP sobre útero e ovários (órgãos com maior sensibilidade ao estrógeno) do que sobre o epitélio vaginal (eventos de abertura do canal vaginal, ciclo estral e primeiro estro), igualmente sugere a fraca estrogenicidade do ftalato, manifestando toxicidade sobre órgãos responsivos aos estrógenos, como útero e ovários (MOORE et al., 2000).

#### 6.1.4 Massa de órgãos metabolizadores e excretores

O DEHP tem potencial de causar toxicidade hepática e renal. A massa absoluta e relativa do fígado dos animais aumentou em até 58% e 63% , respectivamente, na dose de 500 mg/kg em relação ao controle. A massa absoluta e relativa dos rins aumentou em até 44% e 41%, respectivamente, na dose de 250 mg/kg em relação ao controle. Estudos prévios demonstraram que o DEHP produz toxicidade hepática, carcinomas e adenomas hepatocelulares em roedores, relacionados à ativação de PPAR $\alpha$  (BENTLEY et al., 1993; KAVLOCK et al., 2002). O aumento na massa do fígado e rins dos animais expostos ao DEHP por via oral, pode estar indicando alterações funcionais nestes órgãos, proliferação tecidual e indução de proliferação peroxissomal pelo ftalato, além de desequilíbrio nos sistemas enzimáticos. Em nossas condições experimentais, não podemos afirmar que houve proliferação de peroxissomos ou alterações enzimáticas induzidas pelo DEHP, pois estas variáveis não foram avaliadas. Entretanto, a literatura científica fornece evidências dos efeitos tóxicos atribuídos ao DEHP que possivelmente ocorreram nos animais do presente estudo. Além de alterações hepáticas, o DEHP pode aumentar a massa dos rins, alterar a pigmentação do órgão e induzir policistose renal (LOFF et al., 2000). Muitas destas características tóxicas foram identificadas nos ratos do presente estudo, como a alteração na pigmentação renal nos animais tratados com o ftalato.

#### 6.2 VARIÁVEIS AVALIADAS NOS MACHOS

Há relatos de que a saúde reprodutiva masculina tem se deteriorado em muitos países, nas últimas décadas (CARLSEN et al., 1992; SHARPE et al., 1994). Dentre vários autores que estão identificando anomalias na saúde reprodutiva, TOPPARI et al. (1996) relatam o aumento na incidência de câncer testicular, hipospadias e criptorquidismo. A exposição a diversas substâncias químicas produzidas e utilizadas precariamente em larga escala devido ao desenvolvimento industrial, pode explicar as alterações na saúde reprodutiva humana e animal.

Em fases críticas do desenvolvimento como a puberdade, os hormônios sexuais desempenham papel importante. Nestas fases, as substâncias com o potencial de desregular o sistema endócrino podem interferir no desenvolvimento normal dos órgãos sexuais e tecidos responsivos aos estímulos hormonais (NEUBERT e CHAHOUD, 1995; TOPPARI

et al., 1996; GRAY e OTSBY, 1998). Desta forma, baseando-se nas normas e protocolos propostos pelo Comitê Consultivo da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana para avaliação dos riscos de toxicidade reprodutiva, investigamos os possíveis efeitos adversos do DEHP sobre o desenvolvimento geral e sexual de ratos expostos cronicamente no período pré-púbere, caracterizado como uma fase crítica para o desenvolvimento de um organismo (US EPA, 1996; EDSTAC, 1998).

#### 6.2.1 Ganho de massa corporal

O DEHP não interferiu no ganho de massa corporal relativo ou absoluto dos ratos púberes. Os ratos adultos também não mostraram alterações no ganho de massa corporal relativo ou absoluto, em relação ao grupo controle. Estes resultados indicam que para as condições experimentais, a NOEL-dose para toxicidade geral foi de 500 mg/DEHP/kg.

#### 6.2.2 Avaliação do dia da ocorrência da separação prepucial

O tempo médio para a separação prepucial nos ratos machos é uma variável andrógeno-dependente, um sinal externo do desenvolvimento sexual de ratos machos, dependente da secreção de andrógenos (DALSENTER et al., 1999). A exposição dos animais ao DEHP na fase pré-púbere alterou (estatisticamente) o período médio (dias) para a separação prepucial, mas estes dados não trazem repercussões em nível biológico, já que a diferença de um dia na observação da variável encontra-se na variabilidade normal de ocorrência deste fenômeno andrógeno-dependente. Desta forma, a diferença estatística encontrada não reflete alterações nos padrões biológicos. As massas corporais absolutas dos animais, no dia da ocorrência da separação prepucial, não sofreram alterações.

#### 6.2.3 Massa de órgãos metabolizadores e excretorios

A avaliação da massa de órgãos fornece indícios da toxicidade causada pelo DEHP nos animais. No protocolo realizado, os ratos púberes apresentaram aumento na massa absoluta e relativa do fígado de até 19% e 15%, respectivamente, na dose de 100 mg/kg em relação ao grupo controle. Houve aumento na massa absoluta e relativa dos rins dos animais púberes, de até 10 % e 8% respectivamente, na dose de 100 mg/kg em relação ao grupo

controle. Nos ratos adultos, a massa absoluta do fígado aumentou em até 11 % na dose de 500 mg/kg, em relação ao grupo controle. A massa relativa do fígado e rins, e a massa absoluta dos rins, não sofreram alterações significativas com relação ao grupo controle, nos animais adultos. FAN et al. (2003) determinaram que ratos submetidos ao tratamento prolongado com o DEHP (via oral) manifestam toxicidade hepática (hepatomegalia, hepatocarcinogênese) e alterações no metabolismo de ácidos graxos.

O DEHP induz a proliferação de peroxissomos hepáticos e crescimento do fígado (BENTLEY et al., 1993). Neste órgão, os peroxissomos são relacionados à clivagem de ácidos graxos de cadeia longa, complementando o metabolismo mitocondrial destes compostos e regulam genes envolvidos na expressão de vários membros da família do citocromo P<sub>450</sub>. Um aumento nos níveis de RNAm de P<sub>450</sub> foi observado no fígado e rins de ratos F-344, após exposição crônica aos proliferadores de peroxissomos (FAN et al., 2003). Os mecanismos possivelmente relacionados à indução na proliferação de peroxissomos pelo DEHP envolvem a ativação de receptores específicos citossólicos, facilitando sua translocação para o núcleo da célula e ativação da expressão de genes específicos, além da desregulação no metabolismo lipídico (FAN et al., 2003).

A produção desordenada de enzimas peroxissomais causada pelo DEHP faz aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem estar relacionadas ao surgimento de tumores hepáticos nos animais que receberam o ftalato pela via oral. As espécies reativas de oxigênio podem causar danos indiretos no DNA, lesões hiperplásicas, estimulando o crescimento do órgão e relacionando-se à formação tumoral (BENTLEY et al., 1993). A resposta das diferentes espécies animais diante dos proliferadores de peroxissomos é variável. Os roedores são bastante sensíveis aos proliferadores de peroxissomos, enquanto que os humanos são relativamente insensíveis ou não responsivos às doses que produzem toxicidade em roedores (BENTLEY et al., 1993).

Há suspeitas do plastificante causar rins policísticos em roedores (LOFF et al., 2000). Como em nossas condições experimentais o massa dos rins sofreu aumento, pode-se suspeitar da presença de policistose neste órgão, induzida pelo DEHP, além de proliferação de peroxissomos renais. Entretanto, este dado não pode ser confirmado, pois não foi realizada a avaliação histológica dos órgãos excretórios dos animais experimentais para identificar cistos renais.

#### 6.2.4 Massa de órgãos sexuais

A determinação da massa de órgãos sexuais masculinos (testículos, epidídimo, vesícula seminal e próstata) permite avaliar os riscos reprodutivos, pois estes órgãos dependem de andrógenos e podem refletir mudanças no *status* androgênico do animal ou na função testicular (STOKER et al., 2000). A massa absoluta dos testículos é preferencialmente utilizado em relação à massa relativa, porque em ratos adultos, a massa dos testículos e a massa corporal são variáveis independentes (AMANN et al., 1982; ZENICK e CLEGG, 1989). Normalmente, a massa testicular sofre pequena variação dentro de uma espécie, indicando que a alteração na massa absoluta dos testículos evidencia alterações patológicas na gônada (ZENICK e CLEGG, 1989; US EPA, 1996). Modificações toxicocinéticas dependentes da idade, existentes entre ratos adultos e jovens, são responsáveis pela maior sensibilidade destes animais, às injúrias nos órgãos reprodutivos após a exposição ao DEHP (SCHEUPLEIN et al., 2002).

No protocolo desenvolvido, os animais púberes sofreram redução nas massas absolutas e relativas de testículos, de até 71 e 72%, respectivamente, na dose de 500 mg/kg. Os animais adultos também apresentaram redução nas massas absolutas e relativas de testículos, de até 65 e 66%, respectivamente, na dose de 500 mg/kg. Os resultados demonstram a irreversibilidade dos efeitos testiculares provocados pelo DEHP, pois a toxicidade gonadal manifestou-se na puberdade, permanecendo na idade adulta.

ARCADI et al. (1998) relatam a irreversibilidade nos danos testiculares causados por DEHP (animais com mais de 56 dias de vida). Entretanto, OISHI et al. (1985) relatam reversibilidade da injúria testicular causada por DEHP, a partir da interrupção da administração de DEHP. Há outras pesquisas mostrando a reversibilidade da toxicidade gonadal induzida pelo ftalato. ISHIHARA et al. (2000) induziram distúrbios na espermatogênese de ratos administrando o DEHP na dieta, observando atrofia testicular nos animais que receberam 2% de DEHP (a maior concentração utilizada). Houve reversão na patologia, após administração simultânea de vitaminas antioxidantes (C e E) nos ratos, sugerindo que o efeito antioxidante das vitaminas pode proteger os testículos da toxicidade induzida pelo DEHP. OISHI et al. (1985) estudaram os efeitos do DEHP (2g/kg) administrado por via oral a ratos jovens, por 14 dias, evidenciando a reversibilidade parcial da atrofia testicular induzida pelo DEHP. A metade dos animais foi sacrificada ao final do tratamento e os demais ficaram 45 dias sem receber o ftalato, sendo então sacrificados. Os

autores verificaram que a concentração de testosterona dos ratos sacrificados logo após o término do tratamento com DEHP era baixa, mas apresentou-se normal nos ratos que ficaram 45 dias sem tratamento, apesar destes animais manifestarem toxicidade reprodutiva (atrofia testicular, reduções na espermatogênese, na concentração de zinco e nos níveis de testosterona).

A administração de DEHP, por via oral, a animais pré-púberes, causa toxicidade no epidídimo. Os animais púberes sofreram redução nas massas absolutas e relativas de epidídimos, de até 45 e 46%, respectivamente, na dose de 500 mg/kg. Os animais adultos também apresentaram redução nas massas absolutas e relativas de epidídimos, de até 47 e 49%, respectivamente, na mesma dose. Assim, o período em que os animais ficaram sem receber o DEHP não foi suficiente para permitir a reversão dos efeitos tóxicos reprodutivos. O DEHP também é tóxico para a próstata, pois os animais púberes apresentaram redução na massa absoluta deste órgão, de até 38% (dose de 250 mg/kg) e relativo (de até 34%) nas doses de 250 e 500 mg/kg. Os animais adultos apresentaram redução nas massas absolutas e relativas da próstata, de até 38 e 42%, respectivamente, na dose de 250 mg/kg. Os animais púberes apresentaram redução na massa absoluta da vesícula seminal, de até 21% (dose de 500 mg/kg) e relativo (de até 20%), nas doses de 250 e 500 mg/kg. Os animais adultos também apresentaram redução nas massas absolutas e relativas da vesícula seminal, de até 31 e 36%, respectivamente, na dose de 500 mg/kg. Assim, o DEHP causa efeitos tóxicos irreversíveis sobre a próstata e vesícula seminal, pois a toxicidade manifestou-se na puberdade, permanecendo na idade adulta. A próstata, vesícula seminal e os outros órgãos do sistema reprodutor masculino dependem do estímulo androgênico para ganhar e manter massa durante e depois da puberdade. Após a análise dos resultados dos animais púberes e adultos, caracterizando alterações significativas nas massas absolutas e relativas dos testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal, fica evidente a toxicidade do DEHP sobre o sistema reprodutor masculino (US EPA, 1996). OSTBY et al. (1999) relatam que as substâncias com ação antiandrogênica podem reduzir o massa das glândulas sexuais acessórias e causar outras alterações estruturais e funcionais. OISHI et al. (1984) observaram casos de atrofia testicular e redução na concentração de zinco no órgão, em ratos que receberam uma dieta com DEHP a 2%. O principal efeito do DEHP nos testículos é atrofia de túbulos seminíferos e redução na espermatogênese. No presente estudo, vários casos de atrofia testicular foram observados. Provavelmente nestes animais houve depleção testicular de zinco, relacionada às alterações na espermatogênese. POON et al. (1997) avaliaram ratos

púberes que foram expostos ao DEHP por meio da dieta, nas concentrações de 0,4; 3,7; 38 e 375 mg/kg/dia, durante 13 semanas. As lesões histopatológicas testiculares foram severas nos animais que receberam 375 mg de DEHP/kg/dia.

PUGH et al. (2000) estudaram o efeito do DEHP (via oral), em macacos pré-púberes (2 anos de idade), utilizando 500 mg/kg/dia, durante 14 dias. Os macacos pré-púberes são tão sensíveis aos efeitos tóxicos do DEHP quanto os ratos pré-púberes, tanto que os autores identificaram alterações patológicas nos testículos dos animais. Pela proximidade filogenética existente entre os macacos e os seres humanos, sugere-se que há possibilidade dos seres humanos sofrerem injúrias no sistema reprodutor, quando expostos ao DEHP.

As reduções observadas na massa de órgãos sexuais do presente protocolo não excluem a possibilidade do DEHP ser um agente estrogênico fraco, relacionado a alterações no número de células dos órgãos sexuais e produção de fluido na rede testicular, comprometendo o normal funcionamento dos órgãos reprodutores masculinos. Desta forma, o comprometimento da função dos órgãos dos ratos expostos ao DEHP na pré-puberdade, pode estar relacionado à atividade estrogênica fraca do ftalato (OKUBO et al., 2003; ASAI et al., 2000).

#### 6.2.5 Contagens espermáticas

Os protocolos de exposição crônica (fase pré-púbere) sugeridos pelo EDSTAC devem ser realizados para caracterizar o potencial das substâncias testadas sobre a desregulação do sistema endócrino. Estes protocolos auxiliam na compreensão dos mecanismos de ação e das possíveis injúrias, decorrentes da ação de substâncias sobre organismos imaturos e/ou já desenvolvidos (EDSTAC, 1998). A partir de estudos andrológicos, as contagens de espermatozóides do epidídimo e de espermátides (testiculares), resistentes à homogeneização, permitem identificar alterações na espermatogênese (PARMAR et al., 1986). Dentre as variáveis reprodutivas avaliadas neste protocolo, o número de espermatozóides na cauda do epidídimo, a produção espermática diária e a taxa de trânsito espermático, foram significativamente afetados nos períodos investigados (puberdade e idade adulta). A exposição dos ratos à maior dose de DEHP reduziu a produção espermática diária em 23 % nos animais púberes, e de 20 % nos animais adultos, com relação ao grupo controle. A exposição dos ratos à maior dose de DEHP

reduziu o número de espermatozóides em 21 % nos animais púberes, e de 13 % nos animais adultos, com relação ao grupo controle. A taxa de trânsito espermático não sofreu alterações nos animais púberes ou adultos tratados com DEHP, com relação ao grupo controle.

Uma possível interferência na síntese de androgênios, FSH e LH pode prejudicar o desenvolvimento geral do trato reprodutivo masculino, manifestando-se pela alteração em variáveis como produção espermática diária, contagem de espermatozóides e taxa de trânsito espermático. No macho, o LH estimula a secreção de testosterona pela ação direta nas células de Leydig testiculares, enquanto que o FSH liga-se às células de Sertoli dentro dos túbulos seminíferos, auxiliando na espermatogênese (GUYLTON et al., 2002; DOUGLAS, 2002). O tamanho dos testículos e a produção espermática dependem do número de células de Sertoli formadas no período perinatal (SHARPE et al., 1994; TOPPARI et al., 1996). A toxicidade testicular mediada pelo metabólito MEHP envolve alterações nas células de Sertoli como vacuolizações no retículo endoplasmático, redução na síntese da proteína de ligação ao andrógeno, colapso no filamento de vimentina e alteração na formação de fluido nos túbulos seminíferos (RICHBURG et al., 2002). Estas disfunções podem afetar profundamente o processo espermatogênico (ZENICK e CLEGG, 1989). No protocolo apresentado, os animais expostos ao DEHP apresentaram alterações na espermatogênese, sugerindo fisiopatologia testicular. Desta forma, o número e a função das células de Sertoli dos ratos podem ter sido alterados pelo DEHP, mas esta afirmação não pode ser comprovada, pois não analisamos quantitativa ou qualitativamente estas células. Uma substância que reduza a multiplicação das células de Sertoli pode afetar de modo irreversível a função reprodutiva do animal, pois estas células não se dividem no rato adulto e constituem uma população fixa de células que dão suporte físico e bioquímico às células germinativas na espermatogênese (ORTH et al., 1982). ASHBY et al. (1997a) expuseram ratos ao DEHP, por via oral, identificando redução na produção espermática diária e o número de espermatozóides. Na avaliação do protocolo de exposição de animais na fase pré-púbere, as reduções no número de espermatozóides na cauda do epidídimo e produção espermática diária ocorreram na puberdade e se mantiveram até a idade adulta, refletindo uma interferência na espermatogênese, embora o efeito sobre o número de espermatozóides não seja uma alteração específica desse processo (DALSENTER et al., 1999).

LOVERKAMP-SWAN et al. (2003) relatam que o MEHP causa redução na atividade, RNAm e níveis da aromatase (enzima taxa-limitante), que converte testosterona em estradiol nas células granulosas, um tipo celular que apresenta muitas características

funcionais e estruturais em comum com as células de Sertoli. Em ratos imaturos, a principal fonte de estrógeno vem destas últimas células, mas as células germinativas também têm receptores de estrógeno, evidenciando a importância deste hormônio para a espermatogênese.

A espermatogênese de roedores é parcialmente controlada pelos estrógenos. As células de Leydig têm enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos a partir de andrógenos, em ratos adultos. Nos ratos imaturos, as células de Sertoli são a principal fonte de estrógenos, importantes na sobrevivência de células germinativas, maturação de espermátides e fertilidade (CARREAU et al., 2003). O DEHP inibe a enzima aromatase, reduzindo a síntese de estrógenos essenciais à espermatogênese. Outro mecanismo do DEHP alterar a espermatogênese em ratos, envolve a desregulação na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos, causando apoptose de células germinativas. Assim, dentre os efeitos tóxicos causados pelo ftalato, destacam-se as reduções no número de espermatozóides e na produção espermática diária dos animais (WONG et al., 2002; PARK et al., 2002).

#### 6.2.6 Níveis plasmáticos de testosterona

A concentração de testosterona no plasma de ratos Wistar aumenta mais de 15 vezes a partir do 28º dia de vida, até a fase adulta. O primeiro aumento significativo nos níveis séricos deste hormônio, em ratos Wistar, ocorre entre o 40º e 50º dia de vida, e um aumento progressivo pode ocorrer no máximo até o 76º dia de vida. A partir de então, os níveis séricos da testosterona sofrem redução gradativa, atingindo níveis adultos no 97º dia de vida. Na puberdade, os testículos são ativados, sofrem maturação sexual e secretam testosterona, produzindo espermatozóides (WITORSCH et al., 2002). O DEHP, em nossas condições experimentais, não alterou os níveis plasmáticos de testosterona dos ratos púberes e adultos, apesar de induzir alterações nas massas absolutas e relativas nos órgãos reprodutivos e glândulas acessórias sexuais. Por outro lado, os ratos podem ter sofrido alterações nos níveis hormonais de gonadotrofinas liberadas pela adenohipófise, como LH e FSH (importantes para a espermatogênese). Entretanto, esta informação não pode ser confirmada pois não foram quantificados os níveis plasmáticos de LH e FSH, devido ao elevado custo das análises hormonais.

AKINGBEMI et al. (2001) evidenciaram que ratos pré-púberes tratados com DEHP por via oral (0, 1, 10, 100, 200 mg/kg), do 21º ao 48º dia de vida, sofreram aumento na produção de testosterona (sérica e basal, nas células de Leydig). Quando a síntese do andrógeno é afetada acentuadamente, as concentrações de testosterona reduzem, fazendo o LH aumentar (secreção hipofisária), que por sua vez atua nas células de Leydig, fazendo-as secretar mais testosterona. A testosterona restaura os níveis de LH, caracterizando um mecanismo compensatório, um *feedback* negativo responsável pelo controle homeostático do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Entretanto, a ocorrência simultânea de níveis elevados de LH e testosterona (acima do normal), sugerem desregulação do mecanismo pelo DEHP. Desta forma, os níveis elevados e persistentes de testosterona podem causar, a longo prazo, supressão da esteroidogênese, além de hiperplasia de células de Leydig (associada ao estímulo do LH) e danos nos túbulos seminíferos.

Outros estudos indicam o DEHP administrado por via oral a ratos com 28 dias de vida (100 ou 1000 mg/kg por 5 dias) altera o metabolismo de testosterona pelas células de Leydig. O ftalato causa desregulação na atividade da aromatase e várias isoformas do citocromo P<sub>450</sub> no testículo, relacionadas à hidroxilação de testosterona e outras reações envolvidas no metabolismo esteroidal (KIM et al., 2003; WONG et al., 2002).

AKINGBEMI et al. (2001) não observaram reduções nos níveis plasmáticos de testosterona, de animais púberes (do 62º ao 89º dia de vida), tratados com DEHP (0, 1, 10, 100 ou 200 mg/kg- por via oral), sugerindo que os efeitos do DEHP na esteroidogênese pelas células de Leydig são influenciados pela idade em que os animais são expostos, podendo ocorrer por meio da modulação nos níveis de LH e outras enzimas relacionadas ao metabolismo da testosterona. Este fenômeno pode ter ocorrido no presente protocolo, pois os níveis de testosterona não foram alterados, mas a função das células de Leydig pode ter sido desregulada pelo DEHP e seus metabólitos. Entretanto, o estudo imunohistoquímico das células de Leydig não foi realizado para avaliar a esteroidogênese local.

Os mecanismos pelos quais o DEHP pode estar alterando a biossíntese de enzimas esteroidogênicas, são complexos, envolvendo alterações hormonais, genéticas e enzimáticas, mas provavelmente outros mecanismos compensatórios auxiliaram na manutenção da atividade de enzimas esteroidogênicas (AKINGBEMI et al., 2001; WONG et al., 2002; KIM et al., 2003). A presença de níveis séricos normais de testosterona não indica ausência de toxicidade esteroidogênica, pois o DEHP pode desregular genes envolvidos no metabolismo esteroidal (WONG et al., 2002; KIM et al., 2003).

### 6.2.7 Campo aberto

Em ratos, a pré-puberdade é a fase final do neuro-desenvolvimento, período em que os sistemas neurais têm desenvolvimento incompleto, caracterizando-se por descontinuidades comportamentais e na função cerebral (do 30º ao 42º dia de vida). Compostos químicos com atividade hormonal podem desregular o funcionamento do sistema nervoso central, alterando o comportamento do animal (EERTMANS, 2003; NAROTSKY e KAVLOCK, 1995). A exposição de animais pré-púberes aos plastificantes e outras substâncias tóxicas pode modificar componentes do sistema nervoso e reprodutivo, causar efeitos de longa duração, devido ao desenvolvimento tardio do sistema nervoso (córtex cerebral) e alterações funcionais que ficam aparentes na idade adulta (NEUBERT e CHAHOUD, 1995; GRAY e OTSBY, 1998). Compostos estrogênicos fracos podem promover alterações comportamentais importantes em animais jovens, decorrentes do incompleto desenvolvimento de elementos integrantes do sistema nervoso central, como enzimas e reações peroxissomais.

No presente estudo, ratos pré-púberes expostos ao DEHP por via oral sofreram alterações comportamentais. O tempo em que o animal ficou levantado nas patas traseiras (levantamentos) aumentou em até 49% (100 mg/kg) em relação ao grupo controle. Considerando o tempo de imobilidade do animal (ou congelamento) (s), houve aumento de até 390% (100 mg/kg). Houve redução de até 80% no número de vezes que o animal realizou auto-limpeza (250 mg/kg). Também houve redução, de até 46%, na locomoção dos ratos expostos à dose de 500 mg/kg. O número de bolos fecais dos ratos tratados com 100 mg/kg sofreu uma redução de 63%, em relação ao grupo controle.

A quantidade de movimento do animal indica a atividade exploratória. O animal pode estar se movimentando num ambiente estranho por vários motivos, por exemplo, numa tentativa de encontrar uma via de escape. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras é usada para medir o nível de excitabilidade. A partir de variáveis como taxa de ambulação e de defecação, um animal emocional apresenta menor taxa de ambulação e maior taxa de defecação. O ambiente do teste (distinto do ambiente normal dos animais) causa medo e ansiedade, que geram reações no sistema nervoso central, como aumento na defecação e tempo de congelamento. Entretanto, a exata função da resposta defecatória não está ainda esclarecida. A imobilidade no campo aberto geralmente indica altos níveis de estresse (HANAS, 1999).

MOSER et al. (2003) relataram que ratos expostos ao DEHP por via oral não mostraram alterações neurotóxicas, porém ARCADI et al. (1998), relataram que a exposição de ratos (via oral) ao DEHP causou redução na habilidade de ambulação dos animais. Outro mecanismo para explicar as alterações comportamentais induzidas pelo DEHP envolve a proliferação de peroxissomos cerebrais. A ativação de receptores envolvidos com a proliferação de peroxissomos cerebrais pode gerar estresse oxidativo (tóxico para o sistema nervoso dos animais), causando alterações comportamentais observadas no teste do campo aberto. De acordo com FAN et al. (2003), a realização de testes *in vitro* para confirmar a expressão de receptores ativados pelos proliferadores de peroxissomos no cérebro pode ser útil para elucidar um mecanismo de alteração comportamental induzida por substâncias pelo ftalato. O DEHP está envolvido na regulação de 51 genes, envolvidos na detoxificação de xenobióticos, resposta de estresse oxidativo, metabolismo de hormônios esteroidais, função imunológica, dentre outras funções (WONG et al., 2002). Assim, uma alteração na expressão de genes, levando ao estresse oxidativo cerebral, por exemplo, pode causar neurotoxicidade com repercussão biológica evidenciada pelas alterações nas variáveis comportamentais avaliadas no teste de campo aberto. Apesar da literatura fornecer evidências da toxicidade genética causada pelo DEHP, esta alteração não foi analisada no presente estudo, pois não analisamos a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo induzido pelo ftalato.

### 6.3 Limitações do protocolo de puberdade

O protocolo de puberdade mostra limitações, relacionadas às variáveis avaliadas e à elucidação do mecanismo de ação da substância testada. Variáveis como massa de órgãos sexuais, níveis plasmáticos hormonais e separação prepucial são sensíveis à modulação endócrina. Entretanto, a sensibilidade da separação prepucial aos antiandrógenos inibidores da esteroidogênese ainda não está bem estabelecida, e o atraso na separação prepucial não pode confirmar a ação de antiandrógenos. Nos ratos, o curso normal da puberdade pode sofrer alterações por substâncias químicas que alterem a função hipotalâmica e hipofisária. Por este motivo, testes *in vivo* e *in vitro* adicionais devem ser realizados, para identificar o mecanismo de ação responsável pelas alterações na fase púbere. Alterações nos níveis de prolactina, GH, LH, FSH, ou lesões no hipotálamo, podem interferir com a maturação

púbere em ratos. Apesar deste protocolo estar sendo utilizado há mais de uma década, sua padronização e validação ainda estão em processo de desenvolvimento (STOKER et al., 2000).

#### 6.4 Vantagens dos protocolos de puberdade

Experimentos que utilizam animais (como o protocolo de exposição de animais na fase pré-púbere), apresentam muitas vantagens em relação aos experimentos *in vitro*. Os resultados obtidos de experimentos *in vitro* não são conclusivos se analisados isoladamente. Nestes testes, os compostos podem se ligar apenas aos componentes do meio de cultura, levando a resultados variados e muitas vezes contraditórios. Os estudos *in vitro* quantificam apenas algumas variáveis ou características específicas de compostos desreguladores endócrinos, e por isto necessitam de complementação, por exemplo, com experimentos *in vivo* (GRAY et al., 2002).

As variáveis avaliadas no protocolo são sensíveis diante de substâncias químicas capazes de alterar o organismo, permitindo a compreensão do sistema endócrino. O protocolo de puberdade em fêmeas, de modo semelhante ao protocolo de machos, é sensível na detecção de alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e esteroidogênese (incluindo a aromatase). Apesar do protocolo não permitir a detecção de compostos agonistas ou antagonistas de receptor de andrógeno, alguns das variáveis avaliadas são sensíveis, como a abertura do canal vaginal. Na identificação de compostos xenoestrógenos, esta variável é mais sensível em relação à separação prepucial (STOKER et al., 2000).

#### 6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento realizado representa um modelo biológico relevante para o conhecimento da toxicidade de ftalatos, incluindo efeitos mediados pelo sistema hormonal. A exposição de ratos ao DEHP, na fase pré-púbere, permitiu a observação de alterações na função neuro-endócrina (avaliando-se variáveis reprodutivas e comportamentais). Entretanto, não deve ser subestimada a importância de testes adicionais, como os experimentos *in vitro*, por contribuírem na caracterização do potencial toxicológico das substâncias com atividade hormonal. Desta forma, a associação de vários testes

experimentais pode contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação de uma substância química, assim como das possíveis injúrias que o sistema reprodutivo pode sofrer, diante da exposição crônica a compostos como o DEHP.

#### 6.5.1 Comparação dos resultados obtidos com a exposição de animais ao DEHP na fase gestacional e lactacional, com a fase pré-púbere

SANTANA et al. (2002), desenvolveram o protocolo de exposição de ratos Wistar ao DEHP por via oral (doses de 0, 20, 100 ou 500 mg/kg), na fase *in utero* e lactacional, para avaliar a toxicidade do ftalato sobre o organismo materno e sistema reprodutor da progênie (avaliada na fase púbere e adulta). Como resultados, os filhotes das progenitoras expostas à maior dose apresentaram redução de massa ao desmame, sendo pouco numerosos ao nascimento. Estas progenitoras tiveram menor índice de parto (redução de 52% para as fêmeas expostas à maior dose), evidenciando possível toxicidade materna neste grupo. As progênies masculinas expostas à maior dose e avaliadas nas fases púbere e adulta, sofreram redução na massa relativa da próstata e vesícula seminal, na produção espermática diária e no número de espermatozóides. Não foram observadas alterações significativas nas massas de testículos ou epidídimos dos animais.

No protocolo desenvolvido no presente trabalho, as ratas expostas ao DEHP por via oral (pré-puberdade) apresentaram aumento na massa absoluta e relativa de útero, ovários, fígado e rins, mas não sofreram alterações no ganho de massa corporal relativa ou absoluta, abertura do canal vaginal, primeiro estro e regularidade do ciclo estral. Os ratos expostos por via oral, na fase pré-púbere, e avaliados na puberdade ou na fase adulta, não mostraram alteração no ganho de massa corporal absoluta ou relativa, mas sofreram redução nas massas absolutas e relativas da próstata, vesícula seminal, testículo e epidídimos, aumento na massa do fígado e rins, redução na produção espermática diária e número de espermatozóides, além de alterações comportamentais (teste do campo aberto). Apesar de existir uma diferença estatística significativa para o dia da ocorrência da separação prepucial, biologicamente esta variável não sofreu alterações nos animais tratados com DEHP.

Desta forma, se as patologias teciduais ocorrerem nas fases iniciais do desenvolvimento (como na pré-puberdade), aumenta a probabilidade destas alterações persistirem na vida adulta (WITORSK et al., 2002). A exposição ao DEHP por via oral pode alterar o desenvolvimento do sistema reprodutor e a saúde de ratos jovens, pois os

mecanismos antiandrogênicos envolvidos nos efeitos adversos podem ser numerosos (AKINGBEMI et al., 2001). A realização destes protocolos evidenciou a toxicidade reprodutiva irreversível causada pelo DEHP, pois o composto causou efeitos permanentes no sistema reprodutivo de ratos expostos em estágios iniciais do desenvolvimento como gestação, lactação e pré-puberdade, porém avaliados em fases adiantadas (puberdade e maturidade).

## 7 CONCLUSÕES

- O uso de protocolos recomendados pelas agências regulatórias internacionais e pela comunidade científica, assim como a validação de novos protocolos para estudos em toxicologia reprodutiva, permitem avaliar os potenciais efeitos tóxicos que o DEHP oferece à saúde animal.
- Comparando os resultados obtidos no protocolo de exposição de ratos na pré-puberdade, com os resultados do protocolo de exposição de ratos na fase gestacional e lactacional, podemos concluir que o DEHP causa efeitos tóxicos irreversíveis sobre o sistema reprodutor masculino, contribuindo para o entendimento dos efeitos do ftalato sobre a reprodução.
- O DEHP causou efeitos adversos no sistema reprodutivo dos ratos expostos na fase pré-púbere.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p.252-1259. 2001.

AMANN, R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.2, p.13-25. 1982.

ANDRADE, A. J.M.; ARAUJO, S.; SANTANA, G.M. et al. Screening for (anti) estrogenic and (anti) androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 379-382. 2002.

ARCADI, F.S.; COSTA, C.; IMPERATORE, C.; MARCHESE, A. et al.. Oral toxicity of bis (2- ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long- Evans Rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 963-970. 1998.

ASAI, D.; TAHARA, Y.; NAKAI, M. et al. Structural essentials of xenoestrogen dialkyl phthalates to bind to the estrogen receptors. **Toxicology Letters**, v. 118, p. 1-8. 2000.

ASHBY, J.; TINWELL, H.; LEFEVRE, P.A. et al. Normal sexual development of rats exposed to Butyl Benzyl Phthalate from conception to weaning. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 102- 118. 1997a.

ASHBY, J.; LEFEVRE, P.A. The Weanling Male Rat as an Assay for Endocrine Disruption: Preliminary Observations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 330–337. 1997b.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for lead. Atlanta: **United States Department of Health and Human Services**, 1993.

BAKER, V.A. Endocrine disrupters- testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in vitro**, v.15, p. 413-419. 2001.

BALLY, M.B.; OPHEIM, D.J.; SHERTZER, H.G. Di (2- ethylhexyl) phthalate enhance the release of lysosomal enzymes from alveolar macrophages during phagocytosis. **Toxicology**, v.18, p. 49-60.1980.

BENTLEY, J.I.; CALDER, I.; ELCOMBES, C.et al. Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 11, p. 857-907. 1993.

BHATT, R.V. Environmental influence on reproductive health. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 70, p. 69-75. 2000.

BOUMA, K.; SCHAKEL, D. J. Migration of phthalates from PVC toys into saliva stimulant by dynamic extraction, **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.602-610. 2002.

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

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANDE, C. et al. Aromatase expression and role in male gonad: a review. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-6. 2003.

CHAHOU, I.; KWASIGROCK, T. E. Controlled breeding of laboratory animals. **In: Methods in Prenatal Toxicology, Evaluation of Embryotoxic Effects in Experimental Animals** (D. Neubert, H. J.; Merker, T. E.; Kwasigroch, Eds.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p.79-91. 1977.

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

CORTON, J.C.; BOCOS, C.; MORENO, E.S. et al. Peroxisome proliferators alter the expression of estrogen-metabolizing enzymes, **Biochimie**, v.79, p.151-162. 1997.

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

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; COELHO, R.S. et al. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v.142, p. 45-52. 2003.

DALGAARD, M.; NELLEMAN, C.; LAM, H.R. et al. The acute effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats. **Toxicology Letters**, v.122, p. 69-79. 2001.

DALSENTER, P. R., DALLEGRAVE, E.; MELLO, J.R.B. et al. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Human and Experimental Toxicology**. v. 18, p. 583- 589. 1999.

DAMGAARD, I.N.; MAIN, K.M. Impact of exposure to endocrine disruptors in utero and in childhood on adult reproduction. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n.2, p. 289-309. 2002.

DAVIS, B.J.; MARONPOT, R.R.; HEIDEL, J.J. Di (2-ethylhexyl) phthalate supresses estradiol and ovulation in cycling rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.128, p.216-223. 1994.

DAVIS, B.J.; WEAVER, R.; GAINES, L.J. et al. Mono-(2- ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-AMPC stimulation in rat granulosa cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 128, p. 224- 228. 1994.

DI GIANGI, J. Voluntary measures fail to ensure safety of vinyl products. **Greenpeace USA**. 1998.

DOUGLAS, C.R. Fisiologia do Sistema Hipotalâmico-Hipofisário. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de Fisiologia aplicada à saúde**, Robe Editorial, São Paulo, 5 ed, 2002. cap. 72. p. 1166-1182.

DOULL, J.; CATTLEY, R.; ELCOMBE, C. et al. A cancer risk assessment of di (2-ethylhexyl) phthalate: Application of the new US EPA Risk Assessment Guidelines. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 29-p.327-357. 1999.

EAGON, P.K.; CHANDAR, N.; EPLEY, M.J.; ELM, M.S.; BRADY, E.P.; RAO, K.N. Di (2- ethylhexyl) phthalate- induced changes in liver estrogen metabolism and hyperplasia. **Internacional Journal of Cancer**, v. 58, n.5, p. 736- 743. 1994.

EDSTAC- ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING AND TESTING ADVISORY COMMITTEE ( EDSTAC). **EPA/743/R-98/003**: Final Report. Washington, 1998.

EERTMANS, F.; DHOOGHE, W.; STUYVAERT, S.; COMHAIRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in Vitro**. in press. 2003.

FAN, L.Q.; COLEY, J.; MILLER, R.T. et al. Opposing mechanisms of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase regulation by peroxisome proliferators, **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n.6, p. 49-59. 2003.

FERRUTI, P.; MANCIN, I.; RANUCCI, E. et al. Polycaprolactone- Poly (ethylene glycol) multiblock copolymers as potential substitutes for Di (ethylhexyl) phthalate in flexible poly (vinyl chloride) formulations. **Biomacromolecules**, n.4, p.181-188. 2003.

FISHER, G.M.; SWAIN, M.L. Effect of sex hormones on blood pressure and vascular connective tissue in castrated and noncastrated rats. **American Journal of Physiology** , v.232, p.617-21.1977.

GOLDMAN, J.M.; LAWS, S.C.; BALCHAK, S.K. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: Prepubertal Exposures and Effects on Sexual Maturation and Thyroid Activity in the Female Rat. A Focus on the EDSTAC Recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**, v.30, n.2, p.135-196. 2000.

GRAY, L.E.J.; OSTBY, J.; WILSON, V. et al. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. **Toxicology**, v.27, p.371–382. 2002.

GRAY, L. E.; OSTBY, J. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morfological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. **Toxicology and Industrial Health**, v. 14, n.1-2, p. 159-184. 1998.

GUYLTON, A.C & HALL, J.E. Os Hormônios hipotalâmicos e seu controle pelo Hipotálamo. In: \_\_. **Tratado de Fisiologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10 ed, 2002, cap. 75, p. 791-800.

HANAS, T. R.. O teste do campo aberto. In: XAVIER, G.F. **Técnicas para o estudo do Sistema Nervoso**. Plêiade. São Paulo, 1999, p. 203-220.

HARRIS, C.A.; HENTTU, P.; PARKER, M.G.; SUMPTER, J.P. The Estrogenic Activity of Phthalate Esters *in vitro*. **Environmental Health Perspectives**, v.105, p.802-811. 1997.

HERSHBERGER, L.; SHIPLEY, E.; MEYER, R. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator any muscle method. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.83, p.175- 180. 1953.

ISHIHARA, M.; ITOH, M.; MIYAMOTO, K.; et al. Spermatogenic disturbance induced by di- (2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. **International Journal of Andrology**, v.23, p.85–94. 2000.

JÓBLING, S.; REYNOLDS, T.; MIYOSHI, M. et al. A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers, Are Weakly Estrogenic. **Environmental Health Perspectives**. v. 103, p. 582-587. 1995.

KAMINUMA, T.S; TAKAI-IGARASHI, T; NAKANO, T. et al. Modeling of signaling pathways for endocrine disruptors. **BioSystems**. v. 55, p. 23-31. 2000.

KASAHARA, E.; SATO, E.F.; MIYOSHI, M. et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl) phthalate. **Biochemical Journal**, v.365, n.3, p. 849-856. 2002.

KAVLOCK, R. A.; BOEKELHEIDE, B.K.; CHAPIN, R.C. 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. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 529–653. 2002.

KIM, H.S.; SAITO, K.; ISHIZUKA, M.; FUJITA, S. Short period exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 8, p. 446-451. 2003.

KOBAYASHI, T.; NIIMI, S.; FUKUOKA, M. et al. Regulation of Inhibin  $\beta$  Chains and Follistatin mRNA Levels During Rat Hepatocyte Growth Induced by the Peroxisome Proliferator Di-n-butyl Phthalate. **Biology Pharmacology Bull.** v.25, n.9, p. 1214-1216. 2002.

LATINI, G. Potential Hazards of Exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in Babies. **Biology of Neonate**, v. 78, p. 269-276. 2000.

LATINI, G.; C DE FELICE, G.; PRESTA, A.; et al. In utero exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate and human pregnancy duration. **Environmental Health Perspectives**, v.83, n.1, p.22-26. 2003.

LOFF, S.; KABS, F.; WITT, K. et al. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers, **Journal of Pediatric Surgery**, v.35, n.12, p.1775-1781. 2000.

LOVERKAMP-SWAN, T.; JETTEN, A.M.; DAVIS, B.J. Dual activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by mono (2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 1-9. 2003.

LLOYD, S.C.; FOSTER, P.M. Effect of mono (2-ethylhexyl) phthalate on follicle-stimulating hormone responsiveness of cultured rat Sertoli cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.95, p.484–9. 1988.

MARCILLA, A.; GARCÍA, S.; GARCÍA-QUESADA, J.S. Study of the migration of PVC plasticizers. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, in press. 2003.

MARKEY, C.M.; RUBIN, B.S.; SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 1802, p. 1–10. 2003.

MARTY, M.S.; CRISSMAN, J.W.; CARNEY, E.W. Evaluation of the EDSTAC Female Pubertal Assay in CD Rats using 17 $\beta$ - Estradiol, Steroid Biosynthesis Inhibitors, and a Thyroid Inhibitor. **Toxicological Sciences**, v. 52, p. 269-277. 1999.

MARTY, M.S.; CRISSMAN, J.W.; CARNEY, E.W. Evaluation of the Male Pubertal Onset Assay to detect testosterone and steroid biosynthesis inhibitors in CD rats. **Toxicological Sciences**, v. 60, p. 285-295. 2001.

MASSAAD, C.; ENTEZAMI, F.; MASSADE, L. et al. How can chemicals compounds alter human fertility? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 100, p. 127- 137. 2002.

MEEK, M.E.; CHAN, P.K.L. Bis (2-ethylhexyl) phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. **Journal of Environmental and Scientific Health**, v.12, p.179–94. 1994.

MIHOVEC-GRDIC', SMIT, Z.; PUNTARIC', D. et al. Phthalates in Underground Waters of the Zagreb Area. **Croatian Medical Journal**. v. 43, n. 4, p. 493- 497. 2002.

MOORE, R.W.; RUDY, T.A.; LIN, T.M. et al. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di (2-ethylhexyl) phthalate. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.3. 2001.

MOORE, P.N. The estrogenic potential of the phthalate esters. **Reproductive Toxicology**, v.14, p.183-192. 2000.

MOSER, V.C.; MACPHAIL, R.C.; GENNINGS, C. Neurobehavioral evaluations of trichloroethylene, heptachlor, and di (2-ethylhexyl) phthalate in a full-factorial design. **Toxicology**, v.188, p.125- 137. 2003.

NAROTSKY, M.G.; KAVLOCK, R.J. A multidisciplinary approach to toxicological screening: II. Developmental toxicity. Reproductive toxicology: The science today. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 45, p.145-171. 1995.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrinology and Chemical Environment**, v.3, p. 24-52. 1995.

NTP-CERHR (National Toxicology Program).1982. **Carcinogenesis bioassay of di(2-ethylhexyl)phthalate (CAS No. 117-81-7) in F344 rats and B6C3F<sub>1</sub> mice (feed study)**. Report NIH/PUB-82-1773, NTP-80-37 (citado em U.S. EPA, 1987).

ODUM, J. LEFREVE, P.A.; TITTENSOR, S. et al. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 176-188. 1997.

OIE, L.; HERSOUG, L.G.; MADSEN, J.O. Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 9, p. 972-980. 1997.

OISHI, S. Effects of di-2-ethylhexyl phthalate on lipid composition of serum and testis in rats. **Toxicology Letters**, v. 23, n.1, p.67-72. 1984.

OISHI, S. Reversibility of testicular atrophy induced by di (2-ethylhexyl) phthalate in rats. **Environment Research**. v. 36, n.1, p. 160-169. 1985.

OISHI, S. Effects of phthalic acid esters on testicular mitochondrial functions in the rat. **Archives in Toxicology**. v. 64, n. 2, p. 143-151.1990.

OKUBO, T., SUZUKI, T., YOKOYAMA, Y. et al. Estimation of Estrogenic and Anti-Estrogenic Activities of Some Phthalate Diesters and Monoesters by MCF-7 Cell Proliferation Assay in Vitro. **Biology and Pharmacology Bull**, v.26, n. 8, p. 1219-1224. 2003.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical Record**. v. 203, p. 485- 492. 1982.

OSTBY, J.; KELCE, W.R.; LAMBRIGHT, C. et al. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen- receptor antagonist in vivo and in vitro. **Toxicology and Industrial Health**. v. 15, p. 80- 93. 1999.

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

PARKER, S.P.; TYL, R.W. White Paper on Species/Strain/Stock in Endocrine Disruptor Assays Contract No. 68-W-01-023 JULY 25, 2003. RTI Project No. 08055.002.023. **U.S. Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program**. Washington, DC. 2003.

PARMAR, D.; SRIVASTAVA, S.P.; SETH, P.K. Effect of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. **Toxicology**, v.42, p. 47-55. 1986.

POON.R.; LECAVALIER, P.; MUELLER, R. et al. Subchronic oral toxicity of di-*n*-octyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.225–39. 1997.

PUGH, G.; ISENBERG, J.S.; KAMENDULIS, L.M. et al. Effects of di-isononyl phthalate, di (2-ethylhexyl) phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. **Toxicological Sciences**, v.56, p.181–8. 2000.

RICHBURG, J.H.; JOHNSON, K.J.; SCHOENFELD, H.A. Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in testis. **Toxicology Letters**, v.135, p. 167- 183. 2002.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 103- 107. 1978.

ROBERTS, R.A. Peroxisome proliferators: Mechanisms of adverse effects in rodents and molecular basis for species differences. **Archives of Toxicology**, v.73, p.413- 418. 1999.

SANTANA, G. M. **Efeitos do plastificante Di-(2-etilhexil) ftalato sobre o sistema reprodutor de Ratos Wistar**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCHEUPLEIN, R.; CHARNLEY, G.; DOURSON, M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. I. Biological basis. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n.3, p. 429- 447. 2002.

SEO, K.W.; KIM, K.B.; KIM, Y.J. et al. Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, in press. 2003.

SHARPE, R.M. Could environmental, estrogenic chemicals be responsible for some disorders of the human male reproductive development? **Current Opinion in Urology**, v.4, p. 295- 301. 1994.

SHARPE, R.C. Environment, lifestyle and male infertility. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.14, n. 3, p.489- 503. 2000.

SJOBERG, P.; BONDESSON, U.; KJELLEN, L. et al. Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. **Acta of Pharmacology and Toxicology**, v.56, p.30–7. 1985.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of Environmental estrogens and androgens mimics and antagonists. **Journal of Steroidal Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n.1-6, p. 143-150. 1998.

SOTO, A.M., SONNENSCHNEIN, C., CHUNG, K.L. et al. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, v. 103,p. 113–122. 1995.

STEINBERGER, E. Disorders of the male reproductive system. In: **Principles and Practice of Environmental Medicine** (A Bezman Tarcher, ed.) Plenum Medical Book Company, NY, p. 437-457. 1992.

STOKER, T.E.; PARKS, L.G.; GRAY, L.E.; COOPER, R.L. Endocrine-Disrupting Chemicals: Prepubertal Exposures and Effects on Sexual Maturation and Thyroid Function in the Male Rat.A Focus on the EDSTAC Recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**, v.30, n.2, p.197–252. 2000.

TOPPARI, J.; LARSEN, J.H.; CHRISTIANSEN, P. et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 4, p. 741-803. 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA 87). Health and Environmental Effects Profile for Phthalic Acid Alkyl, Aryl and Alkyl/Aryl Esters, Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, **Environmental Criteria and Assessment Office**, Cincinnati, OH for the Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, 1987.

U.S.ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA 96). **Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC)**, Washington, 1996.

U.S.ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U. S. EPA). **Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis**. Washington, p. 111. 1997.

WHO- Internacional Programme on Chemical Safety, **Environmental and Health Criteria 131**, Diethylhexyl phthalate. World Health Organization, Geneva, 1992.

WITORSCH, R.J. Low-dose *in utero* effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans:an analytical review of the literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.905-912. 2002.

WONG, J.S.; GILL, S.S. Gene Expression Changes Induced in Mouse Liver by Di (2-ethylhexyl) Phthalate, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 185, n. 3, p. 180-196. 2002.

WWF- WORLD WIDLIFE FOUND CANADA- WWF, 2000. **Effects of EDCs** <http://www.wwfcanada.org/hormone-disruptors/science/endosys.html>>. Acesso em: 30 ago. 2002.

ZACHAREWSKI, T.R.; MEEK, M.D.; CLEMONS, J.H. et al. Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters, **Toxicological Sciences**, v.46, p.282- 293. 1998.

ZENICK, H.; CLEGG, E.D. Assessment of male reproductive: a risk assessment approach. In: **Principies and Methods of Toxicology** (A Wallace Hayer, eds). Raven Press Inc. New York, 1989, p. 275- 309.