

ANDRÉ VICENTE PLASTINO SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PLASTIFICANTE
ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) – DEHA SOBRE O
SISTEMA REPRODUTIVO DE CAMUNDONGOS
MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* E DURANTE A
LACTAÇÃO

PPGVS/ INCQS

FIOCRUZ

2007

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PLASTIFICANTE
ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) – DEHA SOBRE O
SISTEMA REPRODUTIVO DE CAMUNDONGOS
MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* E DURANTE A
LACTAÇÃO

ANDRÉ VICENTE PLASTINO SILVA

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Prof^a Dr^a Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro
2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PLASTIFICANTE ADIPATO DE DI-(2-ETIL-
HEXILA) – DEHA SOBRE O SISTEMA REPRODUTIVO DE CAMUNDONGOS
MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* E DURANTE A LACTAÇÃO

ANDRÉ VICENTE PLASTINO SILVA

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof^a Dr^a Helena Pereira da Silva Zamith (INCQS)

Prof^a Dr^a Nancy Barbi (UFRJ)

Prof^a Dr^a Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (INCQS)

Orientadora: Prof^a Dr^a Isabella Fernandes Delgado (INCQS)

Rio de Janeiro

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, André Vicente Plastino

Avaliação da toxicidade do plastificante adipato de di-(2-etil-hexila) – DEHA sobre o sistema reprodutivo de camundongos machos expostos *in utero* e durante a lactação./ André Vicente Plastino Silva. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2007.

xvii, 89 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007. Orientador: Isabella Fernandes Delgado.

1. Toxicidade Reprodutiva. 2. DEHA. 3. Adipato.
4. Plastificante. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que apesar de desejarem não têm oportunidade de estudar; e aos camundongos, que tiveram suas vidas sacrificadas em favor da ciência.

EPÍGRAFE

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade.

(São Tomás de Aquino)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas graças constantes em minha vida, resolvendo todos os problemas que coloquei em suas mãos.

À Prof^a Dr^a Isabella Fernandes Delgado pela orientação, estímulo, amizade e confiança.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS.

Aos funcionários do Serviço de Animais de Laboratório (SAL) do INCQS.

Aos meus colegas do Departamento de Farmacologia e Toxicologia. Em particular, aos meus colegas de laboratório João Martins, Clarice Lima, Michele Cardoso, e Gizeli Faria; pela colaboração e ajuda na realização deste trabalho.

RESUMO

O adipato de di-(2-etil-hexila) – DEHA tem substituído os ftalatos como plastificante em filmes de policloreto de vinila (PVC) usados para embalagem de alimentos, principalmente porque alguns ftalatos induzem toxicidade testicular e efeitos antiandrogênicos. A toxicidade reprodutiva do DEHA foi estudada em camundongos machos *Swiss Webster* expostos *in utero* e durante a lactação. Fêmeas grávidas foram tratadas com doses de 0, 200, 400 e 800 mg DEHA/kg *p.c./dia*, através de entubação gástrica do 6º dia de gravidez ao 21º dia pós-natal. Foram avaliados dados de toxicidade materna e de desenvolvimento geral e sexual dos descendentes. Os descendentes machos foram avaliados na puberdade e na idade adulta quanto ao peso de órgãos sexuais, sendo que, para os adultos sexualmente maduros, ainda foram registrados produção espermática diária, número de espermatozóides na cauda do epidídimo, tempo de trânsito espermático, porcentagem de alterações morfológicas nos espermatozóides e níveis plasmáticos de testosterona. Na idade adulta também foi realizado o teste de fertilidade em animais de ambos os sexos. No presente estudo, o DEHA induziu toxicidade peri- e pós-natal a partir da dose de 400 mg de DEHA/kg *p.c./dia*. Observou-se ainda que o tamanho médio da ninhada diferiu entre os grupos ao desmame – mas não ao nascimento – sugerindo que a prole foi mais vulnerável aos efeitos do DEHA durante a lactação do que durante a gestação. Em animais sexualmente maduros, previamente expostos *in utero* e durante lactação, o tratamento com o DEHA, diminuiu o peso absoluto e relativo da vesícula seminal a partir da dose de 400 mg/kg *p.c./dia*. Também foi associada ao tratamento com o DEHA uma redução na concentração média de espermatozóides na cauda do epidídimo (a partir de 400 mg/kg *p.c./dia*) e no tempo de trânsito espermático (a partir de 200 mg/kg *p.c./dia*). Os resultados indicam que, em camundongos, a exposição *in utero* e durante a lactação ao DEHA pode induzir toxicidade no desenvolvimento e alterações em parâmetros específicos do sistema reprodutivo masculino, em níveis de dose, em que não se observa toxicidade materna evidente.

ABSTRACT

Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) has replaced the phthalates in thin plasticized (PVC) polyvinyl chloride films used for food packaging, mainly because some phthalates induce testis toxicity and antiandrogenic effects. The reproductive toxicity of the DEHA was studied in *Swiss Webster* male mice exposed *in utero* and during the lactation period. The pregnant dams were treated by oral gavage with doses of 0, 200, 400 e 800 mg DEHA/kg *b. wt./day* from the day 6th of pregnancy to the 21st postnatal. Maternal and reproductive general outcome data and sexual development landmarks were assessed. At puberty and adulthood, male offspring had the sexual organs weights evaluated. Furthermore, sexually mature male mice (adulthood) were assessed to daily sperm production, sperm counts (epididymis's tail), sperm transit time, sperm morphology and testosterone levels. At adulthood the fertility was also assessed in animals of both sexes. In the present study, DEHA induced peri- and postnatal toxicity at doses up to 400 mg of DEHA/kg *b. wt./day*. It was still observed that the medium size of the litter differed between the groups to the wean, but not to the birth, suggesting that the offspring was more vulnerable to the effects of DEHA during the lactation period than during the pregnancy. In sexually mature animals, the treatment with DEHA reduced the absolute and relative weights of the seminal vesicle (up to the 400 mg/kg *b. wt./day*). A reduction of the concentration of spermatozoa in the epididymis's tail (up to 400 mg/kg *b. wt./day*) and of the sperm transit time (up to 200 mg/kg *b. wt./day*) was also associated to DEHA exposure. The results indicate that *in utero* and lactational exposure to DEHA can induce toxicity in the development and alterations in specific parameters of the masculine reproductive system of mice, at dose levels, at which evident maternal toxicity is not observed.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>ad libitum</i>	–	à vontade
ANOVA	–	Análise de variância (estatística)
<i>apud</i>	–	do latim “junto a”, fonte de uma citação direta
BBP	–	Ftalato de butilbenzila
ca.	–	cerca de
°C	–	graus Celcius
CAS	–	Chemistral Abstract Services
CECAL	–	Centro de Criação de Animais de Laboratório - Fiocruz
CYP	–	Citocromo P450
DBP	–	Ftalato de dibutila
DEHA	–	Adipato de di-(2-etil-hexila)
DEHP	–	Ftalato de di-(2-etil-hexila)
DHT	–	Diidrotestosterona
DINP	–	Ftalato de di-isononila
DL ₅₀	–	Dose letal 50%
EDSTAC	–	Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisory Committee
EEC	–	Comunidade Econômica Européia
<i>e.g.</i>	–	por exemplo (<i>exempli gratia</i>)
EH	–	Etil hexanol
<i>et al</i>	–	e colaboradores
EU	–	União Européia
FDA	–	Agência de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos
FSH	–	Hormônio Folículo Estimulante
g	–	grama
GnRH	–	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HSDB	–	Hazardous Substances Data Bank
IARC	–	Instituto Internacional para Pesquisa em Câncer
ICH	–	Conferência Internacional de Harmonização
IDA	–	Ingestão Diária Aceitável
IDT	–	Ingestão Diária Tolerável
<i>i.e.</i>	–	isto é (“ <i>id est</i> ”)
<i>i.p.</i>	–	intraperitoneal
IRIS	–	Sistema Integrado de Informação de Risco
kg	–	quilograma
LH	–	Hormônio Luteinizante
Ltda	–	limitada
mg	–	miligrama
min	–	minuto
mL	–	mililitro
mm	–	milímetro
ng	–	nanograma
n°	–	número
NOAEL	–	Nível de dose onde não se observa efeito adverso
NOEL	–	Nível de dose onde não se observa efeito
OECD	–	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
<i>p</i>	–	nível de significância estatística
<i>p.c.</i>	–	peso corpóreo
PN	–	pós-natal
ppm	–	parte por milhão
PVC	–	Policloreto de vinila
<i>s.c.</i>	–	subcutânea

T	–	Testosterona
TM	–	marca registrada
μl	–	microlitro
US EPA	–	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WHO	–	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO TESTÍCULO	02
FIGURA 02	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESPERMATOGÊNESE EM UM CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO.....	06
FIGURA 03	– BIOSÍNTESE DE TESTOSTERONA E OUTROS ESTERÓIDES.....	08
FIGURA 04	– EIXO HIPOTÁLAMO – HIPÓFISE – TESTÍCULOS.....	10
FIGURA 05	– POSSÍVEIS FONTES DE EXPOSIÇÃO AO DEHA	27
FIGURA 06	– ESTRUTURA QUÍMICA E METABOLISMO DO DEHP E DEHA	29
FIGURA 07	– ÚTERO ANTES E DEPOIS DE TRATADO PELO MÉTODO DE SALEWISK.....	39
FIGURA 08	– FOTOS DA CESAREANA	41
FIGURA 09	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS: ESPERMÁTIDES NO TESTÍCULO E ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO.....	43
FIGURA 10	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MORFOLOGIA NORMAL DE UM ESPERMATOZÓIDE DE CAMUNDONGO	45
FIGURA 11	– EFEITO DO DEHA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL MATERNO DURANTE A GESTAÇÃO.....	52
FIGURA 12	– EFEITO DO DEHA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL MATERNO DURANTE A LACTAÇÃO.....	53
FIGURA 13	– EFEITO DO DEHA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL DOS DESCENDENTES DURANTE A LACTAÇÃO	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	–	DADOS DA GRAVIDEZ E DE DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE	51
TABELA 02	–	PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DOS ÓRGÃOS DAS PROGENITORAS	54
TABELA 03	–	EFEITO DA EXPOSIÇÃO <i>IN UTERO</i> E DURANTE A LACTAÇÃO AO DEHA SOBRE PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO PÓS- NATAL DE FÊMEAS E MACHOS	56
TABELA 04	–	PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DE ÓRGÃOS DE DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E DURANTE A LACTAÇÃO – AVALIADOS NA PUBERDADE E NA IDADE ADULTA	57
TABELA 05	–	VARIÁVEIS REPRODUTIVAS DE DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E DURANTE A LACTAÇÃO – AVALIADOS NA PUBERDADE E NA IDADE ADULTA	59
TABELA 06	–	AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS <i>IN UTERO</i> E DURANTE A LACTAÇÃO AO DEHA	61
TABELA 07	–	AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE DESCENDENTES FÊMEAS EXPOSTAS <i>IN UTERO</i> E DURANTE A LACTAÇÃO AO DEHA	62
TABELA 08	–	NÍVEIS ESTIMADOS DA EXPOSIÇÃO DIÁRIA DE LACTENTES AO DEHP.....	68

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01	– TIPOS DE EFEITOS ADVERSOS A SEREM VERIFICADOS NOS ESTUDOS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA	19
QUADRO 02	– RESUMO DAS DIRETRIZES REGULATÓRIAS PARA AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA TOXICIDADE RELACIONADA COM O DESENVOLVIMENTO	23
QUADRO 03	– INFORMAÇÃO QUÍMICA DO DEHA	24
QUADRO 04	– PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DEHA	24
QUADRO 05	– DESCRIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	37

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO	01
1.1.1 Anatomia funcional	01
1.1.2 Espermatogênese	03
1.1.3 Síntese de hormônios androgênicos e regulação hormonal dos testículos	07
1.1.4 Esteróides gonadais e a diferenciação sexual masculina	11
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	13
1.3 TESTES EM TOXICOLOGIA REPRODUTIVA	18
1.4 DEHA	24
1.4.1 Informação química	24
1.4.2 Propriedades físico-químicas	24
1.4.3 Produção e usos	25
1.4.4 Exposição humana	25
1.4.5 Toxicidade geral	27
1.4.6 Carcinogenicidade	28
1.4.7 Toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento	29
1.4.8 Aspectos regulatórios	33
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 ANIMAIS	36
3.2 ACASALAMENTOS	36
3.3 DOSES E TRATAMENTO	37

3.4 ACOMPANHAMENTO PRÉ- E PERI-NATAL	38
3.5 ACOMPANHAMENTO PÓS-NATAL	39
3.6 DETERMINAÇÃO DO PESO ABSOLUTO E RELATIVO DE ÓRGÃOS	40
3.7 TESTE DE FERTILIDADE	40
3.8 MACHOS NA IDADE ADULTA	41
3.8.1 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides e tempo de trânsito espermático	42
3.8.2 Análise morfológica de espermatozóides	45
3.8.3 Níveis plasmáticos de testosterona	46
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4. RESULTADOS	48
4.1 DADOS DA GRAVIDEZ E DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE	48
4.2 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MACHOS	58
4.2.1 Peso absoluto e relativo de órgãos sexuais	58
4.2.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides e tempo de trânsito espermático	58
4.2.3 Morfologia espermática	58
4.2.4 Níveis plasmáticos de testosterona	59
4.3 TESTE DE FERTILIDADE	60
5. DISCUSSÃO	63
5.1 TOXICIDADE MATERNA E EFEITOS PRÉ-NATAIS	63
5.2 DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE	66
5.3 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MACHOS.....	71
5.3.1 Peso absoluto e relativo de órgãos sexuais	71
5.3.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides e tempo de trânsito espermático	72
5.3.3 Morfologia espermática	73
5.3.4 Níveis plasmáticos de testosterona	73
5.4 TESTE DE FERTILIDADE	74
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO

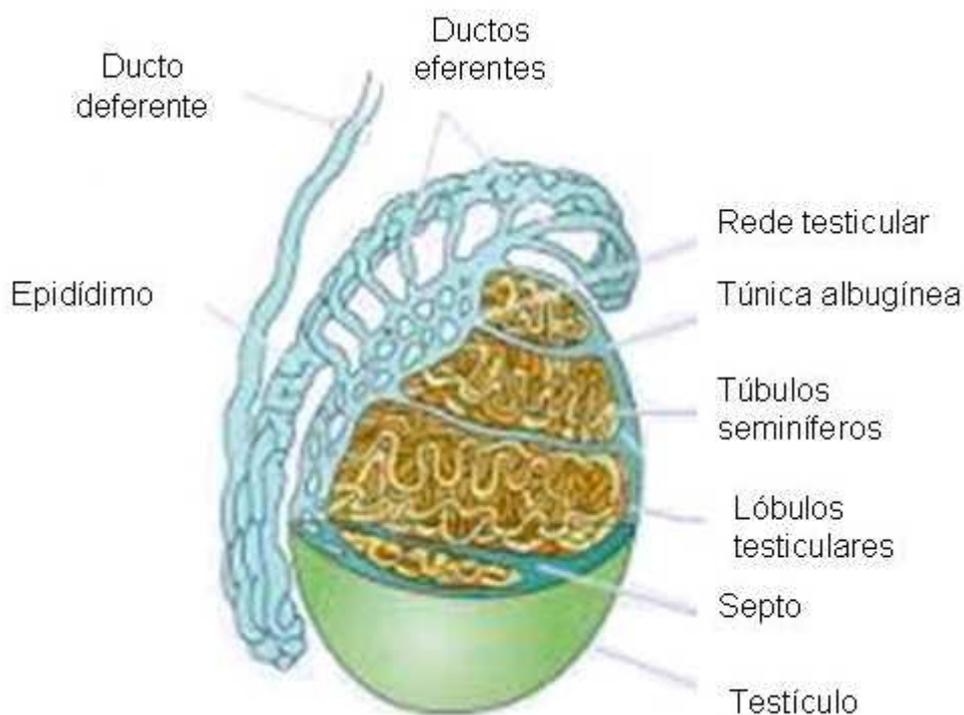
1.1.1 ANATOMIA FUNCIONAL

O sistema reprodutivo masculino é formado por órgãos que atuam em conjunto para produzir espermatozóides e liberá-los de forma viável no sistema reprodutivo da fêmea. Este esforço conjunto envolve tanto o sistema neuroendócrino (hipotálamo e hipófise) quanto o genital (testículos, epidídimos, ductos genitais intra e extratesticulares, glândulas sexuais acessórias e pênis).

Os testículos têm duas funções: espermatogênese, a formação dos gametas masculinos e secreção do hormônio sexual masculino, testosterona.

Na maioria das espécies, os testículos são formados na cavidade abdominal e depois descem para o escroto (saco cutâneo modificado) onde ficam suspensos e mantidos a alguns graus abaixo da temperatura corporal para produção eficiente de espermatozóides. Os testículos são formados por células intersticiais, vasos sanguíneos e túbulos seminíferos. Cada testículo é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo chamada túnica albugínea. A maior parte do volume do testículo é constituída pelos túbulos seminíferos formados por canais enovelados onde ocorre a espermatogênese (figura 1). Ainda nos túbulos seminíferos, localizam-se as células de Sertoli, que se estendem desde a membrana basal até a luz do túbulo, sendo responsáveis pela nutrição e sustentação das células germinativas deslocando-as na sua migração dentro do epitélio. As células de Sertoli estão aderidas entre si por fortes junções de oclusão (barreira hemato-testicular) que impedem a passagem de muitas substâncias do sangue ou do interstício para o compartimento luminal. Esta barreira protege os espermatozóides principalmente de anticorpos e do ataque de linfócitos T (os espermatozóides apresentam na sua superfície vários antígenos estranhos ao sistema imunológico do corpo). No outro compartimento funcional do testículo – o tecido intersticial – estão presentes as células de Leydig responsáveis pela produção da testosterona (GUYTON, 2006; QUINTAS, 2002; KAPIT, 2004).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO TESTÍCULO



FONTE: Internet – busca por imagens (www.google.com) Acesso: janeiro, 2007
(Adaptado)

A produção da testosterona é fundamental para o desenvolvimento das características sexuais secundárias e para a manutenção da espermatogênese. Os espermatozoides imaturos se movem para o epidídimo por intermédio da rede testicular, uma rede de condutos anastomosados. O transporte é ajudado por um fluido produzido pelas células de Sertoli. Os ductos eferentes conectam a rede testicular ao epidídimo, situado na base posterior do testículo. O epidídimo é um ducto único, altamente enovelado, subdividido anatomicamente em três partes (cabeça, corpo e cauda). No epidídimo ocorrem a maturação (capacidade de fertilizar o óvulo) e o armazenamento dos espermatozoides. A testosterona, e proteínas especiais – secretadas pelas células da parede do epidídimo – estimulam a maturação dos espermatozoides. Na cabeça – onde penetram os ductos eferentes – os espermatozoides adquirem motilidade. No corpo, adquirem habilidade de fertilização. Na cauda, parte inferior, menor, é onde os espermatozoides funcionalmente maduros ficam armazenados. Ao final da cauda

do epidídimo, o ducto aumenta de diâmetro para formar o ducto deferente. Esse passa pelas glândulas sexuais acessórias, cujas secreções compõem o sêmen, acrescentando volume, nutrientes, tampões e íons (QUINTAS, 2002). A contribuição de cada glândula varia com a espécie e é responsável pela variação do volume e na característica do ejaculado. Existe considerável variação entre as espécies em relação ao número de glândulas acessórias, sendo que a próstata é a única presente em todos os mamíferos. As secreções da próstata e da vesícula seminal constituem boa parte do líquido seminal. As vesículas seminais são revestidas por um epitélio secretor que secreta uma substância mucóide, contendo grande quantidade de frutose e outros nutrientes, bem como grandes quantidades de prostaglandinas e fibrinogênio. Durante o processo de ejaculação, a vesícula seminal esvazia seu conteúdo no ducto ejaculador, logo após o esvaziamento do esperma pelo canal deferente. A glândula prostática secreta um líquido fino e leitoso capaz de tamponar o sêmen formado aumentando grandemente a motilidade e a fertilidade do espermatozóide (infértil em pH ácido) em meio às secreções vaginais da mulher (pH de 3,5 a 4), garantindo o sucesso na fertilização do óvulo. A próstata, além do papel secretor de material para a formação do sêmen, é também o local de transformação da testosterona em diidrotestosterona. A união do ducto deferente com o ducto da vesícula seminal forma o ducto ejaculatório que conduz o sêmen à uretra (QUINTAS, 2002; SILVERTHORN, 2003; GUYTON, 2006).

1.1.2 ESPERMATOGÊNESE

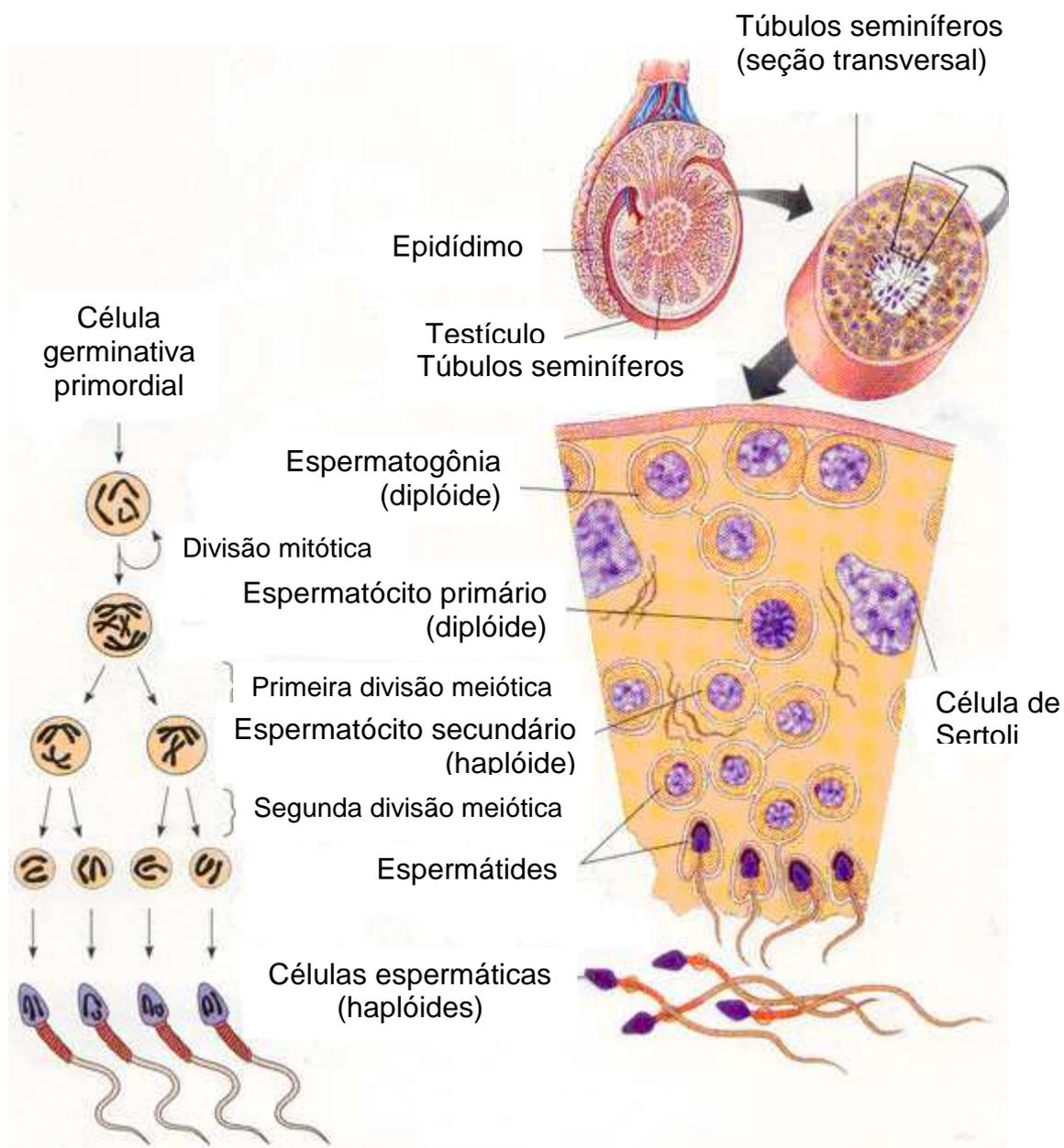
A espermatogênese ocorre em todos os túbulos seminíferos através de um processo complexo e dinâmico envolvendo a replicação de células germinativas e uma série de mudanças morfo-bioquímicas. Ocorre durante a vida sexual ativa, como resultado da estimulação pelos hormônios gonadotrópicos da glândula hipófise anterior (FSH e LH), começando na puberdade e continuando pela maior parte do restante da vida, mas reduzindo acentuadamente na velhice. Os mais importantes eventos na espermatogênese são: a renovação de células germinativas por mitose; a redução do número de cromossomos por meiose, e a transformação de uma célula convencional em uma complexa estrutura mótil

(espermatozóide). Assim, espermatogênese pode ser dividida em três fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. Cada uma delas envolvendo uma classe de células germinativas. Na primeira fase (espermatocitogênese), as espermatogônias primordiais indiferenciadas (tipo A) se dividem por mitoses sucessivas dando origem a dois diferentes tipos celulares. Um tipo mantém a população de espermatogônias indiferenciadas (tipo A) para a manutenção de uma população constante de células primordiais. Parte destas células, no entanto, transforma-se em espermatogônias do tipo B que originam os espermatócitos primários (diploides – $2n$). Na segunda fase (meiose) os espermatócitos sofrem então divisão meiótica (reducional = meiose I) dando origem ao espermatócito secundário, com metade do número de cromossomos (haploides- n). Os espermatócitos secundários passam pela segunda divisão meiótica (equacional = meiose II) para separação das cromátides, formando espermatídes que ainda conservam característica epitelióides (arredondadas). Durante a espermiogênese, as espermatídes passam por um processo de diferenciação que envolve uma extensiva reorganização nuclear e citoplasmática de forma que as características comuns de células epiteliais são perdidas progressivamente. As espermatídes tornam-se alongadas, condensam o núcleo, desenvolvem cauda e uma estrutura contendo enzimas importantes para a penetração no oócito, chamada acrossoma, diferenciando-se completamente em espermatozóides. Para que este processo ocorra adequadamente é necessário que as espermatídes unam-se às células de Sertoli. Estas células de sustentação exibem uma relação específica com as espermatídes, proporcionando nutrição, hormônios e enzimas necessárias às alterações. As células de Sertoli desempenham outro papel importante na espermatogênese, por meio do engolfamento e da digestão dos fragmentos remanescentes do citoplasma e restos celulares que sobram da transformação das espermatídes em espermatozóides. A seqüência de eventos na espermatogênese é refletida em arranjos de células germinativas organizadas em camadas, interconectadas por pontes citoplasmáticas que lhes permitem se dividir em sincronia, onde as células mais diferenciadas estão mais próximas do lúmen dos túbulos seminíferos (QUINTAS, 2002; ALBERTS, 2004; GUYTON, 2006). Em conseqüência disso, cortes transversais dos testículos mostram túbulos com diferentes gerações de células germinativas representando estágios específicos do seu desenvolvimento (AMANN, 1982). A figura 2 mostra esquematicamente a seqüência de eventos e as células formadas durante a espermatogênese no

túbulo seminífero. O tempo necessário para um ciclo completo espermatogênético varia com a espécie. No camundongo, a duração é de 34,5 dias; e no homem é de aproximadamente 64 dias (JOHNSON *et al.*, 1992; SOHARA *et al.*, 2007).

Após a formação nos túbulos seminíferos, os espermatozoides passam para o epidídimo onde adquirem capacidade de movimentar-se e de fertilização (QUINTAS, 2002).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESPERMATOGÊNESE EM UM CORTE TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO



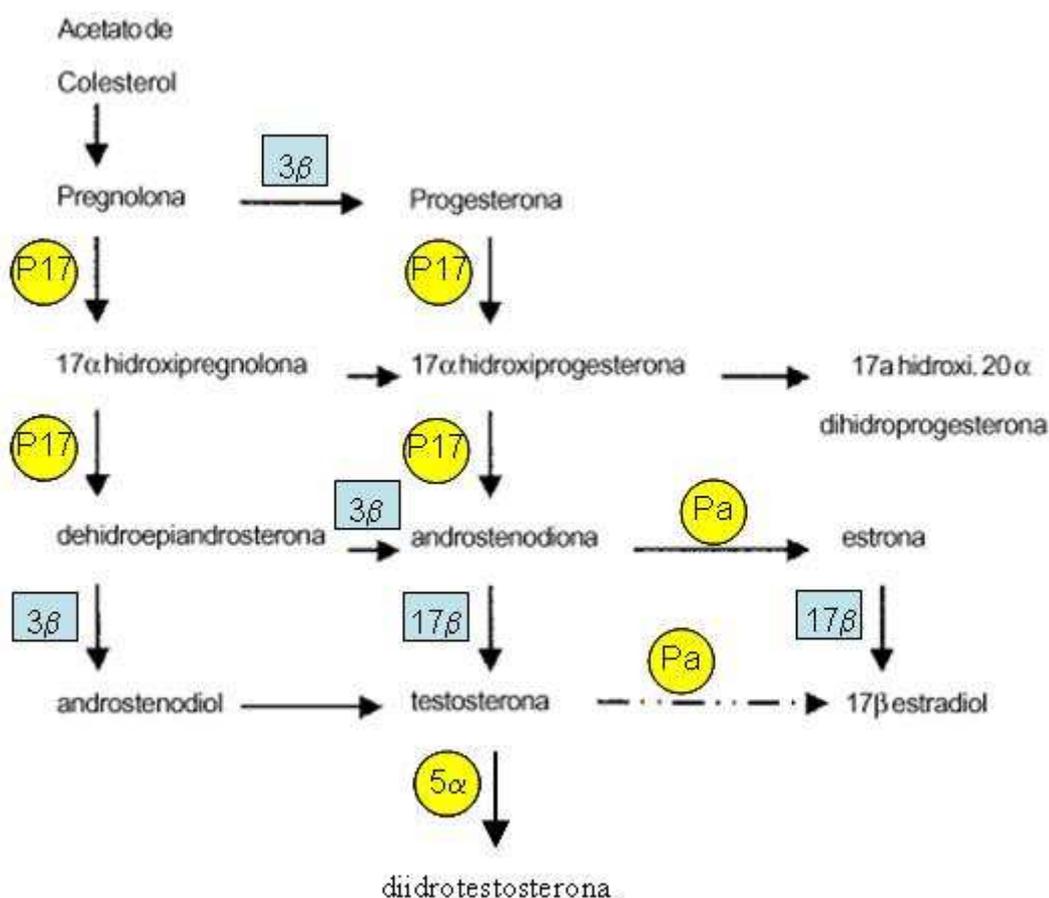
FONTE: Internet – busca por imagens (www.google.com) Acesso: janeiro, 2007
(Adaptado)

1.1.3 SÍNTESE DE HORMÔNIOS ANDROGÊNICOS E REGULAÇÃO HORMONAL DOS TESTÍCULOS

Os testículos atuam como órgãos endócrinos para produzir os esteróides sexuais (esteroidogênese). A testosterona é o principal hormônio, embora estas gônadas secretem outros hormônios com menor atividade androgênica como androstenediona, desidroepiandrosterona e androstenodiol. As células intersticiais de Leydig utilizam o colesterol como precursor dos hormônios esteróides. Elas podem obter o colesterol a partir da mobilização de reservas intracelulares (ésteres de colesterol), da captação do colesterol circulante mediado por receptores de lipoproteínas plasmáticas ou sintetizar colesterol no interior da célula a partir do acetato (ALBERTS, 2004). Duas famílias de enzimas estão envolvidas na síntese desses hormônios: enzimas hidroxilases da família do citocromo P450 (CYP); e as enzimas esteróide-desidrogenases. (NEUBERT, 1997). A primeira etapa na síntese de hormônios esteróides envolve a clivagem da cadeia lateral do colesterol para formar a pregnenolona nas cristas mitocondriais. A mobilização do colesterol para a membrana interna da mitocôndria é a etapa limitante na síntese dos esteróides e envolve a proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR) (MILLER, 2007). A pregnenolona é convertida em progesterona que, sob a ação de enzimas específicas, é convertida em testosterona no retículo endoplasmático liso. O estradiol e a estrona são formados pela aromatização da testosterona e androstenodiona, respectivamente. Uma pequena porcentagem da testosterona é convertida em metabólitos biologicamente ativos, em determinados tecidos; entretanto, a maioria é convertida em metabólitos inativos, excretados pelos rins e vias biliares. A testosterona é convertida, pela 5-alfa-redutase, em diidrotestosterona na próstata, mais efetivamente, e em menor extensão na pele e no fígado. A diidrotestosterona é um andrógeno mais potente que a testosterona, que por aromatização, é também convertida em estradiol em menor proporção. No cérebro, a aromatização da testosterona em estradiol tem um importante efeito na regulação da secreção de gonadotrofina e na função sexual e, nos demais tecidos, a importância da aromatização, na mediação do efeito da testosterona, ainda não está claro (VELDHUIS *et al.*, 1988; GUYTON, 2006).

A figura 3 mostra o esquema de biossíntese da testosterona e de outros esteróides, bem como, as enzimas chaves envolvidas em cada etapa.

FIGURA 3 – BIOSÍNTESE DE TESTOSTERONA E OUTROS ESTERÓIDES



Nota: São cinco as enzimas chaves envolvidas na síntese de esteróides gonadais: 17α-hidroxilase CYP (P17), 3β-hidroxiesteróide-desidrogenase (3β), 17β-hidroxiesteróide-desidrogenase (17β), CYP aromatase (Pa), e 5α-redutase (5α).

Fonte: NEUBERT, 1997 (Adaptado)

O sistema neuroendócrino constitui a base do controle do sistema reprodutivo, que requer ajustada orquestração do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas para seu adequado funcionamento. O hipotálamo, importante centro neuroendócrino que ocupa uma pequena parte do cérebro, sintetiza e secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Liberado de forma pulsátil através

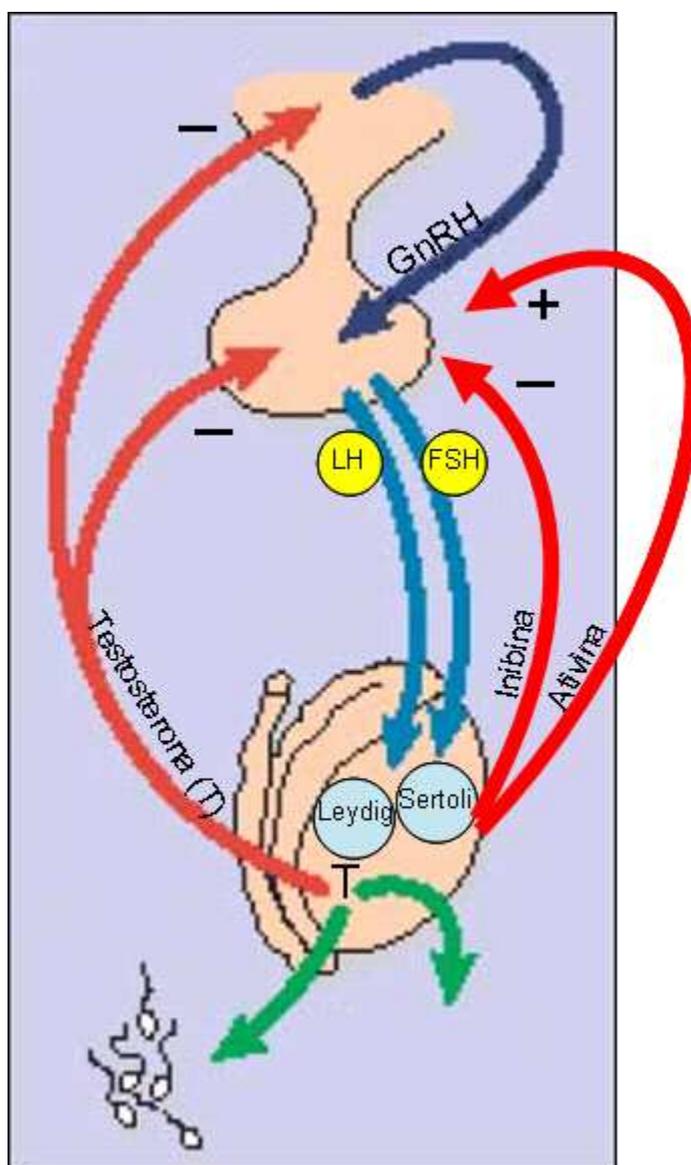
do sistema porta hipotálamo-hipofisário, atua diretamente sobre a hipófise anterior estimulando a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). Estes hormônios glicoproteicos gonadotróficos atuam sobre os testículos para estimular a espermatogênese e a secreção de andrógenos. O LH controla a liberação de testosterona pelas células de Leydig e o FSH age sobre as células de Sertoli, a fim de controlar a espermatogênese. As ações do LH e FSH ocorrem através dos seguintes eventos: 1) ligação com os receptores na membrana plasmática; 2) ativação das proteínas G de membrana; 3) ativação da adenililciclase da membrana; 4) formação de AMP cíclico, o qual manifesta os efeitos biológicos do LH e FSH sobre as células-alvo (GUYTON, 2006).

As secreções dos hormônios hipotalâmicos, hipofisários e gonadais obedecem a respostas sincronizadas de estímulo e inibição. Os níveis plasmáticos estáveis da testosterona, em machos adultos, são alcançados pelo efeito de retroalimentação negativa da testosterona sobre o hipotálamo e sobre a hipófise anterior. Uma diminuição no nível de testosterona estimula o hipotálamo a liberar mais GnRH, o qual estimula a hipófise anterior a liberar LH para o sangue. O LH estimula as células de Leydig a aumentar a liberação de testosterona aumentando o substrato para sua formação e regulando o fluxo sanguíneo testicular. Se os níveis de testosterona aumentarem acima do ponto normal de regulação, o mesmo mecanismo de retroalimentação diminuirá os níveis de GnRH e de LH e retornará o nível de testosterona ao normal. A testosterona inibe preferencialmente a secreção de LH, mas também exerce retroalimentação negativa sobre o hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH (figura 4). As mudanças nos níveis de testosterona alteram a frequência e a intensidade dos pulsos de liberação do GnRH (GUYTON, 2006; SILVERTHORN, 2003).

A formação dos espermatozóides nos testículos é regulada principalmente pela gonadotrofina FSH. O FSH exerce ações trópicas e tróficas sobre as células de Sertoli, estimulando várias funções – principalmente dar sustentação à espermatogênese e à secreção da proteína de ligação com andrógeno (ABP). A ABP favorece o acúmulo de andrógenos nos compartimentos testiculares, uma vez que a manutenção da espermatogênese requer altos níveis de testosterona intratesticular. As células de Sertoli secretam dois hormônios peptídicos

chamados inibina e ativina, que podem, respectivamente, inibir e ativar a liberação de FSH pela hipófise, sem alterar a liberação de LH (figura 4). A inibina tem potencial de ser usada como contraceptivo masculino porque altas doses dela reduzem a produção de espermatozóides por meio da diminuição do FSH. O LH também é importante para a espermatogênese, porém seus efeitos são mediados pela liberação de testosterona que estimula a função da célula de Sertoli (QUINTAS, 2002; KAPIT, 2004; GUYTON, 2006).

FIGURA 4 – EIXO HIPOTÁLAMO – HIPÓFISE – TESTÍCULOS



1.1.4 ESTERÓIDES GONADAIS E A DIFERENCIAÇÃO SEXUAL MASCULINA

A diferenciação sexual é um processo seqüencial que se inicia com o estabelecimento do sexo cromossômico, seguido pelo desenvolvimento do sexo gonadal e culmina com a diferenciação fenotípica.

As células somáticas, em mamíferos, dos machos normais têm 22 pares de cromossomos somáticos, mais um cromossomo X e um Y (XY). As fêmeas normais têm a combinação 22 mais XX. O sexo genético masculino é determinado pelo cromossomo Y. Nos machos, a meiose dos espermatozoides resulta em dois tipos de espermatozoides, um levando o cromossomo X e outro o cromossomo Y. A meiose de oócitos primários na fêmea produz apenas óvulos com X. A fertilização do óvulo por um espermatozoide levando um cromossomo X, produz um zigoto XX – isto é, feminino – e um espermatozoide levando um Y, produz um zigoto XY (masculino). Portanto, o sexo genético é determinado pelo pai (ALBERTS, 2004).

O sexo gonadal é determinado quando os genes se expressam no embrião indiferenciado. O gene *Sry* presente no braço curto do cromossomo sexual masculino (Y), expressa a proteína *Sry*, a qual age como um fator de transcrição e estimula a gônada indiferenciada a formar o testículo. Cada gônada tem uma medula e um córtex. Nos geneticamente masculinos, o córtex regride e a medula forma o testículo fetal. A expressão do *Sry* ocorre apenas em um subgrupo de células somáticas da gônada em desenvolvimento, e isto faz com que estas células se diferenciem em células de Sertoli, que é o principal tipo de células de sustentação encontrado no testículo. As células de Sertoli dirigem o desenvolvimento sexual ao longo de uma via de diferenciação masculina por afetar outras células na crista genital. As células de Sertoli, então, estimulam as células germinativas primordiais a se desenvolverem ao longo de uma via que produz espermatozoides. Elas também secretam hormônio antiMülleriano, que causa regressão dos ductos de Müller (primórdios da genitália feminina), evitando a formação de órgãos reprodutivos femininos no macho, e ajudam a induzir outras células somáticas a se diferenciarem em células de Leydig, que secretam testosterona. Secretada no sangue fetal, logo após a diferenciação gonadal, a testosterona promove o desenvolvimento dos ductos de Wolffian para a formação

da genitália interna masculina (próstata, epidídimos, vesícula seminal e canal deferente). Ela também promove o desenvolvimento da genitália externa masculina (pênis e escroto); mas para esta ação, a testosterona é convertida em diidrotestosterona, pela enzima 5- α -redutase do tecido alvo (GUYTON, 2006; ALBERTS, 2004). Algum mecanismo que reduza a concentração deste hormônio durante este período crítico de diferenciação pode causar a indução de um desenvolvimento anormal da genitália externa masculina (NEUBERT, 1997). No embrião feminino – na ausência de testosterona e de fator antimülleriano – a genitália feminina interna e externa se desenvolvem autonomamente a partir da regressão passiva dos ductos de Wolffian e da diferenciação dos ductos de Müller e de outras estruturas primordiais (QUINTAS, 2002).

No desenvolvimento fetal, os mecanismos hipotalâmicos para controle do comportamento sexual e neuroendócrino estão indiferenciados e bipotenciais. No sexo heterocromossômico (XY), a diferenciação fenótica do SNC ocorre como resultado da secreção de testosterona pelos testículos. A testosterona induz a diferenciação do hipotálamo de tipo masculino, promovendo um padrão secretor contínuo (não cíclico) de pulsos de GnRH e gonadotrofinas FSH e LH. A testosterona produzida nos testículos no período perinatal atinge o SNC e sofre a ação da aromatase, produzindo estrógeno no hipotálamo. O estrógeno, interagindo com seus receptores no SNC, leva a masculinização do hipotálamo e, deste modo, desempenha um papel principal na determinação da identidade e da orientação sexual masculina e, por isto, no comportamento: por exemplo, as ratas que são tratadas com testosterona logo após o nascimento mostram mais tarde um comportamento sexual semelhante ao dos machos. Na ausência de testosterona (sexo homocromossômico XX normal), o hipotálamo desenvolve espontaneamente os mecanismos reguladores cíclicos e pulsáteis de secreções de GnRH, FSH e LH do tipo feminino, bem como o comportamento sexual feminino. A presença de α -fetoproteína, uma proteína extracelular, previne a masculinização do hipotálamo feminino ao ligar-se ao estrógeno circulante, evitando que atinja os receptores no SNC (KAPIT, 2004; GUYTON, 2006; ALBERTS, 2004; McEWEN *et al.*, 1977; HUTCHISON *et al.*, 1997; LOVE, 2006).

1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

De acordo com a definição dada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) os desreguladores endócrinos são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (US EPA, 1997). O interesse nos desreguladores endócrinos cresceu nos últimos anos, uma vez que surgiram evidências de que várias substâncias utilizadas nos mais variados tipos de indústria podem interferir com o sistema endócrino (NEUBERT, 1997).

O sistema endócrino e o sistema nervoso constituem os principais sistemas responsáveis pelo controle e pela integração das funções vitais nos mamíferos e outros animais superiores. Particularmente, o sistema endócrino é de fundamental importância para o sistema reprodutivo, exercendo durante a embriogênese um papel essencial na diferenciação sexual, sendo responsável também pela maturação sexual que acontece na puberdade e pela função reprodutiva na vida adulta. Além disso, o sistema endócrino tem participação na regulação do metabolismo, na digestão, na função cardiovascular e na excreção. Os hormônios também estão implicados na etiologia de certos tipos de câncer que acometem tecidos hormônio-dependentes, tais como o de seio, do útero e da próstata. Portanto, a desregulação endócrina pode provocar distúrbios reprodutivos e do desenvolvimento (SULTAN *et al.*, 2001).

Ao nível molecular, o sistema endócrino atua através de mensageiros químicos transportados de uma célula a outra, denominados hormônios. Os hormônios são secretados por glândulas e atuam sobre receptores específicos, que por sua vez se encontram distribuídos pelos tecidos e órgãos que constituem os alvos das ações hormonais. Dependendo do tipo de hormônio envolvido, os receptores residem ou na superfície da célula alvo ou dentro da célula. A interação hormônio-receptor desencadeia, por sua vez, uma variedade de reações bioquímicas que ocorrem no interior da célula alvo levando a uma resposta biológica característica (GUYTON, 2006).

Em vista da complexidade do sistema endócrino, substâncias químicas provenientes do meio ambiente podem provocar a desregulação endócrina de diferentes maneiras. Um desregulador endócrino pode afetar, por exemplo, a secreção glandular do hormônio e/ou alterar a taxa de eliminação do hormônio do organismo. Além disso, os desreguladores endócrinos podem alterar as relações de retroalimentação regulatória existentes entre dois órgãos endócrinos (tais como o ovário e a hipófise) ou ainda interagir diretamente com os receptores hormonais, mimetizando ou antagonizando a ação dos hormônios naturais (WITORSCH, 2002), sendo que o efeito dependerá da estrutura química da substância, dose e tempo de exposição (SULTAN, 2001). Uma vez que os mecanismos acima estão inter-relacionados (por exemplo, as relações de retroalimentação envolvem receptores hormonais) a desregulação endócrina pode envolver um arranjo complexo de efeitos (WITORSCH, 2002).

O rápido desenvolvimento tecnológico e industrial que ocorreu na segunda metade do século XX foi responsável pelo marcante crescimento na produção de medicamentos, pesticidas, aditivos alimentares e compostos químicos industriais. Nos últimos anos, surgiram evidências de que várias substâncias que sempre foram consideradas tóxicas, tais como as dioxinas, o bifenil policlorado, o diclorodifeniltricloroetano e derivados, e ftalatos possivelmente causam toxicidade através de mecanismos de desregulação endócrina. Concomitantemente, a incidência de desordens do desenvolvimento do trato reprodutor masculino mais do que dobrou nos últimos 30-50 anos, enquanto que a contagem do esperma caiu aproximadamente pela metade (SHARPE & SKAKKEBAEK, 1993). Além disso, durante a última década, vários trabalhos foram publicados reportando um aumento de anomalias nos órgãos reprodutivos masculinos, assim como um aumento de câncer testicular e um declínio no número relativo de nascimentos de bebês do sexo masculino e na qualidade do sêmen (RITTLER & CASTILLA, 2002). Atualmente, se sabe que a exposição a agentes químicos capazes de alterar os padrões endócrinos normais, durante o desenvolvimento sexual (pré e pós-natal), pode afetar o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de forma irreversível, uma vez que, nos mamíferos, o trato reprodutor desenvolve-se como feminino, a menos que andrógenos sejam produzidos e utilizados normalmente pelo feto. Desta forma, agentes com atividade antiandrogênica ou estrogênica, por exemplo, podem ser capazes de causar redução na produção

espermática, alteração no comportamento sexual ou pseudohermafroditismo. Alterações no balanço hormonal também podem afetar o desenvolvimento do trato reprodutor feminino. A exposição a substâncias androgênicas ou estrogênicas durante o desenvolvimento sexual pode resultar em efeitos adversos na anatomia e função reprodutivas, em doses que não afetam indivíduos adultos (US EPA, 1996). Existem basicamente seis processos, os quais podem ser perturbados com conseqüências irreversíveis, no final do período pré-natal e início do pós-natal (NEUBERT, 1997; McCARTHY *et al.*, 1997).

1. Interferência direta com a organogênese (estágio embrionário final), neste caso especial, com a formação dos órgãos sexuais primários (ou a multiplicação das células germinativas primárias, resultando em um número reduzido de células germinativas). Tal efeito é causado principalmente por agentes sem ações hormonais, *i.e.*, teratógenos não hormonais, que provavelmente interferem com o desenvolvimento da gônada. Frequentemente, tais efeitos são induzidos com outras ações teratogênicas.
2. Diferenciação dos órgãos sexuais internos masculinos (diferenciação do ducto de Wolffian e regressão do ducto de Müller) sob a influência dos andrógenos endógenos. Embora teratógenos possam também prejudicar estes processos, efeitos anti-hormonais são mais freqüentes. Enquanto o desenvolvimento fenotípico feminino é o que ocorre naturalmente em mamíferos, a diferenciação fenotípica dos órgãos sexuais internos masculinos requer a capacidade indutiva da testosterona, produzida pelo feto, sob a influência do cromossomo Y. A interferência neste processo induzido pela testosterona pode levar a feminilização.
3. Interferência com a diferenciação das glândulas acessórias e genitália externa masculina durante o estágio fetal. Embora outros teratógenos possam também prejudicar estes processos, efeitos anti-hormonais são mais freqüentes.
4. Interferência com a formação das células de Sertoli. Estas células são formadas durante o período pré-natal e seu número durante a vida pós-

natal é determinado antes do nascimento. Este processo pode ser prejudicado por substâncias não hormonais.

5. Interferência com o estabelecimento do mecanismo regulatório hipotálamo-hipófise-gônadas para o controle da formação e liberação dos hormônios nas gônadas masculina e feminina.
6. Interferência com a característica comportamental. Isto geralmente ocorre durante a fase inicial do período pós-natal. Sob a influência dos hormônios sexuais (masculino) o comportamento sexo-específico é determinado no hipotálamo.

Um dos aspectos mais bem estudados da desregulação endócrina está relacionado ao grupo de substâncias químicas ambientais que interagem com receptores. Tais substâncias têm sido chamadas de agentes com atividade hormonal e as mais estudadas são aquelas que interagem com os receptores de estrogênio, denominadas de estrogênios ambientais ou xenoestrógenos (NEUBERT, 1997). Os xenoestrógenos pertencem a diferentes classes químicas e são provenientes de variadas fontes, podendo ser compostos industriais, produtos farmacêuticos, derivados de plantas (fitoestrógenos) ou fungos (micoestrógenos) e pesticidas. Desde 1930 muitos estudos têm demonstrado que a administração de numerosas substâncias químicas não esteroidais a animais de sexo feminino provoca uma resposta parecida com aquela provocada por estrogênio (por exemplo, uma mudança em células da vagina ou aumento uterino) (COOK *et al.*, 1933; BITMAN *et al.*, 1968; LIEBERMAN 1996). Existem evidências de que aproximadamente 100 substâncias não esteroidais atuam ou se ligando a receptores estrogênicos ou provocando respostas estrogênica ou anti-estrogênica em vários sistemas de ensaio biológico *in vivo* ou *in vitro*. Com exceção do estrogênio sintético dietilestilbestrol (DES) (o qual é tão potente quanto o estradiol), a maioria dos outros xenoestrógenos apresenta atividade fraca, de 1.000 a 1.000.000 de vezes inferior à do estradiol (WITORSH, 2002).

Em humanos, a exposição ao dietilestilbestrol (DES) é o principal exemplo do potencial deletério que as substâncias desreguladoras endócrinas podem ter sobre o sistema reprodutivo (SHARPE, 1994). Entre o final da década de 40 e o

início da década de 70 essa substância estrogênica foi utilizada terapêuticamente por mais de 5 milhões de mulheres grávidas para prevenir abortos e complicações da gravidez (TOPPARI *et al.*, 1996; DASTON *et al.*, 1997). Seu uso foi abandonado depois que foi constatada a alta incidência de um tipo raro de câncer endocervical em adolescentes expostas *in utero*. Posteriormente, também foram detectados índices elevados de anormalidades reprodutivas, incluindo baixa contagem de espermatozoides, nos descendentes masculinos expostos ao DES (TOPPARI *et al.*, 1996; JENSEN *et al.*, 1995).

Além de exercer um papel chave na fertilidade feminina, atualmente existem evidências de que o estrógeno também exerce um importante papel na fertilidade masculina. Diversos estudos têm relacionado à ocorrência de anormalidades no sistema reprodutivo masculino com a exposição pré e perinatal a substâncias com atividade estrogênica (JENSEN *et al.*, 1995; TOPPARI *et al.*, 1996; DASTON *et al.*, 1997), o que reforça a atuação dos xenostrogênicos como desreguladores endócrinos .

A interferência com a produção ou ação de hormônios androgênicos também pode ocasionar diversos prejuízos no desenvolvimento do trato reprodutor masculino. Compostos antiandrógenos, que se ligam aos receptores androgênicos sem ativá-los, podem causar efeitos similares aos observados em indivíduos que apresentam receptores androgênicos defeituosos (US EPA, 1997). Diversos contaminantes químicos encontrados no meio ambiente como os plastificantes ftalato de di-etil-hexila (DEHP), ftalato de dibutila (DBP) e ftalato de butilbenzila (BBP); e os fungicidas vinclozolin e procimidona já foram identificados como anti-andrógenos (OTSBY *et al.*, 1999a; OTSBY *et al.*, 1999b; LATINI *et al.*, 2004; BORCH *et al.*, 2004). Existem evidências de que a administração de baixas doses de vinclozolin durante o período de diferenciação sexual em ratos pode provocar diversas alterações no trato reprodutivo masculino como agenesia da próstata, redução da distância ano-genital, retenção de mamilos e redução na produção espermática (OSTBY *et al.*, 1999b). Em relação aos ftalatos, tem sido demonstrado, que a exposição de animais de laboratório de sexo masculino a estas substâncias causa efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo como: agenesia do epidídimo, redução da distância ano-genital, formação de

mamilos/aréola, hipospadia¹, atrofia dos túbulos seminíferos e hiperplasia das células de Leydig (MYLCHREEST *et al.*, 1998; MYLCHREEST *et al.*, 1999; GRAY *et al.*, 2000; MYLCHREEST *et al.*, 2002).

1.3 TESTES EM TOXICOLOGIA REPRODUTIVA

Ao longo da história, a experiência da humanidade com as drogas e outros xenobióticos tem mostrado a necessidade da realização de testes toxicológicos em animais como fontes essenciais de informação para a adequada avaliação dos riscos que podem estar associados com a exposição às substâncias químicas. Desde o trágico incidente ocorrido com a talidomida, entre as décadas de 50 e 60, que as exigências quanto aos estudos de segurança que outrora se restringiam a caracterização da toxicidade para efeitos agudos, neurotóxicos e carcinogênicos, passaram a ser mais rigorosas, incluindo a avaliação dos riscos decorrentes da exposição crônica e os efeitos adversos sobre o comportamento, reprodução e desenvolvimento (NEUBERT & CHAHOUD, 1995).

O aumento significativo da taxa de câncer testicular, da incidência de casos de infertilidade e a diminuição da qualidade do sêmen humano ao longo dos últimos anos (RITTLER & CASTILLA, 2002; SULTAN *et al.*, 2001) tem atraído o interesse não só das agências regulatórias e de organismos internacionais pertinentes, como também, de inúmeros grupos científicos, pela pesquisa de substâncias químicas com potencial toxicidade reprodutiva. Isso tem provocado, nos últimos anos, o surgimento de um grande número de trabalhos visando detectar os efeitos e os prováveis mecanismos de ação dessas substâncias.

O termo “toxicidade reprodutiva” pode ser usado para indicar todos os efeitos adversos sobre a sexualidade e a fertilidade, tanto em machos quanto em fêmeas, assim como os efeitos sobre o desenvolvimento, os quais incluem

¹ hipospadia = anomalia de desenvolvimento na qual a uretra masculina abre-se no lado inferior do pênis ou no períneo.

qualquer efeito que interfira com o desenvolvimento normal, tanto antes, quanto depois do nascimento, a partir da concepção até a maturidade sexual (Quadro 1).

QUADRO 1 – TIPOS DE EFEITOS ADVERSOS A SEREM VERIFICADOS NOS ESTUDOS DE TOXICIDADE REPRODUTIVA.

Período e alvos de toxicidade das substâncias	Efeitos adversos sobre, por exemplo:
Toxicidade adulta	Libido; comportamento sexual; função endócrina; acasalamento (taxa de acasalamento, taxa de prenhez); produção de gametas (morfologia e função, por exemplo, contagem de espermatozóide, motilidade).
Toxicidade materna (modificação da fisiologia e do metabolismo durante a gravidez e lactação)	Susceptibilidade a toxinas; habilidade para amamentar; Quantidade e qualidade do leite.
Toxicidade relacionada ao desenvolvimento	
Pré-implantação e implantação	Fertilização Movimento do óvulo fertilizado Implantação Sobrevivência do óvulo fertilizado
Desenvolvimento do embrião	Crescimento e diferenciação Desenvolvimento dos órgãos Sobrevivência
Desenvolvimento da placenta	Crescimento e Função
Desenvolvimento do feto	Crescimento e diferenciação Função dos sistemas de órgãos Sobrevivência
Desenvolvimento pós-natal (neonatal, pré-puberdade, pós-puberdade, puberdade)	Peso ao nascer Sistemas de órgãos Função hormonal Função imune Função do sistema nervoso Função sexual Outras funções celulares Sobrevivência

Fonte: RIECKE & STAHLMANN, 2000.

O objetivo dos estudos sobre toxicidade reprodutiva é detectar qualquer efeito que uma substância química possa provocar sobre a reprodução em mamíferos. Coelhos e roedores são os animais mais indicados para os estudos

de toxicidade reprodutiva (AMANN, 1982), uma vez que apresentam um curto período de gestação e são criados facilmente nas condições de laboratório. Entre os roedores, os ratos são usados preferencialmente em função do seu tamanho pequeno, processos reprodutivos bem estabelecidos e uso geral em estudos toxicológicos. Os coelhos são utilizados como segundo animal de escolha nos testes de toxicidade reprodutiva, apresentando algumas vantagens como a possibilidade de coleta de sêmen ejaculado (AMANN, 1982; COLLINS *et al.*, 1999). Nestes testes, a exposição dos animais às substâncias químicas de interesse pode ser feita por meio da ração, da água ou por gavagem (COLLINS *et al.*, 1999; KIMMEL & MAKRIS, 2001).

Quanto aos desreguladores endócrinos, as agências regulatórias internacionais como o FDA (Food and Drug Administration) e a Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) estão francamente envolvidos no desenvolvimento e na validação de métodos que possam ser usados para avaliar o potencial destas substâncias em alterar o sistema endócrino (TAYLOR, 1999). Um comitê consultivo foi criado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U. S. EPA) com a finalidade de desenvolver um programa de triagem e testes de substâncias com possível função de desregulação endócrina (EDSTAC, 1998). No relatório final elaborado pelo comitê é proposta a realização de vários protocolos de triagem com a função de detectar substâncias ou misturas com potencial de interferir no sistema endócrino e baterias de testes que devem avaliar os riscos associados à exposição a essas substâncias. Os protocolos de triagem contêm diversos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Os ensaios *in vitro* são adequados particularmente para a detecção de substâncias que atuam diretamente nos receptores hormonais, mas não levam em consideração os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos que ocorrem no organismo intacto. Por outro lado, os ensaios *in vivo* podem detectar substâncias que atuam por mecanismos não diretamente relacionados aos receptores, como a interferência na síntese, metabolismo e liberação dos hormônios. O teste uterotrófico e o teste de Hershberger são os dois principais ensaios *in vivo* de curta duração utilizados na triagem de substâncias desreguladoras endócrinas e detectam a capacidade que um produto químico tem de estimular ou de inibir respostas estrogênicas do útero e androgênicas, respectivamente (EDSTAC, 1998; BAKER, 2001).

A detecção da toxicidade reprodutiva pode ser abordada de diferentes modos. A escolha do tipo de teste mais apropriado para a avaliação da toxicidade reprodutiva depende do tipo de substância química em questão e de seu uso e deve ser abrangente quanto ao período de exposição, uma vez que as alterações induzidas por substâncias químicas podem ser desencadeadas em qualquer estágio do desenvolvimento, desde a vida embrionária até a idade adulta. Com este objetivo, o FDA (Food and Drug Administration) estabeleceu três protocolos de estudos (ANDRADE, 2002; GRAY *et al.*, 1997):

- Segmento I: “fertilidade e desempenho reprodutivo geral” envolve o tratamento de machos e fêmeas antes do acasalamento por um tempo suficiente para cobrir todos os estágios da espermatogênese e do desenvolvimento folicular, durante a prenhez e lactação, e o acompanhamento da cria até a maturidade sexual;
- Segmento II: é conhecido como o segmento que avalia a toxicidade pré-natal; avalia as alterações do desenvolvimento das progênies expostas durante a fase de organogênese (teratogenia). Normalmente, são utilizadas duas ou mais espécies animais (rato, coelho e primatas). As progenitoras são sacrificadas ao final da prenhez e os fetos avaliados quanto a alterações externas, viscerais e esqueléticas;
- Segmento III: toxicidade peri e pós-natal; avalia os efeitos sobre o desenvolvimento pós-natal de progênies expostas durante o desenvolvimento fetal (fase final da prenhez) e a lactação;

Recentemente, vários fatores, tais como o avanço do conhecimento sobre os processos reprodutivos básicos e uma divergência crescente entre os protocolos de estudo em diferentes países, levaram a publicação de novos protocolos que têm sido aceitos internacionalmente. Estas diretrizes resultaram da Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Drogas para Uso Humano (International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH). Em contraste com os tipos de estudos propostos pelos segmentos I, II e III,

elas agora incluem flexibilidade considerável na implementação dependendo das características gerais da droga a ser avaliada.

As recomendações da ICH afirmam que “o objetivo dos estudos de toxicidade reprodutiva é revelar qualquer efeito de uma ou mais substâncias sobre a reprodução em mamíferos”. A combinação dos estudos selecionados deve permitir a consideração dos efeitos da exposição em todos os estágios do desenvolvimento a partir da concepção até a maturidade, e não apenas a exposição de adultos maduros. Para um melhor entendimento do teste, esta seqüência integrada pode ser dividida nos seguintes estágios:

- A- Pré-acasalamento até a concepção (avalia as funções reprodutivas de fêmeas e machos adultos, desenvolvimento e amadurecimento dos gametas, comportamento durante o acasalamento e fertilização);
- B- Concepção até a implantação (avalia as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento da pré-implantação e a implantação);
- C- Implantação até o fechamento do palato duro (avalia as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento embrionário e a formação dos principais órgãos);
- D- Fechamento do palato duro até o final da prenhez (avalia as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento e crescimento fetal e desenvolvimento e crescimento dos órgãos);
- E- Nascimento até puberdade (avalia as funções reprodutivas de fêmeas adultas, adaptação à vida extra-uterina do neonato, desenvolvimento pré-puberdade e crescimento);
- F- Puberdade até a maturidade sexual (desenvolvimento e crescimento pós-puberdade, adaptação a vida independente e obtenção da função sexual completa).

Os elementos chave dos estudos propostos pelos segmentos I, II e III assim como dos protocolos estabelecidos pelo ICH são mostrados no quadro 2. Em cada protocolo, é fornecida a orientação com relação às espécies/ou seleção de linhagens, rota de administração, número e intervalo dos níveis de dose, duração do tratamento, tamanho da amostra experimental e outros detalhes metodológicos.

QUADRO 2 – RESUMO DAS DIRETRIZES REGULATÓRIAS PARA AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA TOXICIDADE RELACIONADA COM O DESENVOLVIMENTO.

Estudo	Exposição	Aspectos analisados	Comentários
Segmento I Estudo de fertilidade e de reprodução geral	Machos: 10 semanas antes do acasalamento Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Desenvolvimento dos gametas, fertilidade, viabilidade pré- e pós-implantação, nascimento, lactação	Avalia a capacidade reprodutiva de machos e fêmeas após a exposição por um ciclo espermatogênico completo ou por vários ciclos oogênicos
Segmento II Teste da teratogenicidade	Da implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia (análise externa, visceral e esquelética do conceito antes do nascimento)	Exposição limitada a fim de prevenir adaptação metabólica materna e para fornecer alta exposição ao embrião durante o período de vulnerabilidade associado à gastrulação e organogênese
Segmento III Estudo perinatal	Do último trimestre da prenhez até a lactação	Sobrevivência pós-natal, crescimento e morfologia externa	Observa os efeitos sobre o desenvolvimento dos principais órgãos funcionais durante o período peri-natal
ICH 4.1.1 Protocolo de fertilidade	Machos: 4 semanas antes do acasalamento; Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Machos: peso e histologia dos órgãos reprodutivos, contagem e motilidade dos espermatozoides; Fêmeas: viabilidade do conceito na metade da prenhez ou mais adiante	Melhor avaliação dos aspectos reprodutivos em machos; Duração do tratamento mais curto do que no Segmento I
ICH 4.1.2 Efeitos sobre o desenvolvimento pré- e pós-natal, incluindo função materna	Da implantação ao final da lactação	Toxicidade relativa de fêmeas prenhas vs não prenhas; viabilidade pós-natal, crescimento, desenvolvimento e déficits funcionais (incluindo comportamento e reprodução).	Semelhante ao estudo de Segmento I
ICH 4.1.3 Efeitos sobre o desenvolvimento do embrião/feto	Da implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia (análise externa, visceral e esquelética) dos fetos antes do nascimento	Semelhante ao estudo de Segmento II, geralmente conduzido em duas espécies (roedor e não roedor)

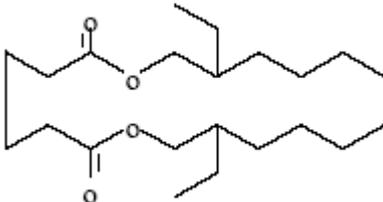
Fonte: RIECKE & STAHLMANN, 2000.

1.4 DEHA

1.4.1 INFORMAÇÃO QUÍMICA

Informações a respeito da fórmula e estrutura molecular do DEHA encontram-se no quadro 3.

QUADRO 3 – INFORMAÇÃO QUÍMICA DO DEHA.

CAS n°	103-23-1
Sinônimos	DEHA; bis(2-etilhexil)adipato; di-2-etil hexil adipato; di-octil adipato; ácido hexanodióico di-octil ester
Fórmula molecular	$C_{22}H_{42}O_4$
Estrutura molecular	

FONTE: HSDB[®] – busca por bis(2-ethylhexyl) adipate. (www.toxnet.nlm.nih.gov)
Acesso: janeiro, 2007

1.4.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Informações a respeito das propriedades físico-químicas do DEHA encontram-se resumidas no quadro 4.

QUADRO 4 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DEHA.

Peso molecular	370.58 g/mol
Estado físico	Líquido oleoso incolor
Ponto de fusão	- 67 °C

Ponto de ebulição	417 °C
Densidade	0,922 g/cm ³ a 25 °C
Solubilidade em água	0,78 mg/L a 22 °C
Pressão de vapor	< 0,00133 Kpa a 20 °C

FONTE: HSDB[®] – busca por bis(2-ethylhexyl) adipate. (www.toxnet.nlm.nih.gov)
Acesso: janeiro, 2007

1.4.3 PRODUÇÃO E USOS

Ainda não é conhecido se o DEHA corresponde a uma substância natural. Industrialmente, ele é produzido pela reação do ácido adípico com o 2-etil hexanol, na presença de um catalisador tal como o ácido sulfúrico ou o ácido p-toluenosulfônico (HSDB, 2007). O DEHA é um plastificante usado principalmente pela indústria produtora de plásticos com a finalidade de conferir flexibilidade a produtos como o policloreto de vinila (PVC) (ESTEVES *et al.*, 2006). Como um dos principais produtos a base de PVC em que o DEHA é utilizado; destacam-se as películas e embalagens plásticas para a produção e estocagem de alimentos (KAY, 1991; GOULAS, 2000). O DEHA não se encontra quimicamente ligado ao plástico, mas está disperso na matriz das cadeias do polímero (ESTEVES *et al.*, 2006). Outros produtos que contém DEHA incluem cosméticos, isolantes para fios elétricos, mangueiras de jardim, vestimentas plásticas, borracha sintética, fluido hidráulico e tubos utilizados no processo de hemodiálise (HUFF, 1982; ABRANTES *et al.*, 2007).

1.4.4 EXPOSIÇÃO HUMANA

A exposição humana ao DEHA se dá, principalmente, por via oral, através do consumo de água e alimentos contaminados e, em menor escala, por via dérmica, através do uso de vestimentas plásticas e de produtos cosméticos. As principais fontes de contaminação da água por DEHA são os efluentes industriais e o chorume proveniente da decomposição do lixo. Devido à sua natureza

química, o DEHA apresenta uma baixa solubilidade na água e um alto coeficiente de partição no solo, o que propicia a sua deposição na biota, no sedimento e no solo. A principal fonte de exposição da população em geral ao DEHA é através do consumo de alimentos. O *EU Scientific Committee for Foods* fixou a IDT (ingestão diária tolerável) em 0,3 mg de DEHA/kg, aproximadamente 21 mg/pessoa, considerando o peso médio de 70kg de peso corpóreo (PETERSEN & BREINDAHL, 1998).

A migração do DEHA do filme de PVC para uma variedade de alimentos tem sido investigada em diversos países (LOFTUS *et al.*, 1994). Tem sido demonstrado que a migração desta substância é mais acentuada quando os filmes plásticos estão em contato com alimentos com alto teor de gordura, como em derivados do leite, óleos e carnes (PETERSEN & BREINDAHL, 1998). Para estes alimentos, a migração tem ultrapassado o limite máximo de 18 mg DEHA/Kg de alimento, proposto pelo *EU Scientific Committee for Foods* (PETERSEN *et al.*, 1995; GOULAS *et al.*, 2000). Em 1987, uma pesquisa sobre os níveis de DEHA nos alimentos indicou que o nível máximo de consumo por pessoa por dia era em torno de 16 mg (LOFTUS *et al.*, 1994). Há pouco mais de dez anos atrás, a estimativa do consumo diário máximo de DEHA foi reduzida para 8,2 mg/pessoa, em decorrência das reduções dos níveis de DEHA usados nos filmes plásticos na época (LOFTUS *et al.*, 1994).

Em outro estudo onde o consumo de DEHA foi determinado pela medida dos níveis do ácido 2-etil hexanóico na urina, o consumo médio de DEHA por pessoa foi estimado em 2,7 mg/dia (LOFTUS *et al.*, 1994). Contudo, deve ser levado em consideração que o ácido 2-etil hexanóico também é um metabólito do ftalato de di-etil-hexila (DEHP), o que significa que nem todo o ácido 2-etil hexanóico detectado na urina pode ser considerado produto do metabolismo de DEHA. Dados atuais sobre os níveis de exposição ao DEHA não foram encontrados. Baseando-se no fato de que o DEHA tem substituído grande parte dos ftalatos na indústria de plásticos para embalagem de alimentos (GOULAS *et al.*, 2000) é provável que o nível de exposição ao DEHA tenha aumentado bastante na última década.

A exposição humana ao DEHA também pode ocorrer após alguns tipos de procedimentos médicos, como e.g. após transfusão de sangue, tratamento por hemodiálise e aplicação de medicamentos através de tubos plásticos flexíveis. DEHA também tem sido detectado em produtos para bebê prontos para consumo (PETERSEN & BREINDAHL, 2000).

FIGURA 5 – POSSÍVEIS FONTES DE EXPOSIÇÃO AO DEHA



FONTE: Internet – busca por imagens (www.google.com) Acesso: janeiro, 2007

1.4.5 TOXICIDADE GERAL

O DEHA exibe baixa toxicidade aguda em mamíferos com DL_{50} oral e dérmica maior que 2g/kg de peso corpóreo em ratos e nenhuma mortalidade em roedores expostos via inalação por oito horas em níveis até a saturação. Dados disponíveis sobre estudos em animais mostram que o DEHA não é irritante para a pele ou para os olhos e, também, não é um sensibilizador dérmico. Estudos de toxicidade dose-repetida (até 90 dias) em ratos e camundongos com DEHA na dieta mostraram redução no ganho de peso corporal em doses a partir de 400 mg/kg em ratos e a partir de 600 mg/kg em camundongos. Estudos de genotoxicidade *in vitro* mostraram-se negativos para mutações, síntese de DNA não programada e interações de DNA em sistemas bacteriano e de células de mamífero. Estudos de genotoxicidade *in vivo* (ensaios de micronúcleo) também têm se mostrado negativos (HSDB, 2007).

1.4.6 CARCINOGENICIDADE

O DEHA pertence a um grupo de substâncias químicas conhecidas por induzir a proliferação de peroxissomos. Um dos principais motivos para preocupação com relação a este grupo de substâncias químicas diz respeito ao seu potencial em causar a proliferação de peroxissomos hepáticos e o aparecimento de tumores em roedores. O DEHA tem sido avaliado tanto em camundongos como em ratos, mas até o momento, só há evidência significativa de câncer no fígado de camundongos fêmeas (HUFF, 1982; LAKE *et al.*, 1997).

Os dados referentes à carcinogenicidade do DEHA têm sido revisados pelo IARC (1982, 1987 e 2000) e pelo U.S. EPA (1994). Em um dos seus relatórios, o IARC (2000) comenta que existem evidências limitadas de que o DEHA seja carcinogênico para camundongos, e que não existem dados sobre a carcinogenicidade da substância para humanos. Tal achado levou o IARC a identificar o DEHA como uma substância química do Grupo 3 sendo, portanto, não classificável quanto ao potencial carcinogênico para humanos (IARC, 2000).

Contudo, baseado em uma avaliação de 1991, o U.S. EPA (1994) classifica o DEHA como um possível carcinógeno humano, Grupo C. A classificação foi baseada na ausência de dados em humanos e na evidência experimental de que o DEHA induz tumores hepáticos em camundongos fêmeas (IRIS, 2007).

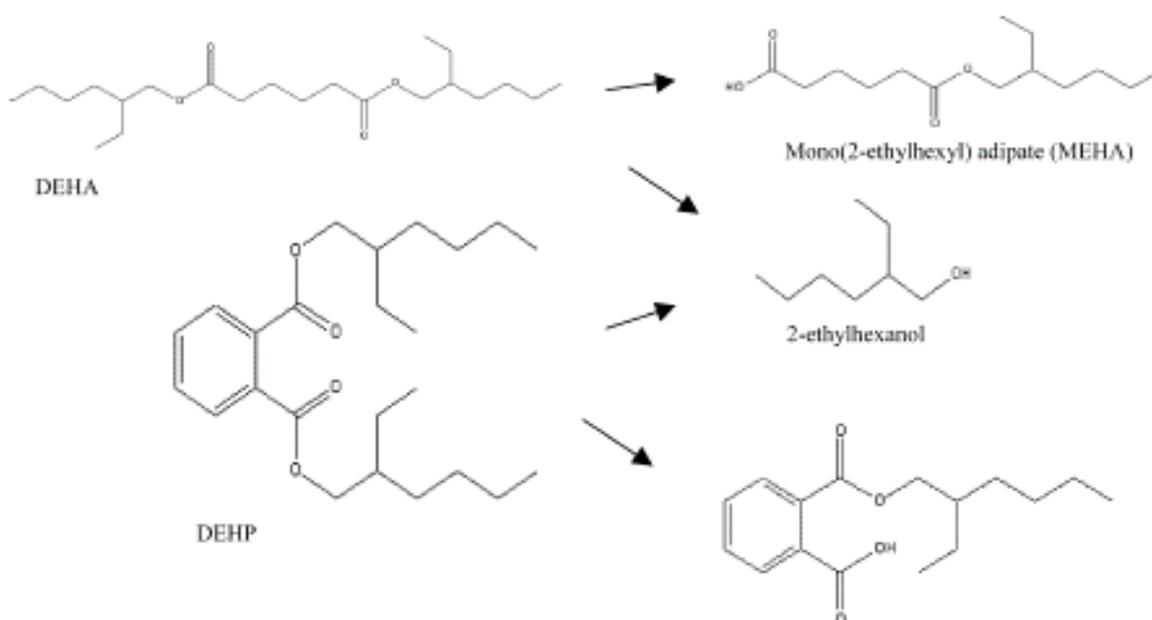
As evidências descritas acima, demonstrando que camundongos são mais susceptíveis do que ratos aos efeitos do DEHA, pelo menos no que diz respeito ao seu potencial carcinogênico, foi um dos fatores levados em consideração para que tenhamos elegido o camundongo como a espécie de estudo desta dissertação. Outro fator que contribuiu para esta escolha foi o fato de que os poucos estudos que existem a respeito do potencial tóxico do DEHA sobre o organismo em desenvolvimento – em particular do organismo masculino - foram realizados em ratos. Assim, o presente estudo pretende contribuir no sentido de ampliar a base de dados sobre o potencial tóxico do DEHA em outras espécies animais.

1.4.7 TOXICIDADE REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

A toxicidade testicular e os efeitos anti-androgênicos do DEHP em roedores são bem conhecidos da comunidade científica. Tão conhecidos, que esta substância tem sido – por essa razão – substituída nos filmes plásticos usados em embalagens de alimentos. Um dos substitutos do DEHP é o DEHA. No entanto, comparativamente ao DEHP, são poucos os dados publicados sobre a toxicidade reprodutiva do DEHA. Até o momento em que concluímos o levantamento bibliográfico para elaboração desta dissertação cinco trabalhos foram encontrados (DALGAARD *et al.*, 2003; BORCH *et al.*, 2004; JARFELT *et al.*, 2005; NABAE *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2006).

Similaridades em termos de estrutura química e no metabolismo com o DEHP (figura 6) levaram dois autores (JARFELT *et al.*, 2005; BORCH *et al.*, 2004) a investigar uma possível modulação do DEHA sobre efeitos tóxicos já conhecidos do DEHP sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos, como *e.g.* alterações no tecido testicular e efeitos antiandrogênicos (TANAKA, 2005; STROHECKER *et al.*, 2005; SALAZAR *et al.*, 2004; LATINI *et al.*, 2004; PARKS *et al.*, 2000; GRAY *et al.*, 2000).

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA E METABOLISMO DO DEHP E DEHA.



Fonte: DALGAARD *et al.*, 2003.

Jarfelt *et al.* (2005) administraram por via oral DEHP (300 ou 750 mg/kg *p.c./dia*) ou DEHP (750mg/kg *p.c./dia*) em combinação com o DEHA (400 mg/kg *p.c./dia*) do 7º dia de gestação até o dia 17 PN, *i.e.* exposição durante a gestação e lactação. Esses autores observaram uma diminuição da distância anogenital, aumento do número de mamilos e a diminuição do peso da próstata em machos descendentes dos três grupos experimentais. Investigações histopatológicas revelaram alterações na morfologia do testículo, tanto em animais púberes quanto em animais adultos. Observou-se também, diminuição no tamanho da ninhada e aumento da mortalidade pós-natal no grupo combinando DEHA ao DEHP. Porém, apesar do DEHA incrementar a toxicidade do DEHP sobre o desenvolvimento geral da prole, não foi observado efeito combinatório do DEHA e DEHP com respeito especificamente aos efeitos anti-androgênicos. Assim, os machos que receberam DEHP em combinação com o DEHA não exibiram efeitos tóxicos mais pronunciados no sistema reprodutivo do que os machos que receberam somente DEHP.

Borch *et al.* (2004) administraram por via oral DEHP (300 ou 750 mg/kg *p.c./dia*), DINP (750 mg/kg *p.c./dia*), DEHP (750 mg/kg *p.c./dia*) em combinação com o DEHA (400 mg/kg *p.c./dia*), e DEHP (300 mg/kg *p.c./dia*) em combinação com o DINP (750 mg/kg *p.c./dia*). Avaliaram a esteroidogênese (em diferentes fases do desenvolvimento) de ratos machos expostos durante a gestação e lactação. DINP e DEHP reduziram a produção de testosterona testicular *ex vivo* e os níveis de testosterona testicular e plasmática em fetos machos no 21º dia de gestação. Adicionalmente, observaram que os níveis plasmáticos de LH nos fetos machos foram elevados. Nos animais expostos ao DEHP foi observada diminuição da distância anogenital e o aumento do número de mamilos durante avaliação no dia 13 PN. Os níveis de Inibina no soro foram significativamente reduzidos nos animais expostos ao DEHP durante avaliação na pré-puberdade e em alguns animais adultos. Não foi detectada modulação do DEHA nos efeitos endócrinos do DEHP, mas uma tendência de efeitos acumulativos na supressão da síntese da testosterona foi evidenciada na combinação dos ftalatos (DEHP e DINP).

Os trabalhos de Nabae *et al.* (2006) e Kang *et al.* (2006) avaliaram os efeitos do DEHP e do DEHA sobre o tecido testicular e a espermatogênese em ratos em condições de insuficiência renal ou dano hepático, respectivamente.

Nabae *et al.* (2006) administraram na dieta de ratos F344 (com disfunção renal induzida através de um pré-tratamento com injeções s.c. de ácido fólico) DEHP ou DEHA nas concentrações de 0, 6000 ou 25000 ppm durante quatro semanas. Avaliaram se a toxicidade sobre o sistema reprodutivo masculino poderia ser exacerbada quando estas duas substâncias eram administradas em condições de insuficiência renal. Um grupo controle foi constituído por animais que receberam DEHP e DEHA da mesma forma, mas sem o pré-tratamento com ácido fólico. Observaram diminuição no peso dos testículos, atrofia dos tubos seminíferos e diminuição na contagem de espermatozóides, da motilidade e aumento na porcentagem de espermatozóides com morfologia anormal na dose de 25000 ppm de DEHP. No entanto, os efeitos foram mais proeminentes nos animais com insuficiência renal em relação aos animais saudáveis que receberam a mesma dose. Este efeito não foi evidente nos ratos que receberam 6000 ppm de DEHP ou qualquer concentração de DEHA. Um aumento na concentração do mono-derivado do DEHP mono(2-etilhexil) ftalato no sangue, testículo e urina foi considerado relevante na exacerbação da toxicidade reprodutiva do DEHP.

Kang *et al.* (2006) administraram na dieta de ratos F344 (com dano hepático induzido através de um pré-tratamento com injeções *i.p.* de tioacetamida) DEHP ou DEHA nas concentrações de 0, 6000 ou 25000 ppm durante quatro semanas. Avaliaram se a toxicidade sobre o sistema reprodutivo masculino poderia ser exacerbada quando estas duas substâncias eram administradas em condições de dano hepático. Um grupo controle foi constituído por animais que receberam DEHP e DEHA da mesma forma, mas sem o pré-tratamento com a tioacetamida. Observaram diminuição significativa no número de espermatozóides, na motilidade e aumento na porcentagem de espermatozóides com morfologia anormal na dose de 25000 ppm de DEHP. No entanto, os efeitos foram mais proeminentes nos animais com dano hepático em relação aos animais saudáveis que receberam a mesma dose. O tratamento com o DEHA não representou nenhuma toxicidade testicular aparente nos animais saudáveis ou com dano hepático. Exame histopatológico nos testículos revelou

atrofia e degeneração severa dos túbulos seminíferos em todos os animais pré-tratados com tioacetamida e, posteriormente, tratados com DEHP na maior dose. Lesões suaves a moderadas foram encontradas na mesma dose de DEHP nos animais não tratados com a tioacetamida.

E, finalmente, Dalgaard *et al.* (2003) trataram ratas grávidas por via oral com as doses de 0, 200, 400 e 800 mg de DEHA/kg *p.c./dia* do 7º dia da gestação até o 17º dia PN. Todos os animais foram sacrificados no 21º após o nascimento, com exceção de um macho e de uma fêmea, de cada ninhada, mantidos para investigação da maturidade sexual, análise hormonal e do esperma. Neste estudo não foram reportados sinais clínicos de toxicidade nas progenitoras durante o período em que receberam o DEHA. Além disso, os autores observaram que o número de filhotes vivos por ninhada e que a distribuição de animais do sexo masculino e feminino nas ninhadas foi semelhante entre os grupos, sendo que nenhum efeito anti-androgênico foi reportado em relação aos desfechos avaliados (dosagem de testosterona testicular, análise espermática e peso de órgãos sexuais). Foi observado também um aumento da taxa de mortalidade pós-natal (a partir de 400 mg/Kg *p.c./dia*) e prolongamento do período de gestação (por 1 dia aproximadamente) na dose de 800 mg de DEHA/kg *p.c./dia*. Neste estudo foi considerado o NOAEL de 200 mg de DEHA/kg *p.c./dia* para efeitos de toxicidade sobre o desenvolvimento.

Podemos, então, concluir que até o presente momento, não foram detectados efeitos tóxicos do DEHA sobre o tecido testicular ou efeitos anti-androgênicos em ratos nos trabalhos pesquisados. Foram evidenciados apenas efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento geral da prole com a determinação de um NOAEL de 200 mg de DEHA/kg *p.c./dia* em ratos (DALGAARD *et al.*, 2003). No entanto, é importante ressaltar que esses resultados são ainda incipientes e os protocolos dos estudos realizados até aqui apresentam algumas limitações em relação às doses usadas, número de animais utilizados e os períodos de exposição. Alguns estudos avaliaram a associação do DEHA com o DEHP utilizando somente um tipo de dose de DEHA. Não oferecendo, portanto, dados sobre a relação dose-resposta. Além disso, alguns desfechos importantes em relação à toxicidade reprodutiva do DEHA ainda não foram investigados, como *e.g.* fertilidade, comportamento sexual e a avaliação de parâmetros do

desenvolvimento. Não existindo também, como mencionado anteriormente, dados sobre a toxicidade reprodutiva do DEHA em camundongos.

1.4.8 ASPECTOS REGULATÓRIOS

Plastificantes utilizados pela indústria com o objetivo de conferir flexibilidade a produtos como, o policloreto de vinila (PVC), têm sido alvo de muita atenção nos últimos anos, em relação a efeitos de desregulação endócrina em organismos em desenvolvimento. Inúmeras pesquisas na área da Toxicologia Reprodutiva têm sido realizadas de forma a rastrear os efeitos e os prováveis mecanismos de ação dessas substâncias. De fato, uma série desses compostos, tem causado danos ao sistema reprodutivo masculino de roedores. No ano de 1999, a União Européia proibiu a utilização de ftalatos em brinquedos de PVC e em artigos para bebês, como mordedores, chocalhos e chupetas. A situação é similar nos EUA (ABRANTES *et al.*, 2007; LATINI *et al.*, 2004). A Comissão Nacional de Segurança de Produtos para Consumidores conduziu, em humanos, estudos de migração de ftalatos para a saliva e classificou o risco para crianças como remoto. No entanto, seguindo a tendência de proibição européia, os fabricantes eliminaram os ftalatos de produtos infantis. A eliminação de ftalatos em produtos infantis não ocorreu em outros países, como *e.g.* no Brasil, demonstrando que existe, entre diferentes nações, uma discordância de opinião a respeito do verdadeiro risco que a exposição aos ftalatos pode oferecer à saúde humana.

Conforme mencionado anteriormente, plastificantes alternativos, como o DEHA, têm substituído os ftalatos em uma série de produtos. Nesse processo de substituição, o DEHA é o plastificante mais importante e é amplamente utilizado na produção de filmes plásticos para embalagem de alimentos, sendo freqüentemente encontrado em concentrações que excedem 20% do peso do polímero (GOULAS *et al.*, 2000; DALGAARD *et al.*, 2003). No Brasil, esta tendência foi bastante evidente quando filmes plásticos para embalagem de alimentos foram reprovados em análises realizadas no INCQS por apresentarem teores de DEHP superiores aos limites estabelecidos pela legislação. Após a notificação pela ANVISA dos fabricantes que excediam o valor regulamentar do

DEHP; em análises subseqüentes, observou-se um aumento na utilização do DEHA em relação ao DEHP.

Dois estudos publicados recentemente ilustram bem a situação brasileira em relação ao uso de plastificantes na produção de filmes plásticos para embalagem de alimentos.

Esteves *et al.* (2006) estudaram a migração do Adipato e do Ftalato de di-(2-etil-hexila) de filmes plásticos encontrados no mercado brasileiro para os alimentos. Os valores médios encontrados de migração do DEHP (156,34 mg/kg de alimento) e do DEHA (147,41 mg/kg de alimento) ultrapassaram, em muito, os limites máximos de migração propostos pelo *EU Scientific Committee for Foods* para o DEHP (3 mg/kg) para o DEHA (18 mg/kg) (ESTEVES *et al.*, 2006).

Freire *et al.* (2006) analisaram o conteúdo de DEHP e DEHA em filmes plásticos recolhidos no mercado brasileiro e encontraram teores que variaram de 15 a 44% e de 12 a 19%, respectivamente. Sendo que o limite máximo permitido de DEHP pela legislação brasileira é de apenas 3%.

Um ponto que merece atenção das autoridades nacionais é o fato da Resolução RDC 217 (ANVISA, 2002) e Resolução 105 (ANVISA, 1999) estabelecerem limites máximos permitidos para ftalatos nas películas de celulose (<4mg/dm²) e em filmes plásticos de PVC (3%) para embalagem de alimentos, mas não fazerem referência a níveis toleráveis de DEHA (ESTEVES *et al.*, 2006). O não estabelecimento por lei da concentração máxima permitida de DEHA em produtos de consumo humano pode levar à falta de controle por parte das autoridades regulatórias e, conseqüentemente, à substituição (por parte dos produtores) do DEHP (com limites toleráveis estabelecidos pela ANVISA) pelo DEHA (sem referência na Resolução RDC 217 ou na Resolução 105 da ANVISA), *i.e.* sem garantia de segurança da concentração utilizada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos adversos do DEHA sobre camundongos machos expostos *in utero* e durante a lactação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar os efeitos do DEHA sobre a gravidez;
- avaliar o desenvolvimento geral dos descendentes expostos ao DEHA durante a gestação e lactação;
- avaliar parâmetros específicos do sistema reprodutivo masculino tanto na puberdade quanto na idade adulta;
- avaliar a fertilidade dos descendentes na idade adulta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Baseado nas normas e protocolos (propostos pelo Comitê Consultivo da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana para avaliação da toxicidade reprodutiva) investigou-se os possíveis efeitos adversos do DEHA sobre o desenvolvimento geral e sexual de camundongos, expostos *in utero* e na lactação (U. S. EPA, 1996). O protocolo deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - Fiocruz) sendo licenciado sob o nº P-0262/05.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss Webster*, fêmeas nulíparas e machos, com cerca de 50 dias de idade originários da criação mantida pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Durante o experimento, os animais foram alojados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco autoclavada. Os animais receberam ração comercial (NuvilabTM – Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) e água *ad libitum*. Foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro constante de 12 horas (período claro de 9 às 21 horas). As trocas das camas de maravalha foram realizadas três vezes por semana.

3.2 ACASALAMENTOS

O acasalamento dos animais foi realizado segundo o procedimento proposto por Chahoud & Kwasigroch (1977). Duas fêmeas foram transferidas para a caixa de um macho durante o início das duas últimas horas do período do escuro (7 às 9 da manhã). Ao acender das luzes, o cruzamento era confirmado através da presença do “*plug*” (massa esbranquiçada de espermatozóides) na abertura vaginal. As primeiras 24 horas que se seguiram à confirmação do cruzamento foram consideradas como dia 0 de gravidez.

3.3 DOSES E TRATAMENTO

Após a confirmação do cruzamento, as fêmeas foram pesadas, alojadas individualmente e incluídas aleatoriamente em um dos seguintes grupos experimentais (quadro 5):

Quadro 5 – Descrição dos Grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Nº de fêmeas grávidas (Salewisk Positivo)*
Controle (veículo)	N= 21
200 mg DEHA/Kg de peso corpóreo/dia	N= 21
400 mg DEHA/Kg de peso corpóreo/dia	N= 21
800 mg DEHA/Kg de peso corpóreo/dia	N= 21

* Sítios de implantação detectados pelo método de Salewisk (Salewisk E., 1964)

O DEHA foi diluído em óleo de canola (Purilev™ – Cargill Agrícola S.A., Mairinque, São Paulo) e administrado por via oral, através de entubação gástrica (gavagem) do dia 6 de gravidez até o final do período de lactação (dia 21 pós-natal), nas doses de 200, 400 e 800 mg DEHA/kg de peso corpóreo/dia. As diluições foram feitas de modo a obter um volume de solução de 10mL/kg de peso corporal. O tratamento foi realizado sempre na parte da manhã, entre 9 e 12 horas. Durante todo o período de tratamento as fêmeas foram pesadas diariamente.

A seleção das doses aqui investigadas se deu mediante análise de dados disponíveis na literatura em estudos conduzidos em ratos sobre a toxicidade reprodutiva do DEHA e outros plastificantes (DALGAARD *et al.*, 2003; JARFELT *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2004 e BORCH *et al.*, 2004) e, após conclusão de um estudo piloto realizado previamente em nosso laboratório, no qual um grupo

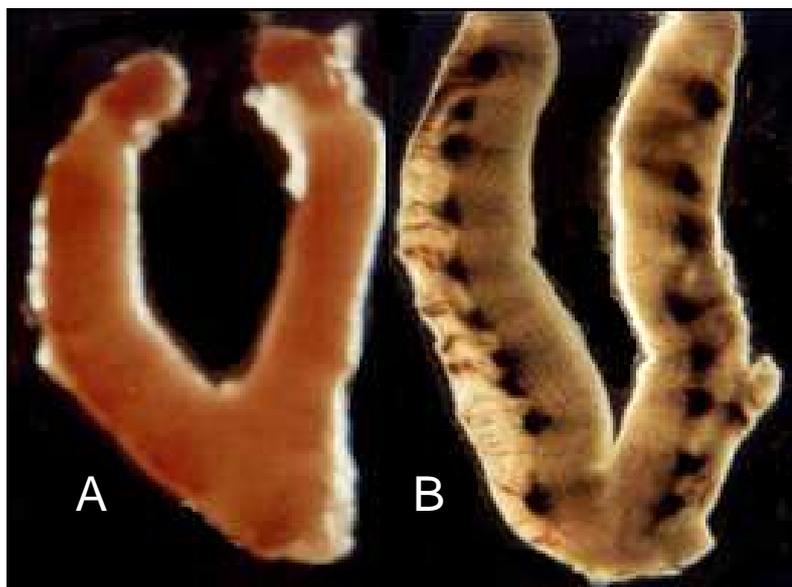
restrito de animais ($N \cong 5/\text{grupo}$) foi tratado com diferentes níveis de dose de DEHA durante a gravidez e parte da lactação e avaliado quanto aos seguintes desfechos: toxicidade materna, mortalidade pré-, peri- e pós-natal da prole, ganho de peso da prole e retardo de marcos físicos do desenvolvimento.

3.4 ACOMPANHAMENTO PRÉ- E PERI-NATAL

A partir do dia 18 de gravidez as gaiolas foram inspecionadas diariamente, sempre às 9 horas e às 17 horas para verificação de nascimentos. Todas as fêmeas que não deram à luz espontaneamente até o dia 22 de gravidez e aquelas que, após terem dado à luz, canibalizaram toda a ninhada, foram pesadas e sacrificadas em câmara de CO_2 . As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal para avaliação de alterações macroscópicas. Órgãos como útero, ovários, timo, fígado e baço foram retirados e seus pesos registrados.

As paredes uterinas foram seccionadas e o conteúdo uterino examinado. Os sítios de implantação foram, então, identificados pelo método descrito por Salewisk (1964). O útero foi imerso em solução de sulfeto de amônio a 10%, por 10 minutos. Em seguida, o útero foi lavado com água e mergulhado por mais 10 minutos em uma solução formada por partes iguais de ferrocianeto de potássio a 20% e ácido clorídrico a 1%. Os sítios de implantação que aparecem, então, como pontos escuros foram localizados e contabilizados.

FIGURA 7 – ÚTERO ANTES E DEPOIS DE TRATADO PELO MÉTODO DE SALEWISK



Nota: **(A)** Útero sem tratamento pelo método de Salewisk; **(B)** Pontos de implantação identificados pelo método de Salewisk.

3.5 ACOMPANHAMENTO PÓS-NATAL

Após a verificação do nascimento, os filhotes foram identificados individualmente, através de injeção subcutânea de nanquim preto na região plantar da pata. Os seguintes parâmetros foram registrados: peso individual, número de filhotes nascidos vivos e número de natimortos. Durante a avaliação destes parâmetros, que durou, em média 5 minutos para cada ninhada, os filhotes foram mantidos afastados da mãe, sob condições controladas de temperatura.

O dia da verificação do nascimento foi considerado dia 1 pós-natal (Dia 1 PN). A partir do dia 1PN até o final do período de lactação (21 PN), cada filhote foi examinado diariamente para avaliação do aparecimento de marcos físicos do desenvolvimento (*i.e.* abertura dos olhos, aparecimento de pêlo, descolamento das orelhas, erupção dos incisivos, descida dos testículos e abertura do canal vaginal). Todos os filhotes nascidos durante o experimento foram pesados individualmente nos dias 5, 10, 15 e 20 PN e o peso destes animais, assim como as mortes ocorridas durante o período de lactação, foram registrados.

No dia do desmame, dia 21 PN, os filhotes foram separados de sua mãe. Cada mãe foi então pesada e submetida à eutanásia em câmara de CO₂. As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal para avaliação de alterações macroscópicas e órgãos como fígado, útero, ovários, timo e baço foram retirados, pesados e fixados para posterior análise histopatológica. Os sítios de implantação foram identificados pelo método descrito por Salewisk (1964). Os filhotes foram separados por sexo e alojados em caixas contendo um número máximo de 05 animais.

3.6 DETERMINAÇÃO DO PESO ABSOLUTO E RELATIVO DE ÓRGÃOS

Uma parte (1/2) da prole masculina foi submetida à eutanásia com 35 dias de idade e a outra metade com 55 dias. Os animais foram pesados e órgãos como fígado, rins, testículos, epidídimos, vesícula seminal, timo e baço foram retirados, pesados e fixados para posterior análise histopatológica. Um animal de cada ninhada (total de 12 ninhadas) de cada grupo experimental foi poupado para a realização do Teste de Fertilidade.

3.7 TESTE DE FERTILIDADE

Ao completarem 60 dias de vida, os animais foram submetidos ao teste de fertilidade. Um macho e uma fêmea, de cada ninhada (N=12 por sexo), foram selecionados, aleatoriamente, em cada grupo experimental e; acasalados, respectivamente, com uma mesma fêmea ou um mesmo macho (não tratados), durante 15 dias ou até a identificação do “*plug*” vaginal. Os acasalamentos foram realizados diariamente, sempre durante as duas últimas horas do ciclo escuro (7 às 9 horas da manhã).

Para avaliação da fertilidade foram calculados os índices de acasalamento e gravidez (US EPA 1996):

- a) Índice de acasalamento = $\frac{\text{n}^\circ \text{ de machos que copularam}}{\text{n}^\circ \text{ total de machos acasalados}} \times 100$;
- b) Índice de gravidez = $\frac{\text{n}^\circ \text{ de machos que tornaram fêmeas grávidas}}{\text{n}^\circ \text{ de machos que copularam}} \times 100$.

O número de machos que acasalaram corresponde ao número de machos em que a cópula foi confirmada pela presença do “*plug*” vaginal.

As primeiras 24 horas que se seguiram à confirmação do cruzamento foram consideradas como dia 0 de gravidez. No dia 17 de gestação, as progenitoras foram submetidas à eutanásia em câmara de CO₂. As cavidades abdominais foram abertas para a retirada e pesagem do útero grávidico e contagem do número de fetos e de reabsorções (figura 8). De cada útero foi ainda registrado a quantidade de implantações uterinas utilizando-se o método de Salewisk (1964).

FIGURA 8 – FOTOS DA CESAREANA



Nota: (1) Abertura da cavidade abdominal; (2) Retirada da placenta e contagem do número de fetos e de reabsorções; (3) Avaliação dos fetos.

3.8 MACHOS NA IDADE ADULTA

Os machos submetidos ao teste de fertilidade (90 dias PN) foram ainda avaliados quanto à produção espermática diária, contagem e análise morfológica dos espermatozoides, tempo de trânsito espermático e nível plasmático de

testosterona. Os órgãos sexuais (testículos, epidídimos e vesícula seminal) também foram retirados, pesados e fixados em solução de Bouin.

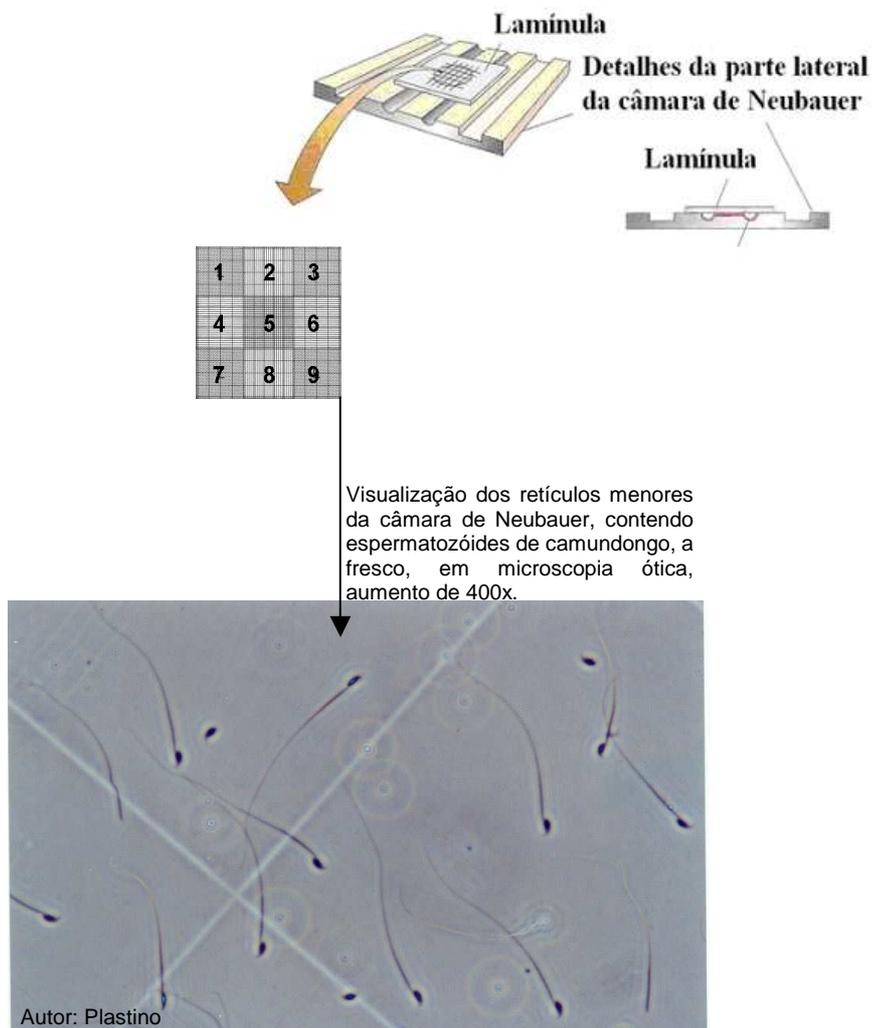
3.8.1 PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA E CONTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO

Depois de medidos os pesos, os testículos e os epidídimos foram separados para determinação da produção espermática diária pelos testículos e da quantidade de espermatozóides na cauda do epidídimo.

Os testículos tiveram a túnica albugínea removida e foram colocados em 2 mL de uma solução salina (cloreto de sódio 0,9%) contendo 0,5% de Triton X-100 para homogeneização. O material foi processado em um homogeneizador manual de tecidos. Então, 250 µl do homogeneizado foram diluídos em 3250 µl de solução salina (diluição 1:14), do qual uma alíquota (10 µl) foi colocada em câmara hemocitométrica (Neubauer) para a contagem do número de espermátides resistentes à homogeneização. Este processo está baseado no fato de que no final da espermatogênese, as nucleoproteínas nas espermátides alongadas se tornam altamente condensadas e entrelaçadas, conseqüentemente, os núcleos das espermátides são resistentes à homogeneização, enquanto o núcleo das outras células germinativas e das células somáticas é destruído (AMANN, 1982; BLAZAK *et al.*, 1985).

As contagens dos dois testículos caracterizaram o número de espermátides de cada animal. A contagem foi feita por microscopia ótica (400X) contando-se as células presentes nos quatro quadrantes laterais (1, 3, 7 e 9) da câmara de Neubauer (figura 9).

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS: ESPERMÁTIDES NO TESTÍCULO E ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO



FONTE: Internet – busca por imagens (www.google.com) Acesso: janeiro, 2007

(Adaptado)

Considerando, que cada quadrante da câmara, com sua lamínula ajustada, representa um volume de $0,1 \text{ mm}^3$ (10^{-4} cm^3) e que cada 1 cm^3 é equivalente a 1 mL, a concentração de espermatozoides por mL foi determinada multiplicando-se o número médio de espermatozoides por quadrante pelo fator 10^4 . Como a suspensão de espermátides sofreu diluição, a concentração de

espermatozóides por mL foi multiplicada pelo fator de diluição utilizado (1:28) formando o fator de correção final ($2,8 \times 10^5$). Para estabelecer a produção espermática diária, o número de espermátides de cada animal foi dividido por 4,84 conforme descrito por Vom Saal *apud* Al-Thani *et al* (2003) e Johnson *et al* (1992). A determinação deste divisor de tempo está baseada nos tipos celulares resistentes à homogeneização (espermátides 14-16) que estão presentes nos estágios II-VIII do ciclo do epitélio seminífero (SOHARA *et al.*, 2006). A série completa das associações de células germinativas é conhecida como ciclo do epitélio seminífero, sendo que sua duração, ou seja, o intervalo necessário para que todos os estágios apareçam num ponto do túbulo seminífero é uniforme em cada espécie (AMANN, 1982). No camundongo, as associações celulares abrangem 16 estágios diferentes. Os estágios II-VIII, nos camundongos, correspondem a 14% de um ciclo completo, o qual tem a duração total de 34,5 dias (JOHNSON *et al.*, 1992).

Para a contagem do número de espermatozóides, depois de avaliados os pesos dos epidídimos, as caudas foram separadas do corpo-cabeça, cortadas em pequenos pedaços e então colocadas em 0,5 mL da solução 0,5% de Triton X-100 em salina. O material foi processado em um homogeneizador manual de tecidos. Então, 250 μ l do homogeneizado foram diluídos em 1750 μ l de solução salina (diluição 1:8), do qual uma alíquota (10 μ l) foi colocada em câmara hemocitométrica (Neubauer) para a contagem do número de espermatozóides. A homogeneização e o processamento foram feitos da mesma forma já descrita para a contagem das espermátides. Os núcleos dos espermatozóides são resistentes à homogeneização, enquanto o tecido do epidídimo não é (BLAZAK *et al.*, 1985). As contagens dos dois epidídimos caracterizaram o número de espermatozóides de cada animal quando multiplicadas pelo fator de correção (4×10^4). O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo foi obtido através da divisão do número de espermatozóides pela produção espermática diária (BLAZAK *et al.*, 1985; JOHNSON *et al.*, 1992).

3.8.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZÓIDES

Para a avaliação da morfologia espermática, foram coletados espermatozóides do ducto deferente por meio de lavagem da luz do ducto deferente, com 0,25 mL de cloreto de sódio 0,9% (solução salina). Uma gota dessa suspensão foi misturada com uma gota de solução de eosina 2% para confecção de um esfregaço.

Os espermatozóides foram analisados em microscopia ótica (400X) e classificados por anormalidades morfológicas de acordo com a descrição de Wyrobeck e Bruce (1975). Duzentos espermatozóides por animal foram avaliados sendo registrado o percentual total de espermatozóides com defeitos de cauda e cabeça.

FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MORFOLOGIA NORMAL DE UM ESPERMATOZÓIDE DE CAMUNDONGO



FONTE: Internet – busca por imagens (www.google.com) Acesso: janeiro, 2007
(Adaptado)

3.8.3 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA

Foi coletado aproximadamente 1,5 mL de sangue (através de punção cardíaca) em animais previamente anestesiados com éter e, imediatamente, transferidos para tubos contendo 20 µl de heparina 5.000 UI/mL. Após a coleta, os tubos foram centrifugados por 15 minutos para a obtenção do plasma. O plasma foi separado e armazenado a - 20 °C até o dia da análise, quando foi descongelado e homogeneizado em Vortex™ para, então, iniciar o processo de dosagem hormonal. Os níveis plasmáticos de testosterona foram medidos por enzima imunoensaio (EIA – *Enzyme Immunoassay*) (American Research Products, Inc.™).

O princípio deste ensaio está baseado na competição entre a testosterona da amostra e a testosterona conjugada utilizada como reagente para uma quantidade constante de anticorpo antitestosterona. Foram adicionados 25 µl da amostra, padrão ou controle nos poços previamente sensibilizados com o anticorpo antitestosterona. Em seguida, foram adicionados 100 µl de testosterona conjugada utilizando-se uma pipeta multicanal e a placa homogeneizada delicadamente por 10 segundos. A seguir, os poços foram cobertos com uma fita adesiva e a placa incubada por 60 minutos a 37 °C em estufa. O conteúdo foi desprezado e os poços lavados três vezes com 300 µl de tampão de lavagem diluído (presente no *kit*) e, então, a placa foi seca através de batidas leves contra um papel absorvente em uma superfície fixa. Assim, quanto maior a concentração de testosterona na amostra, menor será a quantidade de testosterona conjugada que permanece nos poços. A testosterona reagente é conjugada com a enzima peroxidase. Após a lavagem, foram adicionados 150 µl da solução reagente TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina), a placa homogeneizada e incubada por 15 minutos em estufa a 37 °C, ao abrigo da luz. TMB, sob ação da peroxidase, produz coloração azul, em intensidade proporcional à quantidade de enzima presente e, portanto, inversamente proporcional à quantidade de testosterona da amostra (não conjugada). A concentração de testosterona na amostra foi determinada através de uma curva de calibração obtida pelo processamento de padrões com concentrações conhecidas de testosterona (presente no *kit*).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através da análise de variância de uma via (ANOVA) ou pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, quando os dados não se ajustavam a uma curva normal. A existência de diferença significativa entre dois grupos foi estabelecida pelo teste t de Student para amostras independentes, *i.e.* não pareadas ou, no caso de análise não-paramétrica, pelo teste U de Mann Whitney. As comparações envolvendo proporções e percentagens foram feitas pelo teste do Qui-quadrado ou Fisher. Em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do *software* MINITAB 10.5 (Minitab Statistical SoftwareTM, Minitab INC., PA, USA, 1995).

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DA GRAVIDEZ E DO DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE

Nenhuma morte foi provocada e nenhum outro sinal de toxicidade materna foi aparente nas fêmeas tratadas por via oral com DEHA (200, 400 e 800 mg/kg de peso corpóreo/dia) do 6º dia de gestação até o final da lactação (tabela 1). Não houve diferença, estatisticamente significativa, no ganho de peso ao longo da gestação e da lactação, entre as fêmeas tratadas com DEHA e as fêmeas do grupo controle (figuras 11 e 12). A proporção de fêmeas grávidas/acasaladas e a duração da gravidez também não foram afetadas em nenhuma das doses estudadas (tabela 1).

As progenitoras expostas à dose de 800 mg de DEHA/kg *p.c./dia* apresentaram uma ligeira redução da proporção de nascidos vivos/implantações (84,4%) quando comparadas ao grupo controle (90,2%), conforme demonstrado na tabela 1. Apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa, pode-se dizer que ela ocorreu em função do maior número de implantações uterinas observadas no grupo de 800 mg DEHA/kg, já que não observamos diferença entre os grupos experimentais em relação ao tamanho médio da ninhada ao nascimento.

Com exceção do aumento do peso absoluto e relativo do timo e da diminuição do peso absoluto e relativo do baço das fêmeas expostas à maior dose de DEHA (tabela 2), nenhuma outra anormalidade relacionada ao tratamento foi observada nas progenitoras durante a autópsia.

Embora não se tenha observado alteração do número médio de filhotes ao nascimento, houve uma drástica redução no tamanho médio da ninhada ao desmame, a partir da dose de 400 mg DEHA/kg *p.c./dia*, indicando uma maior vulnerabilidade da prole aos efeitos tóxicos do DEHA durante a lactação do que durante a gestação. As progenitoras expostas a 800 mg de DEHA/kg apresentaram índices de viabilidade e desmame para suas proles (45,5% e 45,1%, respectivamente) significativamente menores que os observados para o grupo controle (93,7% e 91,4%, respectivamente).

Além da acentuada mortalidade observada durante a lactação, vale ressaltar a toxicidade peri-natal induzida pelo DEHA (tabela 1). Na dose de 800 mg DEHA/kg, observamos a existência de natimortos e o índice de nascimento (95,3%) foi ligeiramente menor do que no grupo controle (100%). Apesar de não terem ocorrido nascimentos prematuros em nenhuma das doses estudadas, uma ninhada do grupo de 400 mg DEHA/kg *p.c./dia* e cinco ninhadas do grupo 800 mg DEHA/kg *p.c./dia* foram totalmente canibalizadas pelas mães logo após o nascimento.

Os efeitos do DEHA sobre o desenvolvimento geral dos descendentes expostos *in utero* e na lactação estão ilustrados na figura 13 e nas tabelas 3 e 4. A exposição ao DEHA na dose de 800 mg/kg *p.c./dia* causou uma redução do ganho de peso corporal médio dos filhotes durante a gestação (dia 1PN) e durante os primeiros dias do desenvolvimento pós-natal (dia 5PN). No entanto, após esse período, observou-se plena recuperação no ganho peso corpóreo da prole exposta ao DEHA (figura 13).

A tabela 3 mostra a idade do surgimento das características de desenvolvimento geral e sexual das progênes expostas ao DEHA *in utero* e na lactação. Pode-se dizer que dentre os parâmetros investigados (descolamento das orelhas, aparecimento de pêlos, abertura de olhos, erupção de incisivos, descida de testículos e abertura da vagina), observou-se um ligeiro atraso no aparecimento de pêlos. Este atraso foi detectado em todos os níveis de dose estudados e pode estar relacionado ao retardo do crescimento pós-natal, observado através da análise do ganho de peso da prole ao nascimento e durante os primeiros cinco dias de vida. Houve também um ligeiro atraso na abertura de olhos dos animais do grupo de dose de 800 mg/kg *p.c./dia*, quando comparado aos animais do grupo controle.

A tabela 4 mostra os pesos corporais e pesos do fígado, rins, baço e timo de descendentes expostos *in utero* e durante a lactação ao DEHA. Esses pesos foram avaliados em descendentes machos em dois diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal, *i.e.* na puberdade (dia 35 PN) e na idade adulta (dia 55 PN). Pode-se observar que, na puberdade, o peso da prole foi maior nos grupos experimentais de 400 e 800 mg DEHA/kg. Por essa razão, a fim de avaliar

até que ponto um aumento no peso absoluto dos órgãos seria apenas um reflexo do peso corpóreo total aumentado nesses níveis de dose, optamos por apresentar os pesos dos órgãos avaliados tanto em termos absolutos (g) como relativos (peso relativo = peso do órgão/peso corpóreo x100).

Pode-se observar que houve aumento significativo no peso absoluto do fígado a partir da dose de 400 mg de DEHA/kg e no peso absoluto dos rins direito e esquerdo na dose de 800 mg de DEHA/kg, durante autópsia na puberdade. Já durante autópsia na fase adulta foi notada diminuição no peso absoluto do fígado e do baço na maior dose testada.

TABELA 1 – DADOS DA GRAVIDEZ E DE DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE.

VARIÁVEIS	DEHA (mg/kg p.c./dia)			
	VEÍCULO	200	400	800
Proporção de grávidas/acasaladas ψ	21/23	21/23	21/24	21/22
Mortalidade materna	0	0	0	0
Nascimento prematuro	0	0	0	0
Mortalidade peri-natal (mortalidade de toda ninhada) \blackspade	0	0	1	5*
Duração da gravidez (dias)	19,0 \pm 0,0	19,10 \pm 0,30	19,04 \pm 0,2	19,0 \pm 0,0
Número médio de implantações por ninhada	11,7 \pm 1,7	11,1 \pm 2,6	11,0 \pm 2,5	12,7 \pm 1,3
Tamanho médio da ninhada ao nascimento	10,6 \pm 2,0	10,1 \pm 2,6	10,3 \pm 2,6	10,6 \pm 1,8
Nascidos vivos/implantações (%)	90,2	91,4	93,0	84,4
Tamanho médio da ninhada ao desmame	9,7 \pm 1,9	9,1 \pm 2,2	7,5 \pm 2,9*	4,8 \pm 3,6*
Peso médio corpóreo dos filhotes ao nascimento (g)	1,71 \pm 0,15	1,72 \pm 0,15	1,69 \pm 0,11	1,60 \pm 0,13*
Proporção de natimortos/nascidos	0/222	2/215	1/223	11/233*
Índice de nascimento (%)	100,0	99,1	99,6	95,3
Índice de viabilidade (%)	93,7	91,5	74,8	45,5*
Índice de desmame (%)	91,4	90,1	73,5	45,1*

NOTAS: Os resultados são expressos como número absoluto, média \pm desvio padrão ou como percentual quando indicado (%). Os valores foram analisados por análise de variância de um critério (one-way) seguido pelo teste *t* de Student. As proporções foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado ou Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. (* \neq controle).

\blackspade Todas as mortes ocorreram no período peri-natal (dia 1 PN).

ψ Fêmeas grávidas (Salewisk Positivo).

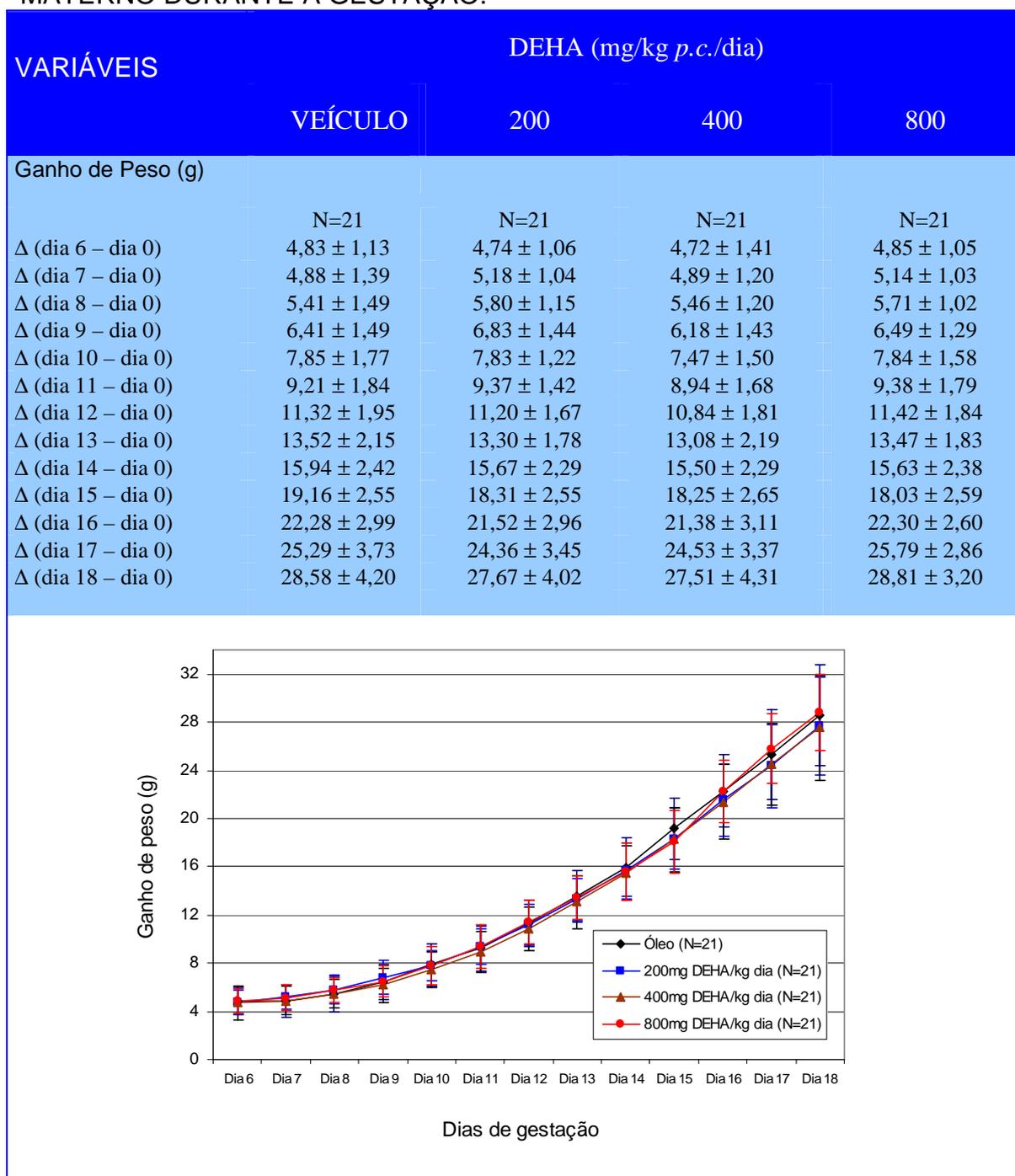
Nascimento prematuro (Grávidas que deram à luz antes do dia 18 de gestação).

Índice de nascimento (%) = n° de filhotes nascidos vivos (x100)/ n° de filhotes nascidos.

Índice de viabilidade (%) = n° de filhotes vivos no 6 PN (x100)/ n° de filhotes nascidos vivos.

Índice de desmame (%) = n° de filhotes vivos no desmame (x100)/ n° de filhotes nascidos vivos.

FIGURA 11 – EFEITO DO DEHA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL MATERNO DURANTE A GESTAÇÃO.



NOTAS: Os dados são mostrados como média ± desvio padrão do ganho de peso materno (em gramas) em relação ao primeiro dia de gestação. Os valores foram analisados por Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. Os resultados não diferiram entre os grupos experimentais.

FIGURA 12 – EFEITO DO DEHA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL MATERNO DURANTE A LACTAÇÃO.

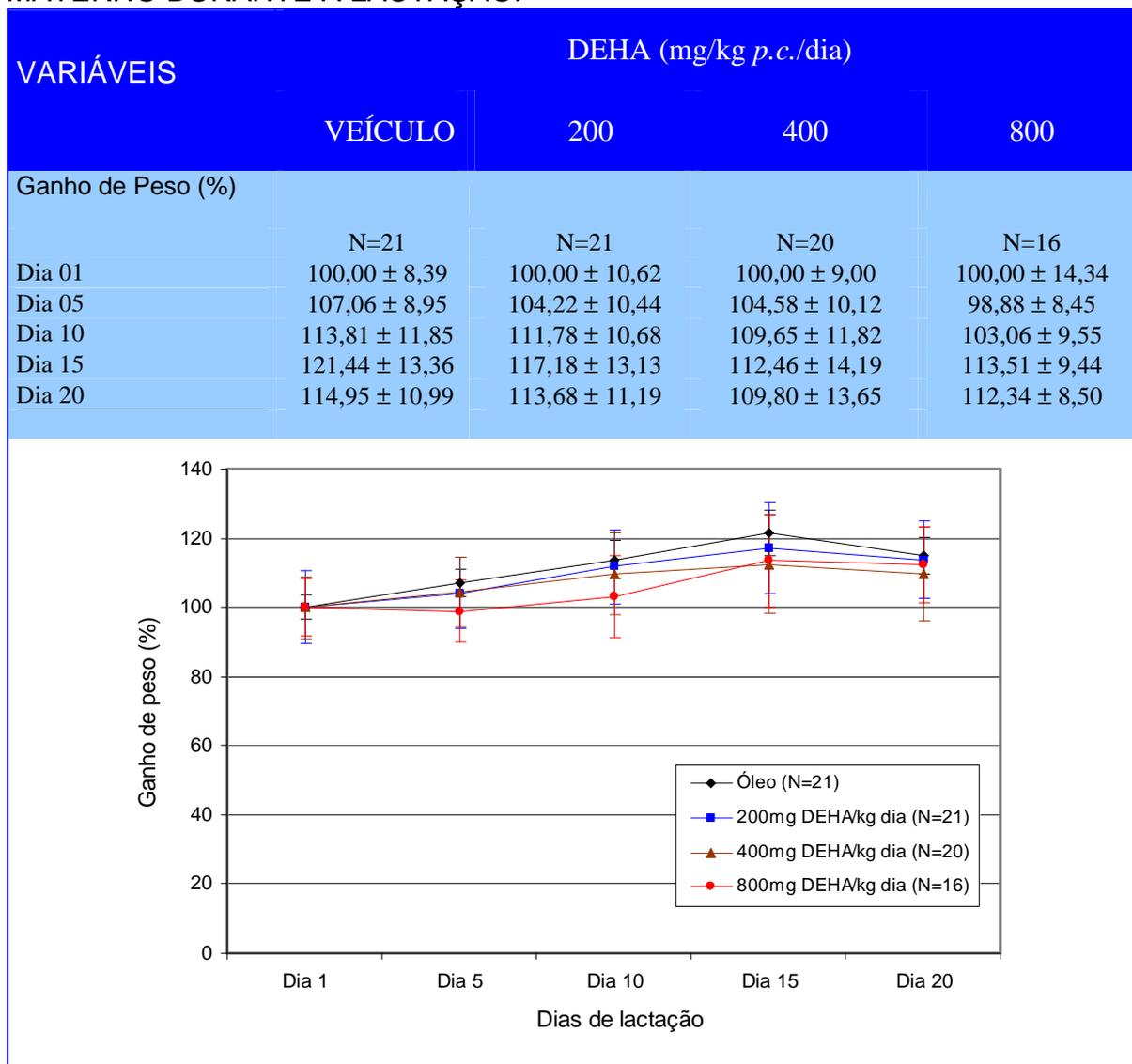
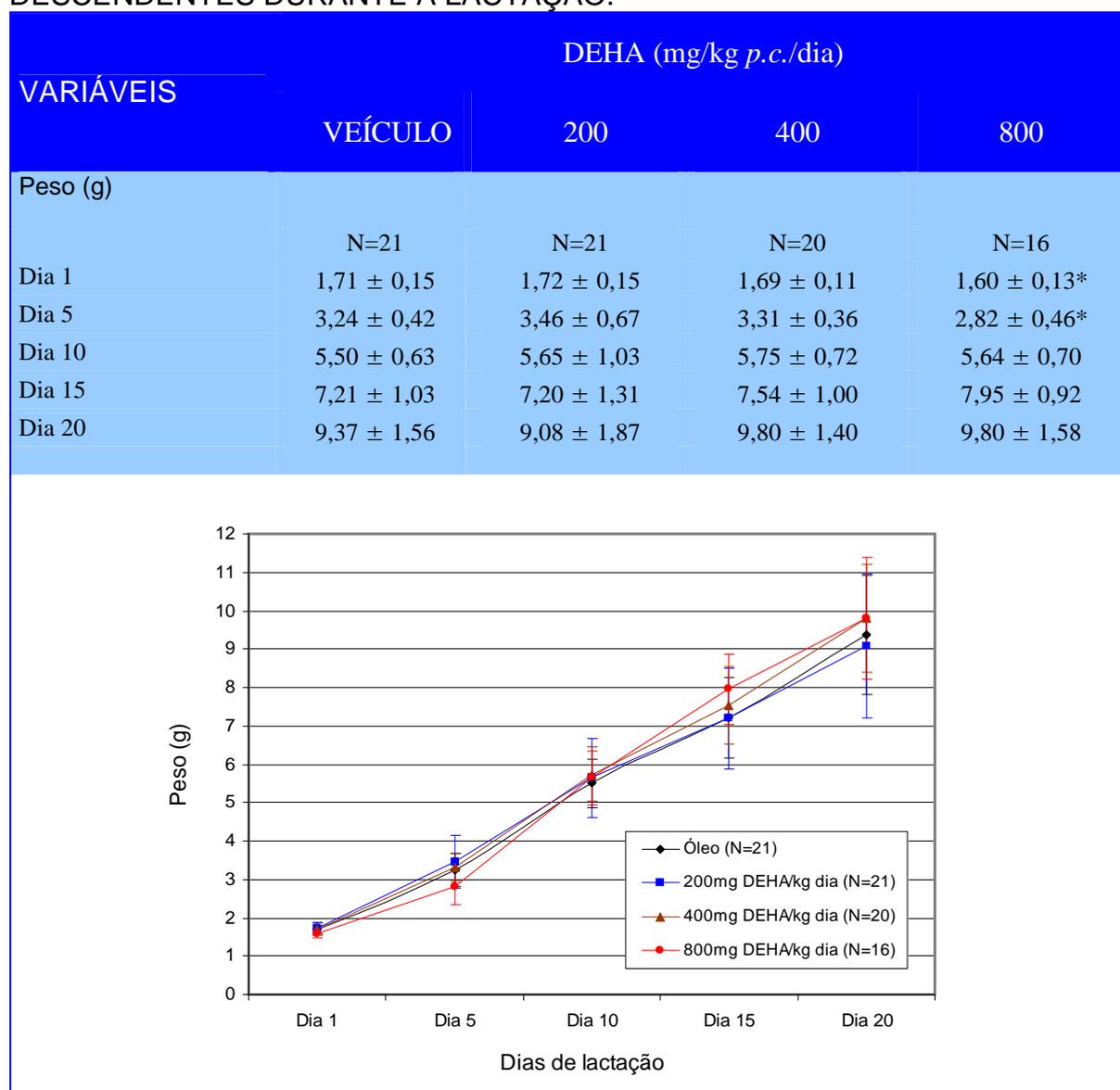


TABELA 2 – PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DOS ÓRGÃOS DAS PROGENITORAS.

VARIÁVEIS	DEHA (mg/kg p.c./dia)			
	VEÍCULO	200	400	800
Progenitoras (n ^o)	21	21	21	21
Peso corporal (g)	45,77 ± 4,90	45,18 ± 4,21	45,27 ± 5,95	46,11 ± 3,99
PESO ABSOLUTO				
Fígado (g)	3,35 ± 0,42	3,44 ± 0,60	3,41 ± 0,62	3,32 ± 0,38
Baço (g)	0,24 ± 0,05	0,25 ± 0,07	0,24 ± 0,05	0,21 ± 0,04*
Timo (g)	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,03*
Ovários (g)	0,03 ± 0,006	0,03 ± 0,008	0,02 ± 0,007	0,02 ± 0,007
Útero (g)	0,15 ± 0,06	0,13 ± 0,06	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,07
PESO RELATIVO				
Fígado (%)	7,33 ± 0,51	7,58 ± 0,87	7,49 ± 0,62	7,20 ± 0,59
Baço (%)	0,53 ± 0,11	0,54 ± 0,13	0,52 ± 0,07	0,45 ± 0,09*
Timo (%)	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,06	0,13 ± 0,05	0,19 ± 0,07*
Ovários (%)	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Útero (%)	0,33 ± 0,15	0,29 ± 0,15	0,32 ± 0,12	0,34 ± 0,15

NOTAS: Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. O pesos absolutos (g) foram analisados por análise de variância de um critério (one-way) seguido pelo teste *t* de Student. Os pesos relativos (%) foram analisados por Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$ (* ≠ controle). As progenitoras foram sacrificadas ao desmame dos filhotes (dia 21 PN).

FIGURA 13 – EFEITO DO DEHA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL DOS DESCENDENTES DURANTE A LACTAÇÃO.



NOTAS: Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão do peso (em gramas) dos descendentes. As ninhadas foram utilizadas como unidade estatística. Logo após o nascimento, uma ninhada do grupo 400 mg DEHA/kg e cinco ninhadas do grupo 800 mg DEHA/kg foram totalmente canibalizadas pelas mães. Os valores foram analisados por análise de variância de um critério (one-way) seguido pelo teste *t* de Student. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

*: O DEHA na dose de 800 mg/kg alterou o peso corporal médio da prole ao nascimento e no dia 5 PN.

TABELA 3 – EFEITO DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E DURANTE A LACTAÇÃO AO DEHA SOBRE PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DE FÊMEAS E MACHOS

VARIÁVEIS	DEHA (mg/kg <i>p.c./dia</i>)			
	VEÍCULO	200	400	800
Total de ninhadas	21	21	20	16
Dia do descolamento da orelha	5 (5-6)	5,5 (5-6)	6 (5-6)	5,5 (5-6)
Dia do aparecimento de pêlos	5 (5-6)	6 (5-6)*	6 (5-6)*	6 (5-6)*
Dia da erupção dos incisivos	10 (9-11)	10 (10-11)	10 (10-11)	10 (9-11)
Dia da abertura dos olhos	16 (15-17)	16 (15-17)	16 (15-17)	16 (16-17)*
Dia da descida do testículo	22 (20-23)	22 (20-25)	22 (20-24)	21 (20-25)
Dia da abertura da vagina	28 (25-30)	27 (24-30)	27 (24-31)	28 (24-29)

NOTAS: Os dados são mostrados como mediana (mínimo - máximo) e foram analisados por Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. (* \neq controle).

TABELA 4 – PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DE ÓRGÃOS DE DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO – AVALIADOS NA PUBERDADE E NA IDADE ADULTA.

VARIÁVEIS	DEHA (mg/kg <i>p.c./dia</i>)			
	VEÍCULO	200	400	800
ANIMAIS NA PUBERDADE				
Número de descendentes	45	41	41	23
Peso corporal (g)	25,46 ± 5,00	25,72 ± 3,29	27,52 ± 3,70*	30,06 ± 5,15*
PESO ABSOLUTO				
Fígado (g)	1,67 ± 0,36	1,74 ± 0,32	1,86 ± 0,43*	1,93 ± 0,44*
Rim direito (g)	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,04*
Rim esquerdo (g)	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,04*
Baço (g)	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,03
Timo (g)	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03
PESO RELATIVO				
Fígado (%)	6,64 ± 1,23	6,75 ± 0,83	6,70 ± 0,93	6,38 ± 0,57
Rim direito (%)	0,66 ± 0,09	0,67 ± 0,10	0,66 ± 0,08	0,64 ± 0,06
Rim esquerdo (%)	0,65 ± 0,08	0,67 ± 0,09	0,66 ± 0,09	0,64 ± 0,05
Baço (%)	0,66 ± 0,15	0,68 ± 0,10	0,63 ± 0,13	0,60 ± 0,07
Timo (%)	0,44 ± 0,08	0,42 ± 0,09	0,40 ± 0,09	0,42 ± 0,11
ANIMAIS NA IDADE ADULTA				
Número de descendentes	38	35	38	25
Peso corporal (g)	41,55 ± 3,37	40,34 ± 3,70	41,74 ± 2,98	38,27 ± 4,83
PESO ABSOLUTO				
Fígado (g)	2,50 ± 0,28	2,50 ± 0,30	2,54 ± 0,26	2,27 ± 0,33*
Rim direito (g)	0,27 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,03
Rim esquerdo (g)	0,27 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,03
Baço (g)	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,15 ± 0,03*
Timo (g)	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03
PESO RELATIVO				
Fígado (%)	6,00 ± 0,40	6,20 ± 0,43	6,10 ± 0,51	5,93 ± 0,44
Rim direito (%)	0,66 ± 0,07	0,65 ± 0,07	0,62 ± 0,05	0,66 ± 0,08
Rim esquerdo (%)	0,64 ± 0,07	0,63 ± 0,05	0,62 ± 0,06	0,63 ± 0,08
Baço (%)	0,40 ± 0,09	0,44 ± 0,10	0,41 ± 0,10	0,39 ± 0,09
Timo (%)	0,25 ± 0,08	0,27 ± 0,08	0,28 ± 0,06	0,29 ± 0,08

NOTAS: Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. O pesos absolutos (g) foram analisados por análise de variância de um critério (one-way) seguido pelo teste *t* de Student. Os pesos relativos (%) foram analisados por Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$ (* ≠ controle). Os animais púberes foram avaliados com 35 dias PN e adultos com 55 dias PN.

4.2 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MACHOS

4.2.1 Peso absoluto e relativo de órgãos sexuais (puberdade e idade adulta)

Os resultados da avaliação dos pesos dos órgãos reprodutivos são apresentados na tabela 5. A autópsia na puberdade revelou uma diminuição significativa no peso relativo de ambos os testículos na maior dose testada de DEHA. A autópsia na idade adulta revelou uma redução significativa no peso absoluto e relativo da vesícula seminal a partir da dose de 400 mg de DEHA.

4.2.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático (idade adulta).

Os resultados da produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático são apresentados na tabela 5. A produção diária de espermatozóides não foi significativamente alterada em nenhum dos grupos tratados. Entretanto, a concentração média de espermatozóides na cauda do epidídimo foi significativamente reduzida a partir da dose de 400 mg de DEHA/kg *p.c./dia*, quando comparado aos animais controle. Já o tempo de trânsito espermático foi significativamente menor a partir da dose de 200 mg de DEHA/kg *p.c./dia*.

4.2.3 Morfologia espermática (idade adulta)

O percentual total de espermatozóides anormais (defeitos de cabeça e cauda) nos animais adultos expostos *in utero* e na lactação ao DEHA não diferiu significativamente do percentual observado nos animais do grupo controle (tabela 5).

4.2.4 Níveis de testosterona (idade adulta)

A exposição *in utero* e na lactação ao DEHA não alterou significativamente os níveis plasmáticos de testosterona nos animais adultos, quando comparado ao grupo controle (tabela 5).

TABELA 5 – VARIÁVEIS REPRODUTIVAS DE DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO – AVALIADOS NA PUBERDADE E NA IDADE ADULTA.

VARIÁVEIS	DEHA (mg/kg <i>p.c./dia</i>)			
	VEÍCULO	200	400	800
ANIMAIS NA PUBERDADE				
Número de descendentes	45	41	41	23
Peso corporal (g)	25,46 ± 5,00	25,72 ± 3,29	27,52 ± 3,70*	30,06 ± 5,15*
PESO ABSOLUTO				
Testículo direito (g)	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Testículo esquerdo (g)	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Epidídimos (g)	0,03 ± 0,008	0,03 ± 0,007	0,03 ± 0,008	0,03 ± 0,008
Vesícula seminal (g)	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02
PESO RELATIVO				
Testículo direito (%)	0,30 ± 0,06	0,32 ± 0,05	0,31 ± 0,04	0,26 ± 0,04*
Testículo esquerdo (%)	0,30 ± 0,06	0,30 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,25 ± 0,04*
Epidídimos (%)	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Vesícula seminal (%)	0,17 ± 0,07	0,19 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,05
ANIMAIS NA IDADE ADULTA				
Número de descendentes	11	12	12	12
Peso corporal (g)	47,99 ± 2,89	50,63 ± 5,00	54,31 ± 6,84	49,76 ± 5,03
PESO ABSOLUTO				
Testículo direito (g)	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,01
Testículo esquerdo (g)	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01
Epidídimos (g)	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Vesícula seminal (g)	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02*	0,13 ± 0,02*
PESO RELATIVO				
Testículo direito (%)	0,29 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,27 ± 0,04
Testículo esquerdo (%)	0,27 ± 0,06	0,28 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,27 ± 0,04
Epidídimos (%)	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,02
Vesícula seminal (%)	0,35 ± 0,05	0,33 ± 0,06	0,31 ± 0,04*	0,26 ± 0,04*
Produção espermática diária				
Por animal (X10 ⁶)	6,53 ± 1,52	7,07 ± 0,96	5,95 ± 1,06	6,07 ± 0,79
Por g de testículo (X10 ⁶)	24,32 ± 3,72	24,69 ± 2,40	23,02 ± 3,18	22,74 ± 3,25
Nº de espermatozóides				
Por animal (X10 ⁶)	4,95 ± 1,29	4,61 ± 1,13	3,61 ± 1,40*	3,64 ± 0,91*
Por g de epidídimo (X10 ⁶)	59,74 ± 13,44	51,96 ± 10,86	43,66 ± 13,95*	47,43 ± 9,40*
Tempo de trânsito espermático (dias)	0,76 ± 0,11	0,64 ± 0,12*	0,59 ± 0,19*	0,60 ± 0,16*
Testosterona plasmática (ng/mL)	4,13 ± 3,00	4,13 ± 2,80	3,19 ± 2,77	5,20 ± 3,19
Espermatozóides anormais (%)	0,9	1,0	1,0	1,0

NOTAS: Os resultados são expressos como n^o absoluto, média ± desvio padrão ou como percentual quando indicado. Os valores absolutos foram analisados por análise de variância de um critério (one-way) seguido pelo teste *t* de Student. Os valores relativos (%) foram analisados por Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. (* ≠ controle). Os animais púberes foram avaliados com 35 dias PN e adultos com 90 dias PN. O peso da vesícula seminal foi reportada sem fluido.

4.3 TESTES DE FERTILIDADE

O DEHA não provocou nenhum efeito adverso nos índices de fertilidade em camundongos de ambos os sexos, expostos *in utero* e na lactação, aos níveis de dose estudados (tabelas 6 e 7). Os índices de acasalamento e gravidez variaram de 83 a 100% e de 90 a 100%, respectivamente, quando machos expostos foram submetidos ao convívio com fêmeas não expostas. Inversamente, quando o mesmo teste foi realizado com fêmeas expostas submetidas ao convívio com machos não expostos, os índices de acasalamento e gravidez variaram de 92 a 100% e de 82 a 92%, respectivamente. Também não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nas outras variáveis reprodutivas avaliadas para as fêmeas acasaladas e suas progênes, indicando ausência de efeitos da exposição materna ou paterna ao DEHA sobre a fertilidade.

TABELA 6 – AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE DESCENDENTES MACHOS EXPOSTOS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO AO DEHA.

VARIÁVEIS	DEHA (mg/kg <i>p.c./dia</i>)			
	VEÍCULO	200	400	800
Fêmeas não expostas acasaladas (n°)	12	12	12	12
Machos expostos acasalados (n°)	12	12	12	12
Fêmeas esperma-positivas (n°)	12	12	10	10
Índice de acasalamento (%)	100	100	83	83
Fêmeas grávidas (n°)	11	11	9	10
Índice de gravidez (%)	92	92	90	100
Peso absoluto do útero gravídico (g)	18,13 ± 2,13	17,37 ± 3,50	18,97 ± 2,63	16,88 ± 2,19
Peso relativo do útero gravídico (%)	27,69 ± 2,25	27,25 ± 4,14	28,98 ± 2,96	26,70 ± 2,65
Ganho de peso materno (g) Δ (dia 0 - 17)	25,10 ± 4,13	25,36 ± 3,69	26,13 ± 3,77	25,77 ± 3,80
Ninhadas (n°)	11	11	9	10
Número de implantações	14,09 ± 1,64	13,91 ± 1,64	14,33 ± 1,58	13,20 ± 1,81
Reabsorções (n°)	8	13	6	13
Reabsorções/implantações (%)	5,1	8,5	4,7	9,8
Fetos mortos (n°)	1	0	0	2
Fetos vivos (n°)	147	140	123	118
Fetos vivos/implantações (%)	94,8	91,5	95,3	89,4
Fetos vivos por ninhada	13,4 ± 1,6	12,7 ± 2,3	13,7 ± 1,7	11,8 ± 1,5
Peso corpóreo fetal (g)	0,89 ± 0,07	0,90 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,94 ± 0,07

NOTAS: Os resultados são expressos como número absoluto, média ± desvio padrão ou como percentual quando indicado (%). Os valores absolutos foram analisados por análise de variância de um critério (one-way) seguido pelo teste *t* de Student. Os valores relativos (%) foram analisados por Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney. As proporções foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$ (* ≠ controle).

Índice de cruzamento (%) = n° de machos que copularam/ n° total de machos acasalados x 100.

Índice de gravidez (%) = n° de machos que tornaram fêmeas grávidas/ n° de machos que copularam x 100.

Fêmeas grávidas (Salewisk Positivo).

TABELA 7 – AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE DESCENDENTES FÊMEAS EXPOSTAS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO AO DEHA.

VARIÁVEIS	DEHA (mg/kg <i>p.c./dia</i>)			
	VEÍCULO	200	400	800
Fêmeas expostas acasaladas (n°)	12	12	12	12
Machos não expostos acasalados (n°)	12	12	12	12
Fêmeas esperma-positivas (n°)	12	11	11	12
Índice de acasalamento (%)	100	92	92	100
Fêmeas grávidas (n°)	11	9	9	10
Índice de gravidez (%)	92	82	82	83
Peso absoluto do útero gravídico (g)	17,5 ± 5,6	17,1 ± 4,8	17,9 ± 3,0	16,9 ± 2,8
Peso relativo do útero gravídico (%)	26,60 ± 6,85	26,00 ± 6,54	27,39 ± 3,28	28,20 ± 3,78
Ganho de peso materno (g) Δ (dia 0 - 17)	25,98 ± 3,88	26,13 ± 4,22	25,86 ± 3,57	26,03 ± 3,48
Ninhadas (n°)	11	9	9	10
Número de implantações	12,91 ± 3,53	12,00 ± 4,16	13,67 ± 1,32	12,40 ± 1,58
Reabsorções (n°)	11	6	9	6
Reabsorções/implantações (%)	7,7	5,0	7,3	4,8
Fetos mortos (n°)	3	0	2	1
Fetos vivos (n°)	129	109	112	117
Fetos vivos/implantações (%)	90,8	90,8	91,1	94,4
Fetos vivos por ninhada	11,7 ± 4,1	12,1 ± 3,4	12,4 ± 2,1	11,7 ± 2,1
Peso corpóreo fetal (g)	0,99 ± 0,09	0,92 ± 0,08	0,94 ± 0,08	0,93 ± 0,07

NOTAS: Os resultados são expressos como número absoluto, média ± desvio padrão ou como percentual quando indicado (%). Os valores absolutos foram analisados por análise de variância de um critério (one-way) seguido pelo teste *t* de Student. Os valores relativos (%) foram analisados por Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney. As proporções foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$ (* ≠ controle).

Índice de cruzamento (%) = n° de machos que copularam/ n° total de machos acasalados x 100.

Índice de gravidez (%) = n° de machos que tornaram fêmeas grávidas/ n° de machos que copularam x 100.

Fêmeas grávidas (Salewisk Positivo).

5 DISCUSSÃO

5.1 TOXICIDADE MATERNA E EFEITOS PRÉ-NATAIS

As investigações científicas sobre a origem de malformações congênitas em mamíferos, assim como os ensaios preditivos relacionados à Toxicologia do Desenvolvimento, são relativamente recentes. Vários fatores contribuíram para o atraso desta área da Toxicologia, sendo que um deles está relacionado à idéia preconcebida de que o desenvolvimento embrionário de mamíferos, por ocorrer no interior do útero materno, estaria protegido dos efeitos adversos de agentes ambientais. Acreditava-se que as conseqüências da exposição materna aos agentes ambientais poderiam ser, unicamente, do tipo “*tudo-ou-nada*”, ou seja, ou o agravo seria severo o suficiente para causar a morte do embrião e a interrupção da gravidez, ou então não causaria mal algum ao concepto (MANSON, 1986). Somente a partir da década de 1930, começaram a surgir as primeiras constatações experimentais de que a proteção materna não era tão eficiente quanto se julgava e que fatores externos (ambientais) poderiam causar anomalias em embriões de mamíferos (PERSAUD, 1979).

Hoje se sabe, que determinados agentes químicos – além de poderem atingir diretamente o desenvolvimento pré-natal – podem causar seqüelas que só serão detectadas na vida adulta. Assim, enquanto muitas anomalias congênitas são diagnosticadas já ao nascimento ou até antes deste (e.g. por ultra-sonografia ou por amniocentese e exame do cariótipo), outras só são detectadas bem mais tarde ou até mesmo décadas depois, como é o caso da carcinogênese transplacentária (e.g. adenocarcinoma de vagina que resulta da exposição *in utero* ao dietilestilbestrol e se manifesta em mulheres adultas jovens).

Para avaliar o efeito tóxico de um determinado agente químico durante a gestação é preciso levar em consideração que sua toxicocinética pode ser modificada por essa condição fisiológica que envolve não somente o organismo materno, mas sim, uma nova unidade denominada unidade “*materno-placentária-feta*” (LEMONICA, 2003). Vários estudos mostram que a manutenção da homeostasia, *i.e.* da constância do meio interno, é essencial ao desenvolvimento embriofetal normal. Assim sendo, o aparecimento do efeito embriofetotóxico induzido por uma determinada substância química pode resultar da interação

desta substância com outros fatores que incidem sobre o organismo materno, como e.g. o estado nutricional, idade materna, estresse e outros fatores ambientais (CHAHOU *et al.*, 2002; KURIYAMA *et al.*, 2000; NODA *et al.*, 2001; CHERNOFF *et al.*, 1988; CHERNOFF *et al.*, 1989).

Há diversos exemplos de que a manutenção da homeostasia materna é essencial para o adequado desenvolvimento embriofetal. Como demonstrado por Chernoff *et al.*, 1988, o estresse experimentado pela mãe durante a gestação pode afetar adversamente o desenvolvimento pré- e/ou pós-natal, além de ser capaz de potencializar o efeito teratogênico de alguns xenobióticos. Algumas doenças maternas, tais como o diabetes melito (BRYDON *et al.*, 2000) e estados como a hipertermia (EDWARDS *et al.*, 1995) podem igualmente comprometer os processos normais de embriogênese.

Assim como nos distúrbios descritos acima, a ação de xenobióticos sobre o organismo materno pode alterar o desenvolvimento normal da prole. No entanto, nem sempre a toxicidade materna está associada à indução de anormalidades do desenvolvimento embriofetal. O estireno, por exemplo, mesmo em níveis de dose altamente tóxicos para a mãe não causa alterações embriofetais, provavelmente porque seus mecanismos tóxicos não envolvem a indução de danos teciduais (MURRAY *et al.*, 1978).

A interpretação de efeitos adversos sobre o desenvolvimento da prole, em níveis de dose tóxicos para o organismo materno, ainda é difícil porque é praticamente impossível distinguir os efeitos embriofetotóxicos diretos decorrentes da exposição transplacentária a um dado agente (através da interação direta da substância com o embrião/feto), daqueles induzidos indiretamente, em consequência de alteração da fisiologia materna (KHERA, 1984 e 1985; CHERNOFF *et al.* 1988, 1989; EPA, 1996; CHAHOU *et al.*, 1999). Nos estudos de toxicidade pré-natal, a toxicidade materna é, via de regra, confirmada por avaliações que podem incluir:

1. Redução do ganho de peso corpóreo;
2. Ocorrência de óbitos maternos durante o período de tratamento;
3. Redução do consumo de água e/ou ração;
4. Aparecimento de sinais clínicos, e;
5. Alterações no peso e/ou morfologia dos órgãos.

Como um agente químico pode interferir no desenvolvimento dos descendentes por afetar diretamente os filhotes, ou indiretamente, ao comprometer a capacidade da progenitora em sustentar a prole, tais informações são importantes e devem ser levadas em consideração na interpretação dos efeitos tóxicos de uma substância.

Nas condições experimentais do presente estudo, a administração de DEHA por via oral não provocou mortes ou qualquer outro sinal de toxicidade aparente nas progenitoras, indicando ausência de toxicidade materna nos níveis de doses estudados. As duas únicas alterações observadas no organismo materno dizem respeito aos pesos de órgãos imuno-relacionados, *i.e.* o aumento do peso absoluto e relativo do timo e a diminuição do peso do baço, tanto em termos de peso absoluto quanto relativo. Este efeito não havia sido previamente descrito por nenhum dos autores que investigaram os efeitos de plastificantes durante a gestação de ratos.

Apesar de não causar toxicidade materna aparente, o DEHA induziu mortalidade da prole e retardo do crescimento pré- e pós-natal, como será discutido a seguir.

5.2 DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE

O DEHA induziu mortes de algumas ninhadas ao nascimento, observadas a partir da dose de 400 mg/kg e também um aumento significativo na proporção de natimortos/nascidos, no maior nível de dose avaliado.

Além disso, no estudo atual, observamos claramente uma diferença inter-individual quanto à suscetibilidade das fêmeas aos efeitos induzidos *in utero* pelo DEHA. Enquanto, em algumas mães, a ocorrência de perdas no período perinatal foi evidente (*i.e.* o canibalismo de toda ninhada observado em cinco mães do grupo de 800 mg/kg e uma mãe na dose de 400 mg/kg), em outras este efeito parece não ter ocorrido, uma vez que as demais mães destes grupos de dose não diferiram do grupo controle quanto ao número médio de filhotes por ninhada ao nascimento. Sendo assim, podemos dizer que, pelo menos no que diz respeito à toxicidade peri-natal, o DEHA tendeu a um efeito “tudo-ou-nada”, *i.e.* ou matou toda a ninhada ou não a afetou e assim não induziu mortes significativas intra-ninhada.

As ligeiras diferenças observadas no número médio de implantações uterinas provavelmente refletem variações fisiológicas da espécie, uma vez que não foram estatisticamente significativas entre os grupos experimentais e nem ocasionaram diferenças no tamanho médio das ninhadas ao nascimento (tabela 1). Em roedores a implantação do blastocisto no útero materno ocorre por volta do dia 6 PN, *i.e.* no momento em que teve início o tratamento das fêmeas grávidas com DEHA. Ao contrário do que se pretendia no presente estudo, naquelas situações em que se tem a intenção de avaliar efeitos sobre o processo de implantação, dá-se início ao tratamento logo após a confirmação do acasalamento. Assim, podemos dizer que dificilmente efeitos sobre o processo de implantação seriam detectáveis nas condições experimentais do presente estudo.

O fato do tamanho médio da ninhada ter diferido entre os grupos ao desmame – mas não ao nascimento – indica que a prole foi mais vulnerável aos efeitos do DEHA durante a lactação do que durante a gestação, apontando assim para a importância de estudos adicionais que avaliem aspectos toxicocinéticos do

DEHA, sobretudo no que diz respeito à eliminação desse composto via leite materno e seu acúmulo no organismo em desenvolvimento.

Em 1987, Bergman & Albanus publicaram importante artigo sobre absorção, distribuição e eliminação de DEHA em ratas e camundongas grávidas. Segundo esses autores, a passagem de DEHA e seus metabólitos via placenta é limitada nestas espécies. Essa pode ser uma possível explicação para o fato da prole - durante a gestação - ter tolerado bem os níveis de dose de DEHA aqui estudados (não observamos aumento da taxa de mortalidade pré-natal), e ter sido susceptível ao tratamento durante a lactação (marcante mortalidade durante os primeiros dias de vida pós-natal).

Este mesmo artigo (BERGAMAN & ALBANUS, 1987) descreve dados toxicocinéticos sobre a distribuição do DEHA em roedores adultos, e aponta para a acumulação deste composto no tecido adiposo (conseqüência da alta solubilidade lipídica do DEHA em sua forma não metabolizada), no fígado e nos rins, refletindo provavelmente o envolvimento desses órgãos nos processos de metabolização e eliminação (via urina) dos metabólitos do DEHA.

Diante dos dados encontrados no presente estudo e mediante a característica altamente lipofílica do DEHA, estudos adicionais sobre a passagem deste composto via leite materno e seu acúmulo no organismo em desenvolvimento seriam de grande relevância no processo de avaliação do risco deste composto. Embora não haja dados sobre o DEHA, alguns estudos descrevem os níveis de DEHP (e seus metabólitos) no leite materno de mulheres sadias (GRUBER *et al.*, 1998; BRUNS-WELLER & PFORDT, 2000; LATINI *et al.*, 2003; LUBICK, 2006; ZHU *et al.*, 2006).

Apesar dos níveis detectáveis de DEHP e seus metabólitos no leite materno flutuarem grandemente – em decorrência do consumo materno de alimentos contendo (ou não) plastificantes – ao longo dos meses avaliados (estudo longitudinal), níveis estimados de ingestão diária de lactentes foram estabelecidos por um grupo de expoentes da Comunidade Européia para a avaliação do risco, conforme descrito por Latini *et al.*, 2004. Estes dados são mostrados na tabela 8.

Tabela 8 – Níveis estimados da exposição diária de lactentes ao DEHP.

Tipos de aleitamento	Exposição ($\mu\text{g}/\text{kg p.c./dia}$)
Leite em pó (0-3 meses de idade)	13
Leite em pó (3-12 meses de idade)	8
Leite materno (0-3 meses de idade)	21
Leite materno (3-12 meses de idade)	8

Fonte: "European Union risk assessment" *apud* LATINI *et al.*, 2004.

Embora o mais alto nível de exposição estimado ao DEHP – via leite materno – seja de 21 $\mu\text{g}/\text{kg p.c./dia}$ (tabela 8), *i.e.* cerca de 10.000 vezes menor do que o menor nível de dose aqui avaliado há de se levar em consideração outras fontes de exposição a esta substância e a presença de outros plastificantes (*e.g.* DEHA) que podem igualmente induzir danos ao organismo em desenvolvimento. Além disso, este tipo de exposição é particularmente preocupante se levarmos em consideração a possibilidade de haver uma maior vulnerabilidade do organismo em desenvolvimento aos possíveis efeitos destas substâncias e outras fontes de exposição exclusivas do público infantil (LATINI *et al.*, 2004).

Apesar da proibição da adição de DEHP em artigos para bebê e brinquedos próprios para crianças com até 3 anos de idade já estar em vigor em diversos países membros da Comunidade Econômica Européia, Canadá e Estados Unidos; esta proibição ainda não foi estendida para outros tipos de brinquedos (EU 1999/815/EG, *apud* LATINI *et al.*, 2004) e nem é seguida por todos os países.

A exposição à dose de 800 mg de DEHA/kg alterou o ganho de peso corporal médio dos filhotes ao nascimento e no dia 5 PN, mostrando um claro efeito tóxico sobre o desenvolvimento da prole. Esse efeito, embora significativo nos primeiros dias de vida pós-natal, foi reversível. A partir do dia 10 PN não observamos mais alteração no ganho de peso da prole nos níveis mais altos de dose estudados. Este fato pode ser justificado pelo menor número de filhotes sobreviventes por ninhada ao longo da lactação (e conseqüentemente uma menor

competição intra-ninhada), ou ainda, devido a uma possível tolerância adquirida por parte da prole após exposição continuada ao DEHA.

É importante ressaltar que a análise do peso médio dos filhotes ao nascimento e ao longo do período de lactação pode ser realizada de duas maneiras distintas: considerando-se a ninhada (peso médio da ninhada) ou o filhote (peso médio por grupo experimental) como unidade de análise estatística. A utilização da ninhada como unidade de análise nos parece mais apropriada porque a mãe/ninhada é a unidade de tratamento, e não o filhote individualmente. Assim, o uso de cada filhote para este tipo de análise tende a inflacionar artificialmente o tamanho da amostra e por isso superestimaria o efeito observado.

Ainda em relação à ocorrência de mortes de filhotes no período pós-natal, nossos dados demonstram que essa foi mais acentuada nos primeiros dias de vida. Enquanto o índice de nascimento não diferiu entre os grupos experimentais, o índice de viabilidade (registrado no dia 6 PN) mostrou-se significativamente reduzido na dose de 800 mg de DEHA/kg (45,5%), e pouco diferiu do índice de desmame (800 mg de DEHA/kg = 45,1%), conforme dados da Tabela 1.

Além do retardo do crescimento, a exposição ao DEHA também atrasou o aparecimento de pêlos da progênie em todos os níveis de doses estudados e a abertura de olhos, na dose de 800 mg/kg *p.c./dia*, quando comparado aos animais do grupo controle. O aparecimento de pêlos coincide com o período de cinco/seis dias de vida pós-natal, quando ainda observamos acentuada redução do ganho de peso da prole. Este foi – dentre os parâmetros do desenvolvimento avaliados – o que mais foi alterado pela exposição ao DEHA.

Neste estudo, as características de desenvolvimento sexual, como *e.g.* os tempos médios (em dias) da descida dos testículos para o saco escrotal e a abertura do canal vaginal, não mostraram diferenças em decorrência da exposição ao DEHA. O aparecimento desses parâmetros foi compatível com as

respostas fisiológicas esperadas para a espécie em questão. Estas variáveis são sinais externos do desenvolvimento sexual dos animais, dependentes de uma adequada produção de hormônios sexuais. Substâncias que desestabilizem o equilíbrio hormonal podem interferir nestes processos, acelerando-os ou retardando-os. A exposição ao DEHA *in utero* e na lactação não alterou os períodos médios para a descida dos testículos (ca. dia 21-22 PN) ou abertura do canal vagina (ca. dia 27-28 PN), não interferindo - portanto - no início da puberdade nos camundongos, tanto machos quanto fêmeas.

Como observamos, nos grupos experimentais de 400 e 800 mg DEHA/kg, aumento no peso corporal médio dos descendentes avaliados na puberdade. Optamos, por apresentar os pesos dos órgãos avaliados tanto em termos absolutos (g) como relativos (% em relação ao peso corporal total).

O aumento significativo no peso absoluto do fígado (a partir da dose de 400 mg de DEHA/kg) e dos rins (no maior nível de dose) – observado nos animais avaliados na puberdade – pode ser explicado pelo maior peso corporal total destes grupos experimentais em relação aos demais, uma vez que a análise do peso relativo desses órgãos, não confirmou esse tipo de efeito. Conforme mencionado anteriormente, o maior peso corporal destes animais na puberdade pode estar associado ao menor índice de viabilidade, o que pode ter permitido aos animais viáveis, um crescimento corporal mais acelerado devido a maior facilidade de alimentação. Esse possível crescimento mais acelerado até atingir a puberdade não representou, contudo, um maior peso corporal na idade adulta. Na verdade, mesmo que não atingindo significância estatística, o peso corporal em média dos animais expostos à dose de 800 mg de DEHA/kg ($38,27 \pm 4,83$) foi menor que o peso registrado para os demais grupos experimentais (e.g. controle = $41,55 \pm 3,37$). Assim, podemos dizer que as alterações, em termos de peso absoluto observadas, para fígado e baço, nos animais adultos da dose de 800mg DEHA/kg são provavelmente reflexos do menor peso corpóreo total observado nesse nível de dose.

5.3 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DOS DESCENDENTES MACHOS

5.3.1 Peso absoluto e relativo de órgãos sexuais

Os pesos dos órgãos sexuais masculinos e glândulas acessórias, que incluem os testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata, podem ser úteis para a avaliação de possíveis efeitos sobre o sistema reprodutivo. As alterações no peso destes órgãos podem ser utilizadas como indicativos de possíveis alterações no *status* androgênico do animal ou na função testicular (GERARDIN & PEREIRA, 2002).

O peso dos testículos apresenta pouca variação entre animais de uma mesma espécie, sendo, portanto, um marcador sensível de injúria gonadal (EPA, 1996). Nossos dados mostram que a exposição *in utero* e durante a lactação à dose de 800 mg de DEHA/kg causou redução do peso relativo dos testículos, durante autópsia na puberdade. No entanto, é importante ressaltar alguns estudos mais gerais sobre a toxicidade do desenvolvimento, que demonstram que em mamíferos o peso dos testículos e o peso corporal são variáveis independentes (AMANN, 1982). Assim, segundo alguns autores, na avaliação da toxicidade testicular, deve-se ser utilizar preferencialmente o peso absoluto desse órgão. Levando em consideração o peso dos testículos – em termos absolutos – não observamos efeito aparente do DEHA.

Durante autópsia na idade adulta, observamos redução do peso da vesícula seminal a partir da dose de 400 mg de DEHA/kg. Este efeito mostrou-se dose-relacionado e foi observado tanto em termos absolutos, como relativos. Esse achado nos parece refletir alguma interferência no sistema endócrino e na função testicular decorrente da exposição ao DEHA (EPA, 1996).

Dados sobre o peso da próstata poderiam consubstanciar os achados em relação ao peso da vesícula seminal sobre uma possível interferência endócrina, mas devido a dificuldades de cunho técnico para dissecação desta glândula, não foi possível realizar esta avaliação.

5.3.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático

O número de células espermáticas reflete a integridade da espermatogênese no interior dos testículos e a função testicular, enquanto que o número de espermatozóides na cauda do epidídimo é uma das avaliações mais significativas da função do epidídimo (AMANN, 1982).

A concentração média de espermatozóides na cauda do epidídimo sofreu redução significativa a partir da dose de 400 mg de DEHA/kg. Essa redução não foi acompanhada da redução na produção espermática diária (no testículo). Assim, observamos que o tempo de trânsito espermático através do epidídimo foi diminuído em todos os níveis de doses de DEHA avaliados.

De fato, segundo a literatura, a redução no número de espermatozóides na cauda do epidídimo pode ocorrer sem que haja outras alterações evidentes no processo de espermatogênese (FAQI *et al.*, 1998). Nas condições experimentais deste estudo, o epidídimo parece ser o órgão do sistema reprodutivo masculino mais sensível ao efeito do DEHA. Nossos dados mostram que as alterações na concentração de espermatozóides no epidídimo podem estar relacionadas, não com efeitos sobre a espermatogênese, mas sim, com a redução no tempo de trânsito espermático ou com alterações no processo de maturação dos espermatozóides.

Alguns desfechos não avaliados poderiam enriquecer a discussão sobre os achados anteriormente apresentados. A produção diária e a maturação dos espermatozóides podem ser criticamente dependentes do número e da funcionalidade das células de Sertoli presentes nos testículos. Cabe lembrar, inclusive, que os espermatozóides imaturos do testículo se movem para o epidídimo, ajudados por secreções das células de Sertoli (NEUBERT, 1997). Mesmo não encontrando dano sobre a produção espermática ou alteração nos pesos dos testículos (variáveis diretamente relacionadas com o número de células de Sertoli), a necessidade da realização de avaliações histopatológicas nos testículos, de forma a complementar os achados deste estudo, não deve ser negligenciada (TOPPARI *et al.*, 1996). Avaliações histopatológicas dos epidídimos

seriam igualmente importantes porquanto são as células da parede do epidídimo responsáveis pela secreção de proteínas fundamentais ao processo de maturação dos espermatozóides. Seguindo nesta mesma vertente de raciocínio, a avaliação da motilidade espermática (desfecho também não avaliado) poderia trazer indícios adicionais sobre a função do epidídimo, visto que a habilidade dos espermatozóides em movimentar-se seria adquirida durante o processo de maturação neste órgão. Porém, devido a dificuldades de cunho técnico, esta avaliação também não pode ser realizada no presente estudo.

5.3.3 Morfologia espermática

A análise da morfologia espermática é usada para ampliar a avaliação de efeitos tóxicos sobre a espermatogênese e indicar se uma determinada substância tóxica é capaz de agir nas células germinativas (US EPA *apud* FAQI *et al.*, 1998). O percentual total de espermatozóides anormais nos animais adultos expostos ao DEHA não diferiu significativamente do percentual observado nos animais do grupo controle.

5.3.4 Níveis de testosterona

A atividade funcional das estruturas do trato reprodutivo masculino é controlada pela concentração plasmática da testosterona. A espermatogênese nos túbulos seminíferos, a maturação dos espermatozóides nos epidídimos e a atividade secretora das glândulas sexuais acessórias requerem adequados níveis de testosterona (NEUBERT, 1997).

Os níveis plasmáticos de testosterona dos descendentes machos adultos expostos ao DEHA *in utero* e na lactação não foram significativamente afetados neste ensaio. A produção pulsátil de testosterona, regulada por picos de liberação de LH, pode explicar a alta variação das concentrações de testosterona encontradas. Além disso, a determinação dos níveis de testosterona em uma única amostra por animal, por si só, já é um fator limitante, e contribui para o grande desvio dos resultados.

Os resultados obtidos para a dosagem de testosterona não estão consistentes com a redução encontrada no peso da vesícula seminal (uma variável andrógeno-dependente). Avaliações da esteroidogênese fetal seriam bastante enriquecedoras neste estudo, uma vez que, durante o desenvolvimento pré e peri-natal, a exposição a hormônios androgênicos é essencial para que as glândulas sexuais acessórias exibam uma responsividade adequada na fase adulta (MALBY *et al.*, 1992). Além disso, alterações na esteroidogênese fetal por agentes tóxicos, durante exposição *in utero*, não necessariamente, representariam alterações nos níveis de testosterona na idade adulta (BORCH *et al.*, 2004).

5.4 TESTES DE FERTILIDADE

A exposição *in utero* e durante a lactação ao DEHA não provocou efeitos adversos sobre a fertilidade de camundongos, machos e fêmeas como demonstrado pelos índices de acasalamento e gravidez. Apesar dos efeitos do DEHA sobre as variáveis reprodutivas masculinas (a partir da dose de 400 mg/Kg *p.c./dia*), a fertilidade, dos descendentes machos adultos, avaliada segundo as taxas reprodutivas para as fêmeas acasaladas e suas progênes, não apresentou redução significativa. Isso se deve provavelmente a uma característica da espécie, na qual são produzidos e armazenados espermatozóides em quantidade muito superior à quantidade necessária para determinar a fertilidade. Em algumas linhagens de ratos e camundongos, por exemplo, a produção espermática pode ser reduzida em 90% sem comprometer a fertilidade (ZENICK & CLEGG *apud* ANDRADE, 2002). Portanto, a ausência de efeitos sobre a fertilidade dos animais expostos ao DEHA não é inconsistente em relação à redução observada na concentração de espermatozóides, uma vez que, em camundongos, as avaliações de fertilidade são limitadas pela insensibilidade em detectar prejuízos reprodutivos. No entanto, reduções bem menos severas podem comprometer a capacidade reprodutiva na espécie humana, que funciona muito próxima do limite de produção necessária para assegurar uma performance reprodutiva adequada (ZENICK & CLEGG *apud* ANDRADE, 2002). Em função dessas diferenças interespecíficas, a Agência de Proteção Ambiental Americana dos Estados Unidos (US EPA, 1996) passou a sugerir a investigação de outras variáveis reprodutivas

além dos acasalamentos, como peso e histopatologia de órgãos sexuais, produção espermática e níveis hormonais, para detectar possíveis efeitos adversos decorrentes da exposição a xenobióticos. Parte dessas avaliações adicionais foi realizada no presente estudo.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados do presente estudo demonstram que a exposição *in utero* e durante a lactação ao DEHA induz mortalidade peri- e pós-natal da prole, retardo do desenvolvimento e alterações em parâmetros específicos do sistema reprodutivo masculino de camundongos, em níveis de dose, em que não se observa toxicidade materna evidente. O fato do tamanho médio da ninhada ter diferido entre os grupos ao desmame – mas não ao nascimento – sugere que a prole foi mais vulnerável aos efeitos do DEHA durante a lactação do que durante a gestação, indicando assim a importância de estudos adicionais que avaliem aspectos toxicocinéticos do DEHA, sobretudo no que diz respeito à eliminação dessa substância via leite materno e seu acúmulo no organismo em desenvolvimento. Apesar de escassos, estudos sobre possíveis efeitos induzidos *in utero* e durante a lactação pelo DEHA não demonstraram efeitos tóxicos desta substância sobre sistema reprodutivo masculino de ratos. Porém, os resultados do presente estudo indicam que o DEHA pode causar dano reprodutivo em camundongos sexualmente maduros, demonstrado através da redução no número de espermatozóides na cauda do epidídimo e no tempo de trânsito espermático. Além disso, apesar da exposição *in utero* e durante a lactação não induzir efeito sobre os níveis plasmáticos de testosterona na prole, houve redução significativa dos pesos – absoluto e relativo – da vesícula seminal (a partir da dose de 400 mg de DEHA/kg de peso corpóreo/dia) uma variável andrógeno-dependente. Desta forma, o risco potencial de efeitos do DEHA sobre a toxicidade reprodutiva e desenvolvimento não deve ser negligenciado.

5 REFERÊNCIAS

ABRANTES, S. M. P., ESTEVES, A. A., BORGES, S. V., SOUZA, C. de M. R. Validação em laboratório de método analítico para determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 219-223, 2007.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 1140-1141.

AL-THANI, R. K., AL-THANI, A. S., ELBETIEHA, A., DARMANI, H. Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice. **Toxicology Letters**, v.138, p. 253-260, 2003.

AMANN, R. P. Use of animal models or detecting specific alterations in reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 2, n. 82, p. 13-25, 1982.

ANDRADE, J. M. A. **Efeitos do piretróide deltametrina sobre o sistema reprodutivo de ratos machos púberes e adultos expostos *in utero* e durante a lactação**. Curitiba: UFPR, 2002. 65p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba.

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

BERGMAN, K. & ALBANUS, L. Di-(2-ethylhexil) adipate: Absorption, autoradiographic distribution and elimination in mice and rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 309-316, 1987.

BITMAN, J., CECIL, H. C., HARRIS, S. J., FRIES, G. F. Estrogenic activity of *o,p'*-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct. **Science**, v. 162, p.371-372, 1968.

BLAZAC, W. F., ERNST, T. L., STEWART, B. E. Potential indicators of reproductive toxicity: Testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, n. 6, p. 1097-1103, 1985.

BORCH, J., LADEFOGED, O., HASS, U., VINGGAARD, A. M. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. **Reproductive Toxicology**, v.18, p. 53-61, 2004.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 105 de 19 de maio de 1999. Aprova os Regulamentos Técnicos: Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Plásticos em contato com Alimentos e seus anexos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 de maio de 1999.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 217 de 01 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Películas de Celulose Regenerada em Contato com Alimentos constante do anexo desta Resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 de agosto de 2002.

BRUNS-WELLER, E. & PFORDT, J. Bestimmung von Phthalsaureestern in Lebensmitteln und Frauenmilch. **ERNO**, v. 1, n. 1, p. 25-28, 2000.

BRYDON, P., SMITH, T., PROFFITT, M., GEE, H., HOLDER, R., DUNNE, F. Pregnancy outcome in women with type 2 diabetes mellitus needs to be addressed. **International Journal of Perinatology**, v. 9, p. 87-93, 2000.

CHAHOUD, I. & KWASIGROCH, T. E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, H. J., KWASIGROCH, T. E. (Editors), **Methodos in Prenatal Toxicology**, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, p. 78-91, 1977.

CHAHOUD, I., LIGENSA, A., DIETZEL, L., FAQI, A. S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 375-381, 1999.

CHAHOUD, I, KURIYAMA, S; PAUMGARTTEN, F. J. R. Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats. **Toxicology**, v. 179 n. 1-2, p.137-49, 2002.

CHERNOFF N., MILLER, D. B., ROSEN, M. B., MATTSHECK, C. L. Developmental effects of maternal stress in the CD1 mouse by restraint on single days during the period of major organogenesis. **Toxicology**, v. 51, p. 57-65, 1988.

CHERNOFF, N., ROGERS, J. M., KAVLOCK, R. J. An overview of maternal and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. **Toxicology**, n. 59, p.111-125, 1989.

COLLINS, T. F. X., SPRANDO, R. L., SHACKELFORD, M. E., HANSEN, D. K., WELSH, J. J. Food and drug administration proposed testing guidelines for reproduction studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 29-38, 1999.

COOK, J. W., DODDS, E. C., HEWETT, C. L. A synthetic oestrus exciting compound. **Nature**, v. 131, p. 56-57, 1933.

COOPER , I., GOODSON, A. , O'BRIEN, A. Specific migration testing with alternative fatty food stimulants. **Food Additive Contaminants**, v. 15, n. 1, p. 72-78, 1998.

DALGAARD, M., HASS, U., VINGGAARD, A. M., JARFELT, K., LAM, H. R., SORENSEN, L. K., SOMMER, H. M., LADEFOGED, O. Di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 17, p. 163-170, 2003.

DASTON, G. P., GOOCH, J. W., BRESLIN, W. J., SHUEY, D. L., NIKIFOROV, A. I., FICO, T. A., GORSUCH, J. W. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive Toxicology**, v.11, n.4, p. 465-481, 1997.

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

EDWARDS, M. J., SHIOTA, K., SMITH, M. S., WALSH, D. A. Hyperthermia and birth defects. **Reproductive Toxicology**, v. 9, n. 5, p. 411, 1995.

ESTEVEES, A. A., ABRANTES, S. M. P., BORGES, S. V., SILVEIRA, M. G. Migração dos plastificantes adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados em filmes flexíveis de poli-cloreto de vinila (PVC), acondicionantes de alimentos gordurosos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 139, p. 83-88, 2006.

FAQI, A. S., DALSENTER, HANS-JOACHIM, P. R. M., CHAHOUD, I. Reproductive Toxicity and Tissue Concentrations of Low Doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin in Male Offspring Rats Exposed Throughout Pregnancy and Lactation: **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 383-392, 1998.

FREIRE, M. T., SANTANA, I. A., REYES, F. G. Plasticizers in Brazilian food-packaging materials acquired on the retail market. **Food Additive Contaminants**, v. 23, n. 1, p. 93-99, 2006.

GERARDIN, D. C. C. & PEREIRA, O. C. M. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 301-305, 2002.

GOULAS, A. E., ANIFANTAKI, K. I., KOLIOULIS, D. G., KONTOMINAS, M.G. Migration of di-(2-ethylhexyl) adipate plasticizer from food grade polyvinyl chloride film into hard and soft cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 83 n. 8, p. 1712-1718, 2000.

GRAY Jr, L. E. *et al.* Endocrine screening methods workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 5, p.719-750, 1997.

GRAY Jr, L. E., OSTBY, J., FURR, J., PRICE, M. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP and DINP, but not DEP, DMP or DOTP, alters sexual differentiation on the male rat. **Toxicology Science**, v. 58, p. 350-65, 2000.

GRUBER, L., WOLZ, G., PIRINGER, O. Untersuchung von Phthalaten in Baby-Nahrung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, v. 94, p. 177-179, 1998.

GUYTON, A. C & HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p. 996-1009.

HSDB. Bis(2-ethylhexyl) adipate. In: Hazardous Substances Data Bank. Disponível em: <www.toxnet.nlm.nih.gov> Acesso em: 06 de fevereiro 2007.

HUFF, J. Di(2-ethylhexyl) Adipate: Condensation of the Carcinogenesis Bioassay Technical Report. **Environmental Health Perspectives**, v.45, p. 205-207, 1982.

HUTCHISON, J. B. BEYER, C., HUTCHISON, R. E., WOZNIAK, A. Sex Differences in the Regulation of Embryonic Brain Aromatase. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 61, n. 3-6, p. 315-322, 1997.

IARC (2000). Di(2-ethylhexyl)adipate. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals. Vol. 77, pp. 149-175. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France.

IRIS. Bis(2-ethylhexyl) adipate. In: Integrated Risk Information System. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <www.epa.gov/iris> Acesso em: 06 de fevereiro 2007.

JARFELT, K., DALGAARD, M., HASS, U., BORCH, J., JACOBSEN, H., LADEFOGED, O. Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. **Reproductive Toxicology**, v. 19, p. 505-515, 2005.

JENSEN, T. K., TOPPARI, J., KEIDING, N., SKAKKEBAEK, N. E. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1896-1901, 1995.

JOHNSON, L., MAY, M. R., BUSBEE, D. L., WILLIAMS, J. D. Effect of age and dietary restriction on daily sperm production and number and transit time of epididymal spermatozoa in the mouse. **AGE**, v. 15, n.3, p. 65-100, 1992.

KANG, J. S., MORIMURA, K., TODA, C., WANIBUCHI, H., WEI, M., KOJIMA, N., FUKUSHIMA, S. Testicular toxicity of DEHP, but not DEHA, is elevated under conditions of thioacetamide-induced liver damage. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 253-259, 2006.

KAPIT, W., MACEY, R. I., MEISAMI, E. **Fisiologia – um livro para colorir**. São Paulo: Roca, 2004, p. 1950-1960.

KAY, S. Plasticizer migration in foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29 n. 2, p. 139-142, 1991.

KHERA, K. S. Maternal toxicity: a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v. 29, p. 411-416, 1984.

KHERA, K. S. Maternal toxicity: a possible etiologic factor in embryo fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. **Teratology**, v. 31 p.129-136, 1985.

KIMMEL, C. A. & MAKRIS, S. L. Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. **Toxicology Letters**, v. 120, p. 73-82, 2001.

KURIYAMA, S. N. **Desnutrição Materna e Embriotoxicidade de Xenobióticos: Estudos Experimentais em Ratos**. Rio de Janeiro: UERJ, 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Rio de Janeiro.

LAKE, B. G., PRICE, R. J., CUNNINGHAME, M. E., WALTERS, D. G. Comparison of the effects of di-(2-ethylhexyl) adipate on hepatic peroxisome proliferation and cell replication in the rat and mouse. **Toxicology**, v. 123, p. 217-226, 1997.

LATINI, G., DE FELICI, C., DEL VECCHIO, A. Lactational exposure to di-(2-ethylhexil)-phthalate. **Pediatric Research**, v. 54, p. 564, 2003.

LATINI, G., FELICE, C., VERROTI, A. Plasticizers, infant nutrition and reproductive health. **Reproductive Toxicology**, v. 19, p. 27-33, 2004.

LEMONICA, I. P., 2003. Embriofetotoxicidade. *In: Fundamentos de Toxicologia* (OGA, Z.), pp. 91-99, 2. Ed., São Paulo: Atheneu Editora.

LIEBERMAN, S. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or syntetic, merely semantical? **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, p. 850-851, 1996.

LOFTUS, N. J., WOOLLEN, B. H., STEEL, G. T., WILKS, M. F., CASTLE, L. An assessment of the dietary uptake of di-2-(ethylhexyl) adipate (DEHA) in a limited population study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n.1, p. 1-5, 1994.

LOVE, R. Alpha-fetoprotein protects female brains from oestrogens. **The Lancet Neurology**, v. 5, n.3, p. 207, 2006.

LUBICK, N. Plasticizers go from breast milk to baby. **Environmental Science Technology**, v. 40, n. 17, p. 5166-5167, 2006.

MALBY T. A., BJERKE, D. L., MOORE, R. W., CENDRON-FITZPATRICK, A., PETERSON, R. E. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 114, p. 97-107, 1992.

MANSON, J. M. Teratogens. In: *Casarett and Doull's. Toxicology. The Basic Science of Poison*. (Klassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J.), New York, Toronto, London: Macmillan Publishing Company, 1986, p. 195-220.

McCARTHY, M. M., DAVIS, A. M., MONG, J. A. Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 487-495, 1997.

McEWEN, B. S., LIEBERBURG, I., MACLUSKY, N., PLAPINGER, L. Do estrogen receptors play a role in the sexual differentiation of the rat brain? **Journal Steroid Biochem**, v.8, n.5, p. 593-598, 1977.

MILLER, W. Mechanism of StAR's regulation of mitochondrial cholesterol import. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.265-266, p. 46-50, 2007.

MURRAY, F. J., JOHN, J. A., BALMER, M. F., SCHWETZ, B. A. Evaluation of styrene given to rats and rabbits by inhalation or by gavage. **Toxicology**, v. 11, n 4, p. 335-343, 1978.

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

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

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

NABAE, K., DOI, Y., TAKAHASHI, S., ICHIHARA, T., TODA, C., UEDA, K., OKAMOTO, Y., KOJIMA, N., TAMANO, S., SHIRAI, T. Toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) under conditions of renal dysfunction induced with folic acid in rats: Enhancement of male reproductive toxicity of DEHP is associated with an increase of the mono-derivative. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 411-417, 2006.

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

NEUBERT, D. Vulnerability of the Endocrine System to Xenobiotic Influence. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 9-29, 1997.

NODA, T., YAMANO, T., SHIMIZU, M. Effects of maternal age on teratogenicity of di-*n*-butyltin diacetate in rats. **Toxicology**, n. 167, p. 181-189, 2001.

OSTBY, J., KELCE, W. R., LAMBRIGHT, C., WOLF, C. J., MANN, P., GRAY JR, L. E. 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, n. 1-2, p.80-93, 1999a.

OSTBY, J., MONOSSON, E., KELCE, W. R., GRAY JR, L. E. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 48-64, 1999b.

PARKS, L. G., OSTBY, J. S., LAMBRIGHT, C. R., ABBOTT, B. D., KLINEFELTER, G. R., BARLOW, N. J., GRAY JR, L. E. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. **Toxicology Sciences**, v. 58, n. 2, p 339-349, 2000.

PERSAUD, T. V. N. Teratogenesis – Experimental Aspects and Clinical Implications. In: **Expermentelle Pathologie**. Gustav Fischer Verlag, Jena. Suplemento 4, 1979.

PETERSEN, J. H., NAAMANSEN E. T., NIELSEN, P. A. PVC cling film in contact with cheese: health aspects related to global migration and specific migration of DEHA. **Food Additive Contaminants**, v. 12, p. 245-253, 1995.

PETERSEN, J. H. & BREINDAHL, T. Specific migration of di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) from plasticized PVC film results from an enforcement campaign. **Food Additive Contaminants**, v. 15, n. 5, p. 600-608, 1998.

PETERSEN, J. H. & BREINDAHL, T. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. **Food Additive Contaminants**, v. 17, n.2, p. 133-141, 2000.

QUINTAS, V. **Biologia do sexo**. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 53-95.

RIECKE, K. & STAHLMANN, R. Test systems to identify reproductive toxicants. **Andrologia**, v. 32, p. 209-218, 2000.

RITTLER, M. & CASTILLA, E. E. Endocrine disruptors and congenital anomalies. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 421-428, 2002.

SAITO, I., UENO, E., OSHIMA, H., MATSUMOTO, H. Levels of phthalates and adipates in processed foods and migration of di-isononyl adipate from polyvinyl chloride film into foods. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v. 43, n. 3, p.185-189, 2002.

SALAZAR, V., CASTILLO, C., ARIZNAVARRETA, C., CAMPÓM, R., TREGUERRES, J. A. F. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats pre-pubertal development of their offspring. **Toxicology**, v. 205, p. 131-137, 2004.

SALEWSKI, E. Faerbemethoden zum Makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, p. 247, 367, 1964.

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

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

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003, p. 732-745.

SOHARA, E., UEDA, O., TACHIBE, T., HANI, T., JISHAGE, K., RAI, T., SASAKI, S., UCHIDA, S. Morphologic and functional analysis of sperm and testes in Aquaporin 7 Knockout mice. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 3, p. 671-676, 2007.

SULTAN, C., BALAGUER, P., TEROVANNE, B., GEORGET, V., PARIS, F., JEANDEL, C., LUBROSO, S., NICOLAS, J. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 99-105, 2001.

STROHECKER, T., CABATON, N., NOURDIN, G., RÉGNIER, J., LHUGUENOT, J., CHAGNON, M. Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. **Toxicology**, v. 208, p. 115-121, 2005.

TANAKA, T. Reproductive and neurobehavioural effects of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in a cross-mating toxicity study of mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 581-589, 2005.

TAYLOR, M. R., HOLMES, P., DUARTE-DAVIDSON, R., HUMFREY, C. D. N., HARRISON, P. T. C. A research strategy for investigation the ecological significance of endocrine disruption: report of UK workshop. **Science of the Total Environment**, v. 233, n.1-3, p. 181-191, 1999.

TOPPARI, J., LARSEN, J. C., CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A., GRANDJEAN, P., GUILLETTE, L. J., JÉGOU, B., JENSEN, T. K., JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J. A., MEYER, O., MÜLLER, J., RAJPERT-DE MEYTS, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R., SUMPTER, J., SKAKKEBAEK, N. E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 4, p. 741-803, 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U. S. EPA). **EPA/630/R-96/009: Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**, 1996.

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

VELDHUIS, J. D., CARLSON, M. L., JOHNSON, M. L. The pituitary gland secretes in bursts: appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 7686-7690, 1988.

VOM SAAL, F. S., COOKE, P. S., BUCHANAN, D. L., PALANZA, P., THAYER, K. A., NAGEL, S. C., PARMIGIANI, S., WELSHONS, W. V. A physiologically based approach to the study of Bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production and behavior. **Toxicology and Industrial Health**, v. 14, p. 239-260, 1998.

WITORSCH, R. J. Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 118-130, 2002.

WYROBECK, A. J. & BRUCE, W. R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 4425-4429, 1975.

ZHANG, Y., JIANG, X., CHEN, B. Reproductive and developmental toxicity in F₁ Sprague – Dawley male rats exposed to di-*n*-butyl phthalate *in utero* and during lactation and determination of its NOAEL. **Reproductive Toxicology**, v. 18, p. 669-676, 2004.

ZHU, J., PHILLIPS, S. P., FENG, Y., YANG, X. Phthalate Esters in Human Milk: Concentration Variations over a 6-Month Postpartum Time. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 5276-5281, 2006.