

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Gustavo Nazareno Monteiro**

**TOXICIDADE TESTICULAR EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57BL/6J  
EXPOSTOS AO ÁCIDO TEREFTÁLICO *IN ÚTERO* E DURANTE A LACTAÇÃO**

**Teófilo Otoni – MG**

**2017**



**Gustavo Nazareno Monteiro**

**TOXICIDADE TESTICULAR EM CAMUNDONGOS C57BL/6J EXPOSTOS AO ÁCIDO  
TEREFTÁLICO *IN ÚTERO* E DURANTE A LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica  
Orientador: Prof. Dra. Sarah Alves Auharek  
Coorientador: Prof. Dr. Douglas Santos Monteiro

**Teófilo Otoni – MG**

**2017**

Ficha Catalográfica  
Preparada pelo Serviço de Biblioteca/UFVJM  
Bibliotecário responsável: Gilson Rodrigues Horta – CRB6 nº 3104

M775t Monteiro, Gustavo Nazareno.  
2017 Toxicidade testicular em camundongos da linhagem C57BL/6J expostos ao ácido tereftálico *in útero* e durante a lactação. / Gustavo Nazareno Monteiro. Teófilo Otoni: UFVJM, 2017.  
69 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sarah Alves Auharek.

1. Ácido tereftálico. 2. Espermatogênese. 3. Desenvolvimento testicular. 4. Desregulador endócrino. I. Título.

**CDD: 547**

Elaborada com dados fornecidos pelo autor.

**Gustavo Nazareno Monteiro**

**TOXICIDADE TESTICULAR EM CAMUNDONGOS C57BL/6J EXPOSTOS AO ÁCIDO  
TEREFTÁLICO *IN ÚTERO* E DURANTE A LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientado por: Prof. Dra. Sarah Alves Auharek

APROVADO EM: 15/12/2017

---

Prof. Dra. Cleide Aparecida Bomfeti  
Examinador  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

---

Prof. Dr. Ernani Aloysio Amaral  
Examinador  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

---

Prof. Dra. Sarah Alves Auharek  
Orientadora/Presidente  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

**Teófilo Otoni – MG**

**2017**



Ao meu filho, pais,  
irmão e amigos.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao criador, pela oportunidade de ver alguns de seus projetos: natureza, humanidade e ciência.

À minha família, alguns bem de perto e outros de longe, com todo o carinho, respeito e paciência por todo o período. Obrigado: Gerson, Gislene e Gabriel.

De maneira mais que especial, gostaria de agradecer o meu filho **VICTOR GABRIEL BARROS MONTEIRO** por apenas existir; me desculpe pelos dias ausentes, prometo estar mais perto de você, sempre. Agradeço à Geórgia, por cuidar tão bem, por ser uma grande mãe.... agradeço por segurar a barra nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Profa. Dra. Sarah Alves Auharek, uma excelente professora, pesquisadora que dedicou muito do seu tempo em transmitir seus conhecimentos a mim: obrigado pela sua sinceridade e amizade.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Douglas Santos Monteiro, pela tranquilidade, confiança e amizade. Agradeço pela paciência nos experimentos químicos e pelos ensinamentos da físico-química.

Ao Dr. Tiago Domingos Mouzinho Barbosa pela grande e divertida amizade, pela ajuda com todo o material histológico, e pelos conselhos.

Aos alunos de iniciação científica Day e Iago, pela presença no laboratório, e pela ajuda com as imagens ao microscópio

Aos demais professores integrantes do programa de Pós-graduação em Química da UFVJM que contribuíram para meu crescimento como pessoa e profissional.

À UFVJM pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, fornecendo todos os recursos necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho o meu muito obrigado.



## RESUMO

O ácido tereftálico (TPA) é um composto aromático mundialmente produzido e amplamente utilizado na fabricação de resinas, assim como matéria-prima para a reação de polimerização com o etilenoglicol objetivando-se a produção do poli (tereftalato de etileno), conhecido como PET. O uso do TPA estende-se à síntese de ftalatos, plastificantes utilizados em diversos produtos industrializados como brinquedos e cosméticos. Ftalatos agem como desreguladores endócrinos e indutores de alterações reprodutivas em homens e animais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade no desenvolvimento embrio/fetal de machos expostos *in útero* e durante a lactação ao ácido tereftálico, em diferentes janelas do desenvolvimento, com destaque na função testicular. Os animais foram tratados via intragástrica com o TPA nas dosagens de dispersões estoque correspondentes a 0,0014 g/ml e 0,56 g/ml de TPA em 0,5 % v/v carboximetilcelulose assim como a dose controle, composta unicamente por dispersão de carboximetilcelulose (0,5 % v/v). Quatro janelas experimentais foram estabelecidas: grupo I- tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), com eutanásia aos 18.5 dias; grupo II- tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 15 dias; grupo III- tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) com eutanásia aos 70 dias (idade de maturidade sexual, PND70); grupo IV- tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 70 dias (PND70). Após a eutanásia dos animais, os testículos esquerdos foram usados para estudos histomorfométricos. Os resultados indicam que o TPA altera os parâmetros reprodutivos (peso testicular, índice gonadossomático, tamanho do pênis e índice anogenital), somente na dose de 0,56 g/ml, no período fetal. Dados da proporção volumétrica dos elementos do testículo, demonstram que a dispersão com maior concentração de TPA, alterou de forma significativa as porcentagens de vasos/capilares sanguíneos, vaso linfáticos e tecido conjuntivo. Somente a dose de 0,56 g/ml de TPA, foi efetiva em diminuir os números de células de Leydig e Sertoli, dos animais eutanasiados aos 18.5 dias. Contudo, existe uma recuperação compensatória dos parâmetros avaliados nas idades de 15 e 70 dias, puberdade e maturidade sexual em camundongos, respectivamente. Os números de células de Sertoli e de Leydig dos animais de 70 dias expostos a TPA no período gestacional e/ou lactacional foram similares ao controle. Os resultados apontam baixa toxicidade na função testicular em períodos distintos do desenvolvimento, não sendo o TPA assim um desregulador endócrino.

Palavras-chave: Ácido tereftálico, espermatogênese, desenvolvimento testicular, desregulador endócrino.



## ABSTRACT

Terephthalic acid (TPA) is a world-wide aromatic compound widely used in the manufacture of resins as well as the raw material for the polymerization reaction with ethylene glycol to produce polyethylene terephthalate, known as PET. The use of TPA extends to the synthesis of phthalates, plasticizers used in various industrialized products such as toys and cosmetics. Phthalates act as endocrine disrupters and induce reproductive changes in men and animals. The present study aimed to evaluate the embryo/fetal developmental toxicity of males exposed in utero and during lactation to terephthalic acid in different development windows, with emphasis on testicular function. The animals were intragastric treated with TPA at dosages of stock dispersions corresponding to 0.0014 g/ml and 0.56 g/ml of TPA in 0.5% v/v carboxymethylcellulose as well as the control dose, composed solely of dispersion of carboxymethylcellulose (0.5% v/v). Four experimental windows were established: group I - treatment in utero, in the fetal period (DG 10.5-18.5), with euthanasia at 18.5 days; group II - treatment in utero, in the fetal period (DG 10.5-18.5) and in the lactational period (PND-15), with euthanasia at 15 days; group III - treatment in utero in the fetal period (DG 10.5-18.5) with euthanasia at 70 days (age of sexual maturity, PND70); group IV - treatment in utero, in the fetal period (DG 10.5-18.5) and in the lactational period (PND-15), with euthanasia at 70 days (PND70). After euthanasia of the animals, the left testicles were used for histomorphometric studies. The results indicate that TPA changes the reproductive parameters (testicular weight, IGS, penis size and anogenital index), only at the dose of 0.56 g/ml in the fetal period. Data on the volumetric ratio of the testis elements show that the dispersion with the highest concentration of TPA significantly altered the blood vessel/capillary, lymphatic vessel and connective tissue percentages. Only at the dose of 0.56 g/ml TPA, it was effective in decreasing the Leydig and Sertoli cell numbers of the euthanized animals at 18.5 days. However, there is a compensatory recovery of the parameters evaluated at the ages of 15 and 70 days, puberty and sexual maturity in mice, respectively. The Sertoli and Leydig cell numbers of the 70-day animals exposed to TPA in the gestational and/or lactational period were similar to the control. The results point to low testicular toxicity at distinct developmental periods, and TPA is not an endocrine disruptor.

Keywords: Terephthalic acid, spermatogenesis, testicular development, endocrine disruptor.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Fórmulas estruturais dos isômeros de posição do ácido ftálico .....	25
FIGURA 2 – Fórmulas estruturais dos ftalatos DHP, DHPC, DBP e DEHP .....	26
FIGURA 3 – Etapas da espermatogênese .....	29
FIGURA 4 – Foto da dispersão de TPA2 (A) e do homogeneizador T25 Digital Ultra Turrax (B) usado na preparação .....	34
FIGURA 5 – Imagem do aparecimento do plug vaginal, indicado pela seta .....	35
FIGURA 6 – Delineamento experimental dos animais tratados .....	36
FIGURA 7– Grid retangular utilizado no programa ImageJ para a estimacão dos pontos projetados sob a imagem histológica .....	39
FIGURA 8 – Peso corporal (A), testicular (B), índice gonadossomático (C) e tamanho do pênis (D) dos animais tratados com dispersões controle, TPA <sub>1</sub> e TPA <sub>2</sub> .....	44
FIGURA 9 – Index anogenital (A) e distância anogenital (B) dos animais tratados com as dispersões controle, TPA <sub>1</sub> e TPA <sub>2</sub> .....	46
FIGURA 10 – Secções transversais de cordões/túbulos seminíferos de camundongos controles (A, D, G e I), tratados com TPA <sub>1</sub> (B, E, H e K) e TPA <sub>2</sub> (C, F, I e L) .....	52
FIGURA 11 – Volume nuclear (A), citoplasmático (B), celular (C) e número de células de Leydig (D) dos animais tratados com dispersões controle, TPA <sub>1</sub> e TPA <sub>2</sub> .....	56
FIGURA 12 – Volume nuclear (A) e número de células de Sertoli (B) no testículo dos animais tratados com as dispersões controle, TPA <sub>1</sub> e TPA <sub>2</sub> .....	58



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Informações gerais e propriedades físico-químicas do ácido tereftálico .....	20
TABELA 2 – Dados de toxicidade aguda em animais de experimentação tratados com o TPA .....	23
TABELA 3 – Proporção volumétrica e diâmetro tubular dos camundongos sexualmente maduros tratados com dispersões Controle, TPA1 e TPA2 .....	53



## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ADG - Distância Anogenital

<sup>14</sup>C - átomo de carbono radioativo

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBP - Di(n-butil)ftalato

DEHP - Di(2-etilexil)ftalato

DE's - Desreguladores endócrinos

DHCP - Dicloexilftalato

DHP - Di(n-hexil)ftalato

FT's - Ftalatos

G/ml - Concentração em gramas por mililitros

IGS - ndice gonadossomático

LD<sub>50</sub> - Dose letal em metade da população

LOAEL - Lowest observed adverse efect levels

Mg/kg - Miligramas por quilogramas

Mg/kg-dia - Miligramas por quilograma por dia

NOAEL - No observed adverse efect levels

TPA - cido tereftálico

TPA<sub>1</sub> - Dispersão menos concentrada de ácido tereftálico

TPA<sub>2</sub> - Dispersão mais concentrada de ácido tereftálico

PET - Poli (tereftalato de etileno)

SDH - Sorbitol desidrogenase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
3.1 Aspectos químicos do ácido tereftálico .....	20
3.2 Toxicologia do ácido tereftálico .....	22
3.2.1 Absorção, distribuição, metabolismo <i>in vivo</i> e toxicidade reprodutiva do TPA.....	24
3.3 Ftalatos.....	25
3.4 Sistema reprodutor masculino - estrutura testicular.....	27
3.4.1 Espermatogênese.....	28
3.5 Desreguladores endócrinos .....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1 Modelo experimental .....	32
4.2 Preparos das dispersões.....	32
4.3 Tratamentos dos animais.....	34
4.4 Coleta e processamento histológico dos testículos .....	36
4.6 Análises histológicas.....	38
4.6.1 Diâmetro tubular .....	38
4.6.2 Proporções volumétricas .....	38
4.6.3 Proporção núcleo/citoplasma das células de Leydig.....	40
4.6.4 Volume nuclear, citoplasmático e individual de células de Leydig e volume nuclear da célula de Sertoli.....	40
4.6.5 Número de células de Sertoli e de células de Leydig por testículo.....	41
4.7 Análise Estatística .....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5.1 Dados biométricos.....	42
5.2 Index/distância anogenital.....	45
5.3 Morfometria testicular.....	46
5.3.1 Compartimento tubular .....	46
5.3.2 Compartimento intertubular .....	47
5.4 Volume nuclear, citoplasmático, celular e número de células de Leydig.....	55

5.5 Volume nuclear e número de células de Sertoli .....	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60



## 1 INTRODUÇÃO

Estudos com interesse na capacidade reprodutiva humana com destaque na produção de gametas masculinos, tornaram-se frequentes e de suma importância no que diz respeito à saúde do homem. O maior contato direto ou indireto a novos compostos naturais e sintéticos têm demonstrado diversos efeitos adversos ao desempenho reprodutivo masculino.

Tem sido observada uma redução gradativa na concentração de espermatozoides com o passar dos anos. A literatura registra uma redução de quase a metade (113 para 66 milhões de espermatozoides/ml) nos anos de 1940 ao ano de 1990 (CARLSEN *et al.*, 1990). Corroborando com a tendência de redução no número de espermatozoides na espécie humana, Levine *et al.* (2017) mostraram um decréscimo de quase 50% na concentração de esperma do ejaculado entre os homens de países ocidentais, entre os períodos de 1973 e 2011. Os principais fatores para este evento biológico devem estar relacionados a mudanças no estilo de vida juntamente à exposição a novos compostos.

Os distúrbios no sistema reprodutor masculino mais relatados nas últimas cinco décadas, definidos por anormalidades com origem comum na vida fetal, podem ser exemplificados por: câncer testicular, criptorquidismo, hipospadias e baixa contagem de espermatozoides. Estas anomalias constituem fatores de risco entre si e podem estar inter-relacionadas (SKAKKEBAEK *et al.*, 2001; SHARPE *et al.*, 2003). Muitas dessas alterações estão relacionados à exposição aos contaminantes químicos, exemplificados por agroquímicos, metais pesados e poluentes em geral (HAUSER; SOKOL, 2008).

Outra classe de substâncias comumente citadas pelas pesquisas em toxicologia reprodutiva e relatadas por serem interferentes na performance do sistema reprodutor masculino são os ftalatos. Ftalatos são ésteres usados em muitos produtos de uso comum: plásticos, produtos de limpeza embalagens e brinquedos (JENSEN *et al.*, 2016; RUDEL *et al.*, 2011). Todas as substâncias químicas citadas acima, fazem parte do rol de compostos capazes de provocar desequilíbrios nos níveis de hormônios e, por conseguinte, de suas funções. Estas substâncias denominam-se desreguladores endócrinos. Os desreguladores endócrinos são responsáveis por uma pluralidade de efeitos sobre o sistema endócrino, abrangendo distúrbios de desenvolvimento, mutagenicidade e carcinogenicidade (CHOI; YOO; LEE, 2004).

Uma estrutura química muito comum à cadeia dos ftalatos são as moléculas de ácido ftálico. Um dos polímeros mais usados no mundo, o poli (tereftalato de etileno), utiliza-se do ácido tereftálico (isômero ao ácido ftálico) como regente para sua síntese. Deste modo, quando há o consumo de água armazenada em garrafas de plástico, ou outros utensílios feitos deste polímero, pode existir um contato direto/indireto ao ácido tereftálico devido a migração do mesmo ao líquido do interior de uma garrafa feita de poli (tereftalato de etileno) (KHANEGHAH *et al.*, 2014).

Estudos preliminares, relatam a ausência de capacidade de ligação/ativação aos receptores androgênicos por alguns monômeros de poliéster (etileno glicol, dietilenoglicol, o ácido isoftálico), indicando uma possível inexistência de toxicidade do poli (tereftalato de etileno) e alguns dos seus monômeros de síntese, em estruturas químicas relativas à reprodução (OSIMITZ *et al.*, 2014). Apesar da possível inexistência de toxicidade supracitada, a literatura nos fornece poucas informações a respeito da ação do ácido tereftálico no testículo de mamíferos. Particularmente, o presente estudo avaliou alterações dos elementos somáticos e germinativos do testículo, permitindo-se repercussões em última análise sobre o desempenho reprodutivo em machos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do ácido tereftálico sobre a função testicular durante o desenvolvimento embrio/fetal de camundongos expostos *in útero* e durante a lactação em diferentes janelas do desenvolvimento.

### 2.2 Objetivos Específicos

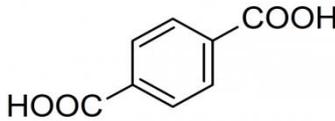
- ✓ determinar a biometria, índice gonadossomático, index anogenital dos animais jovens, distância anogenital (animais sexualmente maduros) e tamanho do pênis dos animais expostos ao ácido tereftálico.
- ✓ investigar a correlação do diâmetro tubular com a formação do lume tubular dos animais expostos ao ácido tereftálico.
- ✓ investigar a proporção dos elementos testiculares intra/intertubulares dos animais expostos ao ácido tereftálico.
- ✓ calcular o número de células de Sertoli e de Leydig por testículo dos animais expostos ao ácido tereftálico.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Aspectos químicos do ácido tereftálico

O ácido tereftálico (TPA), nomenclatura IUPAC ácido 1,4-benzoldicarboxílico, formado estruturalmente por um anel benzeno ligado a dois grupos carboxila, é uma substância amplamente usada como matéria prima para produção e confecção de diversos produtos: resinas, fibras de poliéster para utilização em tapetes e roupas, películas utilizadas na produção de fitas magnéticas e aditivo para ração de aves (BALL; MCLELLAN; BHAT, 2012; CUI *et al.*, 2004; TREMAINE; QUEBBEMANN, 1985). Uma reação química comum de uso contínuo do TPA pelas indústrias é a esterificação do ácido tereftálico com o etilenoglicol, essa polimerização por condensação resulta no composto poli (tereftalato de etileno), conhecido como PET. O PET é usado pelas indústrias de inúmeras maneiras; fibras têxteis, embalagens processadas e polímeros de engenharia. O grande uso e sucesso desse polímero devem-se ao baixo custo de produção, sendo um material caracterizado como termoplástico de excelente relação mecânica/térmica (MACDONALD, 2002). A Tabela 1 abaixo, demonstra as características químicas gerais do TPA.

**TABELA 1** – Informações gerais e propriedades físico-química do ácido tereftálico.

CAS N°	100-21-0
Sinônimos	ácido 1,4-benzoldicarboxílico; para-ácido ftálico; para-dicarboxil benzeno
Fórmula molecular	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Estrutura molecular	
Peso Molecular	166,13 g/mol
Ponto de Fusão	> 300 °C
Ponto de Ebulição	não avaliado
Densidade	1.12 g/cm <sup>3</sup>
Solubilidade em água	15 mg/L a 10 °C (não solúvel)
Pressão de vapor	1.19x10 <sup>-5</sup> mmHg a 25 °C

FONTE: OECD SIDS (2001).

Sendo uma substância química usada em grande escala para diversos fins, a produção mundial de TPA referente ao ano de 2014 atingiu o quantitativo de 56 milhões de toneladas, com um incremento anual de 6% ao ano em diversos períodos (PANG *et al.*, 2015). De acordo com ZHANG *et al.* (2010), normalmente é produzido entre 3 a 10 toneladas de águas residuais para a fabricação de uma tonelada de TPA purificado, nessas águas são encontrados outros compostos como o ácido benzoico, p-carboxibenzaldeído, ácido p-toluico e o próprio TPA. O processo de síntese do ácido tereftálico segue várias metodologias que, em síntese, ocorre pela reação de oxidação do p-xileno (1,4-dimetilbenzeno). O resultado desta reação é um material sólido pulverizado ou na forma de cristais com coloração branca, muitas vezes manuseado e armazenado na forma fundida (OECD SIDS, 2001).

A produção do TPA comercializado pode ser descrita por dois processos: Amoco e Mobil (MANCINI, 2001). A empresa norte-americana Amoco (American Oil Company) sintetiza o TPA pela oxidação do p-xileno em ácido acético sendo adicionado aos catalizadores acetato de manganês (II), cobalto (II) e brometo; esse processo é realizado à pressão de 15 atm e temperatura aproximada de 225°C. Durante a maior parte do tempo, em torno de 90 minutos em tempo reacional, a maior parte do p-xileno é convertida em TPA como 99,95% de pureza em estado cristalizado. Concomitante à reação, há a formação de produtos intermediários que estão em solução ao ácido acético da mistura em ácido acético é retirado o TPA bruto continuamente, incluindo a reutilização do ácido acético. Por fim, o TPA é novamente cristalizado em solução aquosa de ácido acético em pressão e temperatura adequada para torna-se um composto com maior solubilidade (MANCINI, 2001; HUNDLEY *et al.*, 1988).

Para a síntese do TPA feita pelo processo Mobil (Mobil Chemicals), usa-se o oxigênio e metil-etil-cetona (butatona) com 95% de pureza sendo o último o catalizador ativador. Neste processo o p-xileno reagente é convertido em TPA devido a uma reação direta com o ar atmosférico ou através de oxigênio em solução. Nesta reação acontece com a oxidação de grupos metil em grupos carboxila, assim como há a formação de compostos intermediários (BRYANT *et al.*, 1971). Como o TPA é menos solúvel no ácido acético que qualquer dos outros compostos formados durante a reação, ele só pode ser separado diretamente por centrifugação ou filtração. Para a obtenção de TPA como maior grau de pureza, é feita a sublimação direta dos cristais “semipuros”; o tratamento catalítico é feito logo em seguida na fase de vapor que tem como consequência a recristalização do TPA (BRYANT *et al.*, 1971).

### 3.2 Toxicologia do ácido tereftálico

Os efeitos tóxicos resultantes da exposição à determinada substância química, podem ser observados desde alterações mais sutis (fisiológicas e patológicas), ou até mesmo a morte (BENFORD, 2001). Desta forma, diversos tipos de estudos em animais de experimentação, estudos *in vitro* ou até em humanos, fornecem a identificação dos possíveis efeitos tóxicos provenientes à exposição de substâncias químicas de interesse. Conforme Filipsson *et al.* (2003), principais estudos de toxicidade resumem-se em: toxicidade aguda, toxicidade sobreaguda e subcrônica, crônica e oncogenicidade, genotoxicidade, toxicidade na reprodução e desenvolvimento pré-natal, imunotoxicidade e neurotoxicidade.

Neste contexto, a avaliação dose-resposta em estudos toxicológicos diz respeito ao fundamento quantitativo da exposição ao agente tóxico em conjunto a uma incidência de um efeito tóxico, ou seja, um efeito biológico adverso (BENFORD, 2001; KLAASSEN; WATKINS III, 2012). Sendo assim, abordagens limítrofes integram dois termos amplamente usados em toxicologia: NOAEL e LOAEL (do inglês, *no observed adverse effect levels* e *lowest observed adverse effect levels*, respectivamente). Ainda, de acordo com Hodgson (2003) a caracterização da relação dose-resposta inclui a dose letal mediana (LD<sub>50</sub> ou DL<sub>50</sub>, do inglês *lethal dose*).

Estudos toxicológicos do TPA em seres humanos são limitados. Conforme Ball, Mclellan e Bhat (2012) a cinética e o destino de metabólicos do TPA são restritos aos estudos *in vitro*, sendo demonstrado que em colônias de alguns tipos celulares renais o TPA é acumulado, porém não há metabolismo do mesmo (TREMINE; QUEBBEMANN, 1985). Estudos de toxicidade aguda, originados dos tratamentos de animais de laboratórios com o TPA em diferentes doses, assim como as abordagens limítrofes, doses letais e resposta (sinais clínicos e sintomas adversos), são demonstrados na Tabela 2.

TABELA 2 – Dados de toxicidade aguda em animais de experimentação tratados com o TPA.

Estudo	Dosagens	Via	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Comentários gerais	Referência
TPA					
Ratos Sprague Dawley (n=5 em ambos os sexos), LD <sub>50</sub>	Suspensão 50% p/v em água	Gavage	≥5000	Não há detalhes	OECD/SIDS, 2001
Fêmeas swiss mice (n=30), LD <sub>50</sub> determinado após três dias a administração	Solução de 10% em 0,5% em carboximetilcelulose de sódio Solução de 20% em 0,5% em carboximetilcelulose de sódio Solução de 25,5% de disódio-tereftalato em água destilada	Gavage Intraperitoneal Gavage Subcutâneo Intraperitoneal	≥5000 1430 6300 5000 8600 6800 4600 3600	Letargia como um único sinal clínico observado TPA como sal de sódio TPA como um ácido livre TPA como sal de sódio TPA como um ácido livre TPA como sal de sódio TPA como um ácido livre	Hoshi <i>et al.</i> , 1966
Machos swiss mice (n=5, por dose), LD <sub>50</sub> determinado após três horas	Solução de 200, 400, 800, 1200, 1600, 2400 e 3200 mg/kg em 0,5% metilcelulose	Intraperitoneal	1900LD <sub>0</sub> , 3200LD <sub>50</sub>	A média da dose letal corresponde a LD <sub>100</sub>	Grigas <i>et al.</i> , 1973
Cães rafeiros (n=7), LD <sub>100</sub>	2mg/kg por minuto, pós-anestesia	Infusão intravenosa	767LD <sub>100</sub>		

FONTE: Adaptado de Ball, Mclellan e Bhat 2012.

### 3.2.1 Absorção, distribuição, metabolismo *in vivo* e toxicidade reprodutiva do TPA

Através de estudos com camundongos fêmeas, Hoshi e Kuretani (1967) investigaram a absorção do TPA em suspensões a 2% e 5% em um sal de carboximetilcelulose. Os animais foram eutanasiados após 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a administração do TPA. Moléculas de  $^{14}\text{C}$  foram usadas para detectar o TPA e/ou seus metabólicos na urina. As amostras de urina passaram por métodos cromatográficos de identificação para teste de detecção. Os resultados indicaram que 70% da concentração foi absorvida entre o estômago e o intestino delgado. Ainda, Hoshi *et al.* (1996) demonstraram que a concentração plasmática máxima de TPA em coelhos foi atingida em torno de 8-10 horas, logo após gavagem intragástrica de 100 a 200mg/kg de peso corporal do TPA; nesse estudo o ácido tereftálico mostrou uma meia vida de 27 horas após o tratamento.

No que diz respeito ao metabolismo, o ácido tereftálico possui uma ampla cinética, ou seja, ele é bem distribuído pelo organismo. Com o auxílio de moléculas de  $^{14}\text{C}$ , após um único tratamento por gavagem do ácido tereftálico na concentração de 85 mg/kg de peso corpóreo ou, após 1 a 3 dias de 0.5 % de TPA na dieta de camundongos (aproximadamente 250 mg/kg-dia), o rim e o fígado foram os órgãos que apresentaram maior índice de radioatividade (HOSHI; KURETANI, 1967). A radioatividade reduziu ao longo do tempo nos tecidos estudados, e não foi detectada após 48 horas da administração do ácido

Após a administração venosa ou via gavagem intragástrica, os picos cromatográficos demonstraram a presença do composto TPA e a ausência de metabólicos. Este resultado indica através dos picos cromatográficos e do tempo de retenção de amostras de urina, que o TPA não é metabolizado no rato (HOSHI; KURETANI, 1967; WOLKOWSKI-TYL *et al.*, 1982), corroborando com a afirmação que o TPA não é metabolizado *in vivo*.

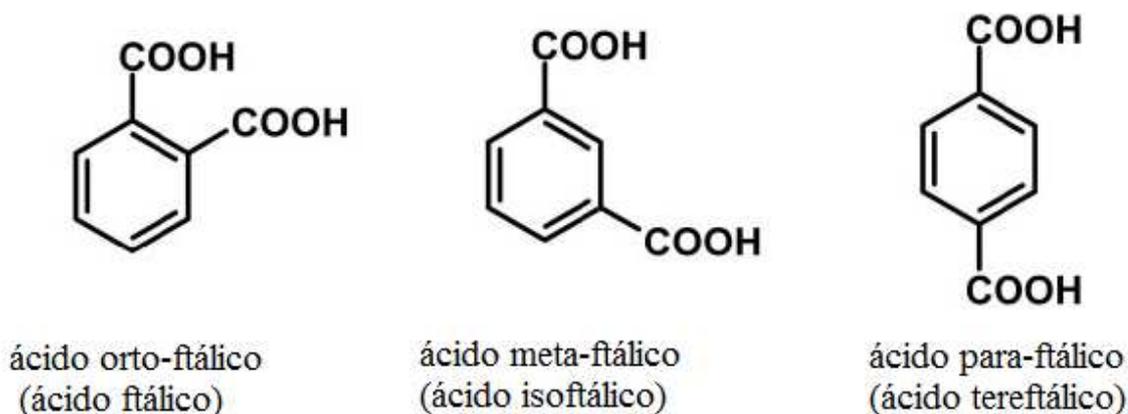
Dados da toxicologia especificamente na função testicular de camundongos administrados com o TPA, ainda são escassos. De acordo com Cui *et al.* (2004), ratos machos Sprague–Dawley administrados com TPA via gavagem na concentração 5%, com relação aos animais controle, tiveram as seguintes alterações: produção espermática diária, peso da cabeça do espermatozoide e atividade da enzima sorbitol desidrogenase (SDH) reduzidas. Conforme Kwack e Lee (2015), Sprague–Dawley que receberam as dosagens de 10, 100 e 1000 mg/kg de peso corpóreo do TPA, tiveram mudanças significativas na motilidade do espermatozoide assim

como citotoxicidade testicular *in vitro*. Sabendo-se que o TPA pode ser um possível metabólico dos ftalatos, o mesmo pode funcionar como um biomarcador para o metabolismo desses ésteres.

### 3.3 Ftalatos

Os ftalatos (diésteres de ácido ftálico, FT's) são compostos orgânicos derivados do ácido ftálico (1,2-benzeno dicarboxílico) e, normalmente apresentam baixa toxicidade (FOSTER, 2005; LOUREIRO, 2002). Representando um dos três isômeros de posição do ácido ftálico (Figura 1) o TPA é pouco solúvel em água e éster, sendo amplamente utilizado para a síntese de FTs, usados como plastificantes (BANG; LEE.I; LEE.B, 2011; BALL; MCLELLAN; BHAT, 2012).

FIGURA 1 – Fórmulas estruturais dos isômeros de posição do ácido ftálico.

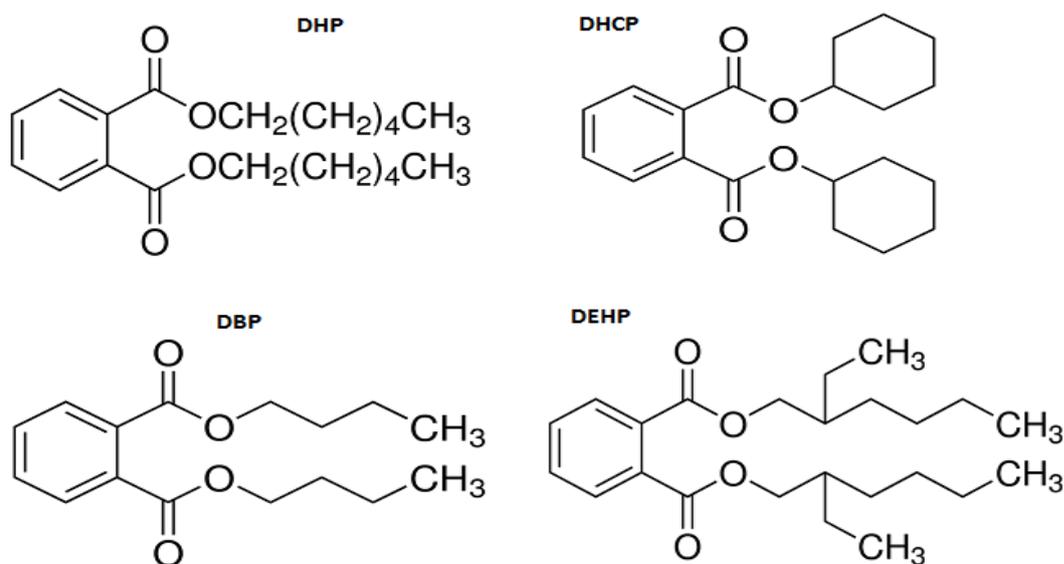


FONTE: Adaptado de BANG; LEE.I; LEE.B, 2011.

Ainda, estas substâncias orgânicas tais como, di(n-hexil)ftalato (DHP), dicloexilftalato (DHCP), di(n-butil)ftalato (DBP), di(2-etilexil)ftalato (DEHP), ilustrados na Figura 3, dentre outros, são compostos químicos que apresentam dois grupos éster ligados a um anel benzeno e são utilizados como aditivos que proporcionam maior maleabilidade aos plásticos. Estão presentes em diversos produtos de uso comum: higiene pessoal, tintas, cosméticos, embalagens de alimentos, plásticos, materiais hospitalares e brinquedos (MYLCHREEST *et al.*, 2000; LOTTRUP *et al.*, 2006). Uma outra característica dos FT's diz respeito a não se ligarem covalentemente aos polímeros com os quais são envolvidos, portanto, eles podem ser lixiviados e volatilizados ao meio ambiente ou liberados em alimentos e bebidas com os quais estiverem em contato (SERRANO *et al.*, 2014; THOMAS.J; THOMAS.M, 1994).

Os FT's são considerados interferentes no sistema reprodutivo masculino (AUHAREK *et al.*, 2010; SATHYANARAYANA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2010), sendo capazes de causarem danos em células (somáticas e germinativas), incluindo, danos no DNA. Segundo Ahabab *et al.* (2014), exposição pré-natal em ratos aos químicos DHP e DHCP, proporciona riscos genotóxicos às células testiculares em todos os estágios de desenvolvimento, incluindo a idade adulta. Ainda, Auharek *et al.* (2010) demonstraram que o tratamento com DBP em roedores no período pós-natal (em torno de 22 dias de nascimento) reduziu em média 56% o número de células de Sertoli comparado ao controle; essas células sustentam as células germinativas no processo espermatogênico espermatogênese.

FIGURA 2 – Fórmulas estruturais dos ftalatos DHP, DHCP, DBP e DEHP.



FONTE: autor

### 3.4 Sistema reprodutor masculino - estrutura testicular

O sistema reprodutor masculino dos camundongos é composto por testículos (gônadas), epidídimos, ductos deferentes, glândulas acessórias e órgão copulador (RUSSELL *et al.*, 1990; RUSSEL; FRANÇA *et al.*, 1995).

Os testículos são órgãos pares cuja função é produzir espermatozoides e andrógenos. Eles são envolvidos pela albugínea testicular, uma cápsula de tecido conjuntivo denso. Através da túnica albugínea, são emitidos septos fibrosos para o interior das gônadas, formando uma região chamada mediastino, onde se localiza a rede testicular (*rede testis*), local rico em tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Os túbulos seminíferos são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lume. No compartimento intersticial, as células mais abundantes são chamadas de células de Leydig, responsáveis pela produção de hormônios, principalmente a testosterona (MARTIN, 2016). A túnica própria reveste o túbulo seminífero externamente, sendo composta de células peritubulares mióides, membrana basal e matriz extracelular. Quanto ao epitélio seminífero, é constituído por células germinativas e pelas células de Sertoli (RUSSELL, 1990; HESS; FRANÇA, 2007). Células de Sertoli, são elementos somáticos que fornecem nutrientes para o crescimento de células germinativas (RUSSELL *et al.*, 1990), além de desencadarem o processo de diferenciação da gônada masculina através da expressão do gene Sry no braço curto do cromossomo Y (KARL; CAPEL, 1998).

O epidídimo é um órgão que pode ser dividido anatomicamente em cabeça, corpo e cauda. O epidídimo pode ser dividido em lóbulos separados por tecido conjuntivo e possui função primária de transportar os espermatozoides oriundos do testículo (FRANÇA *et al.*, 2005). Ainda, o epidídimo participa do processo de maturação espermática; ao saírem dos testículos, os espermatozoides possuem uma morfologia própria (especializada), porém são incapazes de se locomoverem e de fertilizarem o ovócito II (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Do epidídimo sai o ducto deferente que termina na uretra prostática, onde esvazia seu conteúdo. O ducto deferente relaciona-se com o transporte dos espermatozoides.

As glândulas sexuais acessórias incluem tanto as vesículas seminais como a próstata, glândula bulbouretral e glândula prepucial. As vesículas seminais são formadas com epitélio pseudoestratificado colunar rico em secreção. Ainda, a vesícula seminal secreta proteínas que participam dos processos de coagulação do ejaculado e imunoproteção dos espermatozoides; cerca de 70% do ejaculado é oriundo da vesícula seminal (ROBERTS, 2010).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2004), a próstata compreende a maior glândula sexual acessória do sistema genital masculino. Ela é constituída por uma capsula fibroeslástica rica em músculo liso que envolve um conjunto de glândulas túbulo-alveolares ramificadas. A próstata produz um líquido alcalino que neutraliza o conteúdo vaginal ácido, proporcionando nutrientes e transporte para os espermatozoides, além de diluir o sêmen (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) As glândulas bulbouretrais também são glândulas túbulo-alveolares, revestidas por um epitélio simples cúbico secretor de muco que possui função de neutralizar os vestígios de urina, assim como de lubrificar a uretra e a vagina, sendo também uma fonte de energia para os espermatozoides (CHUGHATAI *et al.*, 2005).

O pênis é constituído pela uretra e três corpos cilíndricos de tecido erétil, sendo este conjunto envolvido por pele. Os corpos cavernosos do pênis estão localizados na parte dorsal do órgão e corpo esponjoso da uretra, localizado ventralmente, e permeia a totalidade da uretra. A glande do pênis está localizada na extremidade distal do mesmo. O epitélio pseudoestratificado colunar, que na glande se transforma em estratificado pavimentoso, compreende a maior parte da uretra peniana (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

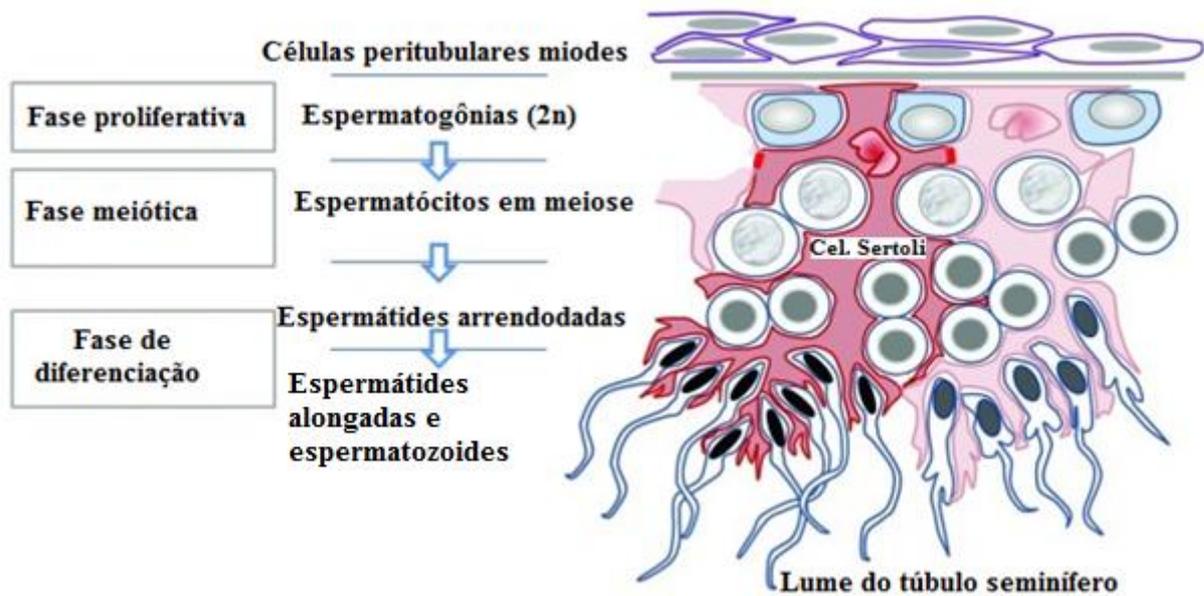
### 3.4.1 Espermatogênese

O processo espermatogênico é um evento complexo e organizado, em que células espermatogoniais se diferenciam em espermatozoides maduros nos cordões/túbulos seminíferos (NETO *et al.*, 2016; RUSSELL *et al.*, 1990). Este processo altamente coordenado, dura em média de 30 a 75 dias na maior parte dos mamíferos (COSTA *et al.*, 2013; FRANÇA; RUSSEL, 1998; FRANÇA *et al.*, 2005; HESS; FRANÇA, 2007; RUSSELL *et al.*, 1990). A espermatogênese pode ser dividida em três fases, com base em características morfofuncionais (Figura 3):

- (a) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual os diferentes tipos de espermatogônias sofrem sucessivas divisões mitóticas;
- (b) fase meiótica ou espermatocitária, na qual ocorre a duplicação o material genético e a formação de uma célula haploide (espermátide), resultado da recombinação e segregação gênica oriundo de duas divisões celulares;

(c) fase de diferenciação ou espermiogênica, em que as células haploides formadas (espermátides arredondadas) se transformam em células altamente especializadas devido a alterações morfológicas e funcionais, os espermatozoides que são células aptas para alcançar e fertilizar os ovócitos (GRISWOLD, 2016; HESS; FRANÇA, 2007; RUSSELL *et al.*, 1990).

FIGURA 3 – Etapas da espermatogênese no interior dos túbulos seminíferos.



FONTE: Adaptado de HUNTER *et al.*, 2012.

Durante a fase espermatogonial, as espermatogônias tronco (espermatogônias tipo A isoladas -  $A_{is}$ ) expandem a população espermatogonial através de sua proliferação; deste processo formam-se diferentes classes de espermatogônias (tipo A pareadas -  $A_{pr}$  e A alinhadas -  $A_{al}$ ), tipo A diferenciada ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$ ), tipo intermediária -  $I_t$  e tipo B. A formação dos espermatócitos primários é resultado da diferenciação das espermatogônias (RUSSEL *et al.*, 1990).

Na fase meiótica, os espermatócitos primários entram na primeira meiose, processo que origina os espermatócitos secundários, que ao passarem pela meiose II, transformam-se em espermatídies. Posterior a fase meiótica, tem-se a fase espermiogênica em que as espermatídies sofrem uma série de modificações morfológicas (condensação da cromatina, perda de citoplasma, formação de acrossomo reposicionamento de mitocôndrias e formação de flagelo); processo que origina os espermatozoides (CLERMONT, 1972; RUSSEL *et al.*, 1990).

Pode-se dizer que, as células germinativas organizam-se em diferentes associações celulares localizadas nos túbulos seminíferos, denominadas estádios. O ciclo do epitélio seminífero é formado pela sucessão de estádios de maneira ordenada (RUSSEL *et al.*, 1990). Ainda, os estádios do ciclo do epitélio seminífero podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (FRANÇA; RUSSELL, 1998; FRANÇA *et al.*, 2005) e pelo método do sistema acrossômico (FRANÇA *et al.*, 2005; RUSSEL *et al.*, 1990). Na primeira classificação, oito estádios dos ciclos são obtidos para todas as espécies, onde a referência de classificação é a forma e a localização das espermatídes assim como a visualização de elementos em divisão meiótica (ORTAVANT *et al.*, 1977). No método do sistema acrossômico XII estádios são identificados para camundongos de acordo com a morfologia nuclear das espermatídes. A quantidade de estádios classificados é variável entre espécies (FRANÇA *et al.*, 2005; RUSSELL *et al.*, 1990).

### 3.5 Desreguladores endócrinos

Acredita-se que o termo desreguladores endócrinos originou-se primeiramente num congresso sediado no Centro de Conferência Wingspread (Estados Unidos em julho de 1991) e a menção do termo em publicações data-se em 1992 (MATHIESSEN *et al.*, 2003; GEROLIN, 2008). De acordo com Zlatnik (2016) e Petro *et al.* (2012), desreguladores endócrinos (DE's) (em inglês, endocrine disrupting chemicals) é qualquer classe de substância química que interfere nas atividades normais do sistema hormonal. Ainda, a Agência de Proteção Ambiental (EUA) define DE's, como “agentes exógenos que interferem na síntese, transporte, secreção, metabolismo, ligação/eliminação dos hormônios naturais, transportados pelo tecido hematopoiético, reprodução e desenvolvimento” (GORE, 2008).

Juntamente com o sistema nervoso, o sistema endócrino coordena diversas funções fundamentais que implicam na secreção de hormônios (MAQBOOL *et al.*, 2015), garantindo dessa forma a homeostase corporal. Hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre os diversos tipos de células. A interação hormônio-receptor induz uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006) como, regulação da concentração de íons no sangue, pressão sanguínea, funcionamento do sistema imunológico, assim como desenvolvimento das gônadas e o crescimento celular. Uma característica preocupante com a relação entre sistema hormonal e os DE's, é a capacidade de interação entre ambos (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1997).

Muitos dos compostos classificados como DE's acumulam-se nos ecossistemas, devido ao tempo de meia-vida ser longo (BERGERON *et al.*, 1994). Em mamíferos, os DE's podem ser transmitidos aos embriões em desenvolvimento no útero, pois têm a capacidade de transpor a barreira placentária (BARR *et al.*, 2007). Estudos demonstram a indução da síntese de vitelogenina (proteína percussora da gema) no plasma de peixes, oriunda da exposição de determinadas concentrações de estrogênios naturais, que atuam como DE's. De acordo com ROUTLEDGE *et al.* (1998), duas espécies de peixes (*Oncorhynchus mykiss* e *Rutilus rutilus*) expostas por 21 dias a concentrações de estrógenos naturais, 17 $\beta$ -estradiol e estrona relevantes ao ambiente aquático (1, 10, 100 ng.L<sup>-1</sup>); o resultado dessa exposição confirma que os estrogênios identificados em efluentes domésticos são suficientes para induzir síntese de vitelogenina.

No sistema reprodutor masculino os DE's podem causar produção espermática deficitária e/ou má qualidade do sêmen, criptodismo, hipospadia e câncer testicular (Auharek *et al.*, 2010; TRAORÉ *et al.*, 2011). De maneira geral, alterações da fertilidade masculina concomitante aos tumores do sistema reprodutor masculino e o aumento das anormalidades congênitas, podem ser agrupados em uma única síndrome denominada síndrome da disgenesia testicular (SDT) que está associada a fatores genéticos bem como exposição de agentes químicos como os DE's, em diferentes fases embrionárias (WOHLFAHRT-VEJE *et al.*, 2011).

De maneira geral os DE's podem ser agrupados em duas classes (BILA; DEZOTTI, 2007):

a)-Substâncias sintéticas - pesticidas como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) e herbicidas utilizados na agricultura; dioxinas como bifenilos policlorados (PCBs) amplamente usados nas indústrias; plastificantes como ftalatos, dietilhexil ftalato (DEHP), diisononil-ftalato (DINP), butil-benzil-ftalato (BBP) , di-(n-butil) ftalato (DBP) e bisfenóis; derivados fenólicos (fenilfenóis presentes em borrachas e desinfetantes);

b)-Substâncias naturais - genisteína e metaresinol (fitoestrogênios) e estrogênios naturais, 17 $\beta$ -estradiol, estrona e estriol.

Neste contexto, Auharek *et al.* (2010) demonstraram que a exposição de ratos em período embrionário ao DBP, reduz a síntese de testosterona assim como o número de células de Sertoli ao nascimento, podendo afetar o processo de espermatogênese. Ainda, segundo Ahbab *et al.* (2014), exposição pré-natal em ratos aos químicos DHP e DHCP, pode

proporcionar riscos genotóxicos às células testiculares em todos os estágios de desenvolvimento, incluindo a idade adulta.

Estudos mostraram que a administração de substâncias como estradiol e testosterona (hormônios exógenos), altera a progressão da puberdade em roedores. Isto sugere que um fator determinante dos efeitos dos DE's é o tempo e a época de exposição ao químico (PAK, 2000). Do mesmo modo, diferentes estudos demonstraram a incidência de cânceres devido a alterações no padrão de metilação do DNA que, resultam em infertilidade masculina e outras disfunções que podem ser transmitidas às diferentes gerações da linhagem paterna devido a ocorrências à exposição de DE's (ANWAY *et al.*, 2005).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Modelo experimental**

No presente estudo 50 camundongos (10 machos e 40 fêmeas) isogênicos da linhagem C57BL/6J, oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG foram utilizados para o acasalamento. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação da Faculdade de Medicina do Mucuri (FAMMUC/UFVJM), em caixas de polipropileno e passaram por um período de adaptação, correspondente a sete dias. A luminosidade e temperatura foram controladas; os animais foram mantidos sob condições padronizadas de climatização (estante com temperatura em torno de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $55 \pm 10\%$ ). A alimentação foi constituída de água filtrada e ração comercial (Nuvilab®), *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos segundo os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados Comissão de Ética no Uso de Animais do Mucuri, protocolo 001-R-2016.

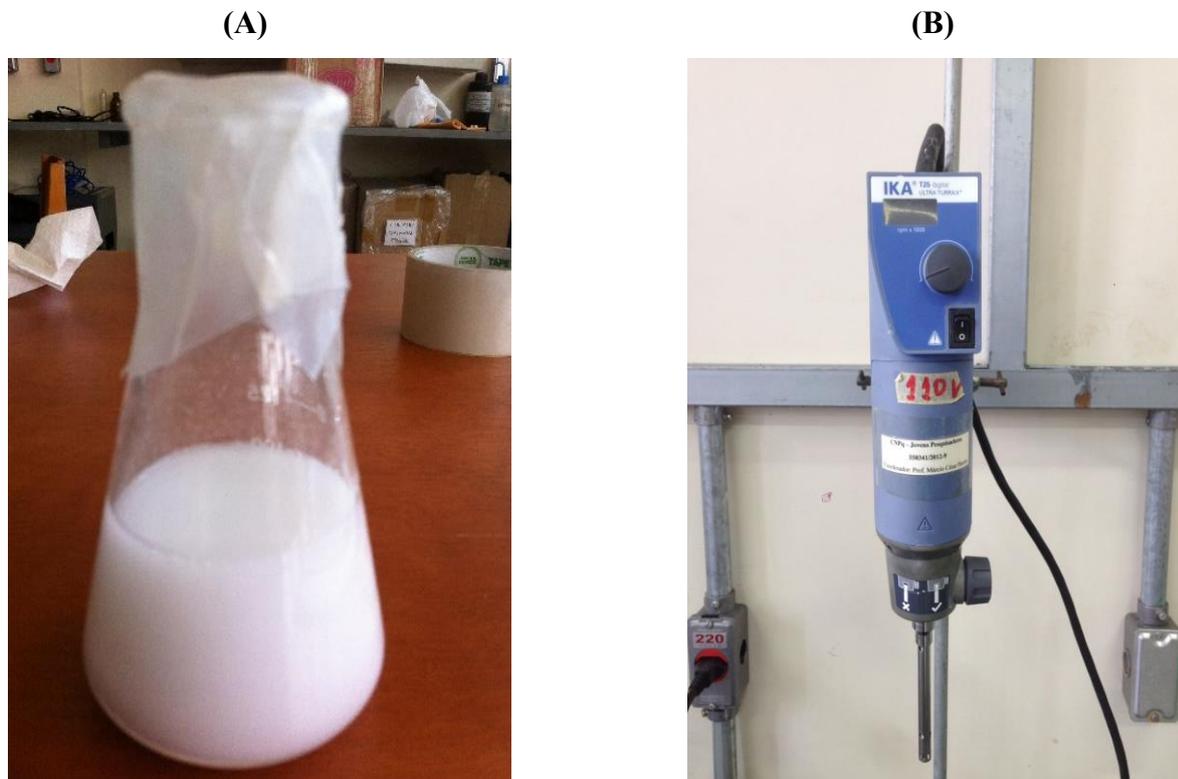
### **4.2 Preparos das dispersões**

O preparo das dispersões foi realizado no Laboratório Multiusuário de Pesquisa do Instituto de Ciência, Engenharia e Tecnologia da UFVJM, Campus do Mucuri. O TPA é uma substância praticamente insolúvel em água, em condições normais. Desta maneira, tentativas

de dissolução em alguns óleos vegetais como óleo de girassol e milho, para a posterior administração nos animais não lograram êxito, mesmo aquecendo os óleos. Para conseguir um veículo adequado, com pouca viscosidade e ausência de toxicidade, utilizou-se a carboximetilcelulose para o preparo das dispersões, segundo Hoshi e Kuretani (1967).

Pesou-se 0,5g de carboximetilcelulose (Synth, BRA) e 100g de água ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ), obtendo-se uma dispersão de 0,5 % p/v. Essa dispersão foi usada como solvente para o preparo de outras duas: 0,0014 (TPA<sub>1</sub>) e 0,56 (TPA<sub>2</sub>) g/ml de ácido tereftálico (Sigma Aldrich, USA) em carboximetilcelulose. As concentrações de TPA citadas acima correspondem, respectivamente a 10 e 4.000 vezes a dose diária estimada (1,4 mg/kg de peso corpóreo) de TPA para humanos (ACGIH, 1996). Ainda, Cui *et al.* (2004) indicaram que a concentração de 4.000 vezes preconizada para humanos (1,4 mg/kg de peso corporal) induz alterações na espermatogênese de ratos. A Figura 4(A), (B) ilustra o TPA<sub>2</sub> e o homogeneizador T18 Digital Ultra Turrax, respectivamente, utilizado para o preparo de todas as dispersões utilizadas no presente trabalho.

**FIGURA 4** – Foto da dispersão de TPA<sub>2</sub> (A) e do homogeneizador T25 Digital Ultra Turrax (B) usado na preparação.



FONTE: Arquivo do autor (A e B).

### 4.3 Tratamentos dos animais

Os animais foram submetidos ao cruzamento *overnight*, na proporção de um macho para quatro fêmeas. Foi designado como dia gestacional-0,5 (DG0.5), o dia da maternidade, identificado pelo aparecimento do plug/tampão vaginal (Figura 5). O dia do nascimento designou-se dia pós-natal 1 (PND1). Os camundongos receberam via intragástrica (gavage) as doses das dispersões controles, TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub>. Desta forma, foram pipetados volumes referentes a 0,1 mL/10 g de peso corpóreo dos camundongos, das dispersões para o tratamento dos animais em quatro grupos distintos de desenvolvimento:

- Grupo I- *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), com eutanásia aos 18.5 dias;
- Grupo II- *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 15 dias
- Grupo III- *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) com eutanásia aos 70 dias (idade de maturidade sexual, PND70);

- Grupo IV- *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 70 dias, PND70.

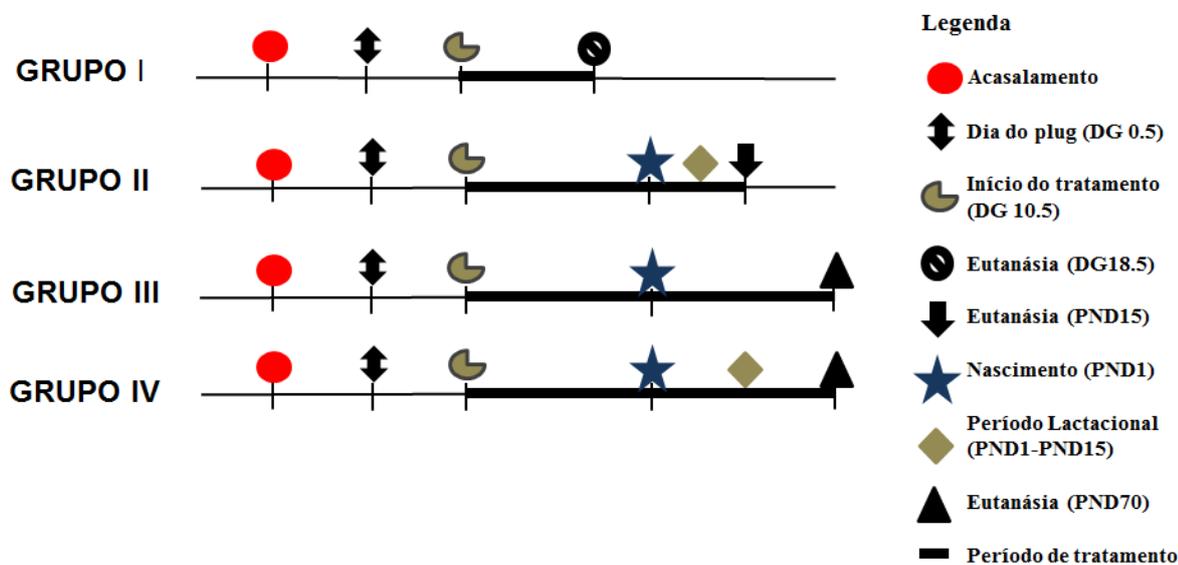
**FIGURA 5** – Imagem do aparecimento do plug vaginal, indicado pela seta.



FONTE: Arquivo do autor.

O grupo controle recebeu somente a dispersão de carboximetilcelulose, via gavagem, nas mesmas janelas descritas anteriormente. O delineamento experimental é ilustrado na Figura 6. O número amostral (n) por grupo experimental (I, II, III e IV) foi mínimo de quatro animais. Foram estimados no dia de eutanásia dados biométricos tais como índice gonadosomático (relação percentual entre a massa testicular e o peso corporal), índice anogenital (animais jovens DG18.5 e PND15), distância anogenital (animais sexualmente maduros) e o tamanho do pênis. Para mensuração do tamanho do pênis e do índice anogenital/distância anogenital utilizou-se um paquímetro digital.

FIGURA 6 – Delineamento experimental dos animais tratados



FONTE: Arquivo do autor.

#### 4.4 Coleta e processamento histológico dos testículos

No processamento histológico utilizou-se os seguintes reagentes e soluções:

- ✓ tampão fosfato 0,2M, preparado a partir da mistura de duas soluções, solução A proveniente da pesagem de 24,0 g de dihidrogenofosfato de sódio, ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Synth, BRA) misturados em 1L de água destilada; solução B preparada a partir da pesagem de 53,7 g de hidrogeno fosfato de sódio heptahidratado ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Synth, BRA) misturados em 1L de água destilada; solução final, oriunda da mistura de 230 mL da solução A com 770 mL da solução B originando-se o tampão fosfato 0,2M.
- ✓ 80 mL de glutaraldeído (pentanodial-50%) ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ , Synth, BRA) misturados com 250 mL de tampão fosfato 0,2M, completou-se com água destilada até o volume de 1L, mediu-se o pH até atingir o valor de 7,4; solução final de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,05M.

Devido ao pequeno porte dos camundongos com idade de 18.5 dias, os testículos esquerdos desses animais foram fixados por imersão em mistura glutaraldeído 4 % em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, após a dose letal do anestésico tiopental sódico, via intraperitoneal, na dosagem de 120 mg/kg de peso corporal (HRAPKIEWICZ *et al.*, 1998). Os testículos foram

coletados e pesados; posteriormente os órgãos foram armazenados em um freezer até o processamento histológico. Os testículos direitos foram congelados – 20 C° após a pesagem para análises cromatográfica futura.

Já os testículos dos camundongos das demais idades investigadas (15 e 70 dias) foram fixados por perfusão intra-ventricular esquerda (SPRANDO, 1990). Aproximadamente 15 minutos antes da perfusão os animais receberam heparina (125 UI/Kg de peso corporal). A eutanásia desses roedores também foi feita pela administração de uma dose letal do anestésico tiopental sódico. Posteriormente, um cateter (22G = 1 mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular foi perfundido com solução salina 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Após a lavagem do leito vascular os testículos do lado direito, foram coletados, pesados e reservados para testes futuros. Logo após foi iniciada a perfusão com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, processo que durou de 25 a 30 min. Após o tempo descrito para a perfusão, os testículos foram retirados e cortados em fragmentos com espessura de 1 a 2 mm. Os fragmentos foram reafixados por imersão no mesmo tipo de fixador descrito, por 24 horas a 4 C°.

Posteriormente, os tecidos fixados passaram pela bateria de desidratação, processo de retirada da água pois, a mesma é polar e não interage com substâncias apolares como a resina usada para inclusão dos tecidos. As desidratações dos fragmentos dos testículos foram feitas por soluções alcoólicas (etanol, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, NEON) crescentes (50, 70, 80, 95, 95% e álcool absoluto (MERCK), cobrindo os fragmentos teciduais com volumes de 10 a 20 vezes maiores que os fragmentos. Após a última desidratação com o álcool absoluto, os fragmentos foram colocados em frascos contendo mistura de álcool absoluto com a resina (1:1) utilizada para a inclusão, ficando no freezer *overnight*. Após as 24 horas nessa mistura, os tecidos foram incluídos em resina (LEICA) e ficaram em estufa à temperatura de 25 C° por 24 horas. Os cortes com espessura de 4 µm, foram obtidos com o micrótomo rotativo Leica (RM 2255, Germany). As navalhas de vidro utilizadas foram produzidas no dispositivo para confecção de navalhas Leica (EM KMR3, Austria). Para a coloração dos cortes histológicos foi utilizado o corante azul de toluidina (Merck, BRA). As lâminas foram montadas com Etellan (Merck, BRA).

## 4.6 Análises histológicas

Estudos histomorfométricos foram realizados para avaliar a morfologia testicular dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos *in vivo*. Estas análises foram feitas através do microscópio trinocular Leica (DM1000, Germany) para captura de imagens, e do programa ImageJ. Todas as análises morfométricas seguiram metodologias já estabelecidas na literatura (FRANÇA; GODINHO, 2003; LEAL; AUHAREK; FRANÇA, 2010; AUHAREK *et al.*, 2011; AUHAREK *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013). Neste sentido, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- a) Diâmetro tubular/cordão;
- b) Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do testículo;
- c) Proporção núcleo/citoplasma das células de Leydig;
- d) Volume, nuclear, citoplasmático e individual de células de Leydig, volume individual da célula de Sertoli;
- e) Número de células de Sertoli e de células de Leydig por testículo;

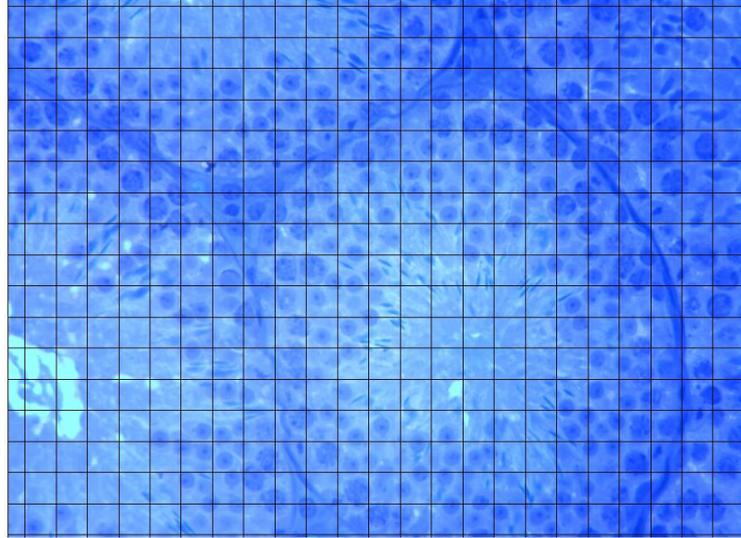
### 4.6.1 Diâmetro tubular

A mensuração do diâmetro tubular médio foi realizada de 20 secções aleatórias de túbulos seminíferos com melhor contorno circular, utilizando-se do programa ImageJ. As imagens digitais foram feitas utilizando-se ocular micrométrica 10x, sendo aumento final de 400x.

### 4.6.2 Proporções volumétricas

O estudo da proporção volumétrica dos componentes testiculares foi estimado a partir da contagem de 475 pontos por campo, oriundo das imagens digitais. Como foi utilizado 15 campos aleatórios para cada animal, a proporção volumétrica dos componentes tubulares e intertubulares foi estimada por um total de 7125 pontos projetados em um grid retangular fornecido pelo Programa Image J. A Figura 7 ilustra a tela do programa com o grid utilizado no presente trabalho.

**FIGURA 7** – Grid retangular utilizado no programa ImageJ para a estimação dos pontos projetados sob a imagem histológica digital.



FONTE: arquivo do autor.

Após os cálculos da proporção volumétrica, foram estimados os volumes em mL de cada componente testicular, a partir do volume líquido do testículo. O valor do volume líquido testicular foi obtido pela subtração entre o peso bruto do testículo e o peso da túnica albugínea, que em camundongos é estimada em 3,5% do peso testicular. De acordo com França (1991), a densidade do testículo está entre 1,03 e 1,04, ou seja, muito próxima de 1. Desta maneira os valores do peso testicular podem ser considerados iguais ao seu volume. A equação para calcular o volume de cada elemento testicular analisado na proporção volumétrica, e demonstrada abaixo:

$$V_{\mu m} = V_t P / 100 \quad (1)$$

Onde  $V_{\mu m}$  é o volume ( $\mu\text{L}$ ) de um determinado elemento no testículo,  $V_t$  ( $\mu\text{L}$ ) é o volume total do parênquima testicular e P é a porcentagem (%) ocupada por um determinado componente testicular (FRANÇA; GODINHO, 2003; LEAL; AUHAREK; FRANÇA, 2010; AUHAREK *et al.*, 2011; AUHAREK *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013).

#### 4.6.3 Proporção núcleo/citoplasma das células de Leydig

Para a proporção núcleo/citoplasma das células de Leydig, primeiramente foi feita uma contagem 475 pontos para cada campo aleatório dos 20 campos selecionados, semelhante à Figura 6. O objetivo desta contagem foi estabelecer o número de pontos sob o núcleo e o citoplasma das células de Leydig. Desta forma, para o cálculo da proporção núcleo/citoplasma das células de Leydig utilizou-se a seguinte equação:

$$P_{n/c} = Q_{n/c}/T \quad (2)$$

onde  $P_{n/c}$  representa a porcentagem (%) de núcleo ou citoplasma em cada animal,  $Q_{n/c}$  representa a quantidade de pontos sob o núcleo ou citoplasma para cada animal e  $T$  o total de ponto que pode ser verificado pela dos pontos encontrados sob o núcleo e os pontos sob o citoplasma das células de Leydig de cada animal. Os subscritos  $n/c$  nesta equação dizem respeito aos cálculos sob o núcleo ( $n$ ) e citoplasma ( $c$ ), respectivamente (FRANÇA; GODINHO, 2003; LEAL; AUHAREK; FRANÇA, 2010; AUHAREK *et al.*, 2011; AUHAREK *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013).

#### 4.6.4 Volume nuclear, citoplasmático e individual de células de Leydig e volume nuclear da célula de Sertoli

Para a mensuração do volume nuclear das células de Leydig e Sertoli, foi utilizado a seguinte equação:

$$V_n = 4/3\pi r^3 \quad (3)$$

onde  $V_n$  ( $\mu\text{m}^3$ ) é o volume nuclear das células de Leydig e Sertoli,  $\pi$  equivale a 3,1416 e  $r^3$  é o raio levado à terceira potência a partir do diâmetro nuclear encontrado. O diâmetro médio foi mesurado dos diâmetros de 40 núcleos por animal.

O volume citoplasmático das células de Leydig, foi calculado utilizando-se a equação a seguir:

$$V_c = P_c V_n / P_n \quad (4)$$

onde  $V_c$  ( $\mu\text{m}^3$ ) é o volume citoplasmático,  $P_c$  é a porcentagem de citoplasma obtida na proporção núcleo/citoplasma,  $V_n$  ( $\mu\text{m}^3$ ) é o volume nuclear e  $P_n$  (%) é a porcentagem de núcleo obtida na proporção núcleo/citoplasma (FRANÇA; GODINHO, 2003; LEAL; F; AUHAREK; FRANÇA, 2010; AUHAREK *et al.*, 2011; AUHAREK *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013).

#### 4.6.5 Número de células de Sertoli e de células de Leydig por testículo

Conhecendo o volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Sertoli e tendo em vista a proporção volumétrica (%) e o volume total ( $\mu\text{L}^3$ ) ocupado pelas mesmas no testículo, o número de células de Sertoli por testículo foi calculado através da equação a seguir:

$$N_{SC} = V_t/V_n \quad (5)$$

onde,  $N_{SC}$  corresponde o número de células de Sertoli por testículo ( $\times 10^6$ ),  $V_t$  ( $\mu\text{L}^3$ ) volume líquido de células de Sertoli no parênquima testicular e  $V_n$  o volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ) da célula de Sertoli.

O número de células de Leydig por testículo, foi determinado segundo a equação abaixo:

$$N_{LC} = V_l/V_n \quad (6)$$

onde  $N_{LC}$  corresponde ao número de células de Leydig por testículo ( $\times 10^6$ ),  $V_l$  o volume líquido desta célula no testículo no testículo (mL), oriundo da proporção volumétrica e  $V_n$  o volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ) da célula de Leydig (FRANÇA; GODINHO, 2003; LEAL; AUHAREK; FRANÇA, 2010; AUHAREK *et al.*, 2011; AUHAREK *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013).

#### 4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do programa “Excel for Windows”, sendo estimadas as médias, desvios padrões e erros padrões da média (EPM). Os dados apresentados no presente estudo foram expressos como média  $\pm$  EPM. O teste ANOVA e o pós teste Bonferroni foram efetuados através do programa GraphPad Prism (version 5; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dados biométricos

Os dados referentes ao peso corporal dos camundongos controles, e tratados com TPA estão ilustrados na Figura 8-A. Conforme pode ser observado nesta figura, o peso corporal foi semelhante entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) nos animais eutanasiados na idade de 70 dias (maturidade sexual), referente aos grupos III e IV. Conforme relatado na literatura para ratos Sprague–Dawley (CUI *et al.*, 2004), o peso corporal de machos adultos tratados com o TPA (0, 2, 1 e 5%,) durante noventa dias, não apresentou diferenças significativas. No presente estudo somente o tratamento com TPA<sub>2</sub>, foi capaz de diminuir ( $p < 0,05$ ) o peso corporal dos animais eutanasiados em 18.5 dias (grupo I). Estes achados corroboram o observado para ratos uma vez que Wolkowski-Tyl *et al.* (1982) mostraram uma diminuição de peso corporal de animais tratados *in útero* com TPA, com eutanásia no final do período gestacional. Similar ao constatado no grupo I administrado com o TPA<sub>2</sub>, os animais eutanasiados aos 15 dias demonstraram uma redução ( $p < 0,05$ ) do peso corporal com o tratamento com a maior concentração de TPA. A literatura cita que os FT's afetam as secreções de hormônios tireoidianos (BOAS *et al.*, 2010; HOWARTH *et al.*, 2001; CHOI; YOO; LEE, 2004). Estudos conduzidos por Huanq *et al.* (2017), demonstraram que um grupo de adultos taiwaneses, expostos de forma geral cotidiana (inalação, contato dérmico, ingestão), aos FT's mais comuns como DEHP e DHP, apresentaram os níveis de tiroxina (T<sub>4</sub>) reduzidos, assim como alterações no hormônio de crescimento (GH) e do fator de crescimento insulina -1 (IGF-1). Ainda, Coulombe, Schwartz e Oppenheimer (1978), demonstrou que animais tratados com e triiodotironina (T<sub>3</sub>) e T<sub>4</sub> apresentaram redução da hipófise, quando comparado aos controles eutireoideos.

Tendo em vista que alterações dos níveis normais dos hormônios tireoidianos afetam o GH na hipófise (FADLALLA *et al.*, 2017), a redução ( $p < 0,05$ ) do peso corporal dos animais dos grupos I e II tratados com o TPA<sub>2</sub> quando comparado aos camundongos controle, pode estar relacionada em parte a uma diminuição das concentrações de hormônio do crescimento na hipófise.

De maneira interessante o peso corporal dos animais tratados com o TPA<sub>1</sub> apresentou-se maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos controles. Este fato pode estar relacionado

a uma correlação inversa entre tamanho de ninhada e peso corporal médio da prole dos roedores (LEON; WOODSIDE; 1983).

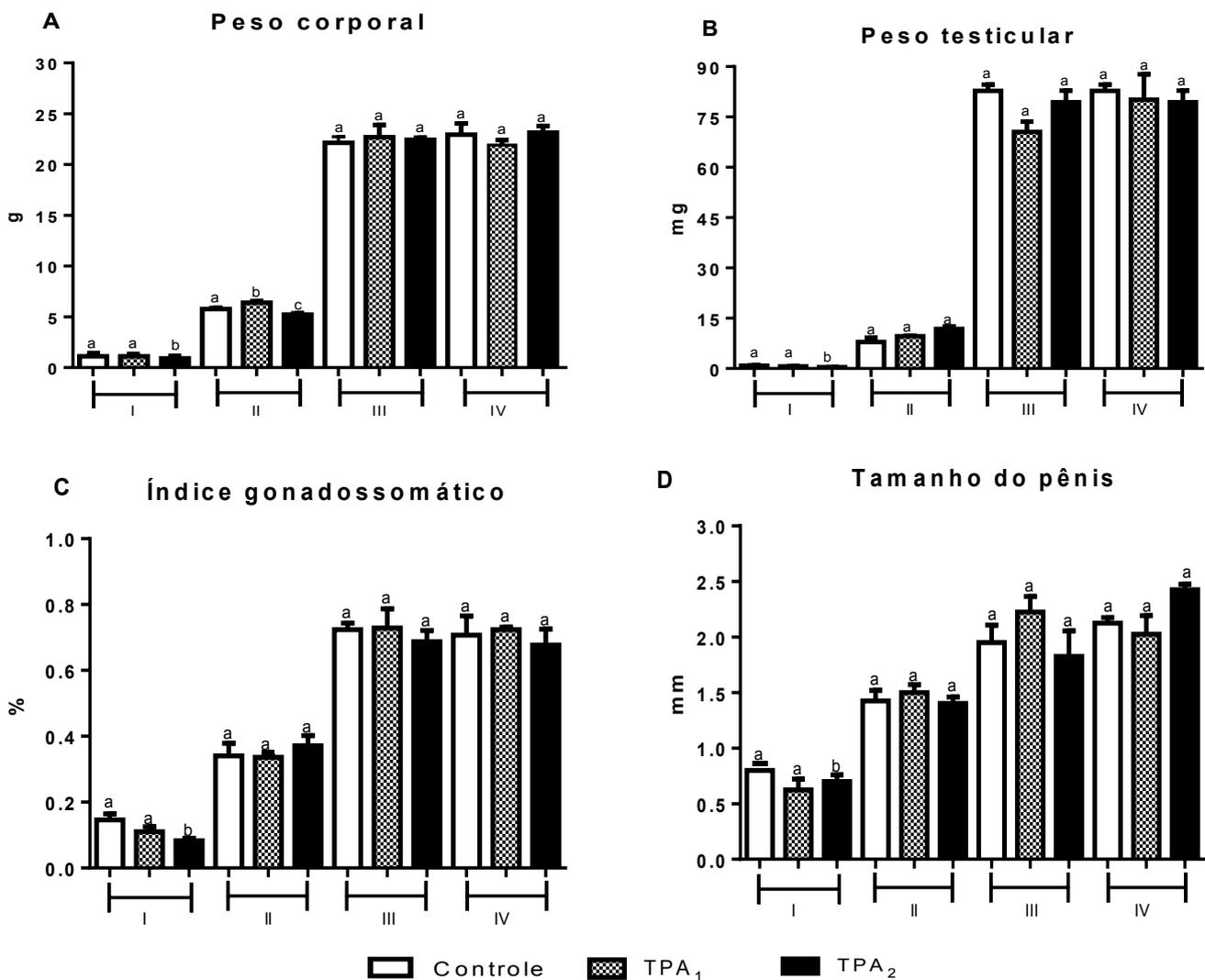
Os valores médios obtidos para o peso testicular e índice gonadossomático (IGS) estão ilustrados na Figura 8 (B) e (C), respectivamente. Comparando-se os animais controle aos tratados com TPA não houve diferenças significativas de peso testicular, referentes aos grupos III e IV. Este achado é semelhante aos dados de Cui *et al.* (2004), no que diz respeito ao peso testicular de machos sexualmente maduros tratados com o ácido tereftálico. Entretanto, os animais que receberam o TPA<sub>2</sub> e foram eutanasiados aos 18.5 dias, apresentaram diminuição ( $p < 0,05$ ) no peso testicular. Este achado é similar ao encontrado por Ball, Mclellan e Bhat (2012), que demonstram redução de peso testicular de roedores administrados com TPA em altas concentrações (3200 mg/kg de peso corporal).

Considerando que o número de células de Sertoli é o determinante primário do peso testicular e produção espermática (FRANÇA *et al.*, 2000; SHARPE *et al.*, 2003), este parâmetro também foi investigado no presente estudo. De acordo com Scott *et al.* (2007), a exposição de ratos *in utero* ao DBP reduziu em 40% o número de células de Sertoli no final do período gestacional. Ainda, Auharek *et al.* (2010) demonstrou uma redução significativa de 56% no número de células de Sertoli no final do período gestacional, de ratos tratados com 500 mg/kg de peso corporal de DBP em relação aos controles. O presente trabalho mensurou o número de células de Sertoli por testículo sendo que, o TPA<sub>2</sub> foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) o número de células de Sertoli dos camundongos eutanasiados aos 18.5 dias (final do período gestacional), em relação aos controles (Figura 12(B)). O TPA<sub>2</sub> ainda refletiu diretamente no índice gonadossomático (IGS) que reduziu ( $p < 0,05$ ) somente nos animais do grupo I, quando comparado aos controles. Conforme esperado, a diminuição do IGS é reflexo do observado para peso corporal e testicular dos animais desse grupo, sabendo-se que o peso do testículo representa um determinado percentual do peso corporal (SETCHELL; BREED, 2006). Desta forma, a redução ( $p < 0,05$ ) do número de células de Sertoli é responsável pelas diminuições do peso testicular e IGS, dos animais tratados com o TPA<sub>2</sub> eutanasiados aos 18.5 dias.

Ainda, através da Figura 8-D pode-se constatar que o tratamento com o TPA<sub>2</sub> foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) os valores médios do tamanho pênis somente nos animais do grupo I com relação aos camundongos controle e, quando comparados com outras janelas experimentais de tratamento (II, III e IV). Tendo em vista que os FT's estão presentes de forma difusa no meio ambiente, Bustamante-Montes *et al.* (2013) demonstra que recém-nascidos do

sexo masculino na capital do México, apresentaram uma redução no comprimento do pênis, relacionados com a média da população de recém-nascidos mexicanos de estudos anteriores. Estudos na literatura apontam que o tamanho do pênis e ADG são excelentes leitores indiretos da exposição/ação de andrógenos no período fetal (VAN DEN DRIESCHE, 2011; WELSH *et al.*, 2010) o que, a princípio sugere, reduzida produção/ação dos andrógenos nesta janela de tratamento. Ademais, houve uma diminuição ( $p < 0,05$ ) do número de células de Leydig, dos animais do grupo I tratados com o TPA<sub>2</sub>, ilustrado pela Figura 11 (D), indicando um paralelismo entre os dados encontrados.

**Figura 8** Peso corporal (A), testicular (B), índice gonadossomático (C) e tamanho do pênis (D) dos animais tratados com dispersões controle, TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub> (média  $\pm$  EPM). Os números romanos representam grupos experimentais, Grupo I tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), com eutanásia aos 18.5 dias; Grupo II tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 15 dias; Grupo III tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) com eutanásia aos 70 dias; Grupo IV tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 70 dias. Letras distintas no mesmo grupo denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

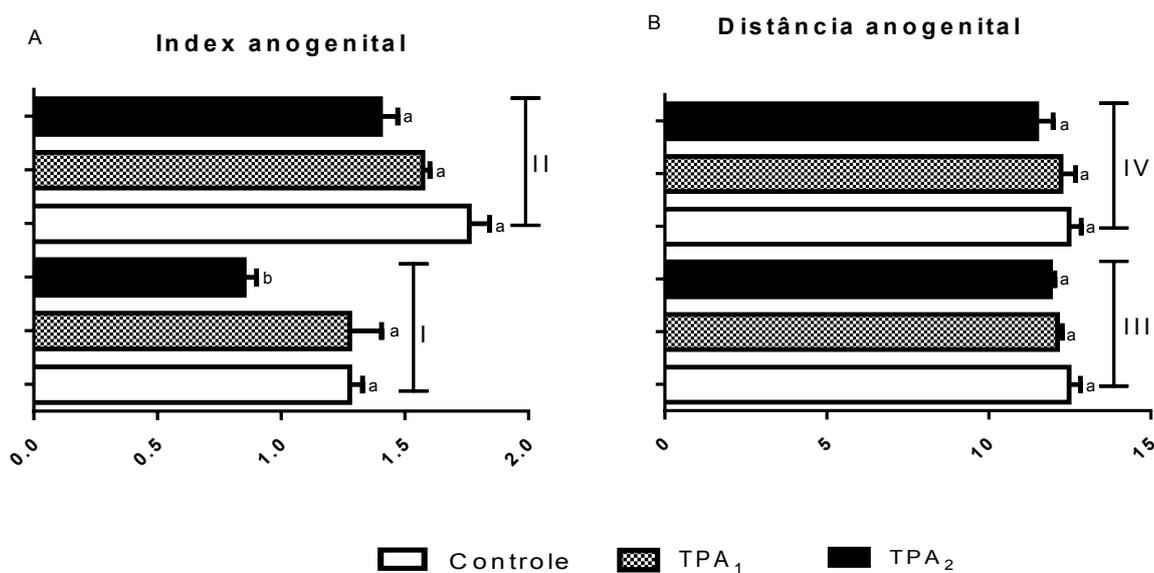


## 5.2 Index/distância anogenital

Os dados referentes ao index/distância anogenital dos camundongos controle e tratados com TPA, estão ilustrados na Figura 9 (A) e (B), respectivamente. A figura supracitada demonstra uma redução ( $p < 0,05$ ) do index anogenital dos animais eutanasiados aos 18.5 dias, tratados com o TPA<sub>2</sub> com relação aos controles. Ainda, percebe-se uma tendência ( $p > 0,05$ ) de redução da AGD dos animais do grupo II. Os animais dos grupos III e IV apresentaram AGD semelhantes ( $p > 0,05$ ) aos tratamentos com o TPA e controle.

Gray *et al.* (2000) e Mylchreest *et al.* (2000), conduziram estudos de exposição dos FT's DBP e DEHP em ratos no período gestacional e, demonstraram que esses ésteres reduziram a AGD devido a inibição de testosterona testicular. Neste mesmo contexto, Borch *et al.* (2006) determinaram que mesmo apresentando baixa toxicidade aguda em roedores, altas concentrações de FT's reduzem a AGD, fato este relacionado com uma redução da produção de testosterona observada nos machos no final da gestação. Senso assim, a literatura demonstrou em ratos que, existe uma curta janela para a programação androgênica pré-natal (entre os dias 15 a 18 de gestação), fortalecendo o uso do parâmetro AGD como marcador da síntese/ação androgênica no período pré-natal (WELSH *et al.*, 2010; VAN DEN DRIESCHE *et al.*, 2011). Apesar de não termos mensurado concentrações de andrógenos no presente trabalho, o TPA<sub>2</sub> foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) o número de células de Leydig (Figura 10(D)), com relação aos animais controles. Deste modo, o número reduzido ( $p < 0,05$ ) de células de Leydig dos animais que receberam maior concentração de TPA em relação aos animais controle, são responsáveis pela redução ( $p < 0,05$ ) do tamanho do pênis e pela diminuição ( $p < 0,05$ ) da AGD, demonstrados pelos animais do grupo I.

**Figura 9** – Index anogenital (A) e distância anogenital (B) dos animais tratados com as dispersões controle, TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub>, (média ± EPM). Os números romanos representam grupos experimentais, Grupo I tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), com eutanásia aos 18.5 dias; Grupo II tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 15 dias; Grupo III tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) com eutanásia aos 70 dias; Grupo IV tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 70 dias. Letras distintas no mesmo grupo denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



### 5.3 Morfometria testicular

#### 5.3.1 Compartimento tubular

Os dados referentes ao diâmetro tubular e proporção volumétrica dos elementos do testículo dos camundongos controle e tratados com TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub>, são demonstrados na Tabela 3. Conforme pode ser observado nessa tabela, o diâmetro tubular foi semelhante ( $p > 0,05$ ) entre os animais controle e tratados com TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub> nos grupos I, III e IV. Entretanto, o TPA<sub>2</sub> aumentou ( $p < 0,05$ ) o diâmetro tubular dos animais eutanasiados aos 15 dias.

Componentes e compartimentos testiculares, são elementos que contribuem para o tamanho e volume do testículo, assim como o diâmetro dos túbulos seminíferos (IBRRHEM, AL-SAHAF; ALWAN, 2014, TRIPATHI *et al.*, 2014). Relatos na literatura apontam que a maturação e ou diferenciação dos elementos somáticos do testículo são intimamente relacionados à cinética do processo espermatogênico (FRANÇA *et al.*, 1995). Sendo assim,

Miranda (2006) mostrou que o grau de maturação das células de Sertoli durante o desenvolvimento pós-natal dos testículos de mamíferos, são ambos processos mais bem refletidos pelo diâmetro tubular. Entretanto, o presente estudo não demonstrou diferenças significativas em parâmetros das células de Sertoli para os camundongos do grupo II tratados com o TPA e o controle, como núcleo e número de células por testículo, conforme Figura 12 (A) e (B), respectivamente. Desta maneira, o aumento ( $p > 0,05$ ) no diâmetro tubular dos animais administrados com o TPA<sub>2</sub> com relação ao controle, descrita anteriormente, é devida em partes, às alterações percentuais de outros elementos testiculares como, o aumento ( $p < 0,05$ ) do epitélio seminífero e lume (Tabela 3).

O epitélio seminífero seguiu a mesma tendência estatística demonstrada para o diâmetro tubular. Somente o TPA<sub>2</sub> foi capaz de aumentar ( $p < 0,05$ ) o epitélio seminífero nos animais do grupo II, permanecendo este parâmetro nos outros grupos de experimentação sem alterações significativas quando comparados ao controle. Este dado indica um paralelismo com o aumento ( $p < 0,05$ ) do lume dos animais do mesmo grupo anterior (eutanasiados aos 15 dias) administrados com a maior concentração de TPA, conforme demonstrado na Tabela 3 e ilustrado pela Figura 10(D, E, F). Os camundongos dos grupos I, III e IV não sofreram alterações ( $p > 0,05$ ) no lume. A formação do lume tubular é um processo consequente à secreção de fluido testicular, sendo um significativo registro funcional que retrata o grau de diferenciação e secreção desse fluido oriundo das células de Sertoli (AUHAREK *et al.*, 2010; SHARPE, 2005). A literatura confirma que alterações nas concentrações de hormônios tireoidianos são capazes de modificar a secreção de fluido pelas células de Sertoli, devido a alteração do processo de maturação e diferenciação dessas células (AUHAREK; FRANÇA, 2010; FRANÇA *et al.*, 1995; MIRANDA, 2006 VAN HAASTER *et al.*, 1993). Embora o presente trabalho não tenha mensurado concentrações de hormônios tireoidianos, Palmero *et al.* (1989) demonstraram a presença do mRNA para o receptor tireoidiano nas células de Sertoli. O aumento da luminação observado nos animais do grupo II tratados com o TPA<sub>2</sub> comparados aos camundongos controle, sugere um adiantamento da espermatogênese, hipótese que é reforçada pelo aumento ( $p < 0,05$ ) do epitélio seminífero.

### 5.3.2 Compartimento intertubular

O compartimento intertubular dos animais dos camundongos eutanasiados aos 15 dias, reduziu ( $p < 0,05$ ) naqueles tratados com a maior concentração do TPA em relação aos

controles. Conforme a Tabela 3, os grupos I, III e IV apresentaram esse parâmetro testicular semelhantes ( $p > 0,05$ ) com relação aos tratamentos controle e com o TPA. O compartimento intertubular ou intersticial compreende as células de Leydig, vasos/capilares sanguíneos, espaço linfático, tecido conjuntivo e outros tipos celulares (RUSSELL *et al.*, 1990). Assim sendo, a redução ( $p < 0,05$ ) do espaço intertubular descrita anteriormente, dever ser explicada pela diminuição ( $p < 0,05$ ) dos constituintes do espaço intersticial tratados com o TPA<sub>2</sub>, conforme demonstrado na Tabela 3.

A célula de Leydig é a maior fonte de andrógeno nos machos e, de maneira geral, representa o tipo celular mais abundante do compartimento intertubular (FRANÇA; RUSSEL, 1998; HAIDER 2004). De acordo com a Tabela 3, os animais do grupo II tratados com o TPA<sub>2</sub> comparados ao controle, apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) na proporção de células Leydig, diferentemente do que é demonstrado para os demais grupos em que a proporção de células de Leydig foi semelhante ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Conforme Harris *et al.* (1997), ftalatos exibem limitada atividade androgênica, existindo um consenso que ésteres de ácido ftálico são antiandrogênicos (HU *et al.*, 2009). A administração de ftalatos no período pós-natal até a puberdade, mostrou efeitos significativos na redução da produção de testosterona e no número de células de Leydig. De acordo com Akingbemi *et al.* (2001), ratos que receberam o DEHP nas concentrações de 100 mg/kg de peso corporal sob a forma pulverizada, apresentaram uma redução significativa na síntese de testosterona e um aumento no número de células de Leydig, no período gestacional até à puberdade. Entretanto presente estudo demonstrou uma semelhança ( $p > 0,05$ ) no número de células de Leydig por testículo (Figura 11-D), dos animais eutanasiados aos 15 dias e tratados com o TPA<sub>2</sub>. Chen *et al.* (2017) demonstraram que camundongos tratados no período gestacional até a puberdade, com a concentração 500mg/kg por peso corporal do DBP, tiveram uma agregação aumentada de células de Leydig fetais. Este fato pode ter retardado esse grupo de células levando a um desenvolvimento interrompido das células de Leydig no período da puberdade, o que pode explicar o número reduzido ( $p < 0,05$ ) da proporção de células de Leydig dos animais do grupo II tratados com o TPA<sub>2</sub> com relação ao controle.

A análise histológica qualitativa dos testículos indica um aumento da quantidade de capilares/vasos sanguíneos nos animais eutanasiados aos 18.5 dias, tratados com TPA com relação aos animais controle, como é ilustrado na Figura 10. Em conformidade à análise qualitativa, a proporção volumétrica (Tabela 3) constata o aumento percentual ( $p < 0,05$ ) de capilares/vasos sanguíneos dos animais tratados com o TPA em ambas concentrações, pertencentes aos Grupo I, indicando uma alteração no processo angiogênico. Os grupos II, III

e IV apresentaram-se semelhante na proporção de capilares/vasos sanguíneos, quando comparados os camundongos controle e tratados com o TPA.

Angiogênese pode ser definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos através de vasos anteriores (RISAU, 1997; VAN MOORSELAAR; VOEST, 2002). Dentre os numerosos fatores envolvidos no processo angiogênico, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) exerce papel essencial no crescimento e renovação tecidual. Uma característica da diferenciação do testículo previsto no processo embriogênico é a vascularização específica, devido à migração das células endoteliais do mesonefro adjacente com finalidade de envolver o agregado de células de Sertoli e, induzir a formação do cordão seminífero (SARGENT et al., 2015). Sendo assim, o aumento percentual de capilares/vasos sanguíneos nos animais do grupo I pode estar relacionado ao processo de renovação celular estimulado por complexos polipeptídicos. De acordo com Ryzhak *et al.* (2017), os complexos de polipéptidos podem reduzir a expressão de fatores apoptóticos p53 (fator de transcrição que regula o ciclo celular) e caspase 3 (proteína pró-apoptótica) e aumentaram a expressão da proteína de proliferação Ki-67 (proteína nuclear). Possivelmente, o ácido tereftálico possui efeito no VEGF, uma glicoproteína dimétrica envolvida, assim como os complexos polipeptídicos, no processo de angiogênese tecidual.

Através da Tabela 3, ainda é possível observar um aumento ( $p < 0,05$ ) no espaço linfático dos animais pertencentes ao grupo I tratados somente com o TPA<sub>2</sub>, assim como uma redução significativa do tecido conjuntivo em ambas concentrações das dispersões do ácido tereftálico, com relação ao controle. Entretanto, os animais eutanasiados aos 15 dias, apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) no espaço linfático em ambos os tratamentos com o TPA em relação ao controle. O tecido conjuntivo dos animais do grupo II também reduziu ( $p < 0,05$ ), com a administração do TPA<sub>2</sub> com relação aos camundongos controle, seguindo a mesma tendência ( $p < 0,05$ ) vista no grupo I. A proporção volumétrica demonstra semelhança ( $p > 0,05$ ) no espaço linfático e tecido conjuntivo, dos animais dos grupos eutanasiados aos 70 dias, tratados com o TPA e controle.

O processo de linfagiogênese quando comparado à angiogênese, ambos referentes ao testículo, é pouco conhecido. A vasculatura linfática, proveniente de vasos sanguíneos preexistentes, pode ser considerada como uma parte especializada do sistema circulatório, essencial em manter a homeostase de fluidos teciduais e transporte de hormônios, macromoléculas e células do sistema imune (OLSZEWSKI, 2003; SCHULTE-MERKER; SABINE; PETROVA, 2011). Ademais, sendo o processo de linfagiogênese intimamente relacionado ao processo angiogênico, o presente estudo não verificou marcadores celulares para

a formação de vasos/capilares sanguíneos e vasos linfáticos. De acordo com Svingen e Koopman (2013), a circulação de hormônios é essencial para a diferenciação e formação de vasos/capilares sanguíneos, porém não está claro como a ação hormonal pode influenciar na linfagiogênese. Deste modo, mesmo não mensurando marcadores celulares e hormônios, é possível sugerir que o TPA afeta fatores bioquímicos ligados a complexos de polipeptídeos no período gestacional e, durante o período lactacional.

O espaço intertubular, é composto por células de Leydig, vasos/capilares sanguíneos e linfáticos, células e fibras do tecido conjuntivo (RUSSEL *et al.*, 1990; SETCHELL; BREED, 2006). Jackson *et al.* (1986) demonstraram que ratos adultos tratados com uma dose única de etanodiol-di-metanosulfato (sulfato de etileno-dimetano), correspondente a 75 mg/kg de peso corporal, resulta em destruição rápida das células de Leydig, que por sua vez é associado ao declínio acentuado de testosterona sérica. Após 21 dias ao tratamento, a morfometria mostrou uma nova geração de células de Leydig, através de marcadores celulares e observações histomorfométricas. Jackson *et al.* (1986) sugeriu que as novas células de Leydig surgem por diferenciação de um vasto número de células do tecido conjuntivo, que inclui fibroblastos e células endoteliais linfáticas (com proporções diminuídas), após um rápido declínio de seu número (JACKSON *et al.*, 1986).

No presente estudo, o número de células de Leydig dos animais tratado com o TPA<sub>2</sub> e eutanasiados aos 18.5 dias, mostrou-se reduzido ( $p < 0,05$ ) (Figura 10-D). Em conjunto ao número de células de Leydig reduzido, o tratamento com o TPA<sub>2</sub> reduziu tamanho do pênis (Figura 7-D) e o índice anogenital (Figura 8-A). Sendo assim, a hipótese de Jackson *et al.* (1986), pode ser usada para a explicação da redução percentual ( $p < 0,05$ ) do tecido conjuntivo dos animais tratados com o ácido tereftálico numa maior concentração. Os demais parâmetros analisados pela morfometria testicular (túbulos seminíferos, túnica própria, epitélio seminífero, compartimento intertubular e células de Leydig) e diâmetro tubular, não sofreram alterações significativas.

Assim como nos animais eutanasiados em 18.5 dias, os animais do grupo II tratados com o TPA apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) do tecido conjuntivo em relação aos animais controle, embora os dados do presente trabalho não apresentem diferenças significativas entre as concentrações do ácido neste parâmetro.

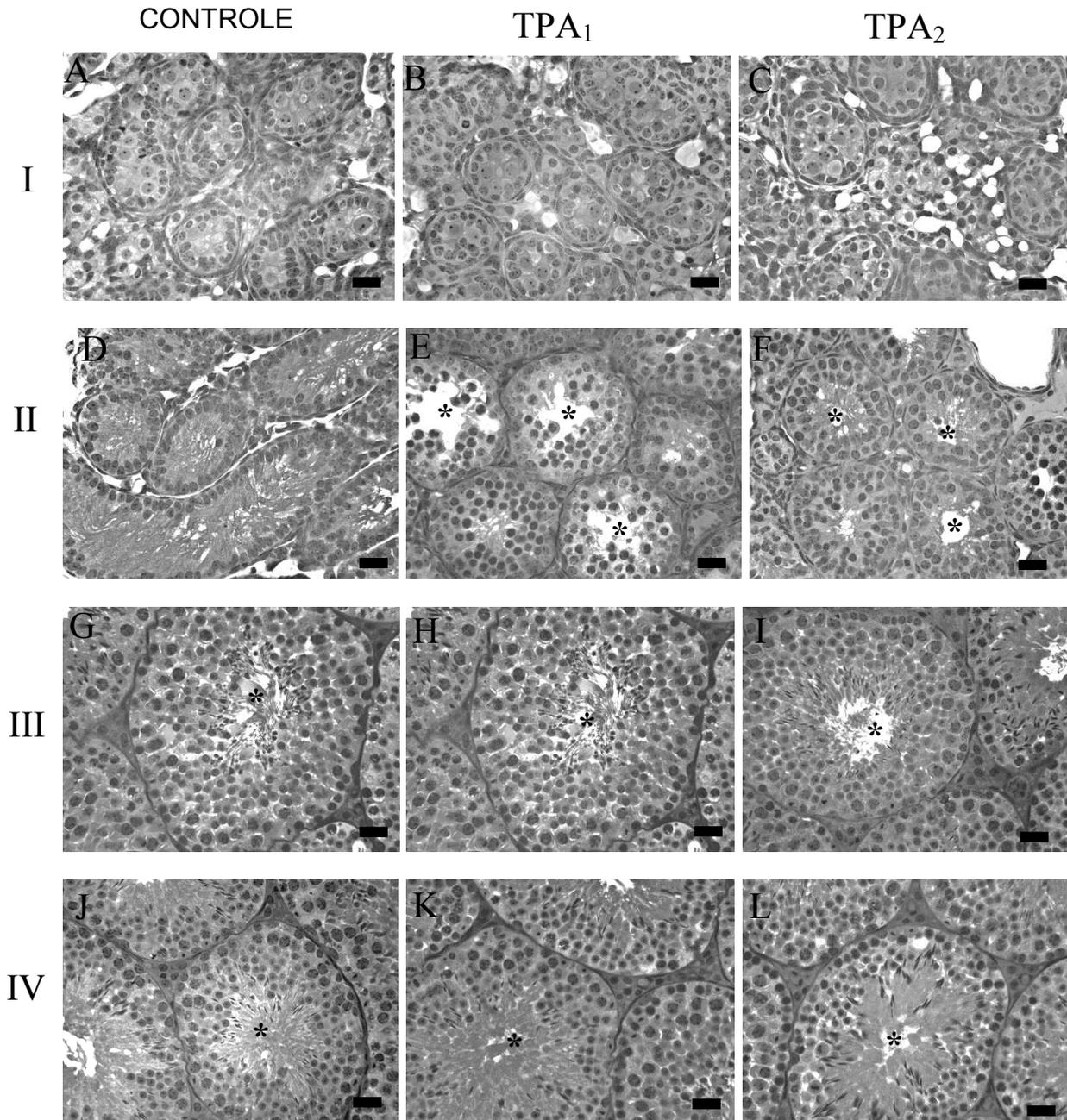
A Tabela 3 ainda demonstra que não houve alteração significativa na proporção de vasos/capilares sanguíneos nos animais do grupo II. Porém a proporção volumétrica dos animais eutanasiados aos 15 dias, não segue a tendência de aumento de vasos linfáticos demonstrado pelos animais do grupo I. Ao contrário do que é visto para os animais do grupo I,

a Tabela 3 demonstra uma redução ( $p < 0,05$ ) dos vasos linfáticos dos animais tratados com ambas dispersões do TPA em relação ao controle. Entretanto, houve um aumento ( $p < 0,05$ ) dos vasos linfáticos dos animais que receberam a concentração maior em relação à menor concentração do ácido. A hipótese para a redução dos vasos linfáticos ( $p < 0,05$ ) dos animais tratados com as concentrações de TPA em contraste aos controles, pode estar relacionada ao acúmulo de ácido tereftálico após o nascimento, sendo que os animais do grupo II foram tratados até a puberdade, e eutanasiados aos 15 dias.

A análise histológica dos animais dos grupos III e IV (Figura 10G a L), mostra-se semelhante aos dados existentes na literatura quanto à morfologia dos compartimentos intertubular e tubulares padrões, no que diz respeito a camundongos machos sexualmente maduros (RUSSELL, 1990). Estes achados são corroborados pela proporção volumétrica (Tabela 3) dos componentes testiculares. Dentre os parâmetros avaliados tais como lume tubular, túnica própria, epitélio seminífero, células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, tecido conjuntivo e diâmetro tubular, não houve diferenças entre os animais controle e os animais expostos ao TPA nas diferentes doses (Grupos III e IV).

Russell *et al.* (1990) mostraram que a proporção volumétrica entre os compartimentos intertubular e tubular não é constante na natureza, esses valores podem variar de acordo com a espécie. No nosso conhecimento, não existem dados na literatura a respeito da proporção volumétrica entre os compartimentos tubular e intertubular, em camundongos tratados com dispersões de TPA.

**Figura 10** – Secções transversais de cordões/túbulos seminíferos de camundongos controles (A, D, G e I), tratados com TPA<sub>1</sub> (B, E, H e K) e TPA<sub>2</sub> (C, F, I e L), e eutanasiados em 18.5 dias, 15 dias e 70 dias (grupos III e IV) de idade, respectivamente. O lume (\*) está presente nos cordões/túbulos seminíferos dos animais com idade superior ou igual a 15 dias. Barra = 50µm.



**TABELA 3.** Proporção volumétrica e diâmetro tubular dos camundongos sexualmente maduros tratados com dispersões Controle, TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub>. Os números romanos representam grupos experimentais, Grupo I tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), com eutanásia aos 18.5 dias; Grupo II tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 15 dias; Grupo III tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) com eutanásia aos 70 dias; Grupo IV tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 70 dias. Letras distintas no mesmo grupo denotam diferenças significativas (p<0,05)

Parâmetro	Grupo I			Grupo II			Grupo III			Grupo IV		
	Controle	TPA <sub>1</sub>	TPA <sub>2</sub>	Controle	TPA <sub>1</sub>	TPA <sub>2</sub>	Controle	TPA <sub>1</sub>	TPA <sub>2</sub>	Controle	TPA <sub>1</sub>	TPA <sub>2</sub>
Diâmetro Tubular	52,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	56,9 ± 3,0 <sup>a</sup>	54,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	87,6 ± 1,8 <sup>a</sup>	99,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	101,5 ± 1,9 <sup>b</sup>	219,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	208,0 ± 3,0 <sup>a</sup>	210 ± 5,2 <sup>a</sup>	200,6 ± 3,4 <sup>a</sup>	209,0 ± 3,5 <sup>a</sup>	200,6 ± 6,4 <sup>a</sup>
Proporção volumétrica (%)												
Túbulos seminíferos	79,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	81,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	83,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	88,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	94,4 ± 1,4 <sup>b</sup>	94,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	94,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	93,9 ± 0,35 <sup>a</sup>	93,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	94,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	94,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	94,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
Túnica Própria	5,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	93,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Epitélio Seminífero	73,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	75,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	77,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	79,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	86,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	83,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	87,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	88,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	87,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	88,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	89,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	88,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
Lume	0	0	0	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>ab</sup>	6,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Compartimento Intertubular	20,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	18,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	16,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	11,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
Células de Leydig	7,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>a</sup>

Vasos sanguíneos	4,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	2,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>
Espaço linfático	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Tecido conjuntivo	6,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,06 <sup>a</sup>

---

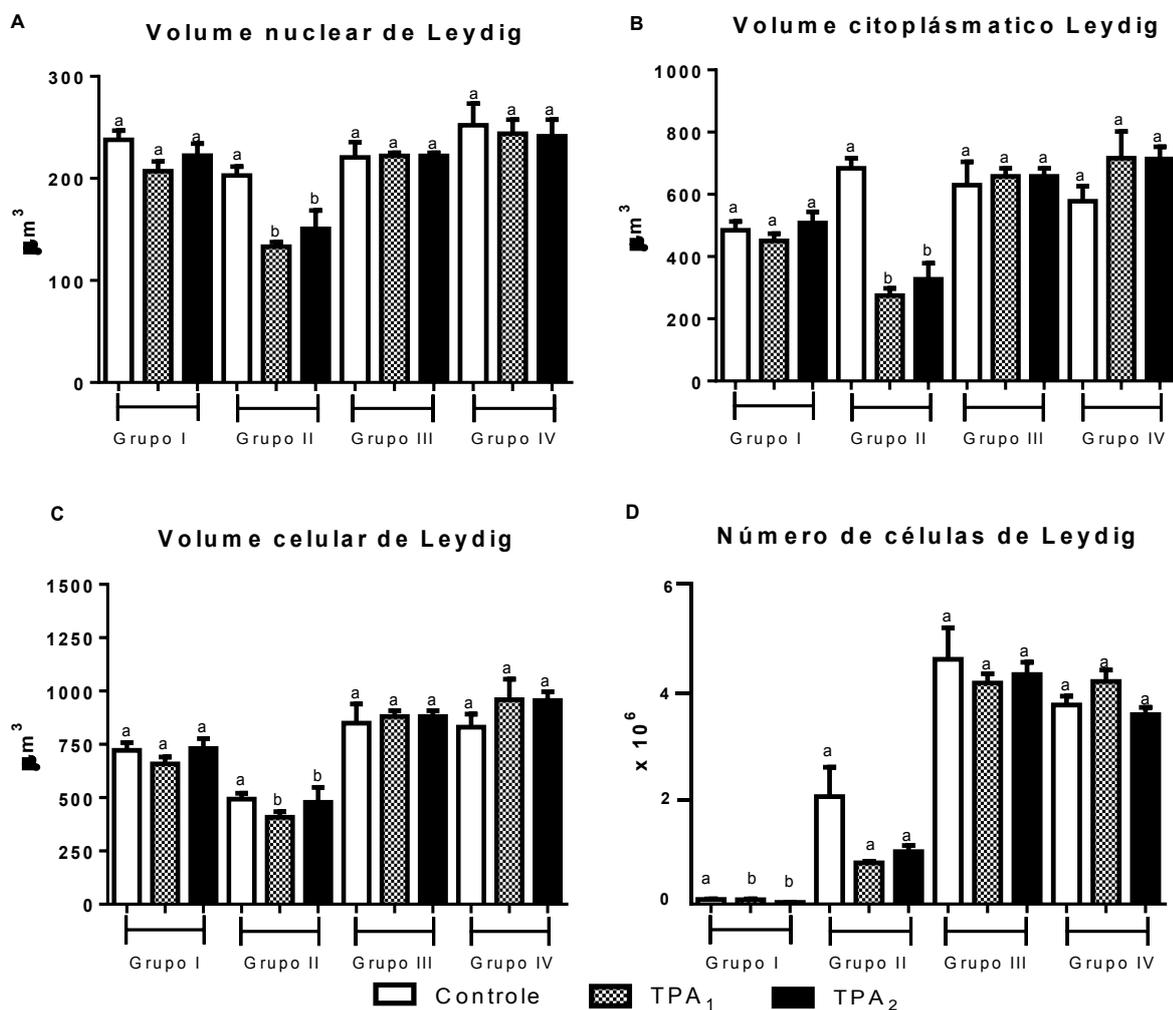
#### 5.4 Volume nuclear, citoplasmático, celular e número de células de Leydig

Os dados referentes ao volume nuclear, citoplasmático, celular e número de células de Leydig dos camundongos controle e tratados com TPA, estão apresentados na Figura 11 (A, B, C e D). Pode-se observar uma redução ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros volume nuclear, citoplasmático e celular das células de Leydig, referente aos animais tratados com o TPA<sub>2</sub> com relação aos animais controle, somente no grupo II.

Castro *et al.* (2000), mostraram que o nível de testosterona testicular e plasmático está correlacionado com o volume nuclear da célula de Leydig. Ainda, Foster *et al.* (2001), demonstraram que em ratos Sprague-Dawley expostos a 500 mg/kg de DBP *in utero* durante o período gestacional, apresentaram hiperplasia de células de Leydig. Sendo assim, o aumento no diâmetro da célula de Leydig, possivelmente indica uma maior atividade nuclear e citoplasmática, obtendo-se assim uma maior atividade celular. Os dados do presente trabalho não corroboram com Foster *et al.* (2001). De acordo com a Figura 11 (A, B e C), o tratamento com ambas concentrações de TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub>, reduziu ( $p < 0,05$ ) os volumes nuclear, citoplasmático e celular de Leydig, quando comparados ao controle. Mesmo tendo mostrado alterações em parâmetro celulares de Leydig, o número de células não sofreu alteração significativa, apesar de uma visível diferença em milhões de células (Figura 11-D). Ainda pode-se observar um paralelismo entre os dados biométrico dos animais do grupo II, tratados com o TPA e o controle. Somente o peso corporal dos animais que receberam a maior dosagem de TPA em relação ao controle, desse mesmo grupo, foi alterado. Os outros parâmetros como o peso testicular, IGS e index tamanho do pênis e index anogenital, permaneceram semelhantes ( $p > 0,05$ ). Mesmo que, no presente estudo a testosterona não tenha sido mensurada nos animais tratados, e sendo demonstrado semelhança ( $p > 0,05$ ) entre os números de células de Leydig por testículo dos camundongos do grupo II, os valores encontrados para os volumes nucleares dos animais tratados com o ácido tereftálico, corrobora com a afirmação de que volume nuclear da célula de Leydig está correlacionado nível de testosterona testicular e plasmático (CASTRO *et al.*, 2000). Nos demais grupos experimentais (I, III e IV), os valores do volume não foram alterados estatisticamente. Castro *et al.* (2000), mostraram que o nível de testosterona testicular e plasmático está correlacionado com o volume nuclear da célula de Leydig. Ainda, Foster *et al.* (2001), demonstraram que em ratos Sprague-Dawley expostos a 500 mg/kg de DBP *in utero* durante o período gestacional, apresentaram hiperplasia de células de Leydig. Os valores encontrados para o volume nuclear dos animais tratados com o ácido tereftálico, corrobora com

a afirmação de que volume nuclear da célula de Leydig está correlacionado nível de testosterona testicular e plasmático (CASTRO *et al.*, 2000). O TPA pode estar afetando o metabolismo das células de Leydig, síntese de RNA, transcrição de proteínas, e comportamento das organelas citoplasmáticas, hipótese corroborada pelas alterações no volume nuclear, citoplasmático e celular das células de Leydig. Os números de células de Leydig no testículo, dos animais tratados com controle e o TPA nas duas dosagens não variaram significativamente entre os grupos III e IV. A médias dos valores encontrados para o quantitativo destas células permaneceram entre 3,8 a 5 milhões de células de Leydig no testículo. Os dados do presente trabalho, referentes aos animais eutanasiados aos 70 dias, confirmam os valores já conhecidos na literatura (RUSSEL, 1996) e corroboram os achados de não comprometimento da função testicular dos animais tratados com TPA.

**Figura 11** – Volume nuclear (A), citoplasmático (B), celular (C) e número de células de Leydig (D) dos animais tratados com dispersões controle, TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub> (média ± EPM). Os números romanos representam grupos experimentais, Grupo III tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) com eutanásia aos 70 dias; Grupo IV tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 70 dias. Letras distintas no mesmo grupo denotam diferenças significativas (p<0,05).



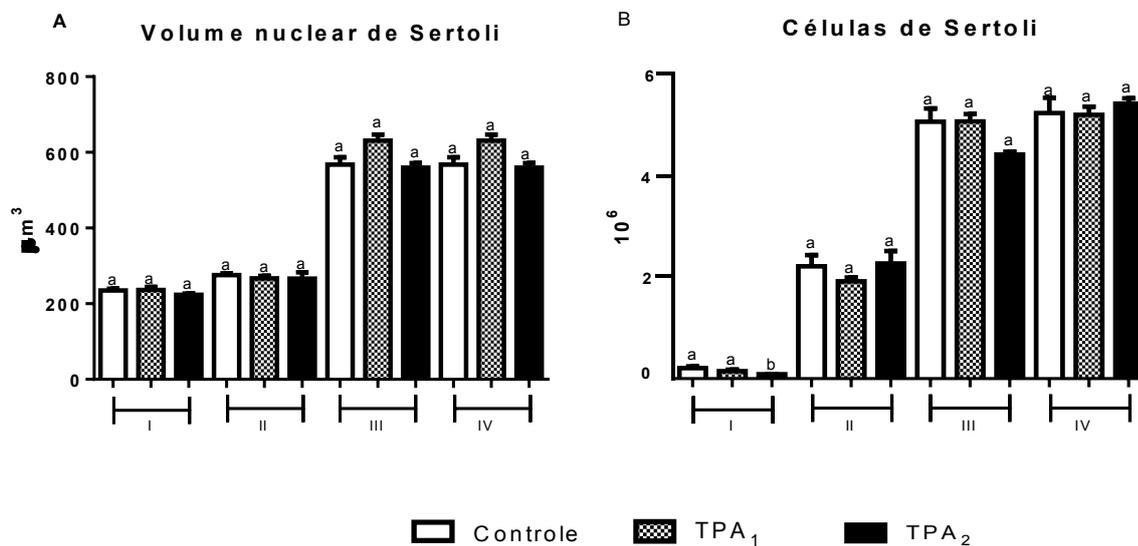
### 5.5 Volume nuclear e número de células de Sertoli

Os valores do diâmetro nuclear e número de células de Sertoli dos animais dos grupos I a IV, tratados com o TPA e controle, são ilustrados através da Figura 12 (A) e (B), respectivamente. Conforme pode ser observado, os valores dos volumes nucleares das células de Sertoli foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) nos animais administrados com TPA<sub>1</sub>, TPA<sub>2</sub> e controle, em todos os períodos de tratamento (gestacional, lactacional e maturidade sexual). Entretanto o TPA<sub>2</sub> foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) o número de células por testículo, quando comparado aos camundongos controle. A célula de Sertoli é o tipo celular mais abundante no túbulo seminíferos até a puberdade, sendo que a partir desse marco sua população fica relativamente sem alteração, sendo consideradas como o grupo celular mais resistente quando comparada às células da linhagem germinativa (RUSSEL, 1990). Ainda, o número de células de Sertoli nos testículos define o número final de espermatozoides produzidos e, via de regra, a função testicular nos machos (FRANÇA *et al.*, 2000). Neste contexto, volume nuclear das células de Sertoli é um excelente marcador que reflete o nível de diferenciação dessas células. Sendo assim, o ácido tereftálico não mostrou capacidade de interferir na maturação das células de Sertoli.

Auharek *et al.* (2010), demonstraram que a exposição em ratos a 500 mg/kg de DBP, reduz o número de células de Sertoli ao nascimento, assim como produção fetal de testosterona. Porém de maneira interessante, o número de células de Sertoli voltam à normalidade, partir do 25° dia pós-natal. Este achado também foi observado no presente trabalho, que demonstrou números de células de Sertoli semelhantes ( $p > 0,05$ ) aos tratamentos com o TPA e controle, nos animais eutanasiados aos 15 dias. Apesar de haver um paralelismo entre os dados dos animais do grupo I tratados com o TPA<sub>2</sub> (diminuição do peso testicular, IGS e número de células de Sertoli) os dados do presente trabalho corroboram com Auharek *et al.* (2010), no que diz respeito a uma recuperação no período pós-natal, do número de células de Sertoli, porém na ausência de DBP.

Os valores de volume nuclear e número de células de Sertoli dos animais sexualmente maduros encontrados neste trabalho, são semelhantes aos existentes na literatura (HESS; FRANÇA, 2008).

**Figura 12** –Volume nuclear (A) e número de células de Sertoli (B) no testículo dos animais tratados com as dispersões controle, TPA<sub>1</sub> e TPA<sub>2</sub> (média ± EPM). Os números romanos representam grupos experimentais, Grupo III tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5) com eutanásia aos 70 dias; Grupo IV tratamento *in útero*, no período fetal (DG 10.5-18.5), e no período lactacional (PND-15), com eutanásia aos 70 dias. Letras distintas no mesmo grupo denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O contato direto/indireto a substâncias como os desreguladores endócrinos têm sido frequente na sociedade pós-moderna. Neste cenário, torna-se importante o entendimento científico a respeito do modo de atuação destas substâncias. O sistema reprodutor masculino é sensivelmente afetado pelos desreguladores endócrinos e/ou seus metabólicos, como por exemplo, o TPA. Alterações nos componentes testiculares como reduções nos números de células de Leydig e Sertoli, responsável pela produção da testosterona testicular e aporte nutricional das células germinativas, respectivamente, são relatados periodicamente pela literatura em toxicologia reprodutiva. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a função testicular de machos da linhagem C57BL/6J tratados com o TPA em diferentes janelas reprodutivas,

Os resultados do presente estudo mostraram que o ácido tereftálico na concentração de 0,56 g/ml reduziu ( $p < 0,05$ ) peso corporal, peso testicular, IGS e tamanho do pênis dos animais eutanasiados aos 18.5 dias. Neste mesmo período de tratamento foi possível observar que o TPA<sub>2</sub> reduziu o index anogenital, que em conjunto com o comprimento do pênis, são excelentes sinalizados da ação/exposição de andrógenos no período gestacional. Ainda pode-se perceber alterações ( $p < 0,05$ ) em elementos testiculares como vasos/capilares sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo dos animais eutanasiados no período de puberdade. Assim, o TPA atuou em períodos específicos e distintos do desenvolvimento.

Particularmente a concentração mais alta utilizada (TPA<sub>2</sub>) influenciou os números de células de Leydig e Sertoli nos camundongos fetais, o que em última análise demonstraria alterações na concentração de testosterona no animal fetal e redução na produção espermática no animal adulto, o que não foi observado no presente estudo. Assim como no período fetal, o TPA<sub>2</sub> induziu alterações nos animais eutanasiados aos 15 dias, idade crítica no que diz respeito ao controle hormonal e fertilidade. Entretanto, pôde-se perceber uma recuperação compensatória demonstrada pelos animais sexualmente maduros, eutanasiados aos 70 dias. Embora alterações pontuais tenham sido observadas nos animais que receberam o TPA, nossos resultados sugerem que este monômero não age como uma desregulador endócrino sobre a função testicular uma vez que os parâmetros testiculares afetados nos animais tratados foram, em sua maioria, relacionados com a alta dose administrada.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERINI, C.L; HUGHES, I.A. Endocrine disrupting chemicals: a new and emerging public health problem? **Archives of Disease in Childhood**, vol. 91, n.8, p. 633-641, 2006.

AHBAB, M.A. *In utero* exposure to dicyclohexyl and di-n-hexyl phthalate possess genotoxic effects on testicular cells of male rats after birth in the comet and TUNEL assays. **Human and Experimental Toxicology**, vol. 33, n. 3, p. 230-239, 2014.

AKINGBEMI, B. T. *et al.* Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 1252–1259, 2001.

ANWAY, M. D. *et al.* Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male and fertility. **Science**, v. 308, n. 1, p. 1466-1469, 2005.

AUHAREK, S. A. *et al.* Sertoli cell numbers and spermatogenic efficiency are increased in inducible nitric oxide synthase mutant mice. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 6, p. 621-629, 2011.

AUHAREK, S. A. *et al.* Prenatal plus postnatal exposure to di(n-butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final Sertoli cell number in the rat. **Endocrinology**, vol. 151, n.6, p. 2868–2875, 2010.

AUHAREK, S. A. *et al.* Effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficiency in mice on Sertoli cell proliferation and perinatal testis development. **International Journal of Andrology**, v. 35, n. 5, p. 741-751, 2012.

ALTUN, M. L. HPLC Method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, p. 521-528, 2002.

BALL, G.J.; MCLELLAN, C.J.; BHAT, V.S. Toxicological review and oral risk assessment of terephthalic acid (TPA) and its esters: A category approach. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 28-67, 2012.

BANG, D.; LEE, I.; LEE, B. Toxicological characterization of phthalic acid. **Toxicological Research**, v. 27, n. 4, p. 191-203, 2011.

BENFORD, D. Principles of risk assessment of food and drinking water related to human health. **Internationnal Life Sciences**, v.1, p. 1-34, 2001.

BERGERON, J. M.; CREWS, P.; MCLACHLAN, J. A. PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 1, p. 780-781, 1994.

BILA, D. M; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 621-666, 2007.

BOAS, M. *et al.* Childhood Exposure to Phthalates: Associations with Thyroid Function, Insulin-like Growth Factor I, and Growth. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n.10, 1458-1464, 2010.

BORCH, J. *et al.* Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. **Toxicology**, v. 223, n. 1-2, p. 144-155, 2006.

BUSTAMANTE-MONTES, L. P. *et al.* Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 4, n. 4, p. 300-306, 2013.

BRYANT, H.S *et al.* Mobil's Process for TPA. **Chemical Engineering Progress**, v.7, n.9, p. 69-75, 1971.

CALAFAT, A. M. *et al.* 2006. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. **Toxicology**, v. 217, n. 1, p. 2-30, 2006.

CARLSEN, E. *et al.* Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **British Medical Journal**, v. 305, n. 6854, p. 609-613, 1992.

CASTRO, A. C. S. *et al.* Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n.4, p. 493-498, 2002.

CHEN, X. *et al.* Prenatal exposure to di-n-butyl phthalate disrupts the development of adult Leydig cells in male rats during puberty. **Toxicology**, v. 386, n. 1, p. 19-27, 2017.

CHOI, S. M.; YOO, S. D.; LEE, B. M. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 7, n. 1, p. 1-24, 2004.

CHUGHTAI, B. *et al.* A neglected gland: a review of Cowper's gland. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 2, p. 74-77, 2005.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiology Reviews**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. O Futuro Roubado. (tradução: Claudia Buchweitz) Porto Alegre. L&P. 354p, 1997.

COULOMBE, P.; SCHWARTZ, H. L.; OPPENHEIMER, J. H. Relationship between the accumulation of pituitary growth hormone and nuclear occupancy by triiodothyronine in the rat. **The Journal Clinical Investigation**, v. 62, n.1 p. 1020-1028, 1978.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 7. Ed. **Campinas**: Editora da Unicamp, 1997.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156-160, 2016.

COSTA, D.S. *et al.* Testis morphometry and kinetics of spermatogenesis in the feral pig (*Sus scrofa*). **Animal Reproduction Science**, v. 142, n. 1-2, p. 63-170, 2013.

CUI, J. *et al.* Effect of oral administration of terephthalic acid on testicular functions of rats. **Toxicology**, v. 201, n.1-3, p. 59-66, Set. 2004.

FADLALLA, M. B *et al.* Effects of hyper- and hypothyroidism on the development and proliferation of testicular cells in prepubertal rats. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 12, p. 1943-1954, 2017.

FRANÇA, Luiz Renato. *Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau*. 1991. 185p. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte. MG. 1991.

FRANÇA, L.R. *et al.* Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals, with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v.63, n. 2, p.300-318, 2005.

FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1554-1561, 2003.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J, editors. **Male Reproduction**. A multidisciplinary overview. Madrid, Spain: Churchill Livingstone; p.197-219, 1998.

FRANÇA, L.R. *et al.* Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p.1433-1412, 2000.

FREIRE, M. T. A. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. **Química Nova**, v. 31, p.1522-1532, 2008.

FILIPSSON, A. F. *et al.* The benchmark dose method--review of available models, and recommendations for application in health risk assessment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 505-542, 2003.

FOSTER, P. M. D. *et al.* Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 3. p. 231-235, 2001.

FOSTER, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 140-147, 2005.

GEROLIN, Eleonilce Rosa Rossi. *Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – SP*. 2008. 119 p. Tese (Doutorando em Engenharia Civil)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, UNICAMP. SP. 2008.

GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 695-706, 2007.

Gray, L. E *et al.* Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat. **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 2, p. 350-365, 2000.

GRISWOLD, M. D. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis, **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 1-17, 2016.

GORE, A. C. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 358-374, 2008.

HAIDER, S. G. Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. **International Review of Cytology**, v. 233, n. 1, p. 181-241, 2004.

HARRIS, C. A. *et al.* The estrogenic action of phthalate esters *in vitro*. **Environment Health Perspectives**, v.105 n. 1, p. 802–811, 1997.

HAUSER, R.; SOKOL, R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 2, p. 59-65, 2008.

HESS, R. A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the Seminiferous epithelium. In: Cheng CY Advances in Experimental Medicine and Biology, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 636, p.61-15, 2007.

HODGSON, E. **A Textbook of Modern Toxicology**. 3rd Edition. Wiley-Interscience, 2004

HOSHI, A. *et al.* Metabolism of terephthalic acid. II. Plasma concentration of terephthalic acid and its biological half-life. **Yakugaku Zasshi**, v. 86, n.1, p. 963–967, 1966.

HOSHI, A.; KURETANI, K. Metabolism of terephthalic acid. 3. Absorption of terephthalic acid from gastrointestinal tract and detection of its metabolites. **Chem Pharm Bull**, v. 15, n, 1 p. 1979–1984, 1967.

HOWARTH, A. J. *et al.* Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. **Toxicology Letters**, v. 121, n. 1, p. 35-43, 2001.

HU, G. S *et al.* Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. **Trends In Endocrinology & Metabolism**. v. 20, n. 3, p. 139-145, 2009.

HUANQ, H. B. *et al.* Does exposure to phthalates influence thyroid function and growth hormone homeostasis? The Taiwan Environmental Survey for Toxicants (TEST) 2013. **Environmental Research**, v. 153, n. 1, p. 63-72, 2017.

HUNDLEY, J.G. *et al.* **Multistage oxidation in a single reactor**. Patente Americana n. 4769487, 1988.

HUNTER, D. *et al.* Models of *in vitro* spermatogenesis. **Spermatogenesis**, v.2, n. 1, p. 32-43, 2012.

HRAPKIEWICZ, K.; MEDINA, L., HOLMES, D.D. **Clinical Laboratory Animal Medicine: an introduction**. 2nd ed. Ames: Iowa State University Press, 1998.

IBRRHEM, N. S.; AL- SAHAF, M. M. H.; ALWAN, A. F. Reproductive activity of mature Iraqi bull buffaloes Epididymis sperm quality and histological picture. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 7, n. 4, p. 56-62, 2014.

JACKSON, A. E. *et al.* The effects of ethylene dimethane sulphonate (EDS) on rat Leydig cells: evidence to support a connective tissue origin of Leydig cells. **Biology os Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 425-437, 1986.

JENSEN, T. K. *et al.* Prenatal Exposure to Phthalates and Anogenital Distance in Male Infants from a Low-Exposed Danish Cohort (2010–2012). **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 7, p. 1107-1113, 2016.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. In: Histologia Básica. 2004. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: p. 415-431.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Development Biology**, v. 202, n. 2, p. 323-333, 1998.

KHANEGHAH, A. M. *et al.* HPLC study of migration of terephthalic acid and isophthalic acid from PET bottles into edible oils. **Journal of the Science of food and agriculture**, v. 94, n. 11, p. 2205-2209, 2014.

KLAASSEN, D.D.; WATKINS III, J.B. **Fundamentos em toxicologia**. 2ª edição. AMGH, 2001.

KÖHLER, H. R. *et al.* Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 131-143, 2007.

KWACK, S. J.; LEE, B. Comparative Cytotoxicity and Sperm Motility Using a Computer-Aided Sperm Analysis System (CASA) for Isomers of Phthalic Acid, a Common Final Metabolite of Phthalates. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 78, n. 16, p. 1038-1050, 2015.

LEAL, M.C.; FRANÇA, L.R. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 4, p. 616-624, 2006.

LEON, M; WOODSIDE, B. Energetic limits on reproduction: Maternal food intake. **Physiology & Behavior**, v.30, n. 1, p. 945-957, 1983.

LEVINE, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 6, p. 646-659, 2017.

LOUREIRO, Iabella Rodrigues. **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara**. 2002. 143 f. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Departamento de Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 2002.

LOTTRUP, G. *et al.* Impact of phthalates on infant reproductive health. **International Journal of Andrology**, vol. 29, n. 1, p. 172-180, 2006.

MACDONALD, W.A. New advances in poly(ethylene terephthalate) polymerization and degradation. **Polymer International**, v. 51, n. 10, p. 923-930, 2002.

MANCINI, Sandro M. **Estudos de Hidrólise de PET Pós-consumo no Estado Sólido Visando a Reciclagem Química**. 2001. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências de Materiais)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de São Carlos, SP, 2001.

MAQBOOL, F. *et al.* Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. **Life Sciences**, v. 145, n.1, p. 265-273, 2015.

MATHIESSEN, P. Historical perspective on endocrine disrupter in wildlife. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 2197-2206, 2003.

MARTIN, L. J. Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. **Molecular Reproduction Development**, v. 83, n. 6, p. 470-487, 2016.

MIRANDA, JOSÉ RAFAEL. *Regulação da proliferação pós-natal das células de Sertoli em ratos*. 2006. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Programa de Pós Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.

MYLCHREEST, E *et al.* Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(nbutyl) phthalate during late gestation. **Toxicology Sciences**. v. 55, n. 1, p. 143-151, 2000.

NETO, F. T. L *et al.* Spermatogenesis in humans and its affecting factors, **Seminars in Cell & Desevelopmental Biology**, v.59, n.1, p.10-26, 2016.

OECD SIDS.Initial Assessment Report. **Terephthalic Acid (TPA) CAS No. 100-21-0**. Paris, France June 2001. Disponível em: <<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSEIDS/100-21-0.pdf>>. Acesso em: 30 de outubro de 2015.

OLSZEWSKI, W. L. The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions. **Lymphatic Research and Biology**, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2003.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PTReproduction in domestic mammals, 1977. Academic Press, New York (USA): p. 203-227.

OSIMITZ, T. G. *et al.* Polyester monomers lack ability to bind and activate both androgenic and estrogenic receptors as determined by in vitro and in silico methods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 75, n.1, p. 128-138, 2014.

PANG, J. *et al.* Synthesis of ethylene glycol and terephthalic acid from biomass for producing PET. **Green Chemistry**, vol. 1, p.205-213, 2015.

PARKS, L. G. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 1, p.339-349, 2000.

PALMERO, S. *et al.* Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 105-111, 1989.

PETRO, E. M *et al.* Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair in vitro oocyte developmental competence. **Human Reproduction**, v. 27, n. 4, p. 1024-1033, 2012.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 12-21, 2006.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 1, p. 671-674, 1997.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. The epididymis. In: Neill JD Knobil and Neill's. Physiology of Reproduction, 2006. Elsevier, St. Louis, USA: p. 1071-1148.

RUDEL, R. A. *et al.* Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethyhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 7, p. 914-920, 2011.

ROBERTS, K.P. **What are the components of male reproductive system?** In: The American Society of Andrology, 2010. Handbook of Andrology, Lawrence: Allen Press: p. 1-5.

ROUTLEDGE, E. J. *et al.* Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Z. In vivo responses in trout and ruack. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n.11, p. 1559 – 1565, 1998.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. **Histological and histopatological evaluation of the testis**, Clearwater (USA): Cache River Press (USA), 1990.

RYZHAK, A. P. *et al.* Effect of Polypeptides on Cell Proliferation and Apoptosis during Aging. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 162, n. 4, p. 534-538.

SARGENT, K. M. *et al.* VEGFA: Just one of multiple mechanisms for Sex-Specific Vascular Development within the testis? **Journal of Endocrinology**, v. 227, n. 2, p. 31-50, 2015.

SATHYANARAYANA, S. *et al.* Baby Care Products: Possible Sources of Infant Phthalate Exposure. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. 260-268, 2015.

SCHULTE-MERKER, S.; SABINE, A.; PETROVA, T. V. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. **The Journal of Cell Biology**, v. 193, n. 4, p.607-618, 2011.

SCOTT, H. M. *et al.* Relationship between androgen action in the ‘male programming window’, fetal Sertoli cell number and adult testis size in the rat. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5280-5287, 2007.

SETCHELL, B. P.; BREED, W. G. **Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract**. In: NEILL J. D, Physiology of Reproduction. Elsevier. p. 771-825. 2006.

SERRANO, S. E. *et al.* Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2014.

SHARPE, RM. **Sertoli cell endocrinology and signal transduction: androgen regulation**. In: Skinner MK, Griswold MD. The Sertoli cell biology, 2005. Elsevier Science (USA): p. 199-216.

SHARPE. R.M. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance (AGD) in the rat before, during and after puberty. **International Journal of Andrology**, v. 34, n.6pt2, p. e578-e586, 2011.

SHARPE, R.M. *et al.* Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, n. 1, p. 769-784, 2003.

SKOOG, R. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of analytical chemistry**. 9 ed. New York. Cengage Learning, 2013.

SOUZA, R. R. *et al.* Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 35, p.1453-1458, 2012.

SKAKKEBAEK, N. E. *et al.* Testicular dysgenesis syndrome: na increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 672-978, 2001.

SPRANDO, R.L. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.; SINHA, H.A.P.; CLEGG, E.D. EDITOR. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Clearwater: Cache River Press; p. 277-80, 1990.

SVINGEN, T.; KOOPMAN, P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. **Genes & Development**, v. 27, n. 22, p. 2409-2426, 2013.

THAMMANA, M. A. Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Research & Reviews: **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 22-28, 2016.

TRAORÉ, F. *et al.* Cyclophosphamide Monotherapy in Children With Burkitt Lymphoma: A Study From the French–African Pediatric Oncology Group (GFAOP). **Pediatric Blood Cancer**, v. 26, n.1, p.70-76, 2011.

TREMAINE, L.M.; QUEBBEMANN, A.J. The renal handling of terephthalic acid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 77, n. 1, p. 165–174, 1985.

TRIPATHI, U. K *et al.* Differential proteomic profile of spermatogenic and Sertoli cells from peri-pubertal testes of three different bovine breeds. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.

THOMAS, J.A.; THOMAS, M.J. 1984. Biological effects of di-(2-ethyl-hexyl) phthalate and other phthalic acid esters. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 14, n. 4, p. 283-317, 1984.

ÜNÜVAR, T.; BÜYÜKQEBİZ, A. Fetal and Neonatal Endocrine Disruptors. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 4, n. 2, p. 51-60, 2012.

VACLAVIK, L. *et al.* Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 810, n. 31, p. 45-60, 2014.

VAN DEN DRIESCHE. S. *et al.* Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 6, p. 578-586, 2011.

VALKÓ, K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. **Journal of chromatography A**, v. 1037, p. 299-310, 2004.

VAN HAASTER, L.H. *et al.* High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. **Endocrinology**, v. 133, n.2, p. 755-760, 1992.

VAN MOORSELAAR, R. J.; VOEST, E. E. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 239-250, 2002.

WELSH, M. *et al.* Critical androgen-sensitive periods of rat penis and clitoris development. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 144-152, 2010.

WISTUBA, J. *et al.* Mammalian Spermatogenesis. **Functional Development an Embriology**, v. 1, n. 2, p. 99-117, 2007.

WOHLFAHRT-VEJE, C. *et al.* Lower birth weight and increased body fat at school age in children prenatally exposed to modern pesticides: a prospective study. **Environmental Health**, v.10, n. 11, p. 79, 2011.

WOLKOWSKI-TYL, R. *et al.* Chemical urolithiasis. III. Pharmacokinetics and transplacental transport of terephthalic acid in Fischer-344 rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v10, n.1, p. 486–490, 1982.

ZLATNIK, M. G. Endocrine-Disrupting Chemicals and Reproductive Health. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 61, n. 4, p. 442-455, 2016.

ZHANG, X. X. *et al.* Toxicity of purified terephthalic acid manufacturing wastewater on reproductive system of male mice (*Mus musculus*). **Journal of Hazardous Materials**, vol. 176, n. 1-3, p. 300-305, 2010.

## APÊNDICE

### Perspectivas

Considerando que o presente trabalho fornece importantes resultados sobre a ação do TPA no processo espermato gênico em diferentes fases do desenvolvimento, nosso estudo abre perspectivas de investigação do monômero na função testicular a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estes estudos futuros contribuirão para o entendimento da biodisponibilidade do TPA nas células testiculares.

O HPLC é um dos métodos analíticos mais utilizados e fornece uma maneira fácil, confiável e precisa para a determinação e quantificação de substâncias de interesse encontradas em misturas complexas (ALTUN, 2001; VACLAVIK *et al.*, 2014; VALKÓ, 2004). Este fato é baseado na distribuição das substâncias químicas entre duas fases imiscíveis, fase estacionária contida em uma coluna e a fase móvel, que será eluída pela fase estacionária por meio de uma pressão (SKOOG *et al.*, 2013). As colunas utilizadas em HPLC, são cobertas (recheadas) com materiais intencionalmente preparados para a passagem de uma fase móvel eluída em alta pressão. A eficiência desse método cromatográfico é devido a constituição das colunas utilizadas que permitem a eluição a altas pressões (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).