



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KARINE VANDRESSA PERNONCINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO
TRICLOSAN EM RATOS**

Londrina
2017

KARINE VANDRESSA PERNONCINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO
TRICLOSAN EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela C. C. Gerardin.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pernoncini, Karine Vandressa.

Avaliação da toxicidade reprodutiva do Triclosan em ratos / Karine Vandressa Pernoncini. - Londrina, 2017.
43 f. : il.

Orientador: Daniela Cristina Ceccatto Gerardin.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Triclosan - Tese. 2. Desregulador endócrino - Tese. 3. Teste de Hershberger - Tese. 4. Contaminante ambiental - Tese. I. Gerardin, Daniela Cristina Ceccatto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

KARINE VANDRESSA PERNONCINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO TRICLOSAN EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Orientadora: Profa. Dra. Daniela C. Ceccatto
Gerardin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Suplentes

Profa. Dra. Andressa de Freitas Mendes Dionísio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de abril de 2017.

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - MULTICÊNTRICO

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 28 dias do mês de abril do ano de 2017, na sala PÓS GRADUAÇÃO DO CIF do Centro De Ciências Biológicas, desta Universidade, às 09:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora homologada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico, composta por Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin Cantamessa, Dra. Claudia Bueno Dos Reis Martinez e Dr. Ernane Torres Uchôa. A reunião teve por objetivo julgar o trabalho da estudante KARINE VANDRESSA PERNONCINE sob o título: ""AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO TRICLOSAN EM RATOS"". Os trabalhos foram abertos pela professora Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin Cantamessa. A seguir, foi dada a palavra à estudante para apresentação do trabalho. Cada examinador arguiu a Mestranda, com tempos iguais de arguição e resposta. Terminadas as arguições, procedeu-se ao julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua aprovação. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora. A estudante deverá reformular seu trabalho no prazo de 30 dias: (X) SIM () Não Se houver alteração no título do trabalho, informar o novo título abaixo:

Obs. Este documento não deve conter rasuras ou corretivo e deve ser preenchido de forma legível.

Londrina, 28 de Abril de 2017.

PRESIDENTE

Dra. DANIELA CRISTINA CECCATTO GERARDIN CANTAMESSA UEL

TITULARES

Dra. CLAUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ

Dr. ERNANE TORRES UCHÔA

UEL

UEL



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado a permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, pelo apoio a minha participação do mestrado.

A minha orientadora Profa. Dra. Daniela por seu apoio e amizade, além da sua dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos meus colegas de Laboratório, por proporcionarem um ótimo convívio, pela solidariedade em sempre estarem dispostos a ajudar em inúmeras etapas deste trabalho.

Aos meus pais, Rosany e Nedir, minhas bases, simplesmente por terem me feito existir, por tanto amor, por tudo o que sou, por cada oração, por terem me proporcionado educação e amor pelos estudos, e, apesar das inúmeras dificuldades, por sempre me estimularem a continuar.

Ao meu esposo José, a quem amo, que me aturou nos instantes em que sacrifiquei o nosso convívio para consecução deste objetivo, me incentivando, fazendo momentos difíceis se tornarem simples, pelo carinho e dedicação a nossa jovem família.

Ao pequeno Daniel que me inspira a cada dia querer ser mais que fui até hoje!

Por fim, agradeço a todos que estiveram presentes de alguma forma para a realização desta conquista.

PERNONCINI, Karine Vandressa. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do Triclosan em ratos**. 2017. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Triclosan (TCS) é um agente antibacteriano extensivamente utilizado em uma variedade de produtos, tais como: sabonete, desodorante, pasta de dente, óleos corporais, entre outros. Estudos indicam que o TCS é um desregulador endócrino (DE), pois possui efeito antiandrogênico ao reduzir a atividade de enzimas esteroidogênicas em culturas de células de Leydig de ratos, e ao reduzir a produção espermática diária de ratos Wistar em estudo *in vivo*, além disso, *in vitro* possui atividade androgênica ao competir com a [³H] testosterona pela ligação ao receptor androgênico de ratos. Mediante a isso, este é o primeiro estudo ao utilizar o Teste de Hershberger para avaliar um possível efeito (anti)androgênico do TCS em ratos Wistar com 52 dias de vida. Além disso, utilizou-se métodos inéditos como: comportamento sexual, motilidade espermática, viabilidade espermática e histomorfometria testicular para avaliar a toxicidade reprodutiva do TCS em ratos Wistar com 49 dias de vida, por um período de tratamento de aproximadamente 90 dias a fim de abranger um ciclo espermático completo, como sugerido pelo guideline OECD/OCDE 416. Ambos os testes utilizaram a menor dose de TCS (0,8 mg/kg) baseada na ingestão diária aceitável de TCS para humanos, sugerida pela Agência de Proteção Ambiental, além de doses 3 e 10 vezes maiores que a menor dose (2,4 e 8,0 mg/kg), sendo por gavagem o meio de administração do TCS. Os resultados do Teste de Hershberger demonstraram que o TCS não teve efeito (anti)androgênico nas doses avaliadas, pois não houve alterações no peso dos órgãos hormônio-dependentes dos animais tratados com TCS. Além disso, a avaliação da toxicidade reprodutiva do TCS não apresentou alterações no comportamento sexual, dosagem hormonal, ganho de peso corporal, peso de órgãos, parâmetros espermáticos e histomorfometria testicular, sugerindo que o período de tratamento e as doses utilizadas não comprometeram os parâmetros reprodutivos e portanto, nessa situação o TCS não apresentou efeito como desregulador endócrino.

Palavras-chave: Antibacteriano. Parâmetros espermáticos. Comportamento sexual. Contaminante ambiental. Desregulador endócrino.

PERNONCINI, Karine Vandressa. **Evaluation of reproductive toxicity of Triclosan in rats.** 2017. 43p. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Triclosan (TCS) is an antibacterial agent extensively used in a variety of consumer products such as: soaps, deodorant, toothpaste, body oils, among others. Studies indicate that TCS is an endocrine disruptor (ED) because it has antiandrogenic effect by reducing the activity of steroidogenic enzymes in Leydig cell cultures of rats, and by reducing daily sperm production *in vivo* study with Wistar rats, in addition, *in vitro* has androgenic activity by competing with [3 H] testosterone for binding to the rat androgen receptor. Therefore, this is the first study to use the Hershberger test to evaluate a possible (anti)androgenic effect of TCS in Wistar rats of 52 days of age. In addition, inedited methods such as: sexual behavior, sperm motility, sperm viability and testicular histomorphometry were used to evaluate the reproductive toxicity of TCS in 49-day-old Wistar rats for a treatment period of approximately 90 days to encompass a complete sperm cycle, as suggested by the guideline OECD/OCDE 416. Both methods administered a dose oral (gavage) based to the acceptable daily intake of TCS (0.8 mg/kg), in addition to 3 and 10-fold higher doses (2.4 and 8.0 mg/kg). The results of the Hershberger test demonstrated that the TCS at the doses evaluated had no (anti) androgenic effect, as there were no changes in the weight of the hormone-dependent organs of the animals treated with TCS. In addition, the evaluation of the reproductive toxicity of TCS did not cause changes in sexual behavior, hormonal dosage, body weight gain, organs weight, sperm parameters and testicular histomorphometry, suggesting that the treatment period and the doses used did not compromise the reproductive parameters and therefore, in this situation the TCS had no effect as an endocrine disrupter.

Keywords: Antibacterial. Sperm parameters. Sexual behavior. Environmental contaminant. Endocrine disruptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Delineamento experimental do Teste de Hershberger. DPN: dia pós-natal 15
- Figura 2** - Delineamento experimental do estudo da toxicidade reprodutiva. DPN:
dia pós-natal..... 17
- Figura 3** - Teste de motivação sexual representação esquemática. Zona de incentivo
da fêmea representada (F) e a zona de incentivo do macho (M) 20
- Figura 4** - Câmara de Makler. À esquerda, foto do modelo da câmara utilizada. À
direita, representação esquemática da vista superior do aparelho, através
do microscópio, com espermatozóides 22
- Figura 5** - Câmara de Neubauer. À direita, foto do modelo de câmara utilizado para
contagem espermática. À esquerda, representação esquemática da vista
através do microscópio de uma das câmaras do aparelho 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação de um possível efeito androgênico do TCS no Teste de Hershberger. Peso corporal e peso absoluto de órgãos hormônio-dependentes	27
Tabela 2 - Avaliação de um possível efeito antiandrogênico do TCS no Teste de Hershberger. Peso corporal e peso absoluto de órgãos hormônio-dependentes	28
Tabela 3 - Frequência de comportamento copulatório e ejaculação de ratos adultos.....	29
Tabela 4 - Comportamento copulatório de ratos adultos.....	30
Tabela 5 - Motivação sexual dos ratos adultos	30
Tabela 6 - Peso corporal final, peso dos órgãos e concentração plasmática de testosterona dos ratos no DPN 140.....	31
Tabela 7 - Morfologia, viabilidade, motilidade e concentração espermática dos animais no DPN 140.....	32
Tabela 8 - Contagem espermática de ratos adultos dos diferentes grupos experimentais.....	33
Tabela 9 - Análise histomorfométrica dos testículos de ratos no DPN 140	34

SUMÁRIO

1	Introdução	11
2	Objetivo	14
	2.1 <i>Objetivo geral</i>	14
	2.2 <i>Objetivos específicos</i>	14
3	Materiais e métodos	15
	3.1 <i>Teste de Hershberger</i>	15
	3.1.1 <i>Delineamento experimental</i>	15
	3.1.2 <i>Drogas</i>	15
	3.1.3 <i>Animais e tratamento</i>	15
	3.2 <i>Estudo da toxicidade reprodutiva</i>	17
	3.2.1 <i>Delineamento experimental</i>	17
	3.2.2 <i>Drogas</i>	17
	3.2.3 <i>Animais e tratamento</i>	18
	3.2.4 <i>Peso corporal</i>	19
	3.2.5 <i>Avaliação dos comportamentos sexuais</i>	19
	3.2.5.1 <i>Avaliações do comportamento copulatório</i>	19
	3.2.5.2 <i>Teste de motivação sexual</i>	19
	3.2.6 <i>Coleta dos órgãos</i>	20
	3.2.7 <i>Concentração plasmática de testosterona</i>	21
	3.2.8 <i>Parâmetros espermáticos</i>	21
	3.2.8.1 <i>Motilidade espermática</i>	21
	3.2.8.2 <i>Concentração espermática</i>	21
	3.2.8.3 <i>Viabilidade espermática</i>	22
	3.2.8.4 <i>Contagem espermática</i>	22
	3.2.8.5 <i>Morfologia espermática</i>	23
	3.2.9 <i>Histomorfometria testicular</i>	24
4	Análise estatística	25
5	Resultados	26

5.1	<i>Teste de Hershberger</i>	26
5.1.1	<i>Ganho de peso corporal, peso de órgãos hormônio-dependentes</i>	26
5.2	<i>Estudo da toxicidade reprodutiva</i>	28
5.2.1	<i>Comportamento sexual</i>	28
5.2.2	<i>Ganho de peso corporal, peso de órgãos, concentração plasmática de testosterona e sinais de toxicidade</i>	31
5.2.3	<i>Parâmetros espermáticos</i>	32
5.2.4	<i>Avaliação histomorfométrica</i>	33
6	Discussão	35
7	Conclusão	38
	Referências	39

1 Introdução

O interesse em monitorar os contaminantes ambientais vem crescendo desde a década de 1970 (AHERNE; ENGLISH; MARKS, 1985; HIGNITE; AZARNOFF, 1977), principalmente pelo reconhecimento dos efeitos destes contaminantes sobre o organismo, tais como: elevação de enzimas hepáticas e musculares (fosfate ácida e alcalina) em peixes (Ftalato de dietila) (GHORPADE *et al.*, 2002), redução na contagem espermática em homens (Bifenilos policlorados e ésteres de ftalato) (ROZATI *et al.*, 2002), puberdade precoce em mulheres (fitoestrogenos, ftalatos e fenóis) (WOLFF *et al.*, 2010), entre outros.

A denominação contaminantes ambientais abrange uma variedade de produtos, no entanto, uma atenção especial vem sendo dada aos chamados desreguladores endócrinos (DEs), que são definidos como uma substância ou mistura de substâncias exógenas, as quais podem imitar ou interferir com uma ou mais funções do sistema endócrino (IPCS/WHO, 2002). Dentre os inúmeros DEs, encontra-se o Triclosan (TCS) (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter) (AHN *et al.*, 2008; BEDOUX *et al.*, 2012), o qual possui ação antibacteriana sendo aplicado a uma variedade de produtos de consumo, como: cosméticos, desodorantes, sabonetes, óleos corporais, entre outros (RAMOS; BRAGA; ALMEIDA PAZ, 2009; RUSSELL, 2004)

A grande demanda de utilização deste antibacteriano durante décadas fez do TCS um composto presente na lista de contaminantes emergentes, que compõe substâncias químicas sintéticas ou de ocorrência natural que normalmente não são monitoradas no ambiente, mas tem o potencial de introduzir-se no meio ambiente e causar efeitos adversos em ecossistemas e/ou na saúde humana (MADHUMITHA RAGHAV *et al.*, 2013). Nesse sentido, o TCS já foi detectado em diversos países como: o Brasil, onde no estado de São Paulo uma concentração que varia entre 2,2 e 66 ng/L foi detectada em diversos rios (MONTAGNER *et al.*, 2014), e a Suíça, onde 23 a 5370 ng/L de TCS foi detectada nos efluentes de águas residuais (DHILLON *et al.*, 2015). Além disso, estudos demonstram que o TCS é apenas parcialmente removido em estações de tratamento de águas residuais, permitindo que este composto esteja presente em água potável (BEDOUX *et al.*, 2012; WICK *et al.*, 2011), além de já ter sido detectado em outros compartimentos ambientais como biossólidos (CHU; METCALFE, 2007).

Em humanos, a pele e o trato gastrointestinal são as vias mais prováveis de exposição ao TCS (MOSS; HOWES; WILLIAMS, 2000; QUECKENBERG *et al.*, 2010; SANDBORGH-ENGLUND *et al.*, 2006), e já tem sido demonstrado que o contato frequente a este produto está associado com altas concentrações do mesmo na urina de indivíduos com

mais de 6 anos (CALAFAT *et al.*, 2008), no leite materno (ADOLFSSON-ERICI *et al.*, 2002) e ainda em plasma sanguíneo de cordão umbilical de humanos (PYCKE *et al.*, 2014).

Quanto à metabolização do TCS em mamíferos, sabe-se que é metabolizado principalmente a conjugados de sulfato e glucuronídeo e excretado com maior relevância na urina em humanos, e através da via fecal em ratos (FANG *et al.*, 2010; SANDBORGH-ENGLUND *et al.*, 2006). Após administração oral de 4 mg de TCS em humanos, as concentrações plasmáticas do antibacteriano aumentam rapidamente, com uma concentração máxima dentro de 1 a 3 h (SANDBORGH-ENGLUND *et al.*, 2006).

A ação antibacteriana do TCS se dá tanto em bactérias gram-negativas quanto gram-positivas (HEATH; ROCK, 2000; REGOS *et al.*, 1979). Em baixas concentrações, o TCS possui um efeito bacteriostático, inibindo o gene *FabI* que codifica a enzima Enoil-ACP-redutase (ENR), essencial para a síntese dos ácidos graxos da membrana citoplasmática das bactérias (ESCALADA *et al.*, 2005; HEATH; ROCK, 2000; MCMURRY; OETHINGER; LEVY, 1998). No entanto, altas concentrações de TCS geram efeito bactericida por desestabilizar a membrana citoplasmática e gerar um vazamento de K^+ (ESCALADA *et al.*, 2005; SULLER; RUSSELL, 2000).

Estudo demonstra que o TCS atua como DEs em cultura de células de Leydig de ratos ao reduzir a ação de enzimas cruciais para o processo de espermatogênese, como a enzima adenilil-ciclase (KUMAR; BALOMAJUMDER; ROY, 2008). Ao interferir sobre esta enzima, o TCS faz com que a síntese do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPC) seja reduzida, pois sua síntese é dependente da enzima adenilil-ciclase (BEAVO; BRUNTON, 2002; KUMAR; BALOMAJUMDER; ROY, 2008). Por vez, a redução da síntese de AMPC (responsável por regular a expressão e ativação da proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR)) leva à atenuação da expressão da proteína StAR, a qual tem como função transportar o colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna em células de Leydig, sendo utilizado por enzimas esteroidogênicas no processo de espermatogênese (KUMAR; BALOMAJUMDER; ROY, 2008; STOCCO; CLARK, 1996). Além de interferir no funcionamento de enzimas, o TCS também promoveu efeitos androgênicos ao deslocar a testosterona do seu receptor em cultura de células de tumor mamário em ratos (GEE *et al.*, 2008).

Em pesquisas *in vivo*, o estudo com ratos Sprague-Dawley (42 dias de vida) tratados com TCS, via gavagem, apresentam uma redução na produção espermática diária, após 8 semanas de tratamento nas doses de 50 e 200 mg/kg (LAN *et al.*, 2015). Além disso, o TCS reduz em ratos Wistar pré-puberes (23 dias de vida) as concentrações do hormônio folículo

estimulante (FSH), colesterol, hormônio luteinizante (LH) e pregnenolona, nas doses de 200 e 300 mg/kg após 31 dias de tratamento (ZORRILLA *et al.*, 2009), e ainda, na dose de 20 mg/kg reduz as concentrações de testosterona de ratos Wistar adultos (70 dias de vida), após 60 dias de tratamento (KUMAR *et al.*, 2009).

Portanto, considerando-se 1) o uso generalizado do TCS em produtos como desodorantes, sabonetes, óleos corporais, plásticos, entre outros; 2) a exposição prolongada a essa substância, uma vez que este composto está presente em compartimentos ambientais como, biossólidos, riachos e ainda na água potável; 3) os relatos de toxicidade do TCS ao sistema reprodutor masculino como, alterações na produção espermática de ratos, 4) a escassez de estudos utilizando o Teste de Hershberger para avaliar um possível efeito (anti)androgênico do TCS e 5) a escassez de estudos usando métodos como: comportamento sexual, motilidade espermática, viabilidade espermática e histomorfometria testicular para avaliar a toxicidade reprodutiva do TCS em ratos Wistar, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento com o TCS pode resultar em alterações sobre a função reprodutiva de ratos.

Para isto, este foi o primeiro estudo a utilizar o Teste de Hershberger para avaliar um possível efeito (anti)androgênico do TCS em ratos Wistar com 52 dias de vida e foi o primeiro estudo a usar métodos como: comportamento sexual, motilidade espermática, viabilidade espermática e histomorfometria testicular para avaliar uma possível toxicidade reprodutiva do TCS em ratos Wistar com 49 dias de vida.

2 Objetivo

2.1 *Objetivo geral*

Investigar os efeitos do TCS nas funções reprodutivas em ratos Wistar adultos.

2.2 *Objetivos específicos*

Investigar um possível efeito (anti)androgênico do TCS em ratos no Teste Hershberguer a partir da análise do:

- ganho de peso corporal e peso dos órgãos reprodutivos e hormônio-dependentes (próstata, vesículas seminais, músculo elevador do ânus, glândulas de Cowper, glândula do pênis, fígado, glândulas adrenais e rins).

Investigar se o tratamento prolongado com o TCS pode alterar em ratos:

- o ganho de peso, o peso dos órgãos reprodutivos e hormônio-dependentes (ducto deferente, testículos, próstata, vesículas seminais, músculo elevador do ânus, glândulas de Cowper, glândula do pênis, fígado, glândulas adrenais e rins) e concentração plasmática de testosterona;
- os parâmetros espermáticos (viabilidade, motilidade, morfologia, contagem e concentração) e histomorfometria testicular;
- os parâmetros comportamentais (frequência de comportamento copulatório e ejaculação, parâmetros copulatório e motivação sexual);

3 Materiais e métodos

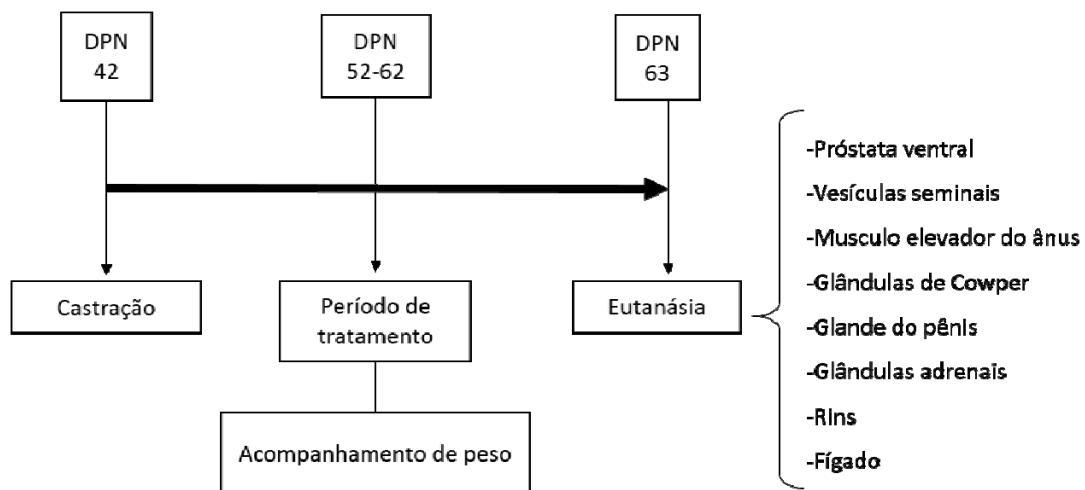
3.1. Teste de Hershberger

Este teste foi realizado de acordo com o guideline – OCSPP 890.1400 (EPA, 2011).

3.1.1. Delineamento experimental

O diagrama a seguir (Figura 1) resume o delineamento experimental empregado nesse teste.

Figura 1 - Delineamento experimental do Teste de Hershberger. DPN: dia pós-natal.



3.1.2. Drogas

TCS 99,38% puro foi adquirido da Vivimed Labs Limited (Habsiguda Hyderabad, Índia) (CAS no. 3380-34-5). Proprianato de testosterona 99,41% puro (CAS no. 57-85-2) e flutamida 99,60% puro (CAS no. 13311-84-7) foram adquiridos da Fragon (São Paulo, Brasil). Todas as drogas foram dissolvidos em óleo de milho.

3.1.3. Animais e tratamento

Foram utilizados ratos Wistar provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), transferidos para o Biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas do CCB, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvilab®, Colombo, PR) à vontade.

No DPN 42 foi realizado o procedimento de castração sob anestesia com éter etílico por incisão no escroto e remoção de ambos os testículos e epidídimos com ligadura dos vasos sanguíneos e dos ductos seminais. No DPN 52, os ratos foram pesado e aleatoriamente distribuídos aos grupos experimentais. Variações no peso entre os animais no primeiro dia de tratamento foi de 10%.

Para avaliar o possível efeito androgênico do TCS, os ratos Wistar foram distribuídos nos seguintes grupos (n: 6/grupo):

- Grupo veículo: receberam diariamente óleo de milho, por gavagem, do dia pós-natal (DPN) 52 ao 62;
- Grupo T (controle positivo): receberam testosterona 0,4 mg/kg diariamente, via subcutânea, do DPN 52 ao 62;
- Grupo TCS 0,8: receberam 0,8 mg/kg de TCS diariamente, por gavagem, do DPN 52 ao 62;
- Grupo TCS 2,4: receberam 2,4 mg/kg de TCS diariamente, por gavagem, do DPN 52 ao 62;
- Grupo TCS 8,0: receberam 8,0 mg/kg de TCS diariamente, por gavagem, do DPN 52 ao 62;

O propionato de testosterona foi utilizado como um controle positivo para androgênicidade.

Para avaliar o possível efeito antiandrogênico do TCS, os ratos Wistar foram distribuídos nos seguintes grupos (n: 6/grupo):

- Grupo T (controle negativo): receberam testosterona 0,4 mg/kg diariamente, via subcutânea, do DPN 52 ao 62;
- Grupo T+FLUT (controle positivo): receberam testosterona 0,4 mg/kg (via subcutânea) mais 3 mg/kg de flutamida (por gavagem) diariamente do DPN 52 ao 62;
- Grupo T+TCS 0,8: receberam testosterona 0,4 mg/kg (via subcutânea) mais 0,8 mg/kg de TCS diariamente (por gavagem) do DPN 52 ao 62;
- Grupo T+TCS 2,4: receberam testosterona 0,4 mg/kg (via subcutânea) mais 2,4 mg/kg de TCS diariamente (por gavagem) do DPN 52 ao 62;

- Grupo T+TCS 8,0: receberam testosterona 0,4 mg/kg (via subcutânea) mais 8,0 mg/kg de TCS diariamente (por gavagem) do DPN 52 ao 62;

A flutamida é utilizada como um controle positivo para antiandrogênicidade pois interfere na ação de hormônios androgênicos, inibindo a ligação dos mesmo aos receptores androgênicos das células dos tecidos-alvos.

Todas as drogas foram administradas durante 10 dias consecutivos após restrição alimentar de 3h. Vinte e quatro horas depois da última dose administrada (DPN 63), os animais foram pesados e submetidos a eutanásia por decapitação. Após a laparotomia os órgãos foram removidos e pesados.

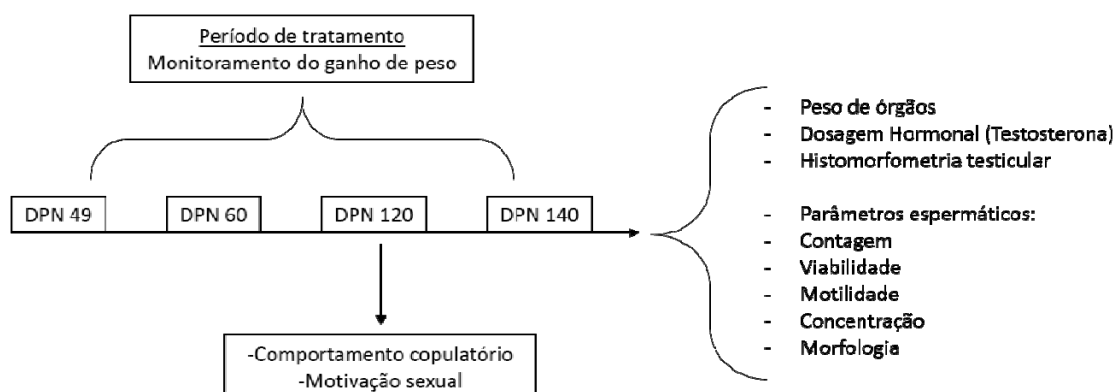
3.2 Estudo da toxicidade reprodutiva

Este estudo foi realizado de acordo com o guideline OECD/OCDE 416 (OECD/OCDE, 2001).

3.2.1 Delineamento experimental

O diagrama a seguir (Figura 2) resume o delineamento experimental empregado nesse trabalho.

Figura 2 - Delineamento experimental do estudo da toxicidade reprodutiva. DPN: dia pós-natal.



3.2.2. Drogas

TCS 99,38% puro foi adquirido da Vivimed Labs Limited (Habsiguda Hyderabad, India) (CAS no. 3380-34-5).

3.2.3 Animais e tratamento

Foram utilizados ratos Wistar provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), transferidos para o Biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas do CCB, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvilab®, Colombo, PR) à vontade.

Ratos Wistar foram distribuídos entre quatro grupos ($n=10/\text{grupo}$):

- Grupo CTR (controle): receberam diariamente óleo de milho, por gavagem, do DPN 49 ao 140;
- Grupo TCS 0,8: receberam 0,8 mg/kg de TCS diariamente, por gavagem, do DPN 49 ao 140;
- Grupo TCS 2,4: receberam 2,4 mg/kg de TCS diariamente, por gavagem, do DPN 49 ao 140;
- Grupo TCS 8,0: receberam 8,0 mg/kg de TCS diariamente, por gavagem, do DPN 49 ao 140.

O tratamento foi realizado uma vez ao dia, obedecendo sempre à mesma rotina de horários de administração (11:00-13:00). O período de tratamento foi baseado no guideline OECD/OCDE 416, o qual sugere o tratamento de pelo menos 70 dias para atingir um ciclo espermático completo.

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA, 2008), a ingestão diária aceitável de TCS em humanos é de 0,3 mg/kg. Considerando que existe a exposição ao TCS através da água potável e que para esta exposição o fator de alocação é de 0,2 (UMBUZEIRO, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011), foram descontados 20% do valor de ingestão diário aceitável do TCS para humanos. Posteriormente, gerou-se um valor aproximado de 0,2 mg/kg, o qual foi aplicado a escala $BW^{3/4}$ (EPA, 2006) para realizar o ajuste dosimétrico onde considerou-se o peso de um humano de 70 kg e o de um roedor com 250 g, obtendo então o valor de 0,8 mg/kg como valor de ingestão diária para o rato. A dose de 2,4 mg/kg foi adotada como uma dose intermediária e para a dose de 8,0 mg/kg adotou-se o fator 10, assumindo as variações intra-espécies.

Todos os procedimentos nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UEL: 283.2015.27).

3.2.4 *Peso corporal*

A determinação do peso corporal foi realizada a cada três dias, durante o período de tratamento, para análise de ganho de peso corporal e correção volumétrica das doses de TCS administradas. Além disso, os animais foram monitorados diariamente quanto ao bem-estar geral e observados quanto a sinais gerais de toxicidade como lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores.

3.2.5 *Avaliação dos comportamentos sexuais*

3.2.5.1 *Avaliações do comportamento copulatório*

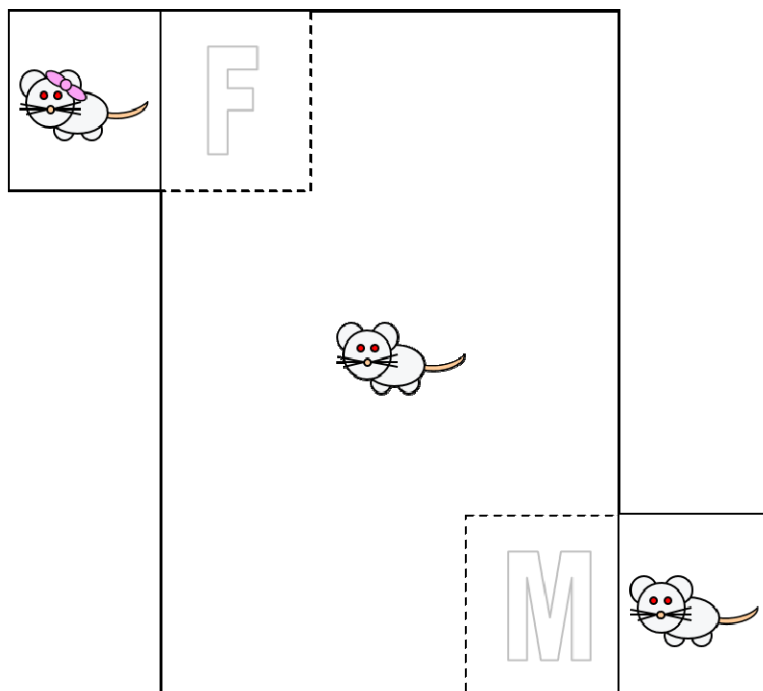
Quinze dias antes das análises comportamentais, os animais (DPN 105) foram transferidos para o biotério com ciclo de luz claro/escuro de 12x12 horas invertido, que possui controle de luminosidade, ruído e temperatura para a perfeita adaptação das funções fisiológicas. As observações comportamentais foram iniciadas 4h após o início da fase escura e foram gravadas por uma câmera de vídeo acoplada a um computador em uma sala adjacente. A partir do DPN 120, cada macho foi inicialmente colocado na gaiola de observação (caixa transparente) e após 5 min. de aclimatação uma fêmea em estro natural foi introduzida na mesma caixa. Durante 30 minutos, as latências e frequências para intromissão e ejaculação foram observadas (GERARDIN *et al.*, 2006). Se por acaso o macho não apresentasse comportamento dentro de 10 min, a avaliação era interrompida e repetida no dia seguinte. Machos que falharam na segunda avaliação foram considerados sexualmente inativos (AGMO, 1997).

3.2.5.2 *Teste de motivação sexual*

Após análise de comportamento copulatório, o teste de motivação sexual foi realizado. Uma arena retangular de 50 x 50 x 100 cm (altura x largura x comprimento) apresentando duas aberturas que se comunicavam com duas arenas menores, ambas com 25 cm² foi utilizada para realização deste teste. As arenas menores são diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal é fechada com uma tela de arame (Figura 2). Uma fêmea em estro natural (zona de incentivo da fêmea) foi adicionada a uma das arenas pequenas, e na outra arena, um macho sexualmente ativo (zona de incentivo do macho). Na frente de cada abertura das arenas menores no piso da arena principal há duas áreas delimitadas com 25 cm² (zonas). O rato macho a ser analisado foi posicionado no centro da arena

principal e seu comportamento foi observado durante 20 min, sendo o número de visitas e o tempo total gasto visitando cada zona de incentivo. Após registrado esses dados, o escore de preferência foi calculado ($[\text{tempo de permanência na zona de fêmea} / \text{tempo total gasto em ambas as zonas de incentivo}] \times 100$) (ÁGMO, 2003).

Figura 3 - Teste de motivação sexual representação esquemática. Zona de incentivo da fêmea representada (F) e a zona de incentivo do macho (M).



3.2.6 Coleta dos órgãos

Após 20 dias do teste de motivação sexual (para reposição do estoque espermático), os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, e então realizada a coleta de sangue para posterior determinação da concentração plasmática de testosterona descrito no item 3.2.7. Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia para visualização dos órgãos reprodutores. Primeiramente foi removido o ducto deferente direito o qual foi utilizado para análise de motilidade (3.2.8.1), viabilidade (3.2.8.3) e concentração espermática (3.2.8.2). O ducto deferente esquerdo foi retirado para análise da morfologia dos espermatozoides (3.2.8.5). Além disso, testículos, epidídimos, vesículas seminais (com secreção), próstata ventral, fígado, glândulas adrenais e rins foram retirados e pesados em balança analítica. O testículo e o epidídimo esquerdo foram congelados para posterior contagem espermática (3.2.8.4), o testículo direito foi preparado para histomorfometria testicular (3.2.9).

3.2.7 Concentração plasmática de testosterona

Amostras de sangue foram coletadas (em tubos de ensaio heparinizados) sempre no mesmo horário, centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 4°C) e o plasma congelado a -20°C para análises posteriores. A concentração de testosterona plasmática foi obtida utilizando o teste de imunoensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT® 2nd Generation Testosterone), com o coeficiente de variação intra-ensaio e sensibilidade de 4,6% e 0,15 nmol/L respectivamente.

3.2.8 Parâmetros espermáticos

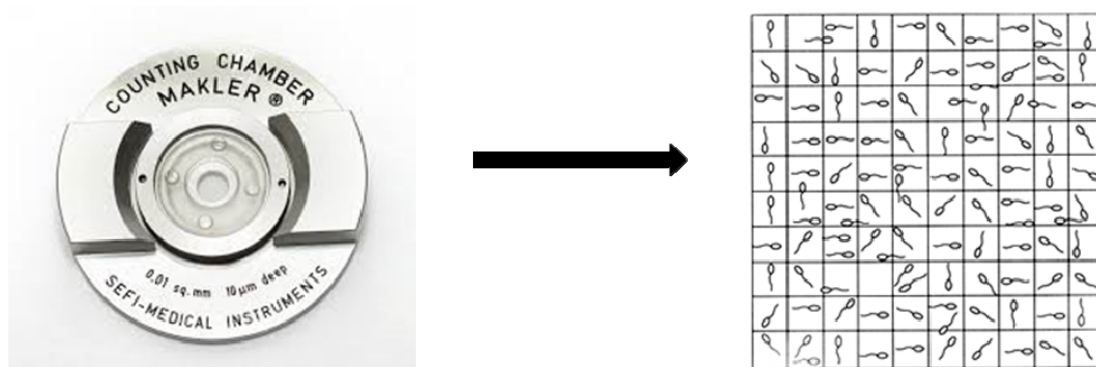
3.2.8.1. Motilidade espermática

A motilidade espermática foi analisada de acordo com Perobelli et al., (2010) e Favareto et al., (2011). A partir do ducto deferente direito foram obtidos os espermatozoides para a análise, estes foram diluídos em 1 ml de meio GV HEPES (Ingamed, Brasil) pré-aquecido a 34°C. Na câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) (Figura 3) foi adicionado uma alíquota de 10µl da amostra deste diluído, e então analisados em fase de contraste do microscópio óptico (100X) (OSM-223287, Olympus). Um total de 100 espermatozoides por animal foi analisado classificados como móveis e imóveis (PEROBELLI *et al.*, 2010).

3.2.8.2. Concentração espermática

Após realizada a análise de motilidade espermática, a concentração espermática foi avaliada em uma câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) (Figura 3) com aumento de 100X, e estimada em milhões por mililitro. A câmara de Makler possui uma marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1 mm²) cada um com 0,1 mm x 0,1 mm e uma profundidade de 0,01 mm. Na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula o volume compreendido é de 0,001 mm³. Apenas os espermatozoides presentes em 10 quadrados (marcação da própria câmara) escolhidos aleatoriamente, em quatro campos diferentes foram contados, e posteriormente realizou-se a média (PIFFER *et al.*, 2009).

Figura 4 - Câmara de Makler. À esquerda, foto do modelo da câmara utilizada. À direita, representação esquemática da vista superior do aparelho, através do microscópio, com espermatozóides.



3.2.8.3. Viabilidade espermática

A viabilidade espermática foi analisada a partir da técnica de coloração com eosina-nigrosina (BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003), em que 50 µl de meio GV HEPES com espermatozoides foram misturados com eosina-nigrosina e diretamente examinados. Um total de 100 espermatozoides por animal foi analisado e classificados como viáveis e não viáveis.

3.2.8.4. Contagem espermática

O testículo esquerdo decapsulado e o epidídimo esquerdo, dos diferentes grupos experimentais, foram removidos e estocados a -20° C para posterior determinação da concentração de células germinativas.

Número de espermátides maduras no testículo e cálculo da produção diária de espermatozoides: Para a realização da contagem das espermátides no testículo, procedeu-se o descongelamento dos testículos dos ratos dos diferentes grupos experimentais seguido de homogeneização do material, segundo método descrito por Robb; Amann; Killian (1978) e adaptado por Fernandes et al. (2007). Após o descongelamento do testículo decapsulado, o parênquima testicular pesado foi colocado em um tubo de ensaio com tampa, onde foram adicionados 5ml de solução contendo NaCl (0,9%), Triton-X (0,05%) e Thimerosal (0,01%). Em seguida, este tubo foi tampado e pesado novamente para cálculo da primeira diluição. A amostra foi homogeneizada com a utilização de um homogeneizador em velocidade máxima por 2 minutos. Após nova diluição na proporção 1:10 na solução de Triton-X100 (100µl do homogeneizado + 900µl de solução), uma alíquota foi transferida por meio de uma pipeta

Pasteur para a câmara de Neubauer (Figura 4), onde as espermátides resistentes à homogeneização foram contadas (2 câmaras por animal, 5 campos por câmara). Para calcular a produção espermática diária, o número de espermátides no testículo foi dividido por 6,1, que é o nº de dias em que essas espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio seminífero. Para facilitar a visualização, os dados obtidos (número de espermátides) são apresentados em 10^6 (em milhões) por testículo e em número de espermátides $\times 10^6$ por grama (g) de testículo.

Figura 5 - Câmara de Neubauer. À direita, foto do modelo de câmara utilizado para contagem espermática. À esquerda, representação esquemática da vista através do microscópio de uma das câmaras do aparelho.



Número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo: os epidídimos esquerdos foram inicialmente divididos nas unidades: cabeça/corpo e cauda. As porções epididimárias foram separadas logo após a coleta e congeladas a -20° C até a homogeneização e contagem dos espermatozoides de acordo com o mesmo procedimento descrito para o item anterior com a diferença que, antes da homogeneização, as peças foram cortadas em pequenos pedaços com tesoura bem afiada. Este material foi diluído em 1ml da mistura contendo Triton X100 para cada 100 mg de cauda e 1ml da mistura para cada 200mg de cabeça/corpo. O tecido epididimário foi então homogeneizado, diluído e contado em câmaras de Neubauer. O tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo foi calculado dividindo-se o número de espermatozoides na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo, pelo valor obtido na produção diária de espermatozoides de cada animal (ROBB; AMANN; KILLIAN, 1978). Para facilitar a visualização, o número de espermatozoides no epidídimo é apresentado em $\times 10^6$ espermatozoides por órgão e em $\times 10^6$ espermatozoides por grama de órgão.

3.2.8.5. Morfologia espermática

Para a análise da morfologia dos espermatozoides o ducto deferente esquerdo dos ratos foi seccionado nas extremidades anterior e posterior e lavado internamente com o auxílio de

agulha e seringa contendo 1,0 ml de formol-salina (10%). O conteúdo foi colhido em um tubo e mantido sob refrigeração para posterior análise. No dia da análise o conteúdo foi depositado em lâmina histológica, coberto com lamínula e após 90 min de secagem foram analisados 200 espermatozoides por animal em fase de contraste do microscópio (400x) (SEED *et al.*, 1996). Anormalidades morfológicas foram classificadas em duas categorias gerais: morfologia de cabeça (sem curvatura característica ou forma isolada, ou seja, sem cauda anexada) ou morfologia de cauda (quebrada ou isolada, isto é, sem cabeça anexada) (FILLER, 1993).

3.2.9. *Histomorfometria testicular*

Para análise desse parâmetro, o testículo direito foi dissecado, pesado e fixado em solução de Bouin por 24 horas e depois foi estocado em etanol 70%. Posteriormente foi cortado em fragmentos de tecido, desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. Foram feitos cortes com 7µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina.

A composição dos dados volumétricos do parênquima testicular foi obtida usando contagem de pontos utilizando uma grade de 100 pontos na ocular em aumento final de 100x. Um total de 10 campos escolhidos aleatoriamente (1000 pontos) foram pontuados para cada animal. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em µl, foi estimado a partir do conhecimento do porcentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. Para obter uma medição mais precisa do volume do parênquima testicular, subtraiu-se do peso bruto do testículo pelo peso da túnica albugínea (~6,5%). O peso do testículo foi considerado igual ao seu volume, uma vez que, a densidade do testículo é quase 1,0 (~1,03–,04) (FRANCA; GODINHO, 2003).

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido pela mensuração ao acaso de 15 secções transversais de túbulo seminífero por animal escolhidos de forma aleatória com perfis redondos ou arredondados. As medições foram realizadas a partir de um micrómetro retículo linear acoplado a um microscópio ocular (Olympus, OSM-223287) em um aumento de 100x. O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS), expresso em metros por testículo, foi calculada a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos e da medição do diâmetro tubular obtido para cada animal, de acordo com a seguinte fórmula: $CTTS = VTS / \pi R^2$, em que VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL *et al.*, 1963; DORST V. J; SAJONSKI, 1974).

4 Análise estatística

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar normalidade (Teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Teste Levene's) de cada variável. Variáveis que apresentaram normalidade e homogeneidade de variâncias foram conduzidas a análises paramétricas, com os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na ausência de normalidade e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram transformadas a fim de atingir os critérios para a análise paramétrica, os dados que ainda não apresentaram normalidade e homogeneidade foram submetidos ao teste não-paramétrico, apresentados como mediana (1º e 3º quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

-ANOVA complementado com Dunnett's: ganho de peso corporal e peso de órgãos do Teste de Hershberger.

-ANOVA complementado com Bonferroni ou Tukey: Ganho de peso corporal, análise dos parâmetros espermáticos, avaliação histomorfométrica testicular, concentração plasmática de testosterona, comportamento copulatório e motivação sexual.

-ANCOVA complementado com Bonferroni: Peso de órgãos tendo o peso corporal final como covariável.

-Kruskal-Wallis complementado com teste Dunn: Comprimento total dos túbulos seminíferos, Comportamento copulatório.

-Teste de Qui-quadrado (X^2): Frequência de Comportamento copulatório e Ejaculação.

O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo software SPSS (IBM, SPSS statistics 19) e GraphPad Prism 7.

5 Resultados

5.1 *Teste de Hershberger*

5.1.1 *Ganho de peso corporal, peso de órgãos hormônio-dependentes.*

ANOVA complementado com teste Dunnett's indicou que o tratamento com testosterona por 10 dias consecutivos elevou significativamente o peso de órgãos como: vesículas seminais, próstata ventral, glândulas de Cowper, músculo levantador do ânus e a glândula do pênis ($p < 0,05$) (Tabela 1). No entanto, não houve alterações significativas quanto aos grupos tratados com TCS quando comparados com o grupo veículo ($p > 0,05$).

Além disso, o tratamento com flutamida mais testosterona por 10 dias consecutivos reduziu significativamente o peso dos órgãos como: vesículas seminais, próstata ventral, glândulas de Cowper, músculo levantador do ânus e a glândula do pênis ($p < 0,05$) (Tabela 2). Por outro lado o tratamento concomitante com testosterona e TCS não alterou o peso dos órgãos hormônio-dependentes quando comparado ao grupo tratado com testosterona e flutamida.

Tabela 1 - Avaliação de um possível efeito androgênico do TCS no Teste de Hershberger. Peso corporal e peso absoluto de órgãos hormônio-dependentes.

	Veículo [6]	T [6]	TCS 0,8 [6]	TCS 2,4 [6]	TCS 8,0 [6]
Peso corporal inicial (g)	204,38±11,78	194,71±7,19	206,64±9,04	208,10±4,15	208,52±8,74
Peso corporal final (g)	250,70±9,39	261,07±9,72	253,35±8,72	258,61±3,89	256,49±9,19
Vesículas seminais (mg)	27,00±4,40	341,73±27,49*	24,30±3,41	23,65±1,99	32,18±2,96
Próstata (mg)	6,97±1,03	96,42±4,03*	4,93±0,79	6,25±1,68	8,38±2,33
Glândulas de Cowper (mg)	3,70±0,53	27,15±2,54*	2,90±0,56	4,12±0,77	4,62±0,84
Músculo levantador do ânus (mg)	119,83±7,81	362,38±21,88*	107,22±3,53	126,82±4,84	120,38±8,83
Glândula do pênis (mg)	17,17±2,14	63,00±4,48*	16,48±1,06	16,97±1,95	17,92±1,39
Glândulas adrenais (mg)	53,53±3,95	43,68±2,56	53,32±2,65	57,62±3,87	50,67±3,92
Fígado (g)	10,29±0,43	12,10±0,50	9,97±0,52	10,85±0,21	11,49±0,54
Rins (g)	1,72±0,10	1,87±0,07	1,73±0,07	1,74±0,06	1,77±0,07

Valores expressos em média ± EPM, *p < 0,05 quando comparado ao grupo veículo (ANOVA complementado com Dunnett). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Grupo veículo (grupo controle) tratado com óleo de milho; Grupo T: tratado com propionato de testosterona 0,4 mg/kg; TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

Tabela 2 - Avaliação de um possível efeito antiandrogênico do TCS no Teste de Hershberger. Peso corporal e peso absoluto de órgãos hormônio-dependentes.

	T [6]	T + FLUT [6]	T +TCS 0,8[6]	T + TCS 2,4[6]	T + TCS 8,0[6]
Peso corporal inicial (g)	194,71±7,19	211,21±10,11	203,94±13,30	209,24±5,99	207,43±8,64
Peso corporal final (g)	261,07±9,72	266,03±9,43	264,59±15,59	269,05±9,48	268,31±11,63
Vesículas seminais (mg)	341,73±27,49	112,35±14,05*	374,38±45,62	412,78±49,32	381,53±38,20
Próstata (mg)	96,42±4,03	40,77±5,61*	110,28±10,64	98,90±13,23	90,08±13,53
Glândulas de Cowper (mg)	27,15±2,54	15,40±1,46*	27,83±3,49	31,33±2,89	27,78±2,62
Músculo levantador do ânus (mg)	362,38±21,88	224,23±7,79*	347,12±32,70	374,95±12,92	365,00±26,12
Glândula do pênis (mg)	63,00±4,48	35,45±3,06*	59,02±4,04	61,92±2,59	57,93±5,92
Glândulas adrenais (mg)	43,68±2,56	48,23±1,85	47,10±3,81	44,97±2,68	45,30±2,89
Fígado (g)	12.10±0.50	12.04±0.70	11,21±0,90	12,34±0,70	12,02±0,59
Rins (g)	1,87±0,07	1,89±0,08	1,68±0,18	1,80±0,09	1,87±0,07

Valores expressos em média ± EPM, *p < 0,05 quando comparado ao grupo veículo (ANOVA complementado com Dunnett). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Grupo T: tratado com propionato de testosterona 0,4 mg/kg; Grupo T + FLUT: tratado com propionato de testosterona 0,4 mg/kg + flutamida 3 mg/kg; T + TCS 0,8: tratado com propionato de testosterona 0,4 mg/kg + TCS na dose de 0,8 mg/kg; T + TCS 2,4: tratado com propionato de testosterona 0,4 mg/kg + TCS na dose de 2,4 mg/kg; T + TCS 8,0: tratado com propionato de testosterona 0,4 mg/kg + TCS na dose de 8,0 mg/kg.

5.2. Estudo da toxicidade reprodutiva

5.2.1. Comportamento sexual

O tratamento com TCS não revelou alterações significativas quanto a frequência de comportamento copulatório $\chi^2(3) = 1,103$, $p = 0,776$ e a frequência de ejaculação $\chi^2(3) = 1,890$, $p = 0,596$ ($p > 0,05$) dentre os grupos experimentais (Tabela 3).

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros do comportamento copulatório. Nenhuma diferença estatística foi apontada nos parâmetros de latência de intromissão e

ejaculação, números de intromissões e números de ejaculações (ANOVA, $p > 0,05$) independente d grupo experimental.

Os parâmetros de motivação sexual estão apresentados na Tabela 5. Não houve diferença estatística no tempo passado na zona do macho (s) [$F(3,36) = 0,529$, $p = 0,665$], na zona da fêmea (s) [$F(3,36) = 0,994$, $p = 0,407$], no número de visitas na zona do macho [$F(3,36) = 0,138$, $p = 0,936$], número de visitas na zona da fêmea [$F(3,36) = 0,486$, $p = 0,694$] e no escore de preferência [$F(3,36) = 0,729$, $p = 0,541$] entre os grupos experimentais (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabela 3 - Frequência de comportamento copulatório e ejaculação de ratos adultos.

	Grupo Experimental			
	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
Frequência de Comportamento Copulatório (%)	60 [6/10]	50 [5/10]	40 [4/10]	60 [6/10]
Frequência de Ejaculação (%)	80 [5/6]	80 [4/5]	50 [2/4]	80 [5/6]

Avaliação da frequência de comportamento copulatório e ejaculação de ratos adultos. Valores expressos em porcentagem (Teste χ^2 , $p > 0,05$). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Grupo CTR (grupo controle) tratado com óleo de milho; Grupo TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

Tabela 4 - Comportamento copulatório de ratos adultos.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
Latência para a primeira intromissão (s)	282,90 ± 74,72 [6/10]	344,40 ± 98,56 [5/10]	400,10 ± 65,20 [4/10]	173,90 ± 37,65 [6/10]
Nº.de Intromissões até a 1º ejaculação	21,33± 4,02 [6/10]	14,60± 4,26 [5/10]	17,25 ± 6,34 [4/10]	17,67 ± 5,29 [6/10]
Latência para a 1º Ejaculação (s)	853,59 (794,92- 944,64) [5/6]	963,08 (838,90- 1208,54) [4/5]	1135,44 (913,00- 1357,87) [2/4]	877,03 (657,36- 916,19) [5/6]
Latência para a 1º Intromissão pós-ejaculação (s)	298,89 (298,44- 316,14) [5/6]	309,18 (306,12- 314,60) [4/5]	326,44 (289,60- 363,27) [2/4]	350,80 (332,40- 375,22) [5/6]
Nº.de Intromissões pós-ejaculação	13,00 (10,00- 14,00) [5/6]	14,00 (9,75- 17,00) [4/5]	12,50 (10,25- 14,75) [2/4]	16,00 (12,00- 17,00) [5/6]
Nº.de Ejaculações	2,00 ± 0,44 [5/6]	1,60 ± 0,60 [4/5]	1,00 ± 0,70 [2/4]	1,66 ± 0,33 [5/6]

Análise dos parâmetros do comportamento copulatório de ratos adultos. Valores da latência para a primeira intromissão, nº de intromissões até a 1º ejaculação e nº de ejaculações estão expressos em média, ± EPM (ANOVA, $p > 0,05$). Os parâmetros de latência para a 1º ejaculação, latência para a 1º intromissão pós-ejaculação, nº. de intromissões pós-ejaculação e nº. de intromissões pós-ejaculação estão expressos como mediana (1º e 3º quartil) e foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, $p > 0,05$. Número entre colchetes indicam o número de animais que apresentaram o comportamento/número total de animais do grupo. CTR (Grupo controle): óleo de milho; TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

Tabela 5 - Motivação sexual dos ratos adultos.

	CTR [10]	TCS 0,8 [10]	TCS 2,4 [10]	TCS 8,0 [10]
Tempo na zona do macho (s)	406,64 ± 56,52	424,62 ± 52,90	339,32 ± 64,40	431,50 ± 57,14
Tempo na zona da fêmea (s)	462,55 ± 50,42	442,15 ± 64,11	584,54 ± 74,55	479,84 ± 63,08
Número de visitas na zona do macho	18,00 ± 1,15	17,20 ± 1,28	17,00 ± 1,44	17,10 ± 0,99
Número de visitas na zona da fêmea	19,40 ± 1,39	17,40 ± 1,51	18,10 ± 1,33	17,30 ± 1,30
Escore de preferência	53,65 ± 5,91	49,98 ± 6,57	62,63 ± 7,19	52,33 ± 6,15

Análise da motivação sexual dos ratos adultos. Valores expressos em média ± EPM (ANOVA $p > 0,05$). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTR (Grupo controle): óleo de milho; TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

5.2.2. Ganho de peso corporal, peso de órgãos, concentração plasmática de testosterona e sinais de toxicidade

O ganho de peso corporal (g) (DPN 140 – 49) não foi influenciado pelo tratamento repetitivo com o TCS (CTR: $237,71 \pm 11,08$; TCS 0,8: $215,78 \pm 13,26$; TCS 2,4: $234,47 \pm 11,75$; TCS 8,0: $224,93 \pm 10,30$ n=10/grupo) como indicado pelo teste paramétrico ANOVA, onde demonstrou $p > 0,05$. Também não foram observadas diferenças significativas no peso corporal final (DPN 140) dos ratos entre os diferentes grupos experimentais [$F_{(3,36)} = 0,202$, $p = 0,895$] (Tabela 6).

Na Tabela 6 observa-se que não houve diferença estatística no peso de órgãos dos grupos TCS, bem como na concentração plasmática de testosterona (ANOVA $p > 0,05$).

Tabela 6 - Peso corporal final, peso dos órgãos e concentração plasmática de testosterona dos ratos no DPN 140.

	CTR [10]	TCS 0,8 [10]	TCS 2,4 [10]	TCS 8,0 [10]
Peso corporal final (g)	$421,96 \pm 14,85$	$405,97 \pm 18,97$	$420,93 \pm 16,05$	$416,86 \pm 14,92$
Peso órgãos				
Testículos (g)	$3,26 \pm 0,23$	$3,24 \pm 0,28$	$3,19 \pm 0,26$	$3,22 \pm 0,21$
Ducto deferente (esq.) (mg)	$104,42 \pm 12,07$	$106,25 \pm 18,68$	$110,50 \pm 13,38$	$102,35 \pm 16,79$
Epidídimo (esq.) (mg)	$617,43 \pm 44,77$	$618,55 \pm 71,19$	$605,84 \pm 55,03$	$618,93 \pm 52,45$
Próstata (g)	$0,36 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,10$	$0,41 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,13$
Fígado (g)	$13,63 \pm 1,41$	$12,59 \pm 2,21$	$14,24 \pm 1,36$	$13,72 \pm 1,99$
Rins (g)	$2,53 \pm 0,27$	$2,40 \pm 0,30$	$2,59 \pm 0,25$	$2,50 \pm 0,33$
Glândulas adrenais (mg)	$50,65 \pm 8,62$	$54,20 \pm 10,69$	$53,83 \pm 16,13$	$51,51 \pm 11,11$
Vesículas Seminais (g)	$1,63 \pm 0,34$	$1,48 \pm 0,32$	$1,72 \pm 0,40$	$1,57 \pm 0,30$
Concentração plasmática de testosterona (ng/dl)	$271,83 \pm 59,14$ [7]	$227,11 \pm 37,92$ [10]	$253,27 \pm 26,98$ [10]	$240,27 \pm 31,38$ [10]

Valores expressos em média \pm EPM, peso corporal final e concentração plasmática de testosterona foram comparados usando ANOVA. Peso de órgãos realizado análise de covariância (ANCOVA) com o peso corporal final como covariável ($p > 0,05$). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Grupo CTR (grupo controle) tratado com óleo de milho; Grupo TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

5.2.3. Parâmetros espermáticos

Dados referentes à análise dos parâmetros espermáticos estão descritos na Tabela 7 e 8. Não foram observadas diferenças estatísticas na morfologia, viabilidade, motilidade, concentração espermática (Tabela 7) e contagem espermática (Tabela 8), entre os grupos experimentais (ANOVA $p > 0,05$).

Tabela 7 - Morfologia, viabilidade, motilidade e concentração espermática dos animais no DPN 140.

Parâmetros Espermáticos	CTR [10]	TCS 0,8 [10]	TCS 2,4 [10]	TCS 8,0 [10]
Anormalidade de cabeça (%)	17,44 ± 1,96	14,26 ± 3,41	15,85 ± 2,03	13,50 ± 1,01
Anormalidade de cauda (%)	2,16 ± 0,41	2,73 ± 0,38	2,14 ± 0,42	2,78 ± 0,70
Concentração espermática (milhões por mililitro)	39,40 ± 5,38	44,70 ± 4,87	40,37 ± 6,07	41,22 ± 4,73
Espermatozoides viáveis (%)	84,50 (79,00–87,00)	80,00 (75,00–85,75)	84,00 (57,25–88,75)	85,00 (73,25–88,75)
Espermatozoides não-viáveis (%)	15,50 (13,00–21,00)	20,00 (14,25–25,00)	16,00 (11,25–42,75)	15,00 (11,25–26,75)
Espermatozoides móveis (%)	77,20 ± 2,93	77,50 ± 2,13	73,40 ± 3,59	79,70 ± 1,92
Espermatozoides imóveis (%)	22,80 ± 2,93	22,50 ± 2,13	26,60 ± 3,59	20,30 ± 1,92

Análise da morfologia, viabilidade, motilidade e concentração espermática dos animais no DPN 140. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA $p > 0,05$. Espermatozoides viáveis e não-viáveis (%) está expresso como mediana (1° e 3° quartil) e foi analisado pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Grupo CTR (grupo controle) tratado com óleo de milho; Grupo TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

Tabela 8 - Contagem espermática de ratos adultos dos diferentes grupos experimentais.

Contagem espermática	CTR [10]	TCS 0,8 [10]	TCS 2,4 [10]	TCS 8,0 [10]
Nº de espermátides (10 ⁶ /testículo)	74,64 ± 8,15	67,00 ± 1,91	78,26 ± 6,13	62,58 ± 5,20
Nº de espermátides (10 ⁶ /g/testículo)	52,05 ± 4,91	46,66 ± 1,82	54,97 ± 4,22	43,49 ± 3,08
Produção diária espermática (10 ⁶)	12,24 ± 1,34	10,98 ± 3,12	12,83 ± 1,00	10,26 ± 8,52
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (10 ⁶ /órgão)	59,26 ± 4,21	56,24 ± 3,53	61,28 ± 3,50	56,46 ± 2,90
Nº de espermatozoides na cabeça/corpos do epidídimo (10 ⁶ /g/órgão)	172,14 ± 10,93	180,73 ± 17,86	198,61 ± 13,36	174,34 ± 8,45
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (10 ⁶ /órgão)	100,44 ± 7,50	92,74 ± 6,11	124,20 ± 7,07	100,31 ± 9,88
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (10 ⁶ /g/órgão)	357,07 ± 19,52	322,85 ± 18,75	397,51 ± 36,78	343,95 ± 30,86
Tempo do trânsito espermático através cabeça/copo do epidídimos (dias)	5,18 ± 0,50	5,12 ± 0,30	5,14 ± 0,62	5,85 ± 0,54
Tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimos (dias)	8,90 ± 0,94	8,58 ± 0,71	10,24 ± 0,95	10,78 ± 1,63

Análise dos parâmetros espermáticos de ratos adultos dos diferentes grupos. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA $p > 0,05$. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Grupo CTR (grupo controle) tratado com óleo de milho; Grupo TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

5.2.4. Avaliação histomorfométrica

Parâmetros histomorfométricos dos testículos estão presentes na Tabela 9. A análise paramétrica (ANOVA) não revelou diferenças significativas quanto ao volume testicular [$F_{(3,35)} = 0,110$, $p = 0,954$], volume do conteúdo intersticial [$F_{(3,35)} = 0,317$, $p = 0,813$], volume dos túbulos seminíferos [$F_{(3,35)} = 0,088$, $p = 0,966$], e do diâmetro dos túbulos seminíferos [$F_{(3,35)} = 2,202$, $p = 0,105$], quando comparado os grupos experimentais. Além disso, a análise não-paramétrica realizada pelo teste Kruskal-Wallis não identificou alterações

significativas no comprimento total dos túbulos seminíferos, $\chi^2(3) = 7,269$, $p = 0,064$ entre os grupos experimentais.

Além disso, não foram observados sinais de toxicidade (lacrimajamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores) entre os grupos avaliados.

Tabela 9 - Análise histomorfométrica dos testículos de ratos no DPN 140.

	CTR [10]	TCS 0,8 [10]	TCS 2,4 [09]	TCS 8,0 [10]
Volume Testicular (ml)	1,52 ± 0,03	1,51 ± 0,04	1,49 ± 0,04	1,50 ± 0,03
Volume do conteúdo intersticial (ml)	0,47 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,45 ± 0,01
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	1,04 ± 0,02	1,05 ± 0,03	1,03 ± 0,03	1,05 ± 0,02
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	291,35 ± 5,20	294,10 ± 5,63	308,82 ± 6,30	303,80 ± 4,74
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	15,52 (14,76-16,65)	16,09 (14,88-16,50)	13,54 (13,06-13,75)	14,85 (14,19-16,03)

Análise histomorfométrica dos testículos de ratos no DPN 140. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA $p > 0,05$. Comprimento total dos túbulos seminíferos (m) está expresso como mediana (1° e 3° quartil) e foi analisado pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Grupo CTR (grupo controle) tratado com óleo de milho; Grupo TCS 0,8: tratado com TCS na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com TCS na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com TCS na dose de 8,0 mg/kg.

6 Discussão

O presente estudo é pioneiro ao avaliar um possível efeito (anti)androgênico do TCS a partir do Teste de Hershberger e ao utilizar métodos inéditos como: comportamento sexual, motilidade espermática, viabilidade espermática e histomorfometria testicular para avaliar a toxicidade reprodutiva do TCS em ratos Wistar. Vale ressaltar que a menor dose usada nestas avaliações foi baseada na ingestão diária aceitável de TCS para humanos descrita pela Agência de Proteção Ambiental (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), 2008), além de doses 3 e 10 vezes maiores que a menor dose, afim de avaliar se estas doses de TCS são capazes de gerar efeitos como desregulador endócrino ao interferir no sistema reprodutor de ratos.

O Teste de Hershberger é um ensaio de triagem de curta duração projetado para detectar *in vivo* efeitos de hormônios sexuais e, além disso, este teste faz parte da Bateria de Triagem de produtos químicos DEs publicado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA, 2011). No presente estudo, o tratamento com TCS não causou aumento no peso dos órgãos hormônio-dependentes na avaliação de um possível efeito androgênico, assim como, não reduziu o peso deste órgãos na avaliação de um possível efeito antiandrogênico. Estes resultados sugerem que as doses de TCS utilizadas neste estudo não foram capazes de causar efeitos (anti)androgênico em ratos Wistar.

Além do Teste de Hershberger, este estudo avaliou a toxicidade reprodutiva do TCS em ratos Wistar, sendo o comportamento sexual (comportamento copulatório e motivação sexual) o primeiro método analisado após 71 dias de tratamento (equivalendo a um ciclo espermático completo) com TCS. O comportamento copulatório e a motivação sexual são regulados por neurotransmissores e hormônios gonadais, dentre eles a testosterona (CANTERAS, 2012; HULL; DOMINGUEZ, 2006). Apesar de haver evidencias de que o TCS reduz a concentração de testosterona plasmática em ratos Wistar após tratamento por gavagem na dose de 20 mg/kg (após 60 dias de tratamento) (KUMAR *et al.*, 2009) e 200 mg/kg (após 31 dias de tratamento) (ZORRILLA *et al.*, 2009), nenhum efeito sobre a concentração plasmática de testosterona e comportamento sexual foi observado em nosso estudo. Por tanto, a ausência de alterações na avaliação do comportamento sexual pode estar relacionado com a ausência de alterações da concentração plasmática de testosterona.

Outro importante indicador de toxicidade reprodutiva de um xenobiótico é o peso corporal (JOHNSON, 1981). Neste trabalho, o tratamento repetitivo com o TCS em ratos

Wistar não foi capaz de induzir alterações no peso corporal, além de não apresentar sinais de toxicidade (lacrimejamento, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores). Similaridade encontra-se nos resultados apresentados no estudo de Kumar et al., (2009), onde a administração de TCS, por gavagem, em ratos Wistar (DPN 70) não afeta o peso corporal após 60 dias de tratamento nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg. Da mesma forma, a ausência de alterações no peso corporal de ratos Wistar (DPN 23) também é observada no trabalho de Zorrilla et al., (2009), após 31 dias de tratamento nas doses de 3, 30, 100, 200 e 300 mg/kg. Por outro lado, dados da literatura tem demonstrado redução do peso corporal em ratos Sprague Dawley (DPN 42), posterior ao tratamento de 8 semanas com TCS, via gavagem, na dose de 200 mg/kg (LAN *et al.*, 2015). Desta forma, propõem-se que a linhagem dos ratos estudados pode ter influenciado nos resultados, uma vez que, na literatura observa-se que o TCS causou efeito sobre o peso corporal apenas na linhagem de ratos Sprague Dawley, sugerindo que a linhagem de ratos Wistar pode ser menos sensível ao tratamento com TCS que os ratos Sprague Dawley.

A análise do peso de órgãos hormônio-dependentes também constitui importante indicador a ser avaliado, principalmente em um estudo de toxicidade reprodutiva (PERREAULT; KLINEFELTER; CLEGG, 2007). No presente estudo, o tratamento com TCS após a puberdade não afetou o peso de órgãos (testículos, ducto deferente, epidídimo, próstata, fígado, rins, glândulas adrenais e vesículas seminais). Este resultado é semelhante ao estudo realizado em ratos Wistar, tratados com TCS na dose de 5 mg/Kg, onde não há alterações no peso dos órgãos reprodutivos, no entanto, em doses superiores (10 e 20 mg/kg) do mesmo estudo o peso destes órgãos é reduzido (KUMAR *et al.*, 2009), sugerindo que as doses utilizadas neste estudo não tem efeito tóxico com relação ao peso de órgãos. Além disso, pode-se propor que os efeitos tóxicos do TCS sobre este parâmetro surgem a partir de 10 mg/kg, pois nesta dose já é possível observar alterações no peso de órgãos.

Com relação aos parâmetros espermáticos, sabe-se que a qualidade espermática é comumente relacionada aos efeitos de uma droga sobre o processo de espermatogênese (KU *et al.*, 1993; POON *et al.*, 2004), o qual é totalmente dependente da ação do hormônio testosterona (PAKARAINEN *et al.*, 2004). Neste estudo, a administração do antibacteriano TCS em ratos Wistar não ocasionou mudanças nos parâmetros espermáticos. No entanto, o tratamento com TCS, por gavagem, em ratos Sprague Dawley (DPN 42) e ratos Wistar (DPN 70) demonstra uma redução da produção espermática diária na dose de 20 mg/kg (KUMAR *et al.*, 2009) após 60 dias de tratamento e nas doses de 50 e 200 mg/kg (LAN *et al.*, 2015) após 8

semanas de tratamento. Nossos resultados sugerem que o tratamento com o TCS nas doses de 0,8, 2,4 e 8,0 mg/kg não foi capaz de afetar o processo espermatogênico dos ratos tratados.

Nos testículos, o resultado da avaliação histomorfométrica também não revelou alterações no parênquima testicular, o que acaba corroborando com os resultados dos parâmetros espermáticos, uma vez que, efeitos tóxicos nos testículos estão intimamente relacionados a alterações espermáticas (FRANCA; GODINHO, 2003). Dados na literatura sobre a avaliação histomorfométrica dos testículos após tratamento com TCS são escassos, no entanto, há relatos que o tratamento com TCS com dose superior a do presente trabalho, como 20 mg/kg, é capaz de causar malformações histopatológicas testiculares em ratos Wistar adultos (KUMAR *et al.*, 2009), propondo que as doses de TCS utilizadas neste estudo não foram capazes de gerar efeitos de toxicidade nos parâmetros relacionados com a histomorfometria testicular.

Por tanto, embora estudo *in vitro* demonstre que o TCS é um potencial desregulador endócrino ao alterar significativamente a produção de testosterona induzida pelo hormônio luteinizante em células de Leydig de ratos (KUMAR, BALOMAJUMDER, ROY, 2008), a ausência de efeitos (anti)androgênicos do teste de Hershberger e a ausência de alterações dos parâmetros avaliados no estudo da toxicidade reprodutiva revelaram que o TCS nas doses estudadas não teve efeito como desregulador endócrino quanto ao sistema reprodutor dos ratos.

7 Conclusão

Através dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que neste estudo o TCS não apresentou efeito como desregulador endócrino no sistema reprodutor de ratos, pois não causou efeito (anti)androgênico pelo teste de Hershberger e não afetou a função reprodutiva de ratos adultos após o tratamento prologando com TCS. Por tanto, a ausência de efeitos como desregulador endócrino sobre o sistema reprodutor dos ratos nos revela um resultado positivo, uma vez que, confirma que a dose sugerida como ingestão diária aceitável de TCS para humanos pela Agência de Proteção Ambiental (EPA, 2008) é realmente segura, assim como doses 3 e 10 vezes maiores quando relacionado ao sistema reprodutor masculino.

Referências

- ADOLFSSON-ERICI, M. *et al.* Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, v. 46, n. 9–10, p. 1485–1489, mar. 2002.
- AGMO, A. Male rat sexual behavior. *Brain research. Brain research protocols*, v. 1, n. 2, p. 203–9, 1997.
- ÅGMO, A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 117, n. 1, p. 55–68, 2003.
- AHERNE, G. W.; ENGLISH, J.; MARKS, V. The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 9, n. 1, p. 79–83, 1985.
- AHN, K. C. *et al.* In Vitro Biologic Activities of the Antimicrobials Triclocarban, Its Analogs, and Triclosan in Bioassay Screens: Receptor-Based Bioassay Screens. *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 9, p. 1203–1210, 16 maio 2008.
- ATTAL, J. *et al.* DÉVELOPPEMENT TESTICULAIRE ET ÉTABLISSEMENT DE LA SPERMATOGENÈSE CHEZ LE TAUREAU. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, v. 3, n. 3, p. 219–241, 1963.
- BEAVO, J. A.; BRUNTON, L. L. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 3, n. 9, p. 710–718, 2002.
- BEDOUX, G. *et al.* Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 4, p. 1044–1065, 5 maio 2012.
- BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIKST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, v. 18, n. 4, p. 813–816, 2003.
- CALAFAT, A. M. *et al.* Urinary Concentrations of Triclosan in the U.S. Population: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 3, p. 303–307, 7 dez. 2008.
- CANTERAS, N. S. Hypothalamic Goal-directed Behavior – Ingestive, Reproductive and Defensive. *The Mouse Nervous System*. [S.l.]: Elsevier, 2012. p. 539–562.
- CHU, S.; METCALFE, C. D. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1164, n. 1–2, p. 212–218, 2007.
- DHILLON, G. S. *et al.* Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *International journal of environmental research and public health*, v. 12, n. 5, p. 5657–84, 2015.
- DORST V. J; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens wahrend der postnatalen entwicklug. *Monaths Vet Med*, v. 29, p. 650–2,

1974.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Harmonization in Interspecies Extrapolation : Use of BW 3 / 4 as Default Method in Derivation of the Oral RfD. 2006.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Reregistration eligibility decision for triclosan: List B. EPA 739/RO/8009. *Washington, DC: US Environmental Protection Agency*, 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Hershberger Assay OCSPP Guideline 890.1400. *Standard Evaluation Procedure*, n. October, p. 1–16, 2011.

ESCALADA, M. G. *et al.* Triclosan – bacteria interactions : single or multiple target sites ? *The society for applied microbiology*, v. 41, p. 476–481, 2005.

FANG, J.-L. *et al.* Occurrence, Efficacy, Metabolism, and Toxicity of Triclosan. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, v. 28, n. 3, p. 147–171, 2010.

FAVARETO, A. P. A. *et al.* Persistent Impairment of Testicular Histology and Sperm Motility in Adult Rats Treated with Cisplatin at Peri-Puberty. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 109, n. 2, p. 85–96, 2011.

FERNANDES, G. S. A. *et al.* Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive toxicology*, v. 23, n. 1, p. 106–12, 2007.

FILLER, R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. *In: Chapin RE, Heindel JH, editors. Male reproductive toxicology. San Diego, California: Academic Press*, p. 334–43, 1993.

FRANCA, 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, 11 dez. 2003.

GEE, R. H. *et al.* Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of applied toxicology : J. Appl. Toxicol.*, v. 28, n. 4, p. 78–91, maio 2008.

GERARDIN, D. C. C. *et al.* Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 83, n. 4, p. 618–23, abr. 2006.

GHORPADE, N. *et al.* Toxicity Study of Diethyl Phthalate on Freshwater Fish *Cirrhina mrigala*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 53, n. 2, p. 255–258, 2002.

HEATH, R. J.; ROCK, C. O. A triclosan-resistant bacterial enzyme. v. 406, n. July, p. 145–146, 2000.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sciences*, v. 20, n. 2, p. 337–341, 1977.

HULL, E. M.; DOMINGUEZ, J. M. Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide,

- and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Research*, v. 1126, n. 1, p. 66–75, dez. 2006.
- IPCS/WHO. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *WHO/PCS/EDC*, v. 2, n. 2, p. 5–9, 2002.
- JOHNSON, A. M. Analysis of animal weight gains in chronic toxicity studies. *J Toxicol Environ Health*, v. 7, n. 2, p. 307–316, 1981.
- KU, W. W. *et al.* Testicular toxicity of boric acid (BA): relationship of dose to lesion development and recovery in the F344 rat. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, v. 7, n. 4, p. 305–19, 1993.
- KUMAR, V. *et al.* Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reproductive Toxicology*, v. 27, n. 2, p. 177–185, abr. 2009.
- KUMAR, V.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: Probable mechanism of action. *Toxicology*, v. 250, n. 2–3, p. 124–131, set. 2008.
- LAN, Z. *et al.* Triclosan exhibits a tendency to accumulate in the epididymis and shows sperm toxicity in male sprague-dawley rats. *Environmental Toxicology*, v. 30, n. 1, p. 83–91, jan. 2015.
- MADHUMITHA RAGHAV *et al.* Contaminants of Emerging Concern in Water. *Water Resources Research Center*, 2013.
- MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. *scientific correspondence*, v. 394, p. 531–532, 1998.
- MONTAGNER, C. C. *et al.* Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 3, p. 1850–1858, 30 fev. 2014.
- MOSS, T.; HOWES, D.; WILLIAMS, F. M. Percutaneous Penetration and Dermal Metabolism of Triclosan (2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenyl Ether). *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, p. 361–370, 2000.
- OECD/OCDE. (Organization for Economic Co-operation and Development). Guideline for testing of chemicals 416. *Two-Generation Reproduction Toxicity Study*, 2001.
- PAKARAINEN, T. *et al.* Testosterone Replacement Therapy Induces Spermatogenesis and Partially Restores Fertility in Luteinizing Hormone Receptor Knockout Mice. *Endocrinology*, v. 146, n. 2, p. 596–606, fev. 2004.
- PEROBELLI, J. E. *et al.* Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A*, v. 73, n. 13–14, p. 991–1002, 2010.
- PERREAULT, S.; KLINEFELTER, G.; CLEGG, E. Assessment of Male Reproductive Toxicity. *Principles and Methods of Toxicology, Fifth Edition*. [S.l.: s.n.], 2007. p. 1605–1640.
- PIFFER, R. C. *et al.* Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed

prenatally to betamethasone. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, n. 5, p. 634–639, 2009.

POON, R. *et al.* Short-term oral toxicity of pentyl ether, 1,4-diethoxybutane and 1,6-dimethoxyhexane in male rats. *Toxicological Sciences*. [S.l: s.n.], 22 dez. 2004

PYCKE, B. F. G. *et al.* Human fetal exposure to triclosan and triclocarban in an urban population from Brooklyn, New York. *Environmental Science and Technology*, v. 48, n. 15, p. 8831–8838, 2014.

QUECKENBERG, C. *et al.* Absorption, Pharmacokinetics, and Safety of Triclosan after Dermal Administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 1, p. 570–572, 1 jan. 2010.

RAMOS, A. I.; BRAGA, S. S.; ALMEIDA PAZ, F. A. Triclosan. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, v. 65, n. 8, p. 404–405, 15 ago. 2009.

REGOS, J. *et al.* Antimicrobial spectrum of Triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application. *Dermatologica*, v. 158, p. 72–79, 1979.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of reproduction and fertility*, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.

ROZATI, R. *et al.* Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertility and Sterility*, v. 78, n. 6, p. 1187–1194, 2002.

RUSSELL, A. D. Whither triclosan? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, n. 5, p. 693–695, 24 mar. 2004.

SANDBORGH-ENGLUND, G. *et al.* Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. *Journal of toxicology and environmental health*, v. 69, n. 20, p. 1861–1873, 2006.

SEED, J. *et al.* Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology*, v. 10, n. 3, p. 237–244, 1996.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical Pharmacology*. [S.l: s.n.], 1996

SULLER, M. T. E.; RUSSELL, A. D. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p. 11–18, 2000.

UMBUZEIRO, G. DE A. Guia de potabilidade para substâncias químicas. *Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*, p. 144, 2012.

WICK, A. *et al.* Sorption of biocides, triazine and phenylurea herbicides, and UV-filters onto secondary sludge. *Water Research*, v. 45, n. 12, p. 3638–3652, 2011.

WOLFF, M. S. *et al.* Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environmental Health Perspectives*, v. 118, n. 7, p. 1039–1046, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality - 4^o ed. Geneva. *WHO*, jun. 2011.

ZORRILLA, L. M. *et al.* The Effects of Triclosan on Puberty and Thyroid Hormones in Male Wistar Rats. *Toxicological Sciences*, v. 107, n. 1, p. 56–64, jan. 2009.