



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO
TRICLOSAN EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS WISTAR**

Londrina
2018



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO
TRICLOSAN EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS WISTAR**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS (PMPGCF)**

Londrina
2018

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO
TRICLOSAN EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS WISTAR.**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Cristina Ceccatto Gerardin

Londrina
2018

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO TRICLOSAN EM
DUAS GERAÇÕES DE RATOS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto
Gerardin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Cristiane Mota Leite
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Universidade Estadual Paulista – UNESP

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

Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Londrina, 20 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, aos que sempre pude contar com apoio e carinho, por mais que a vida nos distancie. Aos meus pais, que sempre deram o bom exemplo, honestidade, caráter e amor acima de tudo.

Agradeço a minha esposa Claudia, por todo o amor incondicional e intenso que me motiva a sempre seguir em frente. Este trabalho eu dedico a você e a nossa filha (Maitê) que ainda não nasceu, mas já vive em seu ventre.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Daniela C. C. Gerardin, que contribuiu de forma excepcional com minha formação desde o mestrado. Sou grato por toda a paciência e dedicação investidos em minha formação acadêmica. Um grande exemplo.

Agradeço também as Professoras Ana Carolina Inhasz Kiss, Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro e Patrícia Carvalho Garcia, pelas valiosas contribuições nas metodologias empregadas nesse trabalho. Agradeço também a Prof^a Janete Anselmo-Franci, que ajudou com recursos para as análises hormonais.

Agradeço aos colegas e amigos de trabalho, pela convivência e pela colaboração para a conclusão deste trabalho: Milene, Nathalia O., Marina, Jeberson, Karine, Simone, Lorena, Maria Luiza, Mariana, Liara e Andreza. Não só pelo trabalho, mas muito mais pela amizade, cumplicidade e companhia que tive durante esses anos.

Agradeço aos Delícias do CIF, Comando Beer Pesca e demais amigos e companheiros de música, onde sempre encontro agradável refúgio em meio à turbulência.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado e ao CNPq pelo financiamento, o qual permitiu a realização das metodologias empregadas nesse trabalho.

Agradeço aos animais, os quais sempre tive todo o zelo e respeito do mundo.

E por fim, agradeço a Deus por todas as bênçãos

*“Saber como pensar torna a pessoa muito mais capaz do que aquele que apenas sabe o que
deve pensar”*

Neil deGrasse Tyson

MONTAGNINI, Bruno Garcia. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do triclosan em duas gerações de ratos wistar**. 2018. 99 f. Tese (Doutorado no Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O Triclosan (TCS) é um derivado fenólico com atividade antibacteriana amplamente utilizado em cosméticos e outros produtos de higiene pessoal, como xampus, pastas de dente, sabonetes, loções, dentre outros segmentos da indústria, já sendo detectado em amostras de urina em mulheres grávidas, plasma e leite materno. Este estudo investigou os efeitos do TCS sobre a função reprodutiva através de estudos que avaliam a exposição aguda (teste uterotrófico) e crônica (estudo de duas gerações). A atividade (anti)estrogênica do TCS foi avaliada em ratas imaturas pelo teste uterotrófico após três dias de tratamento (0,8, 2,4 e 8,0 mg/kg/dia, gavagem), e em um segundo protocolo, a toxicidade reprodutiva através de um estudo de duas gerações de ratos. No estudo de duas gerações, os animais foram tratados com TCS (via gavagem), nas doses de 0,8, 2,4 e 8,0 mg/kg/dia, durante 10 semanas (geração P) e durante 14 semanas (geração F1), sendo continuado durante o acasalamento, gestação e lactação até o desmame das gerações F1 e F2, respectivamente. No teste uterotrófico o TCS não apresentou atividade (anti)estrogênica nas doses testadas. No entanto, no estudo de duas gerações o tratamento com TCS na dose de 2,4 mg/kg diminuiu a viabilidade e motilidade espermática de ratos adultos da geração F1. Nas fêmeas, a exposição ao TCS na dose de 2,4 mg/kg comprometeu o comportamento sexual de ambas as gerações P e F1, e na geração P, diminuiu o consumo de ração, e durante o comportamento materno, aumentou o comportamento de limpeza dos filhotes e diminuiu o tempo fora do ninho. Foram também observadas alterações na morfometria de útero das ratas P tratadas com TCS na dose de 8,0 mg/kg e redução da quantificação folicular nos ovários das ratas F1 expostas ao antibacteriano na dose intermediária (2,4 mg/kg). Esses resultados reforçam que a exposição ao TCS, mesmo dentro dos limites de exposição permitidos pelas agências regulatórias, pode representar um risco potencial para a função reprodutiva em ratos.

Palavras-chave: Desregulador hormonal. Reprodução. Fertilidade. Comportamento.

MONTAGNINI, Bruno Garcia. **Evaluation of reproductive toxicity of triclosan in two generations of wistar rats.** 2018. 99 p. Tese (Master's Degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Triclosan (TCS) is a phenolic compound with antimicrobial action widely used in cosmetics and other personal care products and other industry sections. Its widespread use over the decades has made TCS one of the most commonly detected compounds in wastewater and effluent worldwide already being found in human urine, plasma and milk. This study investigated the effects of TCS on reproductive function through studies evaluating acute (uterotrophic) and chronic exposure (two-generation study). In this study, the (anti)estrogenicity of TCS was evaluated in 18-day old female Wistar rats, after 3-day exposure (0.8, 2.4 and 8.0 mg/kg/day), and in a second protocol, rats were evaluated regarding the reproductive effects of TCS in a two-generation reproduction toxicity study. In the two generation study, animals were daily treated by gavage with TCS at the doses of 0.8, 2.4 and 8.0 mg/kg/day or corn oil (control group) over 10 weeks (F0) and over 14 weeks (F1) prior to mating and then throughout mating, gestation and lactation until weaning of F1 and F2 generation respectively. In the uterotrophic assay, TCS did not show (anti)estrogenic activity at the doses tested. However, in the two-generation study, the TCS exposure at the dose of 2.4 mg/kg reduced the sperm viability and sperm motility of adult male rats from F1 generation. In female rats, TCS exposure at the dose of 2.4 mg/kg compromised sexual behavior in both F0 and F1 generation, while in the F0 generation, TCS decreased maternal food consumption and in the maternal behavior evaluation, increased maternal pup grooming behavior and decreased the total time off the nest at 2.4 mg/kg. The TCS exposure also decreased the perimetrium thickness of F0 females from TCS 8.0 group and growing follicle number of TCS 2.4 females from F1 generation. These results reinforce that exposure to TCS, even within the exposure limits recommended by regulatory authorities, might represent a potential risk to the reproductive function in rats.

Keywords: Endocrine disrupter. Reproduction. Fertility. Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estrutura química do triclosan, tiroxina e bisfenol A	18
Figura 2.	Delineamento experimental do teste uterotrófico	21
Figura 3.	Grupos experimentais para avaliação da atividade (anti)androgênica do TCS no teste uterotrófico	23
Figura 4.	Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao TCS nos machos da geração F1	25
Figura 5.	Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao TCS nas fêmeas das gerações P e F1	26
Figura 6.	Representação esquemática da vista superior da arena do teste de preferência sexual	31
Figura 7.	Câmara de Makler utilizada para realização da motilidade, viabilidade e concentração espermática.....	33
Figura 8.	Câmara de Neubauer utilizada para contagem espermática	36
Figura 9.	Representação dos diferentes graus de lordose e pontuação empregada para avaliação do coeficiente de lordose e score de lordose	39
Figura 10.	Rata em posição arqueada de amamentação	40
Figura 11.	Plataforma com inclinação de 45° para avaliação da geotaxia negativa	43
Figura 12.	Vista superior da arena do teste de campo aberto utilizada para análise de atividade locomotora.....	46
Figura 13.	Fotomicrografia de seções de túbulos seminíferos (TS) de ratos adultos (DPN 140) da geração F1	58
Figura 14.	Parâmetros do comportamento materno observados nas fêmeas da geração P durante o DG 1 ao 10	64
Figura 15.	Parâmetros do comportamento materno observados nas fêmeas da geração F1 durante o DG 1 ao 10	65
Figura 16.	Peso corporal (A e B) e consumo de ração (C e D) das ratas P durante a gestação e lactação	67
Figura 17.	Peso corporal (A e B) e consumo de ração (C e D) das ratas F1 durante a gestação e lactação	68
Figura 18.	Ganho de peso da prole masculina (A: F1; B: F2) e feminina (C: F1; D: F2) durante o período lactacional	73

Figura 19. DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) da prole masculina (A: F1; B: F2) e feminina (C: F1; D: F2) durante o período lactacional 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Teste uterotrófico para atividade estrogênica: peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das ratas	50
Tabela 2.	Teste uterotrófico para atividade antiestrogênica: peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das ratas	51
Tabela 3.	Frequência de comportamento copulatório e ejaculação de ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 120)	52
Tabela 4.	Comportamento copulatório de ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 120)	53
Tabela 5.	Motivação sexual dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 120)	54
Tabela 6.	Peso dos órgãos, DAG, e concentração plasmática de testosterona dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140)	55
Tabela 7.	Morfologia, viabilidade, motilidade e concentração espermática dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140)	56
Tabela 8.	Contagem espermática dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140)	57
Tabela 9.	Análise histomorfométrica dos testículos dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140)	59
Tabela 10.	Coefficientes dos diferentes estágios do ciclo estral e comprimento do ciclo estral (DPN 86-106) das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1	61
Tabela 11.	Coefficiente de lordose, escore de lordose e grau de lordose das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1 (DPN 120)	63
Tabela 12.	Peso corporal final e peso de órgãos das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1 no dia lactacional 21	70
Tabela 13.	Análise morfométrica uterina, contagem de corpos lúteos e quantificação folicular ovariana das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1 no dia lactacional 21	71
Tabela 14.	Desenvolvimento físico e neuromotor (DPN 1-21) da prole masculina das gerações F1 e F2	76

Tabela 15.	Desenvolvimento físico e neuromotor (DPN 1-21) da prole feminina das gerações F1 e F2	77
Tabela 16.	Atividade motora (DPN 13, 17 e 21) da prole masculina das gerações F1 e F2	79
Tabela 17.	Atividade motora (DPN 13, 17 e 21) da prole feminina das gerações F1 e F2	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCB	Centro de Ciências Biológicas
CTR	Controle
CTTS	Comprimento total dos túbulos seminíferos
DG	Dia gestacional
DL	Dia lactacional
DPN	Dia pós-natal
E	Valerato de estradiol
LQ	Coefficiente de lordose
OECD/OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
TAM	Tamoxifeno
TCS	Triclosan
TS	Túbulos seminíferos
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VTS	Volume total dos túbulos seminíferos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	20
2.1.	Objetivo geral	20
2.2.	Objetivo específico	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1.	Avaliação da atividade (anti)estrogênica e do TCS em ratas (teste uterotrófico)	21
3.1.1.	Delineamento experimental	21
3.1.2.	Drogas	22
3.1.3.	Animais e tratamento	22
3.2.	Avaliação da exposição ao TCS nas gerações P e F1, sobre parâmetros de toxicidade reprodutiva	24
3.2.1.	Animais e tratamento	27
3.2.2.	Escolha da dose	28
3.3.	Parâmetros avaliados nos machos F1	28
3.3.1.	Peso corporal	29
3.3.2.	Avaliação dos comportamentos sexuais	29
3.3.2.1.	Avaliação do comportamento copulatório	29
3.3.2.2.	Teste de motivação sexual	30
3.3.3.	Coleta dos órgãos	31
3.3.4.	Concentração plasmática de testosterona	32
3.3.5.	Parâmetros espermáticos	32
3.3.5.1.	Motilidade espermática	32
3.3.5.2.	Viabilidade espermática	33
3.3.5.3.	Concentração espermática	33
3.3.5.4.	Morfologia espermática	34
3.3.5.5.	Contagem espermática	34
3.3.6.	Parâmetros biométricos e análise histológica do testículo	36
3.4.	Parâmetros avaliados nas fêmeas P e F1	37
3.4.1.	Peso corporal durante o período pré-acasalamento	37

3.4.2.	Avaliação do ciclo estral.....	37
3.4.3.	Avaliação comportamental sexual.....	38
3.4.4.	Avaliação do comportamento materno.....	39
3.4.5.	Peso corporal e consumo de ração durante a gestação e a lactação.....	40
3.4.6.	Coleta de órgãos e quantificação plasmática de progesterona.....	41
3.4.7.	Morfometria do epitélio uterino, quantificação dos corpos lúteos e contagem folicular ovariana.....	41
3.4.8.	Fertilidade.....	42
3.5.	Parâmetros de desenvolvimento avaliados nas proles F1 e F2.....	42
3.5.1.	Desenvolvimento sexual.....	42
3.5.2.	Desenvolvimento físico.....	43
3.5.3.	Desenvolvimento neuromotor.....	43
3.5.3.1.	Reflexo de endireitamento.....	44
3.5.3.2.	Geotaxia negativa.....	44
3.5.3.3.	Atividade locomotora.....	45
3.6.	Análise estatística.....	46
3.6.1.	Avaliação da atividade (anti)estrogênica do TCS em ratas imaturas.....	47
3.6.2.	Avaliação da exposição ao TCS nas sobre parâmetros de toxicidade reprodutiva em duas gerações e desenvolvimento da prole.....	47
4.	RESULTADOS.....	49
4.1.	Teste uterotrófico.....	49
4.1.1.	Atividade estrogênica.....	49
4.1.2.	Atividade antiestrogênica.....	50
4.2.	Avaliação da exposição ao TCS sobre parâmetros de toxicidade reprodutiva nas gerações P e F1.....	51
4.2.1.	Parâmetros avaliados nos machos F1.....	51
4.2.1.1.	Peso corporal (período pré-acasalamento).....	51
4.2.1.2.	Comportamento copulatório e motivação sexual.....	52
4.2.1.3.	Peso de órgãos e concentração plasmática de testosterona.....	54
4.2.1.4.	Parâmetros espermáticos.....	55
4.2.1.5.	Histomorfometria testicular.....	58
4.2.2.	Parâmetros avaliados nas fêmeas P e F1.....	59
4.2.2.1.	Ganho de peso no período pré-acasalamento.....	59

4.2.2.2.	Avaliação do ciclo estral.....	60
4.2.2.3.	Avaliação do comportamento sexual e materno.....	62
4.2.2.4.	Peso corporal e consumo de ração durante a gestação e a lactação.....	65
4.2.2.5.	Peso de órgãos e concentração plasmática de progesterona.....	69
4.2.2.6.	Histomorfometria de útero e ovário.....	71
4.2.2.7.	Fertilidade.....	72
4.2.3.	Avaliação da prole (filhotes F1 e F2).....	72
4.2.3.1.	Peso corporal.....	72
4.2.3.2.	Desenvolvimento sexual.....	73
4.2.3.3.	Desenvolvimento físico e neuromotor.....	75
4.2.3.4.	Atividade motor.....	78
5.	DISCUSSÃO	81
5.1.	Machos.....	81
5.2.	Fêmeas.....	84
6.	CONCLUSÃO	88
7.	REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

Desregulador hormonal é definido pela Organização Mundial da Saúde como uma substância ou mistura de substâncias exógenas que podem interferir em uma ou mais funções do sistema endócrino (UNEP; WHO, 2013). A preocupação quanto à exposição ambiental à xenobióticos tem aumentado, uma vez que estes compostos podem atuar sobre a função reprodutiva, estando relacionado, por exemplo, com puberdade precoce (BUTTKE; SIRCAR; MARTIN, 2012; DENG et al., 2012), diminuição da contagem espermática (ROLLAND et al., 2013) ou mesmo câncer de mama (KNOWER et al., 2014) e próstata (ALAVANJA et al., 2003) em humanos.

Introduzido pela primeira vez no início dos anos 1970 para o setor de saúde, o 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol (figura 1), conhecido como triclosan (TCS) é um agente antimicrobiano sintético lipossolúvel amplamente utilizado em cosméticos e outros produtos de higiene pessoal, como xampus, pastas de dente, sabonetes e loções (DANN; HONTELA, 2011; UNEP; WHO, 2013), sendo cada vez mais utilizado em outros produtos, tais como utensílios de cozinha, brinquedos, escovas de dente, indústria têxtil e em plásticos (BHARGAVA; LEONARD, 1996) (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008). Nos EUA, foi estimado que o consumo anual de TCS pode ultrapassar 300 toneladas (HALDEN; PAULL, 2005), enquanto na Europa, pode alcançar até 350 toneladas ao ano (SINGER et al., 2002). Dados mais recentes estimam que em 2015 o consumo global de TCS representou aproximadamente 4.600 toneladas (EPA-DENMARK, 2016). Devido ao seu uso difundido ao longo das últimas décadas, o TCS tornou-se um dos compostos mais comumente detectado em águas residuais e de efluentes em todo o mundo (BLAIR et al., 2013; CHENG; WANG; DING, 2011; PEREZ et al., 2013), sendo apenas parcialmente removido durante o processo de tratamento de água (THOMPSON et al., 2005), permitindo que este composto esteja presente na água potável, para consumo humano (BEDOUX et al., 2012). Nos rios do estado de São Paulo (Brasil), as concentrações mensuráveis deste antibacteriano em águas superficiais variam entre 2,2 a 66 ng/L (MONTAGNER et al., 2014). Essa contaminação ambiental, particularmente nos países em desenvolvimento, é ainda mais preocupante, visto que os sistemas de saneamento menos eficazes permitem uma maior liberação do esgoto bruto em águas superficiais (BALAKRISHNA et al., 2017; FÉLIX-CAÑEDO; DURÁN-ÁLVAREZ; JIMÉNEZ-CISNEROS, 2013; MONTAGNER et al., 2014). Além disso, nas

estações de tratamento de água o TCS pode ser biologicamente metilado em metiltriclosan e/ou quimicamente transformado em derivados clorados, que através de subsequente fotólise, pode ser transformado em 2,4-diclorofenol e várias policlorodibenzo-*p*-dioxinas, que possuem um maior grau de persistência no ambiente do que o próprio TCS (YUEH; TUKEY, 2016).

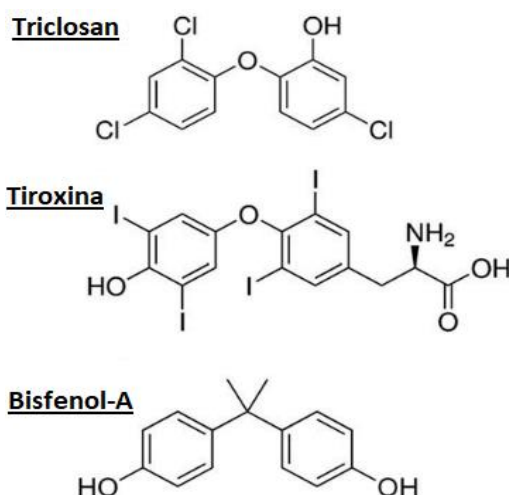
Além da ingestão de água potável (LORAINE; PETTIGROVE, 2006), a exposição humana ao TCS pode também ocorrer através da inalação do ar ambiente (GEENS et al., 2009) e por contato tópico com produtos de consumo, como enxaguantes bucais (LIN, 2000) e pastas de dente (BAGLEY; LIN, 2000). Em consequência da exposição ambiental, estudos em humanos demonstraram que o antibacteriano foi detectado em amostras de urina em mulheres grávidas (MORTENSEN et al., 2014), estando presente também no plasma e no leite materno em diferentes concentrações, sendo maiores nas mães que fizeram uso de produtos de higiene pessoal que continham TCS, sugerindo que o contato por produtos de higiene pessoal é a principal fonte de exposição, mas não a única (ALLMYR et al., 2006).

Estudos conduzidos em ratos Sprague–Dawley demonstram que a placenta e o epidídimo constituem tecidos alvo para o TCS quando administrados via gavagem. Em ratos com 6 semanas de idade o TCS apresentou maior tempo de meia vida de eliminação no epidídimo após 24 horas da administração de 50 mg/kg, quando comparado ao plasma, testículo e próstata (LAN et al., 2015), enquanto que em ratas, o tratamento (30 mg/kg/dia) durante a gestação resultou em maior concentração do antisséptico na placenta em comparação a outros tecidos (fígado, rim, ovário, adrenal, baço e tecido adiposo) (FENG et al., 2016). Estes estudos reforçam a preocupação quanto à segurança deste composto sobre o desenvolvimento fetal e qualidade espermática.

O TCS possui semelhança estrutural a outros desreguladores hormonais conhecidos (Figura 1), incluindo bifenilospoliclorados (PCB's), éteres difenil-polibromados (PBDE) e bisfenol-A (ALLMYR et al., 2008; DANN; HONTELA, 2011), o que pode predizer seu potencial para ação (anti)androgênica ou (anti)estrogênica. Sabe-se que este composto pode interferir na função reprodutiva de roedores mesmo quando administrado em doses abaixo do NOAEL (50 mg/kg/dia, via gavagem) para toxicidade materna e desenvolvimento (NICNAS, 2009). Em ratos Wistar, a administração de TCS (20 mg/kg, via gavagem) por 60 dias tem sido associada com ação antiandrogênica, diminuindo a produção espermática e os níveis plasmáticos de LH, FSH, pregnenolona e testosterona (KUMAR et al., 2009). Além disso, em culturas de células de Leydig, houve uma inibição da atividade da adenilatociclase (KUMAR;

BALOMAJUMDER; ROY, 2008), enzima fundamental que participa dos eventos moleculares envolvidos na produção de testosterona nessas células (ZIRKIN, 2000). Já em ratas Sprague-Dawley, a administração de TCS na dose de 7,5 mg/kg, por três dias consecutivos, a partir do dia pós-natal (DNP) 19, promoveu puberdade precoce e aumentou do peso uterino, sugerindo potencial efeito estrogênico. Por outro lado, em culturas de células de câncer de mama humano (MCF-7) foi observada ação antiestrogênica, uma vez que, o TCS inibiu o crescimento celular induzido pelo 17β -estradiol e a atividade do gene repórter (ERE-CAT), sensível a este hormônio (GEE et al., 2008).

Figura 1. Estrutura química do triclosan, tiroxina e bisfenol A.



Em 6 de setembro de 2016, a Food and Drug Administration (FDA) emitiu uma diretiva estabelecendo a proibição de 19 compostos antibacterianos, incluindo o TCS, em sabonetes e outros produtos de lavagem. Esta diretiva justificou-se pela mudança atribuída a lacunas de dados sobre a eficácia destes antibacterianos e segurança em animais e humanos, indicando a necessidade de mais estudos em diferentes sobre esses efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), particularmente durante o desenvolvimento (FDA, 2016). O teste uterotrófico em ratas imaturas é utilizado para verificar se um determinado xenobiótico pode induzir atividade biológica consistente com agonista e/ou antagonista dos estrógenos naturais, podendo oferecer informações importantes sobre os efeitos de um potencial desregulador hormonal no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION

AGENCY, 2009). Além disso, um estudo de múltiplas gerações em roedores também pode fornecer informações relevantes para o sistema endócrino, incluindo observações do desempenho reprodutivo, gestação e maturação sexual ao longo de duas gerações (PAUL FRIEDMAN et al., 2016). Desse modo, o presente estudo foi conduzido para avaliar os potenciais efeitos do TCS como desregulador hormonal, através da exposição aguda, pelo teste uterotrófico, e exposição crônica, em um estudo de toxicidade reprodutiva em duas gerações de ratos (gerações P e F1), além da avaliação do desenvolvimento das proles F1 e F2 de ratos (machos e fêmeas).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar se o TCS apresenta atividade como desregulador hormonal sobre a função reprodutiva em ratos através de estudos que avaliam a exposição aguda e crônica.

2.1. Objetivos específicos

Investigar se o TCS apresenta atividade (anti)estrogênica através do teste uterotrófico em ratas imaturas.

Investigar a influência do tratamento crônico desse composto na função reprodutiva de duas gerações de ratos, avaliando:

- O desenvolvimento físico, reflexos comportamentais, puberdade, peso de órgãos reprodutivos, parâmetros de fertilidade, concentração plasmática de hormônios sexuais, histomorfometria de órgãos hormônio-dependente e comportamentos reprodutivos.

• 3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais foram elaborados e desenvolvidos com base no princípio dos três R's (Refine, Reduce e Redesign) e aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL: 283.2015.27).

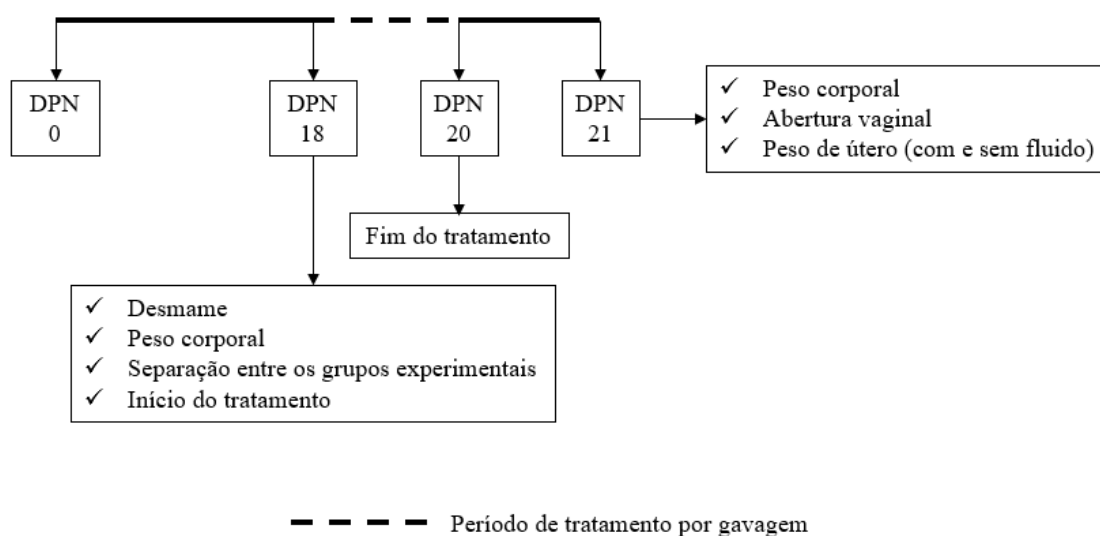
3.1. Teste uterotrófico: avaliação da atividade (anti)estrogênica do TCS em ratas

Para essa avaliação, foram seguidas as orientações do guia OPPTS 890.1600 preconizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA, 2009).

3.1.1. Delineamento experimental

O diagrama a seguir resume o delineamento experimental empregado para a avaliação da atividade (anti)estrogênica através do teste uterotrófico (Figura 1).

Figura 2. Delineamento experimental do teste uterotrófico. DPN: dia pós-natal.



3.1.2. Drogas

O TCS foi obtido da Vivimed Labs Limited (Habsiguda Hyderabad, Índia) (CAS nº 3380-34-5, 99,38% puro) e dissolvido em óleo de milho (veículo). O valerato de estradiol (CAS no. 979-32-8, 99,28% puro) e o citrato de tamoxifeno (CAS no. 54965-24-1, 99,73% puro) foram obtidos da Pharma Nostra Comercial (Rio de Janeiro, Brasil) e dissolvidos em óleo de milho e água, respectivamente. Todos os compostos foram administrados em um volume de dosagem de 2,5 ml/kg de peso corporal.

As doses escolhidas para o valerato de estradiol e citrato de tamoxifeno foram selecionadas com base em estudo anterior realizado em nosso laboratório (MONTAGNINI et al., 2013) e seguiram a orientação do guia OPPTS 890.1600 (U.S. EPA, 2009). A escolha das doses do TCS está descrita no item 3.2.2.

3.1.3. Animais e tratamento

Ratos Wistar, machos e fêmeas, provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas do CCB e colocados para acasalar em gaiolas coletivas (29 × 18 × 13 cm), com serragens de madeira como cama e mantidos sob condições padronizadas (temperatura de 21 ± 2°C, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvilab®, Quimtia SA, Brasil) à vontade.

Para o acasalamento, foi colocado um macho para cada duas fêmeas em cada gaiola ao final da tarde. Na manhã do dia seguinte, o macho foi retirado da gaiola das fêmeas e foram coletadas células da mucosa vaginal através de esfregaço. A prenhez foi considerada positiva quando observado, ao microscópio de luz, a presença de espermatozoides nas lâminas do esfregaço. Esse dia foi considerado como dia gestacional (DG) 0, ocasião em que as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o dia pós-natal (DPN) 0, sendo que no DPN 4, o número de filhotes em cada ninhada foi reduzido para dez (5 machos e 5 fêmeas, quando possível) com o objetivo de que todos recebessem quantidades iguais de leite evitando que o tamanho das ninhadas interferisse no desenvolvimento dos animais, esse número foi mantido com cada mãe até o DPN 18, ocasião em que ocorreu o desmame. Os filhotes machos foram utilizados para avaliação dos efeitos

(anti)androgênicos do TCS (teste de Hershberger) e os resultados foram publicados no artigo “Evaluation of reproductive toxicity in rats treated with triclosan” (PERNONCINI et al., 2018).

No dia do desmame, as ratas foram pesadas e distribuídas aleatoriamente para cada grupo experimental. Com o objetivo de avaliar um possível efeito estrogênico ou antiestrogênico do TCS, as ratas foram distribuídas para compor os grupos (n = 6-7/grupo) conforme Figura 2.

Figura 3. Grupos experimentais para avaliação da atividade (anti)androgênica do TCS no teste uterotrófico. E: valerato de estradiol; TCS: triclosan; TAM: citrato de tamoxifeno.

<ul style="list-style-type: none"> • Atividade estrogênica: • Veículo (controle -) <ul style="list-style-type: none"> • Óleo de milho • Estradiol (E) (controle +) <ul style="list-style-type: none"> • Valerato de estradiol 0,3 mg/kg • TCS 0,8 <ul style="list-style-type: none"> • Triclosan 0,8 mg/kg/dia • TCS 2,4 <ul style="list-style-type: none"> • Triclosan 2,4 mg/kg/dia • TCS 8,0 <ul style="list-style-type: none"> • Triclosan 8,0 mg/kg/dia 	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade antiestrogênica: • E (controle -) <ul style="list-style-type: none"> • Valerato de estradiol 0,3 mg/kg • E + TAM (controle +) <ul style="list-style-type: none"> • E + citrato de tamoxifeno 10 mg/kg • TCS 0,8 + E <ul style="list-style-type: none"> • Triclosan 0,8 mg/kg/dia • TCS 2,4 + E <ul style="list-style-type: none"> • Triclosan 2,4 mg/kg/dia • TCS 8,0 + E <ul style="list-style-type: none"> • Triclosan 8,0 mg/kg/dia
--	---

O TAM foi escolhido para o teste antiestrogênico pela propriedade de bloquear a ligação do estrógeno ao seu receptor no útero. As substâncias foram administradas por gavagem depois de 3 horas de restrição alimentar por 3 dias consecutivos (entre 13h e 13h30). Durante o período de tratamento, os animais foram acompanhados diariamente quanto a peso, mortalidade, morbidade ou sinais gerais de toxicidade, como mudanças comportamentais (agitação ou letargia), alterações neurológicas (convulsão, tremor, rigidez muscular e hiper-reflexia) e sinais autonômicos (lacrimejamento, piloereção, alteração pupilar e padrão respiratório alterado). Após 24 horas da última administração, os animais foram pesados e inspecionados quanto à abertura vaginal, em seguida, foram submetidos à eutanásia com

tiopental sódico (40mg/kg, i.p.). Após a laparotomia, o útero foi retirado e seccionado logo abaixo da sua junção com a cérvix e na junção dos cornos uterinos com os ovários, dissecado cuidadosamente para retirar o tecido conectivo adjacente. Em seguida, o útero foi pesado e posteriormente perfurado com uma agulha, colocado entre duas folhas de papel-filtro para retirada do líquido retido e então pesado novamente.

3.2. Avaliação da exposição ao TCS nas gerações P e F1, sobre parâmetros de toxicidade reprodutiva

Esse estudo baseou-se no guia da OECD/OCDE nº 416, que padroniza os procedimentos para avaliação da toxicidade reprodutiva de substâncias em duas gerações (OECD/OCDE, 2001).

Os diagramas a seguir resumem o delineamento experimental empregado neste trabalho para a avaliação da exposição ao TCS sobre os parâmetros de toxicidade reprodutiva avaliados nos machos (Figura 2) e nas fêmeas (Figura 3).

Figura 4. Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao TCS nos machos da geração F1. DL: dia lactacional; DG: dia gestacional; DAG: distância anogenital; DPN: dia pósnatal.

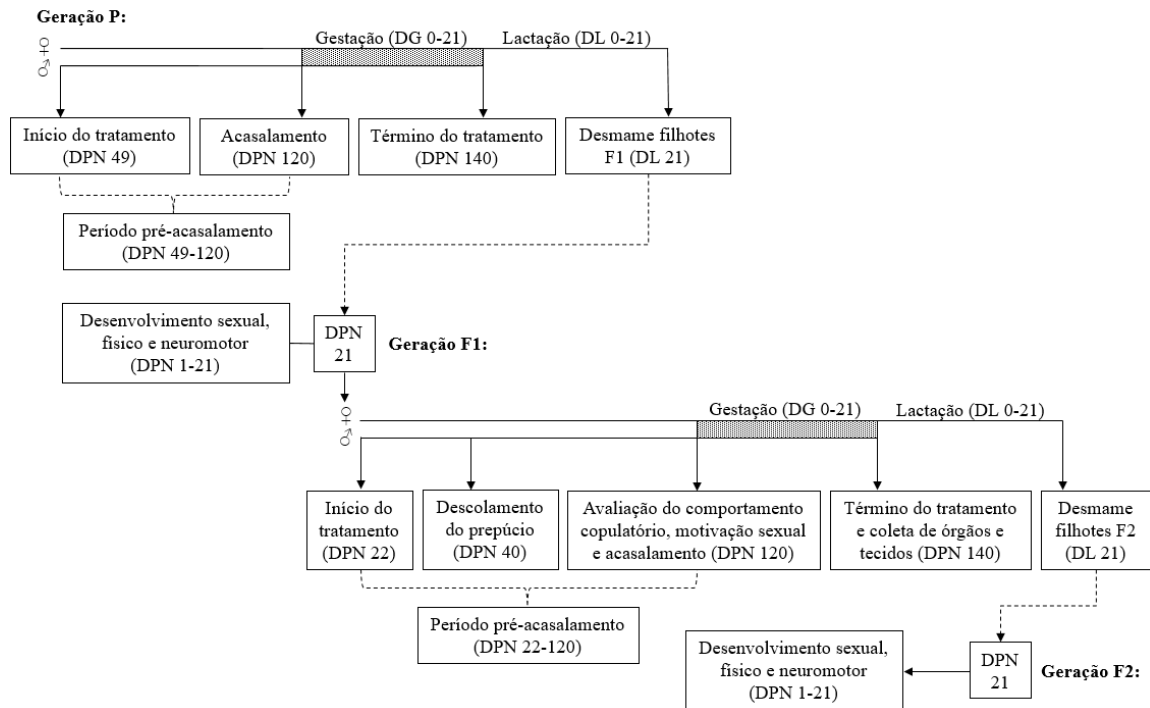
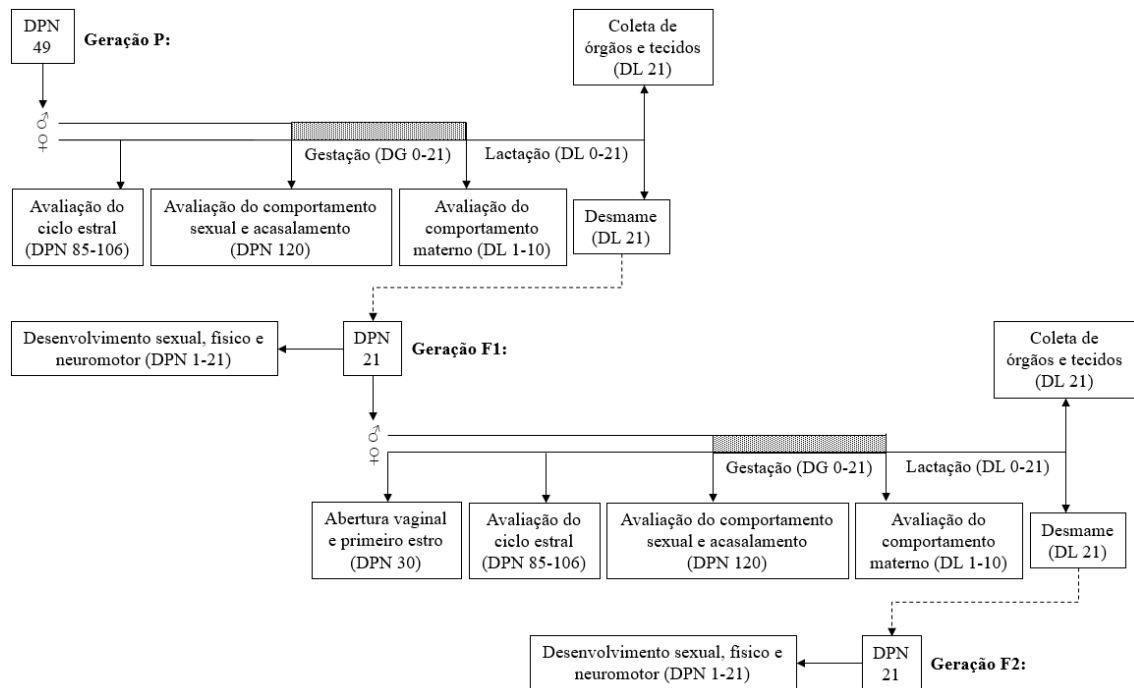


Figura 5. Delineamento experimental empregado na avaliação da exposição ao TCS nas fêmeas das gerações P e F1. DL: dia lactacional; DG: dia gestacional; DAG: distância anogenital; DPN: dia pósnatal.



3.2.1. Animais e tratamento

Os animais da colônia da Universidade Estadual de Londrina foram alojados em gaiolas coletivas de polipropileno (29 × 18 × 13 cm) e mantidos nas instalações do Departamento de Ciências Fisiológicas em um ambiente controlado a uma temperatura de 21±2 °C; fotoperíodo de 12h claro/12h escuro (luzes acesas às 6:00 da manhã) e com água e ração (Nuvilab™, Quimtia SA, Brasil) à vontade.

Ratos Wistar machos e fêmeas (17 animais/sexo/grupo) foram utilizados como geração parental (P). No dia pós-natal (DPN) 49, os animais da geração P foram estratificados pelo peso e alocados para um dos quatro grupos de tratamento para receber doses de TCS de 0,8, 2,4 e 8,0 mg/kg, além do grupo controle (CTR), tratados com o veículo (óleo de milho). Os animais foram tratados por pelo menos 70 dias (com o objetivo de cobrir pelo menos um ciclo espermatogênico completo e vários ciclos estrais) e todo o período de acasalamento, gravidez e lactação (desmame de filhotes F1).

Para o acasalamento, os animais P foram coabitados diariamente durante a noite (um macho e uma fêmea, não-irmãos e do mesmo grupo experimental, por gaiola) até o diagnóstico de gravidez positivo. As fêmeas com espermatozoides observadas no esfregaço vaginal, presumido DG 0, foram então mantidas em gaiolas individuais até o dia do parto. O dia em que o parto ocorreu até as 13 h foi designado como dia de lactação (LD) 0 para as mães e DPN 0 para filhotes. Todos os filhotes vivos foram identificados por tatuagem cutânea a base de tinta nanquim no DNP 1. As ninhadas foram reduzidas para 8 filhotes no DNP 4, mantendo 4 machos e 4 fêmeas sempre que possível e identificados pela marcação auricular ao desmame (DNP 21). Os filhotes F1 não selecionados para dar continuidade ao tratamento após o desmame foram submetidos a eutanásia por decaptação.

Um macho e uma fêmea de cada ninhada foram selecionados para dar continuidade ao tratamento com TCS (geração F1). O tratamento foi continuado nestes animais a partir do DPN 22 (24 h após o desmame) e da mesma forma que na geração P, continuou durante o acasalamento (ou seja, DPN 120), gestação e lactação até o desmame da prole F2, terminando cerca de 24 h antes da eutanásia. Os filhotes F2 (machos e fêmeas) foram expostos ao TCS através de células germinativas, útero e lactação via exposição materna (geração F1) e foram submetidos à eutanásia no dia do desmame. O estado de saúde dos animais animal, bem como

sinais clínicos (lacrimejamento, piloerção, padrão respiratório incomum e tremores) foram verificados diariamente.

3.2.2. Escolha da dose

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008), a ingestão diária aceitável de TCS é de até 0,3 mg/kg, para humanos. Quando não há informações disponíveis sobre exposição de alimentos e água, é aplicado o fator de alocação, que reflete a contribuição provável da água na ingestão diária total para um determinado produtos químicos (WHO, 2011). Na ausência de dados de exposição adequados, caso do TCS, o fator de alocação adotado para o consumo diário total de água potável é de 0,2 (UMBUZEIRO, 2012), o que corresponde a 20% do valor de consumo diário aceitável. Nesse sentido, tomando o consumo diário aceitável para humanos, excluindo o fator de alocação, o ajuste dosimétrico $BW^{3/4}$ foi aplicado considerando o metabolismo de roedores (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006). O peso de um ser humano foi considerado como 70 kg e de um roedor como 250 g para obter o valor de 0,8 mg/kg como valor de ingestão diariamente aceitável para ratos. As doses de 2,4 mg/kg e 8,0 mg/kg foram escolhidas adotando os fatores 3 e 10, respectivamente, assumindo as variações intra-espécies. Todas as três doses de TCS utilizadas neste estudo estão abaixo da DL_{50} (dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste) (> 5,000 mg/kg) estabelecida em roedores, quando administrado por via oral (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008). Os ratos foram tratados diariamente entre as 11-13 h.

3.3. Parâmetros avaliados nos machos F1

Os machos, de ambas as gerações (P e F1, n = 15-17/grupo), foram divididos em 2 subgrupos, sendo que no primeiro (n = 8-10/grupo), os animais foram utilizados para avaliação dos comportamentos sexuais, peso de órgãos, dosagem de testosterona, parâmetros espermáticos e histomorfometria testicular. No segundo subgrupo (n = 7/grupo), os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% para futura identificação dos receptores de andrógenos nos testículos.

As metodologias e os dados referentes aos machos da geração P fazem parte de uma dissertação de mestrado e os resultados foram publicados no artigo “Evaluation of reproductive toxicity in rats treated with triclosan” (PERNONCINI et al., 2018). Neste estudo, serão descritas as metodologias empregadas nos machos F1 utilizados na avaliação dos parâmetros de desenvolvimento físico e sexual, comportamentos sexuais, peso de órgãos, dosagem de testosterona, parâmetros espermáticos e histomorfometria testicular.

3.3.1. Peso corporal

A determinação do peso corporal foi realizada a cada três dias, durante o período de tratamento (DPN 22 até 20 dias após o acasalamento), para análise de ganho de peso corporal e correção volumétrica das doses de TCS administradas.

3.3.2. Avaliação dos comportamentos sexuais

3.3.2.1. Avaliação do comportamento copulatório

Quinze dias antes das análises comportamentais (DPN 105), os animais foram transferidos para o biotério com ciclo de luz claro/escuro de 12×12 horas invertido, com 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, que não participou de nenhum tratamento, foi introduzida na mesma caixa. Durante 30 min, as latências e frequências para intromissão e ejaculação foram observadas como descrito em Gerardin et al. (2006). Caso 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 (ÅGMO, 1997).

3.3.2.2. Teste de motivação sexual

O teste de motivação sexual foi realizado após análise de comportamento copulatório. Para realização deste teste, foi utilizado uma arena retangular de $50 \times 50 \times 100$ cm (altura \times largura \times comprimento) apresentando duas aberturas que se comunicavam com duas arenas menores, ambas com 25 cm^2 . As arenas menores são diagonalmente opostas uma há outra e a comunicação com a arena principal é fechada com uma tela de arame. No dia do teste, 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) (Figura 4). O rato macho a ser analisado foi posicionado no centro da arena principal e seu comportamento foi observado durante 20 min, sendo registrado o número de visitas e o tempo total gasto visitando cada zona de incentivo. Após os registro desses dados, o escore de preferência foi calculado ($[\text{tempo de permanência na zona de fêmea}/\text{tempo total gasto em ambas as zonas de incentivo}] \times 100$) (ÅGMO, 2003).

Após a avaliação do teste de motivação sexual, os machos foram colocados com fêmeas tratadas do mesmo grupo experimental (de ninhadas diferentes) para o acasalamento e obtenção da geração seguinte, conforme descrito no item 3.2.1.

Figura 6. Representação esquemática da vista superior da arena do teste de preferência sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea (sexual) e do macho (social), respectivamente.

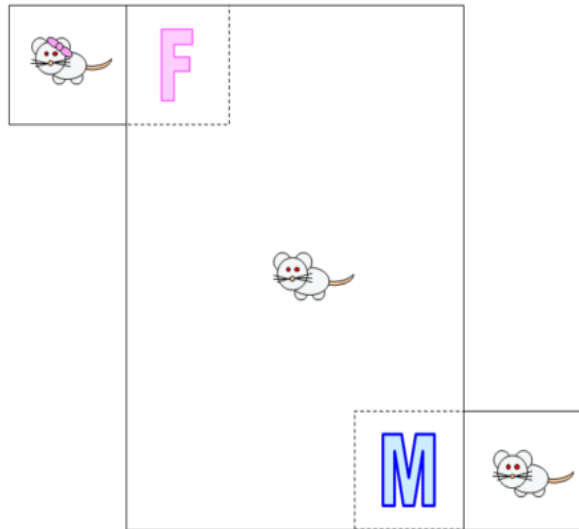


Ilustração: André Demambre Bacchi

3.3.3. Coleta dos órgãos

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação após 20 dias do teste de motivação sexual (para reposição do estoque espermático), e então realizada a coleta de sangue para posterior determinação da concentração plasmática de testosterona (item 3.3.4.). 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 (item 3.3.5.1), viabilidade (item 3.3.5.2) e concentração espermática (item 3.3.5.3). O ducto deferente esquerdo foi retirado para análise da morfologia dos espermatozoides (item 3.3.5.4). 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 (item 3.3.5.5) e o testículo direito foi preparado para análise histomorfométrica (item 3.3.6).

3.3.4. Concentração plasmática de testosterona

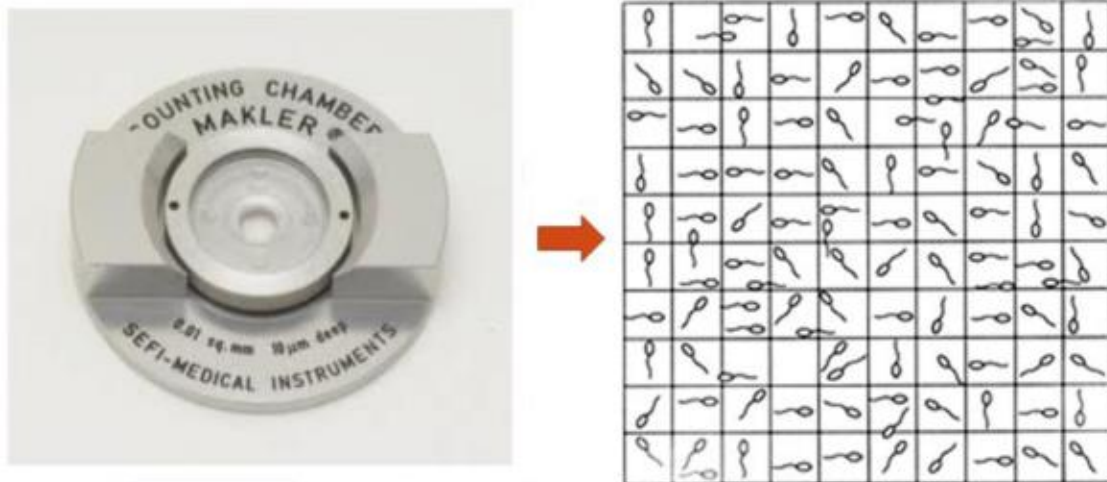
As amostras de sangue foram coletadas (em tubos de ensaio heparinizados) sempre no mesmo horário, centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 4°C) e o plasma congelado a -80°C para análises posteriores. A concentração de testosterona no plasma foi obtida utilizando o teste de imunoensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT[®] 2nd Generation Testosterone), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em um mesmo ensaio onde o coeficiente de variação intra-ensaio e sensibilidade foram 4,6% e 0,15 nmol/L respectivamente.

3.3.5. Parâmetros espermáticos

3.3.5.1. Motilidade espermática

A motilidade espermática foi analisada de acordo com Perobelli et al. (2010) e Favareto et al. (2011). O ducto deferente direito foi seccionado nas extremidades anterior e posterior e raspado delicadamente com bastão de vidro para retirar os espermatozoides de seu interior. Os espermatozoides coletados foram imediatamente diluídos em 1 ml de meio GV HEPES (Ingamed, Maringá, Brasil) pré-aquecido a 34°C com ajuda de uma placa aquecedora para evitar a morte das células. Na câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) (Figura 5) foi adicionado uma alíquota de 10µl da amostra deste diluído, e então analisados em fase de contraste do microscópio de luz Eclipse E200 (100×) (Nikon, Tóquio, Japão). Um total de 100 espermatozoides por animal foram analisados e classificados como móveis e imóveis. Paralelamente, uma pequena alíquota da solução em meio GV HEPES foi coletada para análise da viabilidade espermática (item 3.3.5.2.).

Figura 7. Câmara de Makler utilizada para realização da motilidade, viabilidade e concentração espermática. A esquerda, foto do modelo da câmara utilizada. A direita, representação esquemática da vista superior do aparelho através do microscópio de luz, com espermatozóides.



3.3.5.2. Viabilidade espermática

A viabilidade espermática foi analisada a partir da técnica de coloração com eosina-nigrosina (BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003). Neste teste, uma pequena alíquota de 50 μl da amostra em meio GV HEPES (item 3.3.5.1.) foi misturada com eosina-nigrosina e diretamente examinado em microscópio de luz. Foram avaliados 100 espermatozoides por animal, sendo que os espermatozoides não corados foram classificados como viáveis e os espermatozoides corados foram classificados como não-viáveis.

3.3.5.3. Concentração espermática

Após realizada a análise de motilidade espermática, a concentração espermática foi avaliada em uma câmara de Makler com aumento de 100 \times , e estimada em milhões (10^6) por mililitro. A câmara de Makler possui uma marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1 mm^2) cada um com 0,1 $\text{mm} \times 0,1 \text{ mm}$ e uma profundidade de 0,01 mm . Na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula o volume compreendido é de 0,001 mm^3 . Apenas os espermatozóides 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).

3.3.5.4. 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 solução 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 de luz (400×) (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).

3.3.5.5. Contagem espermática

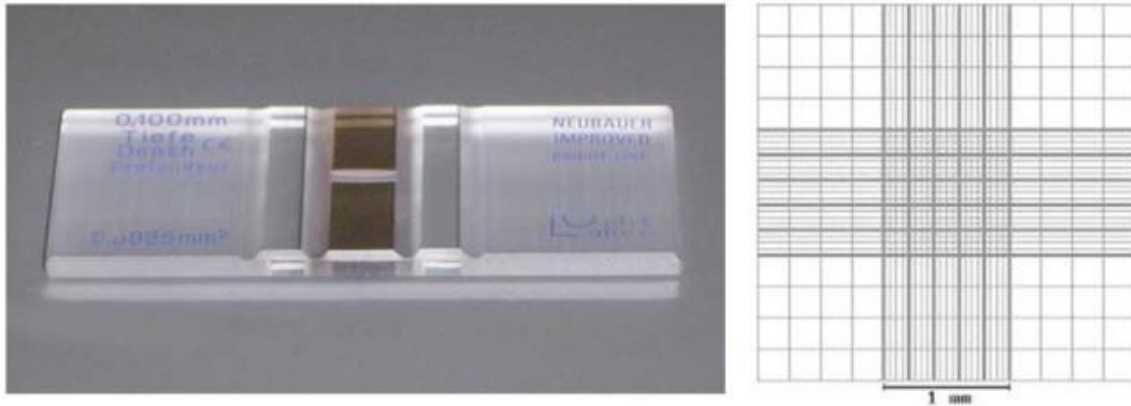
O testículo esquerdo decapsulado e o epidídimo esquerdo, dos diferentes grupos experimentais, foram removidos e estocados a -80° C para posterior determinação da contagem de células germinativas.

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, de acordo com método descrito por Robb, Amann e Killian (1978) e adaptado por Fernandes et al. (2007). Após o descongelamento do testículo decapsulado, o parênquima testicular foi pesado e colocado em um tubo de ensaio com tampa, onde foram adicionados 5ml de solução contendo NaCl (0,9%) e Triton-X (0,05%). 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-X (100 µl do

homogeneizado + 900 μ l de solução), uma alíquota foi transferida por meio de uma pipeta Pasteur para a câmara de Neubauer (Figura 6), 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 n° 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.

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 -80° 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-X para cada 100 mg de cauda e 1 ml da mistura para cada 200 mg de cabeça/corpo. O tecido epididimário foi então homogeneizado, diluído e contado em câmara 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.

Figura 8. Câmara de Neubauer utilizada para contagem espermática. A esquerda, foto do modelo utilizado. A direita, representação esquemática da vista superior de uma das câmaras do aparelho, através do microscópio de luz.



3.3.6. Parâmetros biométricos e análise histológica do testículo

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, o órgão foi cortado em fragmentos de tecido, desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. Foram feitos cortes com 7 μ m de espessura, corados com hematoxilina e eosina.

A composição dos dados volumétricos do parênquima testicular foi obtida pela contagem de pontos utilizando uma grade de 100 pontos na ocular em aumento final de 100 \times . Um total de 10 campos escolhidos aleatoriamente (1000 pontos) foram pontuados para cada animal. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em μ l, foi estimado a partir do conhecimento do percentual 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) (FRANÇA; GODINHO, 2003).

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido pela mensuração cruzada de 15 secções transversais de túbulo seminífero por animal escolhidos de forma aleatória com perfis redondos ou arredondados. Essa medição foi realizada utilizando-se o programa

computacional Motic Images Plus 2.0 (Motic Inc., Xiamen, China) em microscópio de luz Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital Moticom-5 (Motic Inc., Xiamen, China) em um aumento de 100×. 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 dos túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL et al., 1963; DORST; SAJONSKI, 1974).

3.4. Parâmetros avaliados nas fêmeas P e F1

3.4.1. Peso corporal durante o período pré-acasalamento

O peso corporal foi medido a cada três dias, desde o início do período de dosagem (P = DPN 49; F1 = DPN 22) até o dia anterior ao acasalamento (DPN 120), considerado como o período de pré-acasalamento.

3.4.2. Avaliação do ciclo estral

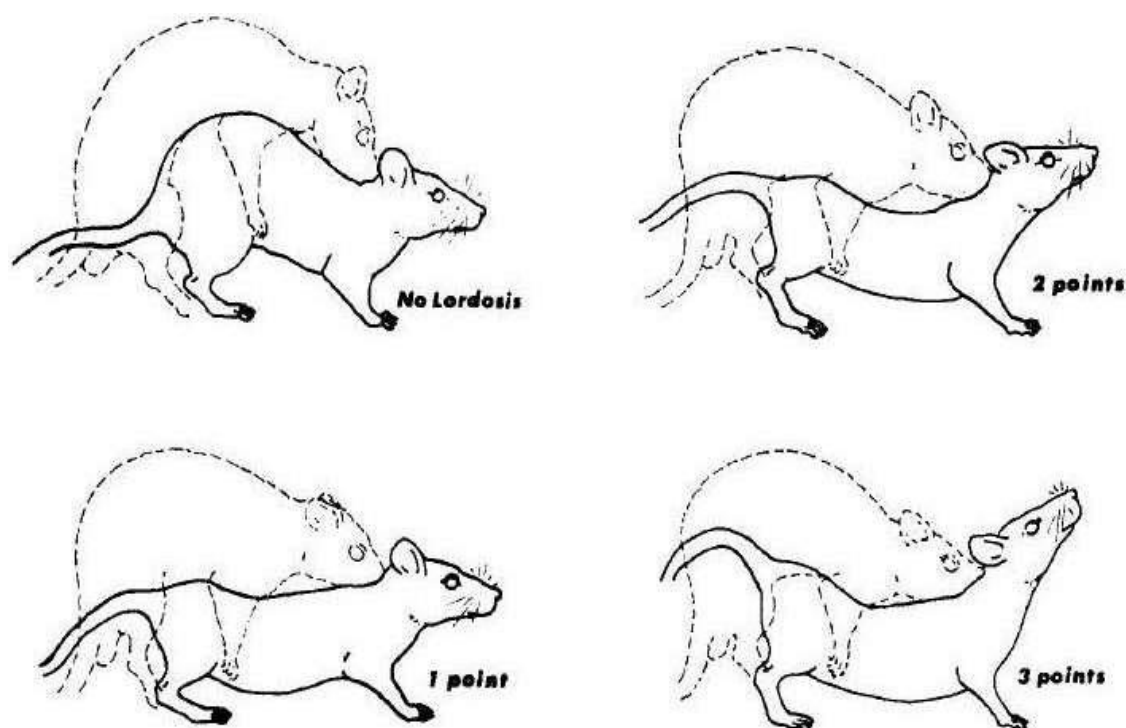
O ciclo estral, das ratas da linhagem utilizada no presente trabalho, dura de 4 a 5 dias (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). O ciclo estral foi acompanhado durante 21 dias a partir do DPN 86, sempre no mesmo horário. Foram coletadas células da mucosa vaginal com auxílio de cotonete, previamente embebido em solução fisiológica. O material foi espalhado numa lâmina, umedecido com uma gota de salina e observado ao microscópio de luz para identificação da fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro). Os coeficientes de estro, diestro/metaestro e proestro foram determinados pela seguinte fórmula de acordo com Chistyakov et al. (2012): $C = [a/b] \times 100\%$, onde, C = coeficiente do ciclo correspondente, a = duração em dias do ciclo correspondente dentro do período de observação, e b = duração média do ciclo estral (em dias). A duração do ciclo estral foi calculada como o número de dias entre uma fase e a próxima.

3.4.3. Avaliação comportamental sexual

A análise do comportamento sexual feminino seguiu a metodologia proposta por Felício e Nasello (1989). Quinze dias antes da análise comportamental, os animais foram transferidos para o biotério com ciclo claro/escuro de 12×12 horas invertido, com controle de luminosidade, ruído e temperatura, para a perfeita adaptação das funções fisiológicas. A partir do DPN 120, foram coletadas células da mucosa vaginal 3 a 4 horas antes do início dos testes. Foram utilizadas apenas as fêmeas na fase de estro e machos sexualmente experientes, vasectomizados, e que não participaram de nenhum tratamento. O teste comportamental foi filmado e analisado por um experimentador localizado fora do biotério de ciclo de luz invertida. Inicialmente, um rato macho foi colocado na gaiola de observação (caixa de policarbonato), onde permaneceu por pelo menos 10 min para adaptação. Em seguida, foi introduzida na mesma caixa a fêmea e o teste durou até que 10 montas tenham sido observadas (RAMIREZ; CARRER; NASELLO, 1979). Foram avaliados o coeficiente de lordose ($LQ = [\text{número de lordoses}/10 \text{ montas}] \times 100$) (BEACH, 1976) e também a frequência de cada grau de lordose, pontuada numa escala de 0 a 3 (em que 0 é classificado como ausência de lordose e 3 como lordose máxima), para calcular o escore de lordose (número total de pontos da lordose/número total de respostas da lordose), conforme mostrado na Figura 7 (HARDY; DEBOLD, 1971).

Finalizada a avaliação do comportamento sexual, as fêmeas foram colocadas com machos tratados do mesmo grupo experimental (de ninhadas diferentes) para o acasalamento e obtenção da geração seguinte, conforme o método descrito para acasalamento no item 3.2.1.

Figura 9. Representação dos diferentes graus de lordose e pontuação empregada para avaliação do coeficiente de lordose e score de lordose



Font

e: Hardy; Debold, 1971

3.4.4. Avaliação do comportamento materno

Após a análise do comportamento sexual (item 3.4.3.), as fêmeas foram mantidas à noite com o respectivo rato, não irmão e do mesmo grupo experimental, e na manhã seguinte, foram separadas em gaiolas individuais e realizado o diagnóstico de prenhez. As ratas prenhas foram utilizadas para análise do comportamento materno. A análise do comportamento materno foi realizada no DL 1 ao 10, seguindo a metodologia adaptada de Reis et al. (2014). Foram realizadas quatro sessões de gravação de 72 minutos. As sessões ocorreram em horários regulares, com 3 períodos durante a fase de luz (10:00, 13:00 e 16:00) e um período durante a fase escura (19:00, uma hora após as luzes desligar) do ciclo luz-escuro. Dentro de cada sessão, o comportamento da mãe foi registrado a cada 3 minutos, resultando em 25 observações por sessão em 4 períodos por dia, representando um total de 100 observações por mãe por dia. Os dados foram expressos como o número de observações em que os filhotes receberam o comportamento materno alvo durante os 10 dias de observação (o número total

de eventos foi de 1000). Os comportamentos observados foram: (a) limpeza do filhote, (b) construção do ninho, (c) fora do ninho e (d) amamentando (Figura 8). Uma descrição detalhada dos comportamentos é fornecida em Myers et al. (1989) e Champagne et al. (2003).

Figura 10. Rata em posição arqueada de amamentação.



Fonte: Laboratório de Farmacologia da Reprodução

3.4.5. Peso corporal e consumo de ração durante a gestação e a lactação

Durante a gestação, o ganho de peso corporal e o consumo de ração foram registrados nos dias 0, 7, 14 e 20. Durante a lactação, o peso corporal e o consumo de ração das mães foram obtidos nos dias 1, 4, 7, 14 e 21. O consumo de ração não foi registrado no DL 21, pois, a partir do DL 14, os filhotes passam a consumir ração, impossibilitando a quantificação do consumo de ração pela mãe, neste período.

3.4.6. Coleta de órgãos e quantificação plasmática de progesterona

Aproximadamente 24 h após o desmame (DL 21), as fêmeas foram pesadas e submetidas a eutanásia por decaptação. O fígado, os rins, as adrenais, os ovários e o útero (com fluido) foram removidos e os pesos determinados. Amostras de plasma foram obtidas no momento da eutanásia e imediatamente armazenadas (-80°C) para posterior análise. A quantificação plasmática de progesterona no sangue foi mensurada por radioimunoensaio utilizando o ImmuChem™ Double Antibody¹²⁵ RIA-Kit para Progesterona (MP Biomedicals, Orangeburg, NY) de acordo com as instruções do fabricante. A sensibilidade mínima do ensaio foi de 0,01 ng/mL e o erro intra-ensaio 5,9%.

3.4.7. Morfometria do epitélio uterino, quantificação dos corpos lúteos e contagem folicular ovariana

Após a pesagem, útero e ovários foram fixados em Bouin por 24h e posteriormente armazenados em álcool 70°. Os órgãos preservados foram cortados em fragmentos de tecido, desidratados concentrações crescentes de etanol e embebidas em paraplast. Os blocos foram seccionados a 6 µm (6 seções por animal/grupo) separados por uma distância de 50 µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio de luz. Em cada seção, cinco regiões diferentes foram analisadas, resultando em um total de 15 medições por animal. No útero, a altura do endométrio foi medida por meio de sistema de captura (Moticam 5, Motic) acoplado a um microscópio ocular a 100 × de aumento final. O epitélio uterino, o estroma endometrial, o miométrio e o perimétrio foram avaliados na porção média do útero, em relação à posição do oviduto e do ovário. As glândulas endometriais e os vasos sanguíneos não foram medidos. Nos ovários, os números de cada tipo de folículo e corpos lúteos formados foram contados. Os folículos foram avaliados por microscopia de luz (aumento de 400x). Os folículos primordiais (tipos 1-3), crescentes (tipos 4-5b) e antrais (tipos 6-8) foram identificados usando uma ligeira modificação dos critérios de Pedersen e Peters (1968). O número médio de folículos ovarianos e corpos lúteos foram calculados nas seções selecionadas.

3.4.8. Fertilidade

O desempenho reprodutivo foi definido pelos seguintes índices: índice de acasalamento (%): (número de fêmeas acasaladas = [esperma vaginal ou gravidez/número de fêmeas colocadas com machos] \times 100); índice de fertilidade (%): (número de fêmeas grávidas = [embriões ou fetos no útero ou parto/número de fêmeas colocadas com machos] \times 100); índice de gestação (%): (número de fêmeas com filhotes vivos/número de fêmeas grávidas) \times 100; índice de natalidade (%): (número de filhotes vivos/número de nascidos vivos + filhotes mortos) \times 100; índice de viabilidade (%): (número de filhotes vivos no dia 4 pós-parto (pré-escolar)/número de filhotes vivos) \times 100; índice lactacional (%): [(número de filhotes vivos no dia 21 pós-parto/número de filhotes vivos no dia 4 pós-parto) \times 100]; perda pós-implantação (%): (número de implantações - número de filhotes entregues/número de implantações) \times 100.

3.5. Parâmetros de desenvolvimento avaliados nas proles F1 e F2

Os parâmetros de desenvolvimento avaliados nas proles F1 e F2 foram baseados no guia da OECD/OCDE n° 426 (OECD/OCDE, 2007).

Todos os descendentes (F1 e F2) foram examinados o mais rápido possível no dia do nascimento (DPN 0) para determinar o número de filhotes vivos e nascidos por ninhada e sexados com base na distância do ânus para e o tubérculo genital. Os filhotes foram pesados nos DPN 1, 4, 7, 14 e 21. O estado de saúde dos filhotes e os sinais clínicos foram verificados diariamente ao longo da lactação.

3.5.1. Desenvolvimento sexual

Os dados de desenvolvimento sexual foram obtidos de um macho e uma fêmea de cada ninhada, selecionados aleatoriamente. A distância anogenital (DAG, distância do ânus até o tubérculo genital) foi obtida através de um paquímetro nos DPN 1, 4 e 21. A DAG

relativa foi normalizada por meio da sua divisão pela raiz cúbica do peso corporal (GALLAVAN et al., 1999).

A abertura vaginal foi observada a partir do DPN 30 e a separação prepucial a partir do DPN 40, para a determinação da instalação da puberdade. Para determinar a idade no primeiro estro, esfregaços vaginais foram coletados diariamente, após a ocorrência da abertura vaginal.

Os dados referentes ao dia da abertura vaginal e primeiro estro e separação prepucial foram registrados apenas dos animais F1 selecionados para dar continuidade ao tratamento/acasalamento.

3.5.2. Desenvolvimento físico

Um macho e uma fêmea de cada ninhada, não selecionados para o acasalamento, foram observados até o dia da ocorrência dos seguintes parâmetros físicos de desenvolvimento: desdobramento da orelha externa (a partir do DPN 2), erupção dos dentes incisivos (a partir do DPN 6), abertura dos olhos (a partir do DPN 10) e retenção mamilar (avaliado nos machos no DPN 12). A idade da abertura dos olhos e desdobramento da orelha externa foram registrados quando os dois olhos ou orelhas foram completamente abertos. A erupção dos incisivos foi examinada diariamente para determinar o primeiro dia da aparência bilateral dos incisivos superiores. A presença/ausência de mamilo/aréola foi definida como pelo menos uma mancha pigmentada de mamilo ou sem pelo, identificada como aréola.

3.5.3. Desenvolvimento neuromotor

O mesmo filhote selecionado para avaliação do desenvolvimento físico (item 3.5.2.) foi utilizado na avaliação dos testes de desenvolvimento neuromotor. A variável dependente analisada para cada teste foi o dia em que o animal alcançou a maturidade do reflexo ou as condições listadas abaixo.

3.5.3.1. Reflexo de endireitamento

A partir do DPN 5, o animal foi colocado em decúbito dorsal sendo medida a ocorrência ou não de resposta. O critério para o registro desse reflexo é que, ao virar-se, o animal fique com as quatro palmas espalmadas na superfície. O período de latência máxima é de 10 segundos.

3.5.3.2. Geotaxia negativa

A partir do DPN 5, os filhotes foram colocados em uma rampa de aproximadamente 45° de inclinação, a 5 cm do final inferior dessa rampa, com a cabeça direcionada para baixo (Figura 9). O período de latência é de 30 segundos para os animais voltarem à posição oposta. Eles foram avaliados até o dia que apresentaram o reflexo.

Figura 11. Plataforma com inclinação de 45° para avaliação da geotaxia negativa.



Fonte: Laboratório de Farmacologia da Reprodução

3.5.3.3. Atividade locomotora

A atividade motora da prole foi avaliada em arena de campo aberto (figura 10) nos DPN 13, 17 e 21. A arena consiste em uma superfície circular de madeira com 39 cm de diâmetro, cercada por parede de madeira de 28 cm de altura. A superfície é pintada de branco e dividida em 19 partes similares por um círculo concêntrico e linhas segmentadas. No dia do teste, cada animal foi colocado no centro da arena e avaliado sua locomoção (número de espaços invadidos pelo animal com as quatro patas) durante uma sessão de 10 minutos (MOREIRA; VASSILIEFF; VASSILIEFF, 2001). Ao fim de cada bateria, o animal era removido e o chão cuidadosamente limpo com um pano embebido em solução de etanol a 5%. O teste foi sempre realizado entre as 09:00 e as 15:00 horas, em uma sala silenciosa. Cada sessão foi gravada por uma câmera de vídeo acoplada a um computador em uma sala adjacente.

Figura 12. Vista superior da arena do teste de campo aberto utilizada para análise de atividade locomotora.



Fonte: Laboratório de Farmacologia da Reprodução

3.6. Análise estatística

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov/ Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) para cada variável. Para os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram conduzidas análises paramétricas e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram transformadas a fim de atingir os critérios para a análise paramétrica e, caso ainda não apresentassem normalidade e homogeneidade, os dados foram submetidos aos testes não paramétricos, apresentados como mediana (1º e 3º quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo software SPSS (IBM, SPSS statistics v19).

3.6.1. Avaliação da atividade (anti)estrogênica do TCS em ratas imaturas

O peso corporal inicial e final foi analisado por ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) complementada com teste de Bonferroni. O peso do útero (cheio e vazio) foi analisado por ANOVA complementado com teste de Dunnett, assim como foi realizado uma análise de covariância (ANCOVA) usando o peso corporal final como co-variável, como sugerido pelo guia seguido neste estudo (U.S. EPA, 2009). Como ANCOVA e ANOVA forneceram resultados semelhantes, os resultados com ANOVA foram escolhidos para serem relatados nos resultados deste estudo. Para análise da atividade estrogênica, todos os grupos foram comparados com o grupo tratado com E e, para atividade antiestrogênica, todos os grupos foram comparados com o grupo tratado com E + TAM.

3.6.2. Avaliação da exposição ao TCS nas sobre parâmetros de toxicidade reprodutiva em duas gerações e desenvolvimento da prole

Os testes estatísticos empregados foram:

- RMANOVA complementada com Bonferroni: Peso corporal durante a gestação/lactação, consumo de ração durante gestação/lactação, peso corporal dos filhotes, DAG relativa e atividade locomotora, sendo o dia e o tratamento utilizados como fatores dentre- e entre-sujeitos, respectivamente;
- ANOVA complementado com Bonferroni/Tukey: ganho de peso durante período pré-acasalamento, peso de órgãos e tecidos, concentração plasmática de testosterona e estradiol (machos DPN 140 e fêmeas DL 21), parâmetros espermáticos (motilidade, viabilidade, concentração, morfologia e contagem), histomorfometria dos órgãos reprodutivos, comportamento sexual, puberdade (descolamento do prepúcio e abertura vaginal) e 1º estro.
- Para o comportamento materno, uma vez que não houve interação dose \times dia, os dados foram novamente colapsados ao longo dos dias pós-parto e analisados com ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey;
- Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn: ciclo estral, desenvolvimento físico e neuromotor;

- Teste Qui-quadrado (Chi-Square test): grau de lordose e índices de fertilidade nas fêmeas e retenção mamilar nos machos.

4. RESULTADOS

No presente estudo o TCS não apresentou atividade (anti)estrogênica no teste uteroitrófico, nas doses utilizadas. No estudo de duas gerações, a exposição ao TCS reduziu a motilidade e viabilidade espermática dos ratos da geração F1, enquanto nas ratas, reduziu a receptividade sexual de ambas as gerações P e F1, reduziu o consumo de ração durante a lactação e o comportamento de limpeza nas mães da geração P e reduziu a quantificação de folículos em crescimento nos ovários das ratas F1. Todos os efeitos foram observados nos animais tratados com a dose intermediária de TCS (2,4 mg/kg).

4.1. Teste uterotrófico

Nenhum animal utilizado nesse teste teve morte ou apresentou sinais gerais de toxicidade, como mudanças comportamentais (agitação ou letargia), alterações neurológicas (convulsão, tremor, rigidez muscular e hiper-reflexia), e sinais autonômicos (lacrimagem, piloereção, alteração pupilar e padrão respiratório alterado).

4.1.1. Atividade estrogênica

ANOVA indicou que não houve diferença do peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento entre os grupos (Tabela 1). Nenhuma fêmea apresentou abertura vaginal durante o teste.

Como esperado, ANOVA complementado com teste de Dunnett, demonstrou que o grupo que recebeu valerato de estradiol (E) (controle positivo para estrogenicidade) apresentou aumento significativo no peso do útero cheio [$F_{(4,31)} = 81,565$; $p > 0,001$] e no peso do útero vazio [$F_{(4,31)} = 116,168$; $p > 0,001$] em relação ao controle negativo (veículo). TCS não demonstrou ter atividade estrogênica nesse teste, pois não houve diferença no peso do útero cheio e vazio em relação ao controle negativo (veículo) ($p > 0,05$).

Tabela 1. Teste uterotrófico para atividade estrogênica: peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das ratas.

	Veículo	E	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
	[7]	[7]	[6]	[6]	[6]
Peso corporal no primeiro dia (g)	28,69 ± 0,66	28,91 ± 0,98	28,43 ± 1,23	28,33 ± 1,11	28,43 ± 1,13
Peso corporal no quarto dia (g)	31,32 ± 1,50	30,13 ± 0,96	29,45 ± 1,63	31,35 ± 1,81	30,25 ± 1,79
Útero cheio (mg)	0,022 ± 0,003	0,085 ± 0,004*	0,022 ± 0,002	0,022 ± 0,002	0,027 ± 0,004
Útero vazio (mg)	0,017 ± 0,002	0,067 ± 0,002*	0,017 ± 0,001	0,017 ± 0,002	0,022 ± 0,003

Dados apresentados como média ± EPM. Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. * $p < 0,05$, comparado ao grupo Veículo. ANOVA complementado com teste de Dunnett (1-tailed). E: valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia; Veículo: óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

4.1.2. Atividade antiestrogênica

A Tabela 2 mostra os resultados do teste uterotrófico para avaliar possíveis efeitos antiestrogênicos do TCS. Não foi detectada diferença significativa para peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento entre os grupos ($p > 0,05$). Somente uma fêmea do grupo E e outra do grupo E + TCS 8,0 apresentaram abertura vaginal durante o teste.

A ANOVA complementada com Dunnett revelou que o co-tratamento com TAM preveniu o aumento do peso uterino induzido pelo estradiol (cheio, $[F_{(4,33)} = 5,424, p < 0,005$ e vazio, $[F_{(4,33)} = 10,193, p < 0,005]$). Este mesmo efeito não foi observado nas fêmeas co-tratadas com E + TCS, indicando que o TCS não apresentou atividade antiestrogênica neste teste ($p > 0,05$).

Tabela 2. Teste uterotrófico para atividade antiestrogênica: peso corporal no primeiro e quarto dia de tratamento, peso do útero cheio e vazio das ratas.

	E	E + TAM	E + TCS 0,8	E + TCS 2,4	E + TCS 8,0
	[7]	[7]	[6]	[7]	[7]
Peso corporal no primeiro dia (g)	28,91 ± 0,98	28,89 ± 1,03	28,58 ± 0,69	29,09 ± 0,43	28,50 ± 1,02
Peso corporal no quarto dia (g)	30,13 ± 0,96	29,64 ± 1,72	30,85 ± 1,17	31,20 ± 1,06	30,91 ± 1,62
Útero cheio (mg)	0,085 ± 0,004	0,051 ± 0,002*	0,092 ± 0,010	0,101 ± 0,014	0,108 ± 0,013
Útero vazio (mg)	0,067 ± 0,002	0,043 ± 0,002*	0,070 ± 0,003	0,074 ± 0,007	0,079 ± 0,005

Dados apresentados como média ± EPM. Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. *p < 0,05, comparado ao grupo E. ANOVA complementado com teste de Dunnett (1-tailed). E: valerato de estradiol 0,3 mg/kg/dia; E + TAM: valerato de estradiol 0,3 mg/kg + citrato de tamoxifeno 10 mg/kg; E + TCS 0,8: valerato de estradiol 0,3 mg/kg + triclosan 0,8 mg/kg; E + TCS 2,4: valerato de estradiol 0,3 mg/kg + triclosan 2,4 mg/kg; E + TCS 8,0: valerato de estradiol 0,3 mg/kg + triclosan 8,0 mg/kg.

4.2. Avaliação da exposição ao TCS sobre parâmetros de toxicidade reprodutiva nas gerações P e F1

4.2.1. Parâmetros avaliados nos machos F1

4.2.1.1. Peso corporal (período pré-acasalamento)

O ganho de peso corporal dos ratos no período pré-acasalamento foi registrado desde o início do período de tratamento (F1 = DPN 22) até o DPN 120, considerado período pré-acasalamento. Conforme descrito pela ANOVA, a administração crônica de TCS não afetou o ganho de peso corporal (g) dos machos dos grupos experimentais da geração F1 (grupo CTR: 403,63 ± 13,07, n = 17; grupo TCS 0,8: 418,63 ± 13,63, n = 15; grupo TCS 2,4: 417,42 ± 17,77, n = 15; grupo TCS 8,0: 415,66 ± 13,58, n = 15) [$F_{(3,61)} = 0,239$, p = 0,869]. Também não foram observadas diferenças significativas no peso corporal final (aprox. 20 dias após acasalamento, DPN 140) entre os grupos experimentais da geração F1 (grupo CTR: 454,09 ± 14,27, n = 17; grupo TCS 0,8: 467,41 ± 13,58, n = 15; grupo TCS 2,4: 462,45 ± 18,31, n = 15;

grupo TCS 8,0: $461,92 \pm 13,64$, $n = 15$) [$F_{(3,61)} = 0,139$, $p = 0,936$], como indicado por ANOVA.

4.2.1.2. Comportamento copulatório e motivação sexual

As frequências (%) para a ocorrência do comportamento copulatório, $\chi^2 (3) = 1,098$, $p = 0,985$, e ejaculação, $\chi^2 (3) = 1,002$, $p = 0,806$, dos machos da geração F1 estão representadas na Tabela 3 e foram semelhantes entre os grupos experimentais. ANOVA não detectou nenhuma diferença estatística entre os grupos experimentais para os parâmetros de latência de intromissão e ejaculação, números de intromissões e números de ejaculações (Tabela 4) ($p > 0,05$).

Tabela 3. Frequência de comportamento copulatório e ejaculação de ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 120).

	Grupo experimental			
	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
Frequência de comportamento copulatório (%)	80 [8/10]	60 [6/8]	62,50 [5/8]	100 [8/8]
Frequência de ejaculação (%)	100 [8/8]	80 [5/6]	80 [4/5]	100 [8/8]

Valores expressos em porcentagem (χ^2 , $p > 0,05$). Número entre colchetes indicam o número de animais que apresentaram comportamento / número total de animais do grupo. Grupo CTR (controle) tratado com óleo de milho; Grupo TCS 0,8: tratado com triclosan na dose de 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: tratado com triclosan na dose de 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: tratado com triclosan na dose de 8,0 mg/kg.

Tabela 4. Comportamento copulatório de ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 120).

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
Latência para a 1ª intromissão (s)	129,00 (89,75 - 246,50) [8/8]	89,00 (64,00 - 222,00) [6/8]	209,00 (119,00 - 316,00) [5/8]	166,00 (74,50 - 325,00) [8/8]
Nº de intromissões até a 1ª ejaculação	18,50 (13,00 - 24,25) [8/8]	15,00 (13,75 - 18,00) [5/6]	21,50 (21,00 - 24,00) [4/5]	16,00 (13,50 - 17,00) [8/8]
Latência para a 1ª ejaculação (s)	739,00 (619,50 - 944,50) [8/8]	616,00 (528,00 - 689,25) [5/6]	1157,00 (992,25 - 1284,75) [4/5]	911,00 (722,50 - 1231,50) [8/8]
Latência para a 1ª intromissão pós-ejaculação (s)	335,50 (310,25 - 356,25) [8/8]	311,10 (275,25 - 325,25) [5/6]	319,50 (270,00 - 361,50) [4/5]	280,00 (270,00 - 324,50) [8/8]
Nº de intromissões pós-ejaculação	19,50 (14,00 - 26,00) [8/8]	20,00 (16,00 - 27,75) [5/6]	13,00 (11,75 - 15,50) [4/5]	13,00 (7,00 - 22,00) [8/8]
Nº de ejaculações	2,00 (0,00 - 2,00) [8/8]	1,50 (1,00 - 1,50) [5/6]	2,00 (1,00 - 2,50) [4/5]	1,50 (1,00 - 2,00) [8/8]

Valores expressos como mediana (1º e 3º quartil). Número entre colchetes indicam o número de animais que apresentaram o comportamento / número total de animais do grupo. $p > 0,05$, comparado ao grupo controle. Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

Os parâmetros de motivação sexual estão apresentados na Tabela 5. Não houve diferença entre os grupos experimentais nos parâmetros avaliados: tempo de permanência na zona do macho (s) [$F_{(3,33)} = 0,337$, $p = 0,799$] e na zona da fêmea (s) [$F_{(3,33)} = 0,204$, $p = 0,893$]; número de visitas na zona do macho [$F_{(3,33)} = 1,344$, $p = 0,279$] e na zona da fêmea [$F_{(3,33)} = 0,614$, $p = 0,611$] e escore de preferência [$F_{(3,33)} = 0,232$, $p = 0,873$].

Tabela 5. Motivação sexual dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 120).

	CTR [10]	TCS 0,8 [8]	TCS 2,4 [8]	TCS 8,0 [8]
Tempo na zona do macho (s)	278,97 ± 43,92	232,16 ± 23,92	304,56 ± 91,56	298,24 ± 39,67
Tempo na zona da fêmea (s)	618,03 ± 49,63	591,74 ± 51,00	583,35 ± 94,38	550,91 ± 47,76
Nº de visitas na zona do macho	17,40 ± 1,72	16,75 ± 0,53	13,88 ± 1,62	17,50 ± 1,36
Nº de visitas na zona da fêmea	20,60 ± 2,40	19,50 ± 1,31	17,00 ± 2,56	20,63 ± 1,86
Escore de preferência	68,69 ± 4,92	71,22 ± 3,26	65,76 ± 9,54	64,64 ± 4,88

Dados apresentados como média ± EPM. Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. $p > 0,05$ comparado ao controle. ANOVA complementado com Bonferroni. CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan de 8,0 mg/kg.

4.2.1.3. Peso de órgãos e concentração plasmática de testosterona

O peso de órgãos e a concentração plasmática de testosterona dos ratos adultos (DPN 140) estão descritos na Tabela 6. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais tratados com TCS em comparação aos animais controle (ANOVA $p > 0,05$).

Tabela 6. Peso dos órgãos, DAG, e concentração plasmática de testosterona dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140).

	CTR [10]	TCS 0,8 [8]	TCS 2,4 [8]	TCS 8,0 [8]
Peso corporal final (g)	438,05 ± 17,43	451,81 ± 18,87	440,15 ± 24,54	432,43 ± 10,89
DAG relativa (mm/g ^{1/3})	5,09 ± 0,13	5,14 ± 0,06	4,97 ± 0,12	5,12 ± 0,09
Testículos (g)	3,33 ± 0,10	3,25 ± 0,10	3,06 ± 0,11	3,38 ± 0,14
Ducto deferente (esq.) (mg)	105,41 ± 4,28	113,31 ± 4,60	109,74 ± 4,17	114,86 ± 3,55
Epidídimo (esq.) (mg)	613,01 ± 13,71	627,58 ± 17,32	581,20 ± 28,38	627,33 ± 17,63
Próstata (g)	0,43 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,39 ± 0,02
Fígado (g)	14,42 ± 0,82	14,69 ± 0,75	14,58 ± 0,68	14,32 ± 0,57
Rins (g)	2,62 ± 0,11	2,65 ± 0,10	2,66 ± 0,10	2,69 ± 0,08
Adrenais (mg)	51,97 ± 2,92	53,03 ± 1,62	47,80 ± 2,36	51,51 ± 50,35
Vesículas seminais (g)	1,64 ± 0,08	1,62 ± 0,04	1,65 ± 0,12	1,58 ± 0,08
Concentração plasmática de testosterona (ng/dl)	192,12 ± 32,52	311,23 ± 38,81	234,99 ± 35,39	279,61 ± 48,12

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. $p > 0,05$ comparado ao controle. Peso corporal final e [] plasmática de testosterona foram comparados usando ANOVA complementado com Bonferroni. Peso de órgãos realizado análise de covariância (ANCOVA) com o peso corporal final como covariável. DAG: distância ano-genital; CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan de 8,0 mg/kg.

4.2.1.4. Parâmetros espermáticos

O tratamento crônico com TCS nos machos da geração F1 afetou a viabilidade espermática, reduzindo porcentagem de espermatozoides vivos [$F_{(3,33)} = 5,935$, $p = 0,003$] e reduziu a porcentagem de espermatozoides móveis [$F_{(3,33)} = 4,666$, $p = 0,009$] dos machos do grupo TCS 2,4 em relação aos animais controle (Tabela 7).

Nenhum dos parâmetros de contagem espermáticas analisados foram afetados pela exposição ao TCS (Tabela 8) (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabela 7. Morfologia, viabilidade, motilidade e concentração espermática dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140).

	CTR [10]	TCS 0,8 [8]	TCS 2,4 [8]	TCS 8,0 [8]
Anormalidade de cabeça (%)	18,96 ± 2,97	14,14 ± 2,96	16,69 ± 2,82	16,87 ± 2,21
Anormalidade de cauda (%)	4,44 ± 0,79	2,17 ± 0,53	3,61 ± 0,74	2,55 ± 0,48
Concentração espermática (10 ⁶ /ml)	55,85 ± 7,89	42,34 ± 4,02	39,59 ± 9,32	61,22 ± 13,75
Espermatozoides viáveis (%)	81,50 ± 2,05	82,63 ± 1,24	70,88 ± 3,10*	83,63 ± 2,76
Espermatozoides não-viáveis (%)	18,50 ± 2,05	17,38 ± 1,24	29,13 ± 3,10*	16,38 ± 2,76
Espermatozoides móveis (%)	80,00 ± 2,34	80,63 ± 1,57	69,25 ± 2,72*	81,00 ± 3,34
Espermatozoides imóveis (%)	20,00 ± 2,34	19,38 ± 1,57	30,75 ± 2,72*	19,00 ± 3,34

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. *p < 0,05 comparado ao controle. ANOVA complementado com Bonferroni. CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan de 8,0 mg/kg.

Tabela 8. Contagem espermática dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140).

	CTR [10]	TCS 0,8 [8]	TCS 2,4 [8]	TCS 8,0 [8]
Nº de espermátides (10^6 /testículo)	87,63 ± 18,82	72,01 ± 11,66	84,90 ± 15,95	85,27 ± 11,57
No de espermátides (10^6 /g/testículo)	60,31 ± 11,62	52,01 ± 8,20	59,04 ± 10,95	57,58 ± 8,02
Produção diária espermática (10^6)	14,37 ± 3,09	11,80 ± 1,91	13,92 ± 2,61	13,98 ± 1,90
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (10^6 /órgão)	91,14 ± 7,34	88,47 ± 3,50	102,48 ± 12,58	93,39 ± 8,61
Nº de espermatozoides na cabeça/corpos do epidídimo (10^6 /g/órgão)	298,57 ± 19,27	291,63 ± 16,86	350,44 ± 31,46	301,09 ± 27,10
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (10^6 /órgão)	172,58 ± 13,69	168,54 ± 17,01	143,91 ± 25,36	192,93 ± 13,13
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (10^6 /g/órgão)	654,89 ± 42,29	642,47 ± 51,75	579,15 ± 76,39	713,72 ± 45,96
Tempo do trânsito espermático através cabeça/copo do epidídimo (dias)	8,53 ± 1,37	9,60 ± 2,23	11,99 ± 5,11	7,61 ± 1,16
Tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo (dias)	16,64 ± 2,68	18,48 ± 4,54	14,37 ± 3,66	16,29 ± 3,01

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. $p > 0,05$ comparado ao controle. ANOVA complementado com Bonferroni. CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan de 8,0 mg/kg.

4.2.1.5. Histomorfometria testicular

Os túbulos seminíferos dos diferentes grupos experimentais apresentados na Figura 11 e os parâmetros histomorfométricos dos testículos estão presentes na Tabela 9.

A análise paramétrica não revelou diferenças significativas quanto aos volumes do parênquima testicular [$F_{(3,33)} = 0,979$, $p = 0,416$], do conteúdo intersticial [$F_{(3,33)} = 1,409$, $p = 0,259$] e dos túbulos seminíferos [$F_{(3,33)} = 0,513$, $p = 0,676$], bem como no diâmetro dos túbulos seminíferos [$F_{(3,33)} = 0,721$, $p = 0,547$] e comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) [$F_{(3,33)} = 0,276$, $p = 0,842$] (ANOVA complementado com Bonferroni).

Figura 13. Fotomicrografia de seções de túbulos seminíferos (TS) de ratos adultos (DPN 140) da geração F1. Escala = 100 μm , coloração de hematoxilina-eosina. A: grupo CTR, tratado com óleo de milho; B: grupo TCS 0,8, tratado com triclosan na dose de 0,8 mg/kg; C: grupo TCS 2,4, tratado com triclosan na dose de 2,4 mg/kg e; D: grupo TCS 8,0: tratado com triclosan na dose de 8,0 mg/kg. TS: Túbulo seminífero; I: Interstício.

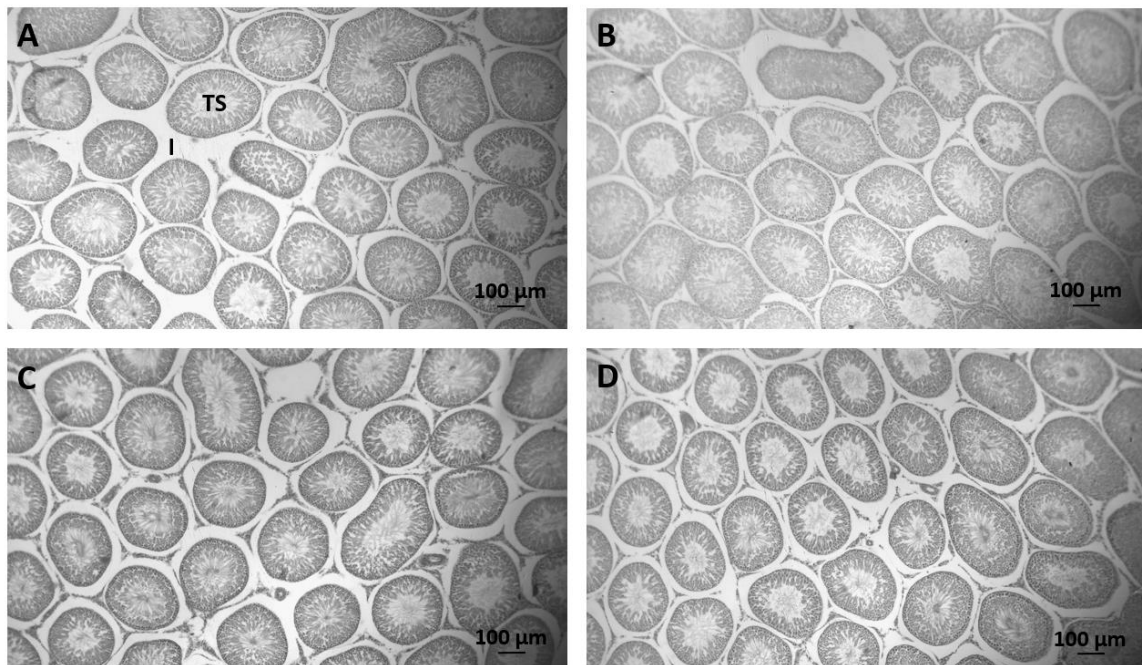


Tabela 9. Análise histomorfométrica dos testículos dos ratos dos diferentes grupos experimentais da geração F1 (DPN 140).

	CTR [10]	TCS 0,8 [8]	TCS 2,4 [8]	TCS 8,0 [8]
Volume Testicular (ml)	1,56 ± 0,05	1,52 ± 0,04	1,47 ± 0,05	1,59 ± 0,06
Volume do conteúdo intersticial (ml)	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,47 ± 0,05
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	1,08 ± 0,04	1,05 ± 0,04	1,07 ± 0,04	1,12 ± 0,03
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	285,87 ± 5,19	273,73 ± 9,85	278,57 ± 6,66	286,26 ± 6,63
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	16,97 ± 0,85	18,16 ± 1,35	17,64 ± 0,66	17,54 ± 0,83

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. $p > 0,05$ comparado ao controle. ANOVA complementado com Bonferroni. CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan de 8,0 mg/kg.

4.2.2. Parâmetros avaliados nas fêmeas P e F1

Uma fêmea F1 do grupo TCS 2,4 começou a perder peso durante o período pré-acasalamento e seus dados foram removidos do estudo. Ocorreu perda transitória de pelagem na região dorsal em duas fêmeas P tratadas com 8,0 mg/kg de TCS, uma durante o período pré-acasalamento (começando no DPN 95) e outra durante o período gestacional. Perda de pelagem recorrente durante o período de pré-acasalamento também ocorreu em uma fêmea F1 do grupo TCS 2,4. Uma fêmea F1 do grupo TCS 8,0 apresentou piloereção e padrão respiratório anormal durante o período gestacional. Como nenhum achado similar foi observado nos outros animais do mesmo grupo, esses sinais foram considerados incidentais, não relacionados com o tratamento.

4.2.2.1. Ganho de peso no período pré-acasalamento

O ganho de peso corporal das ratas foi registrado desde o início do tratamento (P = DPN 49; F1 = DPN 22) até o dia anterior ao acasalamento (DPN 120), considerado período pré-acasalamento. Conforme observado pela ANOVA, o tratamento com TCS não afetou o

ganho de peso corporal (g) dos grupos experimentais da geração P (grupo CTR: $89,43 \pm 4,32$, $n = 17$; grupo TCS 0,8: $92,07 \pm 3,59$, $n = 17$; Grupo TCS 2,4: $92,71 \pm 4,99$, $n = 17$, grupo TCS 8,0: $92,36 \pm 5,90$, $n = 17$) [$F_{(3,64)} = 0,10$, $p = 0,96$], bem como dos grupos experimentais da geração F1 (grupo CTR: $210,14 \pm 5,72$, $n = 17$; grupo TCS 0,8: $214,12 \pm 5,84$, $n = 15$; grupo TCS 2,4: $214,88 \pm 8,52$, $n = 14$; grupo TCS 8,0: $212,65 \pm 5,63$, $n = 16$) [$F_{(3,58)} = 0,11$, $p = 0,95$].

4.2.2.2. Avaliação do ciclo estral

Os dados do ciclo estral das fêmeas P e F1 são apresentados na Tabela 10. Na geração P, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis H não mostrou diferenças significativas nos coeficientes de estro, $\chi^2(3) = 0,031$, $p = 0,999$, metaestro/diestro, $\chi^2(3) = 1,537$, $p = 0,674$, proestro, $\chi^2(3) = 6,475$, $p = 0,091$, ou o comprimento do ciclo estral, $\chi^2(3) = 3,135$, $p = 0,371$, entre os grupos experimentais. Do mesmo modo, os valores para os coeficientes de estro, $\chi^2(3) = 1,528$, $p = 0,676$, metaestro/diestro, $\chi^2(3) = 4,882$, $p = 0,181$ e proestro, $\chi^2(3) = 3,796$, $p = 0,284$ e comprimento do ciclo estral, $\chi^2(3) = 7,027$, $p = 0,071$, foram semelhantes entre os grupos tratados com TCS quando comparados ao controle na geração F1.

Tabela 10. Coeficientes dos diferentes estágios do ciclo estral e comprimento do ciclo estral (DPN 86-106) das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
<i>Geração P</i>	[17]	[17]	[17]	[17]
Coeficiente de estro (Ce)	28,57 (23,81-33,33)	28,57 (23,81-33,33)	28,57 (23,81-33,33)	28,57 (23,81-33,33)
Coeficiente de metaestro/diestro (Cmd)	47,62 (47,62-57,14)	47,62 (42,86-52,38)	47,62 (42,86-52,38)	52,38 (42,86-52,38)
Coeficiente de proestro (Cp)	19,05 (19,05-23,81)	23,81 (19,05-28,57)	23,81 (19,05-23,81)	23,81 (19,05-23,81)
Duração do ciclo estral (dias)	4,00 (3,80-4,33)	4,00 (3,60-4,00)	4,00 (4,00-4,66)	4,00 (3,75-4,25)
<i>Geração F1</i>	[17]	[15]	[14]	[16]
Coeficiente de estro (Ce)	28,57 (28,57-38,10)	28,57 (23,81-33,33)	30,95 (28,57-33,33)	28,57 (23,81-34,52)
Coeficiente de metaestro/diestro (Cmd)	47,62 (42,86-52,38)	47,62 (42,62-54,76)	47,62 (42,86-47,62)	47,62 (46,43-57,14)
Coeficiente de proestro (Cp)	23,81 (19,05-23,81)	23,81 (19,05-23,81)	23,81 (19,05-27,38)	19,05 (17,86-23,81)
Duração do ciclo estral (dias)	4,00 (4,00-4,33)	4,25 (4,00-4,42)	3,90 (3,75-4,00)	4,25 (3,65-4,37)

Os dados são expressos como medianas (1º e 3º quartis). Os números entre colchetes representam o número de animais/grupo. $p > 0,05$ comparado ao controle. Kruskal-Wallis H. Cp, Ce e Cmd foram determinados pela fórmula $C = a / b \times 100$, onde C é o coeficiente do período do ciclo, a é o número de dias do período de ciclo correspondente no decurso da observação, e b é a duração total dos ciclos completos (em dias). Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

4.2.2.3. Avaliação do comportamento sexual e materno

Os dados dos parâmetros avaliados no comportamento sexual, nas gerações P e F1, estão apresentados na Tabela 11. ANOVA complementada com Bonferroni demonstrou uma diminuição significativa [$F_{(3,39)} = 6.397$, $p = 0,001$] no score de lordose das fêmeas da geração P tratadas com TCS na dose de 2,4 mg/kg em comparação com o grupo controle. Na geração F1, houve uma redução significativa do coeficiente de lordose nas fêmeas do grupo TCS 2,4 em comparação ao controle [$F_{(3,39)} = 3,125$, $p = 0,038$].

Em relação ao grau de lordose, o teste de Qui-quadrado mostrou aumento significativo da frequência de lordose grau 1 junto com uma diminuição da frequência de lordose grau 3 ($p < 0,05$) nas fêmeas do grupo TCS 2,4, o que contribuiu para a redução observada no score de lordose nesse grupo. Nas fêmeas do grupo TCS 2,4 da geração F1, o aumento da frequência de lordose grau 0 e redução do grau de lordose 1 ocasionaram na redução significativa do coeficiente de lordose. Os valores significativos observados nas fêmeas TCS 0,8 e TCS 8,0 da geração F1 ($p < 0,05$) não interferiram nos parâmetros de receptividade sexual avaliados (score de lordose e coeficiente de lordose).

Tabela 11. Coeficiente de lordose, escore de lordose e grau de lordose das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1 (DPN 120).

	CTR [10]	TCS 0,8 [10]	TCS 2,4 [10]	TCS 8,0 [10]
<i>Geração P</i>				
Coeficiente de lordose	77,00 ± 6,33	89,00 ± 4,07	70,00 ± 8,94	76,00 ± 6,86
Score de lordose	2,21 ± 0,17	2,40 ± 0,15	1,56 ± 0,14*	2,27 ± 0,14
<i>Lordose^a</i>				
Grau de lordose 0	23% (23/100)	15% (15/100)	30% (30/100)	24% (24/100)
Grau de lordose 1	17% (17/100)	16% (16/100)	35% (35/100)*	12% (12/100)
Grau de lordose 2	23% (23/100)	22% (22/100)	23% (23/100)	27% (27/100)
Grau de lordose 3	37% (37/100)	47% (47/100)	12% (12/100)*	37% (37/100)
<i>Geração F1</i>				
Coeficiente de lordose	89,00 ± 3,79	75,00 ± 6,01	67,00 ± 5,78*	83,00 ± 5,78
Score de lordose	2,00 ± 0,12	1,88 ± 0,14	1,97 ± 0,13	2,15 ± 0,18
<i>Lordose^a</i>				
Grau de lordose 0	11% (11/100)	26% (26/100)*	32% (32/100)*	17% (17/100)
Grau de lordose 1	26% (26/100)	30% (30/100)	18% (18/100)*	21% (21/100)
Grau de lordose 2	37% (37/100)	21% (21/100)*	31% (31/100)	23% (23/100)*
Grau de lordose 3	26% (26/100)	24% (24/100)	19% (19/100)	39% (39/100)

Valores expressos em média ± EPM. ^aValores expressos em porcentagem (χ^2 , * $p > 0,05$). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Números entre parênteses representam o número de observações apresentado em cada grau de lordose/total de observações. * $p < 0,05$ comparado ao controle. ANOVA complementado com Bonferroni. CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan de 8,0 mg/kg.

Os dados dos parâmetros avaliados no comportamento materno, nas gerações P e F1, estão apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Na geração P, a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey mostrou que as fêmeas do grupo TCS 2,4 passaram mais tempo limpando e/ou lambendo seus filhotes [$F_{(3,39)} = 5,025$, $p = 0,005$] e menos tempo sem interagir sua prole (fora do ninho) [$F_{(3,39)} = 3,134$, $p = 0,037$] quando comparado ao controle. Não houve diferenças significativas em relação aos parâmetros de comportamento materno analisados em fêmeas da geração F1 ($p > 0,05$).

Figura 14. Parâmetros do comportamento materno observados nas fêmeas da geração P durante o DG 1 ao 10. Valores expressos em média \pm EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. ANOVA, * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. DG: Dia gestacional; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

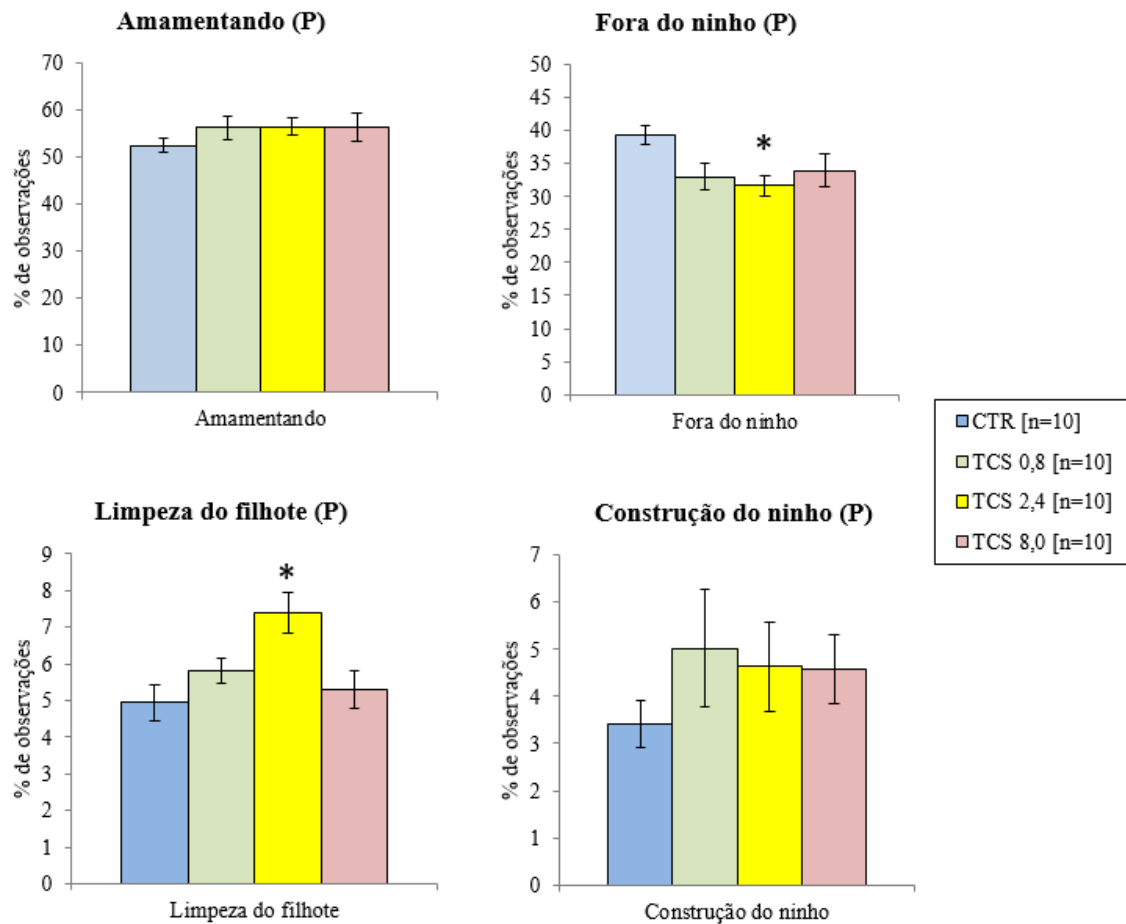
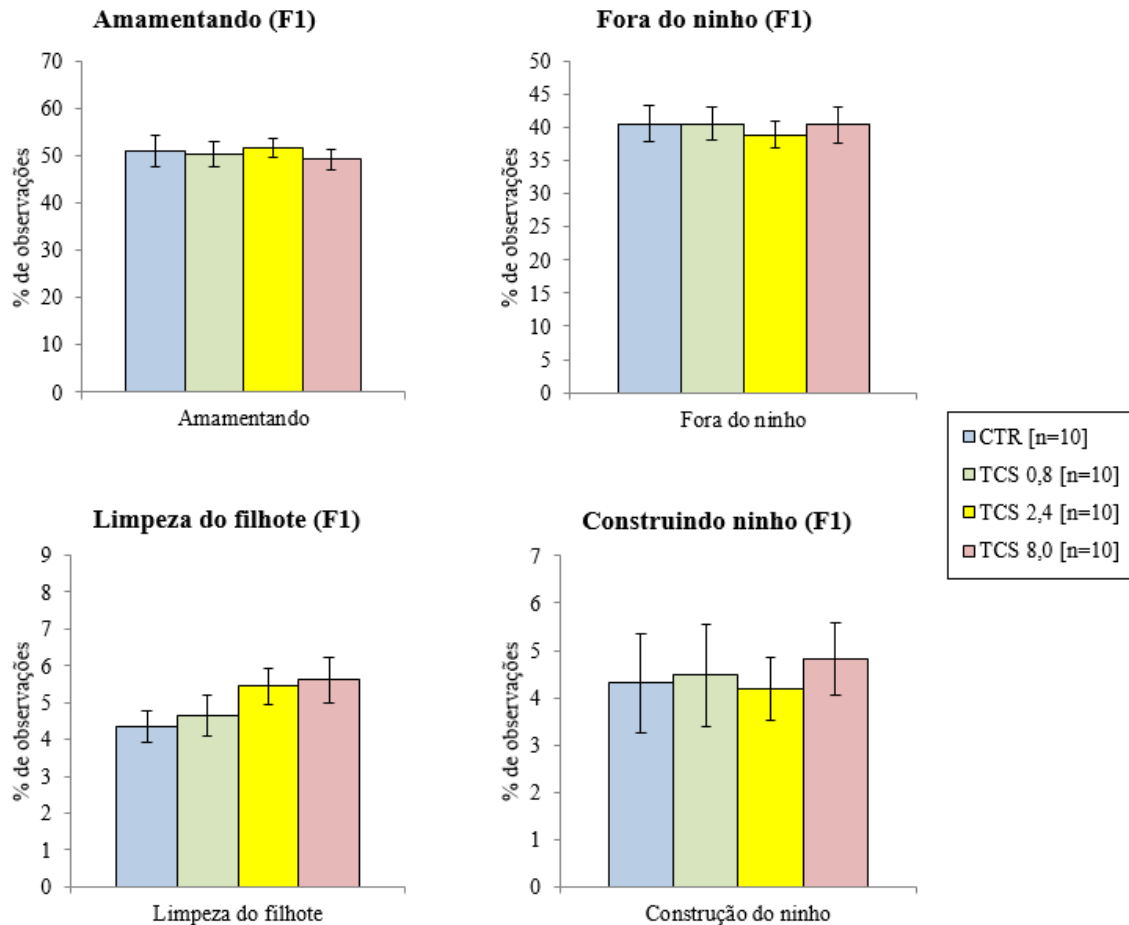


Figura 15. Parâmetros do comportamento materno observados nas fêmeas da geração F1 durante o DG 1 ao 10. Valores expressos em média \pm EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. ANOVA, $p > 0,05$ em comparação com o grupo controle. DG: Dia gestacional; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.



4.2.2.4. Peso corporal e consumo de ração durante a gestação e a lactação

O peso corporal e o consumo de ração durante a gestação e a lactação das fêmeas P e F1 são apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

RMANOVA com correção de Greenhouse-Geisser indicou que o peso corporal das ratas entre os DG 0, 7, 14 e 20 foi estatisticamente significativo, refletindo o ganho de peso das ratas durante a gestação na geração P [$F_{(1,631, 96.241)} = 916,988, p < 0,001$] e F1 [$F_{(1,271, 64.800)} = 1048,454, p < 0,001$], no entanto, nenhuma interação dia \times tratamento foi detectada (p

> 0,05), indicando que todos os grupos ganharam peso de forma semelhante. Não houve diferença significativa no consumo de ração durante este período entre os grupos experimentais das gerações P e F1 experimentais ($p > 0,05$).

Durante a lactação, RMANOVA com correção de Greenhouse-Geisser detectou uma diferença estatisticamente significativa no peso corporal em relação aos dias de lactação (1, 4, 7, 14 e 21) em ambas as gerações P [$F_{(2.897, 170.894)} = 33,317$, $p < 0,001$], e F1 [$F_{(5358.831, 19656.883)} = 13,904$, $p < 0,001$], mas sem interação dia \times tratamento ($p > 0,05$). No entanto, foi detectada uma interação dia \times tratamento para o consumo de ração na geração P [$F_{(3,59)} = 3,408$, $p = 0,023$] e o teste de comparações múltiplas LSD indicou redução da ingestão de ração para as fêmeas do grupo TCS 2,4 quando comparado às fêmeas controles. Não houve diferença no consumo de ração entre os grupos experimentais da geração F1 [$F_{(3,51)} = 1,107$, $p = 0,355$].

Figura 16. Peso corporal (A e B) e consumo de ração (C e D) das ratas P durante a gestação e lactação. Valores expressos em média \pm EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. ANOVA, * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. DG: dia gestacional; DL: dia lactacional; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

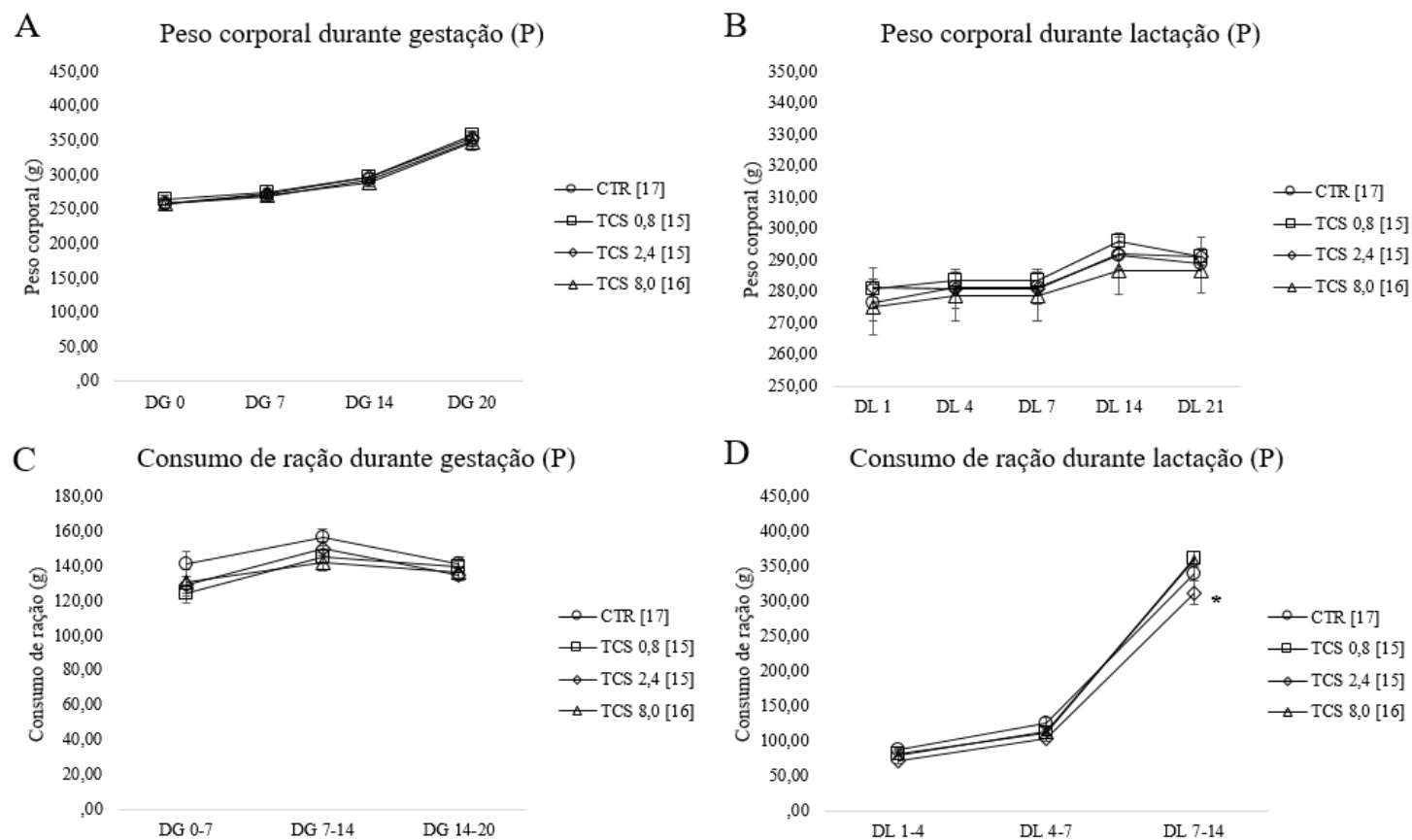
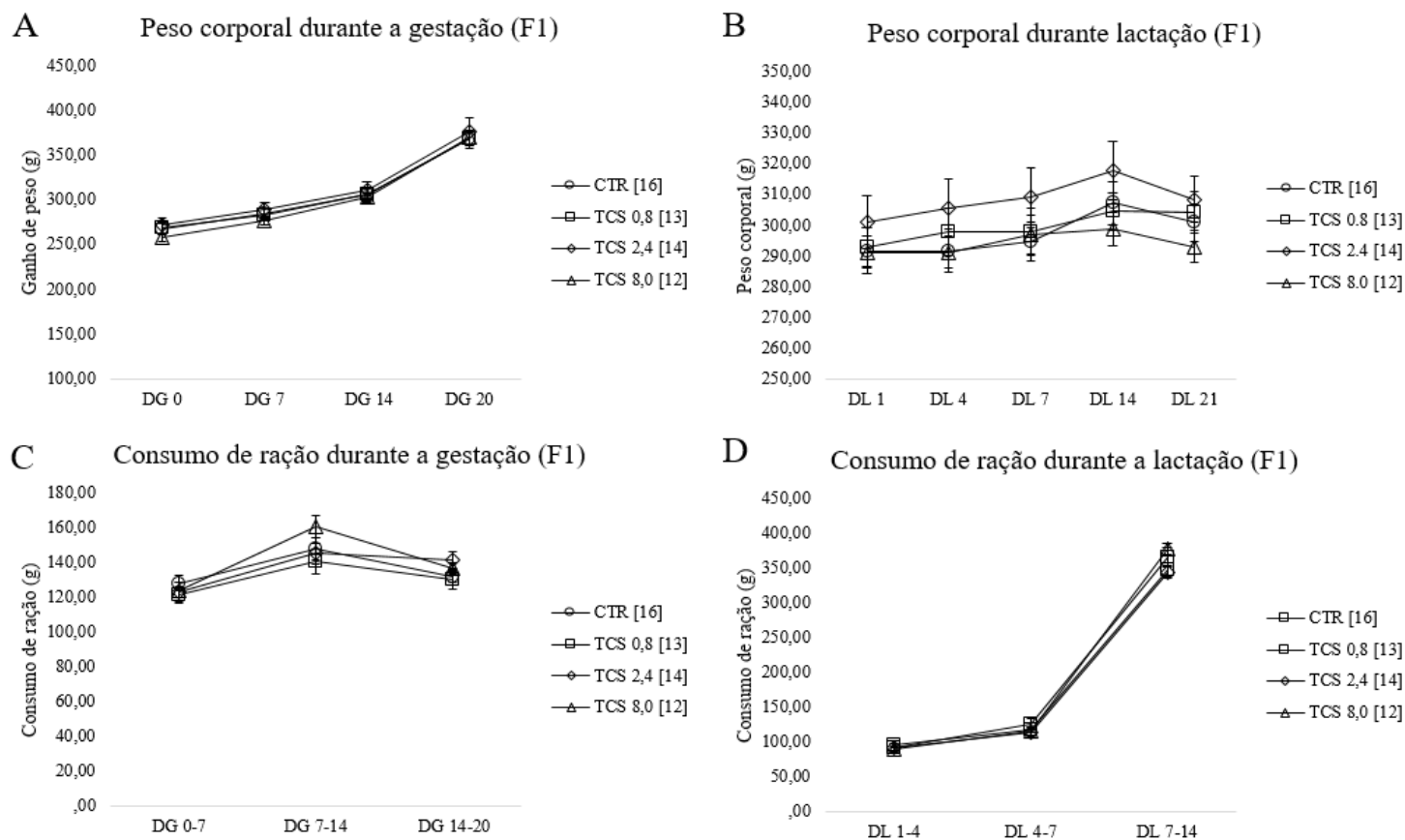


Figura 17. Peso corporal (A e B) e consumo de ração (C e D) das ratas F1 durante a gestação e lactação. Valores expressos em média \pm EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. ANOVA, $p > 0,05$ em comparação com o grupo controle. DG: dia gestacional; DL: dia lactacional; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.



4.2.2.5. Peso de órgãos e concentração plasmática de progesterona

O peso corporal no DL 21 e dos órgãos das fêmeas P e F1 são apresentados na Tabela 12. O tratamento crônico com TCS não interferiu de forma significativa no peso corporal final das fêmeas das gerações P [$F_{(3,62)} = 0,1554$, $p = 0,927$] e F1 [$F_{(3,54)} = 0,935$, $p = 0,430$]. O peso médio do útero, dos ovários, do fígado, dos rins e das adrenais (com o peso corporal final como co-variável) foi semelhante entre os grupos experimentais (ANCOVA, $p > 0,05$) em ambas as gerações. Para a análise da concentração plasmática de progesterona, apenas foram consideradas as amostras de plasma apresentando coeficiente de variação abaixo de 25%. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa na concentração plasmática de progesterona nas fêmeas adultas da geração P [$F_{(3,48)} = 2,029$, $p = 0,123$] e F1 [$F_{(3,50)} = 0,741$, $p = 0,533$].

Tabela 12. Peso corporal final e peso de órgãos das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1 no dia lactacional 21.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
<i>Geração P</i>	[17]	[15]	[15]	[16]
Peso corporal final (g)	288,58 ± 4,54	291,32 ± 5,63	291,78 ± 6,32	286,79 ± 7,25
<i>Peso absoluto</i>				
Útero (mg)	349,40 ± 30,15	340,66 ± 33,49	302,05 ± 21,26	363,18 ± 52,85
Ovários (mg)	76,44 ± 2,11	73,22 ± 2,03	71,88 ± 2,41	68,03 ± 37,71
Fígado (g)	12,60 ± 0,34	13,24 ± 0,41	12,83 ± 0,38	12,82 ± 0,48
Rins (g)	2,00 ± 0,03	2,01 ± 0,05	2,02 ± 0,03	1,98 ± 0,04
Adrenais (mg)	71,75 ± 2,12	75,57 ± 3,01	72,87 ± 3,24	70,97 ± 3,37
Concentração plasmática de progesterona (ng/ml)	[15] 17,01 ± 4,64	[11] 16,14 ± 5,97	[12] 25,81 ± 5,71	[13] 16,43 ± 5,01
<i>Geração F1</i>	[16]	[13]	[14]	[12]
Peso corporal final (g)	302,190 ± 5,81	304,319 ± 6,73	308,431 ± 7,49	293,158 ± 5,06
<i>Peso absoluto</i>				
Útero (mg)	375,14 ± 35,04	357,88 ± 26,10	289,54 ± 23,86	359,13 ± 40,36
Ovários (mg)	77,88 ± 3,46	77,38 ± 2,51	71,31 ± 3,02	73,68 ± 2,16
Fígado (g)	13,62 ± 0,36	13,65 ± 0,36	14,04 ± 0,45	13,50 ± 0,29
Rins (g)	2,07 ± 0,12	2,11 ± 0,03	2,12 ± 0,05	2,02 ± 0,04
Adrenais (mg)	69,99 ± 2,42	71,08 ± 4,04	74,93 ± 3,16	76,05 ± 4,17
Concentração plasmática de progesterona (ng/ml)	[15] 17,17 ± 4,61	[11] 8,35 ± 3,24	[12] 22,70 ± 5,93	[11] 9,50 ± 3,78

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. ANOVA, $p > 0,05$ comparado ao controle. Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

4.2.2.6. Histomorfometria de útero e ovário

A morfometria de útero e ovários e a contagem de corpos lúteos das fêmeas no DL 21 estão apresentadas na Tabela 13. Foi observado uma diminuição do número de folículos em crescimento nas fêmeas tratadas com TCS na dose de 2,4 mg/kg, quando comparado ao grupo controle [$F_{(3,54)} = 3,714$, $p = 0,017$].

Tabela 13. Análise morfométrica uterina, contagem de corpos lúteos e quantificação folicular ovariana das ratas dos diferentes grupos experimentais das gerações P e F1 no dia lactacional 21.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
<i>Geração P</i>	[17]	[15]	[15]	[16]
<i>Parâmetros uterinos</i>				
<i>(μm)</i>				
Estroma endometrial	296,55 ± 19,46	272,54 ± 21,04	314,59 ± 20,58	293,59 ± 11,08
Miométrio	364,99 ± 12,81	308,93 ± 15,50	371,59 ± 20,58	338,34 ± 16,79
Epitélio luminal	20,69 ± 1,08	18,96 ± 1,20	18,54 ± 1,26	16,92 ± 0,67
<i>Geração F1</i>	[16]	[13]	[14]	[12]
<i>Parâmetros uterinos</i>				
<i>(μm)</i>				
Estroma endometrial	289,96 ± 15,67	322,41 ± 21,89	280,83 ± 11,03	298,12 ± 17,29
Miométrio	349,21 ± 13,65	335,66 ± 17,34	336,47 ± 15,41	341,75 ± 21,66
Epitélio luminal	21,47 ± 1,18	19,89 ± 1,68	20,05 ± 0,84	19,32 ± 1,21
Corpos lúteos	3,86 ± 0,34	3,47 ± 0,27	4,10 ± 0,28	3,17 ± 0,29
<i>Folículos</i>				
Primário	9,99 ± 0,55	10,73 ± 0,98	12,36 ± 0,66	12,08 ± 0,87
Crescimento	7,58 ± 0,61	6,83 ± 0,44	5,26 ± 0,39*	7,19 ± 0,66
Antral	4,62 ± 0,51	4,99 ± 0,44	5,39 ± 0,60	4,95 ± 0,55

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. ANOVA complementado com Bonferroni, * $p < 0,05$ comparado ao controle. Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

4.2.2.7. Fertilidade

Não houve diferença significativa (Chi-Square test, $p > 0,05$) nos índices de acasalamento, fertilidade ou gestação entre os grupos experimentais de ambas as gerações. O tratamento com TCS não influenciou a porcentagem do índice de viabilidade fetal, lactação ou perda pós-implantação de fêmeas de gerações P e F1 (Kruskal-Wallis H, $p > 0,05$).

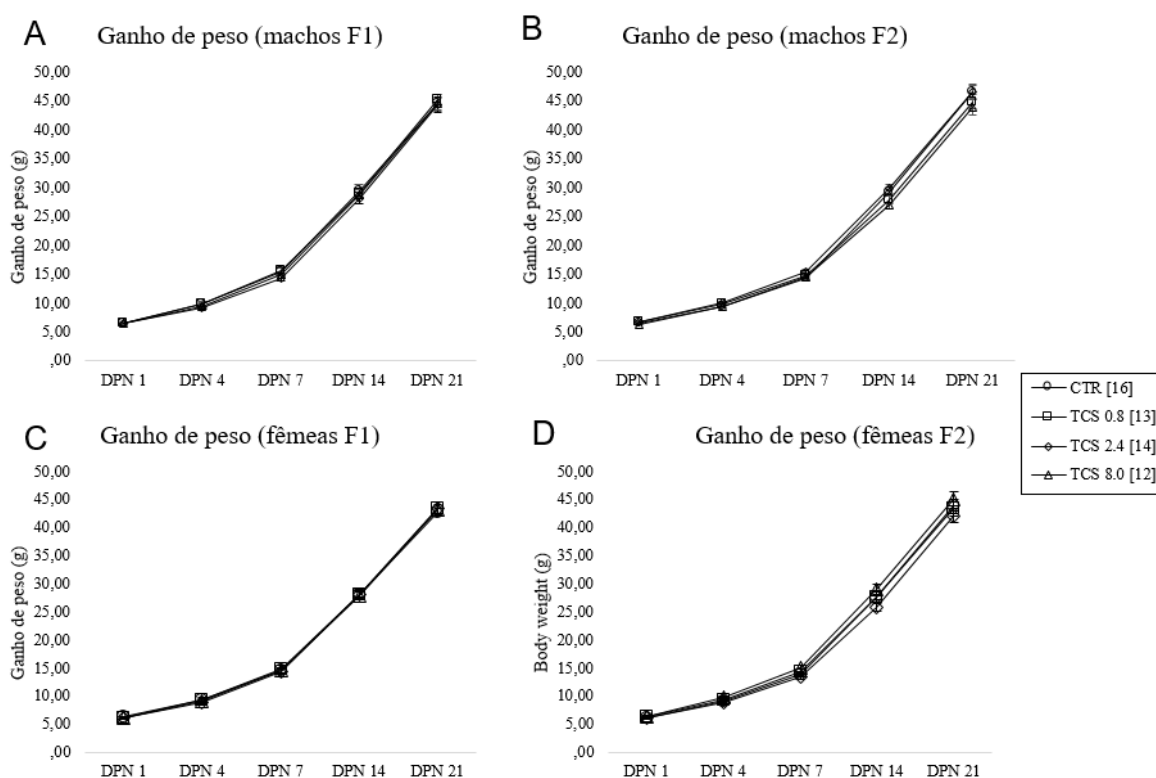
4.2.3. Avaliação da prole (filhotes F1 e F2)

4.2.3.1. Peso corporal

O peso corporal dos filhotes (média da ninhada) das gerações F1 e F2 durante as primeiras três semanas de idade estão ilustrados na Figura 16.

Foi detectado uma interação significativa entre os dias, refletindo o ganho de peso dos filhotes (machos e fêmeas) P e F1 ao longo do desenvolvimento, entretanto, sem interação dia \times tratamento ($p > 0,05$), demonstrando ganho de peso corporal equivalente entre os grupos experimentais em ambas as gerações (RMANOVA com correção de Greenhouse-Geisser).

Figura 18. Ganho de peso da prole masculina (A: F1; B: F2) e feminina (C: F1; D: F2) durante o período lactacional. Valores expressos em média \pm EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. RMANOVA, $p > 0,05$ comparado ao controle. DPN: dia pós-natal; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.



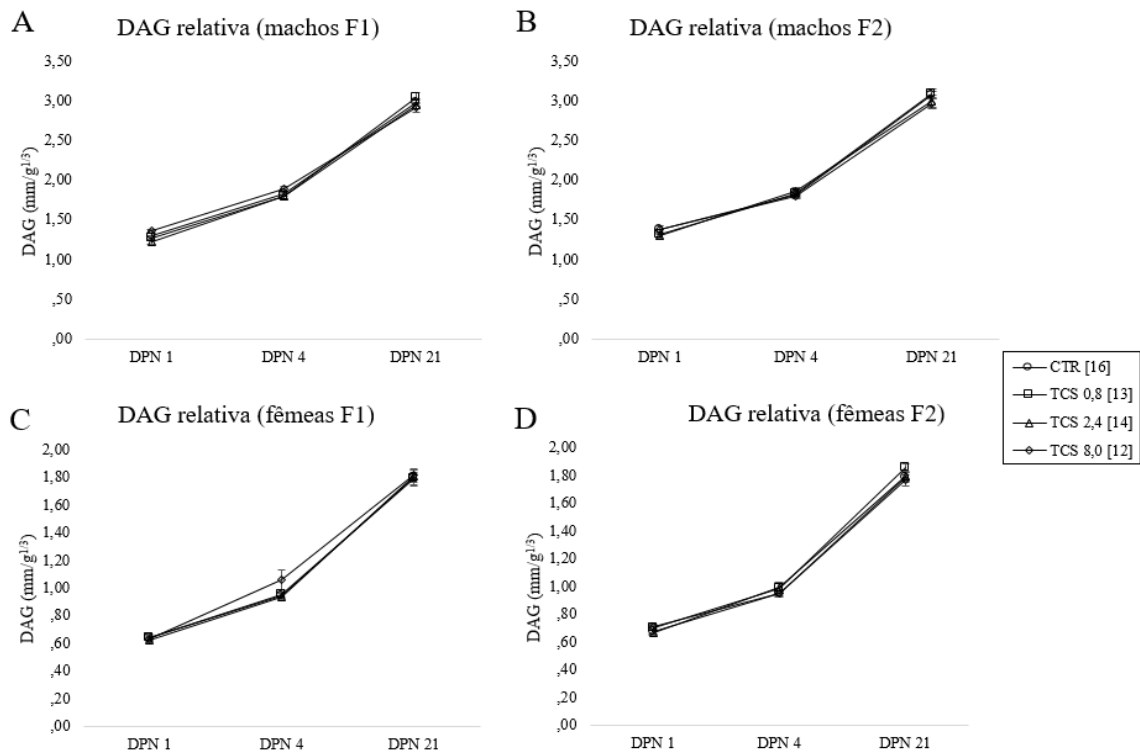
4.2.3.2. Desenvolvimento sexual

Como indicado pela RMANOVA com correção de Greenhouse-Geisser, a DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) (média da ninhada) da prole F1 e F2 nos DPN 1, 4 e 21 não foi influenciada pela exposição ao TCS (Figura 17) ($p > 0,05$).

Nas fêmeas F1, ANOVA complementado com Bonferroni não detectou diferenças significativas entre os dias para a ocorrência da abertura vaginal (CTR: $33,18 \pm 0,58$, $n = 17$; TCS 0,8: $33,00 \pm 0,53$, $n = 15$; TCS 2,4: $32,57 \pm 0,54$, $n = 14$; TCS 8,0: $33,63 \pm 0,43$, $n = 16$) [$F_{(3,61)} = 0,668$, $p = 0,575$] e primeiro estro (CTR: $33,59 \pm 0,65$, $n = 17$; TCS 0,8: $33,87 \pm 0,45$, $n = 15$; TCS 2,4: $33,29 \pm 0,51$, $n = 14$; TCS 8,0: $34,19 \pm 0,48$, $n = 16$) [$F_{(3,61)} = 0,506$, $p = 0,680$].

A exposição ao TCS também não influenciou o dia da instalação da puberdade nos machos F1 (CTR: $47,90 \pm 1,20$, $n = 10$; TCS 0,8: $46,00 \pm 0,94$, $n = 8$; TCS 2,4: $46,75 \pm 1,35$, $n = 8$; TCS 8,0: $46,13 \pm 0,61$, $n = 8$) [$F_{(3,33)} = 0,692$, $p = 0,564$], como observado pela ANOVA.

Figura 19. DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) da prole masculina (A: F1; B: F2) e feminina (C: F1; D: F2) durante o período lactacional. Valores expressos em média \pm EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. RMANOVA, $p > 0,05$ comparado ao controle. DPN: dia pós-natal; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.



4.2.3.3. Desenvolvimento físico e neuromotor

Os dados do desenvolvimento físico e neuromotor da prole masculina e feminina (gerações F1 e F2) estão apresentados na tabela 14 e 15, respectivamente.

Os parâmetros de desenvolvimento físico (erupção dos dentes incisivos, desdobramento da orelha externa e abertura dos olhos) ou reflexos ontogênicos (reflexo de endireitamento e geotaxia negativa) foram similares entre os grupos experimentais de ambas as gerações F1 e F2 (Kruskall-Wallis H test, $p > 0.05$). A retenção mamilar (% de machos) no DPN 12 foi de 100% em todos os grupos experimentais de ambas as gerações F1 e F2 (Chi-Square test, $p > 0.05$).

Tabela 14. Desenvolvimento físico e neuromotor (DPN 1-21) da prole masculina das gerações F1 e F2.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
<i>Machos F1</i>	[17]	[14]	[14]	[15]
Desdobramento da orelha externa (dia)	3,00 (3,00 - 3,00)	3,00 (3,00 - 3,00)	4,00 (3,00 - 4,00)	3,00 (3,00 - 4,00)
Reflexo de endireitamento (dia)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)
Erupção dos dentes incisivos (dia)	10,00 (9,00 - 11,00)	9,00 (9,00 - 9,75)	9,50 (9,00 - 10,00)	10,00 (9,00 - 10,00)
Geotaxia negativa (dia)	10,00 (9,00 - 10,00)	10,00 (9,00 - 11,00)	10,00 (9,25 - 10,75)	10,00 (9,00 - 10,50)
Abertura dos olhos (dia)	14,00 (14,00 - 15,00)	14,00 (13,00 - 14,00)	14,00 (13,25 - 14,00)	14,00 (13,50 - 14,0)
<i>Machos F2</i>	[14]	[12]	[12]	[11]
Desdobramento da orelha externa (dia)	3,00 (3,00 - 3,00)	3,00 (3,00 - 4,00)	3,00 (3,00 - 3,00)	3,00 (3,00 - 3,50)
Reflexo de endireitamento (dia)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)
Erupção dos dentes incisivos (dia)	9,00 (8,00 - 10,00)	9,00 (8,00 - 9,50)	9,00 (8,00 - 9,00)	9,00 (8,50 - 9,50)
Geotaxia negativa (dia)	9,00 (9,00 - 10,75)	10,00 (9,00 - 10,00)	9,00 (9,00 - 9,50)	10,00 (9,00 - 10,50)
Abertura dos olhos (dia)	14,00 (14,00 - 14,00)	14,00 (14,00 - 15,00)	14,00 (14,00 - 15,00)	14,00 (13,50 - 14,00)

Valores expressos como mediana (1° e 3° quartil). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo

Kruskal-Wallis, $p > 0,05$, comparado ao grupo controle. DPN: dia pós-natal; CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

Tabela 15. Desenvolvimento físico e neuromotor (DPN 1-21) da prole feminina das gerações F1 e F2.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
<i>Fêmeas F1</i>	[15]	[15]	[11]	[16]
Desdobramento da orelha externa (dia)	3,00 (3,00 - 4,00)	3,00 (3,00 - 3,00)	3,00 (3,00 - 4,00)	3,00 (3,00 - 3,00)
Reflexo de endireitamento (dia)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)
Erupção dos dentes incisivos (dia)	10,00 (9,00 - 11,00)	9,00 (9,00 - 9,50)	9,50 (9,00 - 10,00)	9,50 (8,75 - 10,00)
Geotaxia negativa (dia)	10,00 (10,00 - 11,00)	10,00 (9,00 - 10,00)	10,00 (10,00 - 11,00)	10,00 (9,75 - 10,00)
Abertura dos olhos (dia)	14,00 (14,00 - 15,00)	14,00 (13,00 - 14,00)	14,00 (14,00 - 14,00)	14,00 (13,00 - 14,25)
<i>Fêmeas F2</i>	[15]	[13]	[13]	[12]
Desdobramento da orelha externa (dia)	3,00 (3,00 - 4,00)	3,00 (3,00 - 4,00)	3,00 (3,00 - 4,00)	3,00 (2,00 - 4,00)
Reflexo de endireitamento (dia)	5,00 (5,00 - 6,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)	5,00 (5,00 - 5,00)
Erupção dos dentes incisivos (dia)	9,00 (8,50 - 11,00)	9,00 (9,00 - 11,00)	9,00 (8,00 - 10,00)	9,00 (9,00 - 10,00)
Geotaxia negativa (dia)	10,00 (8,50 - 12,00)	9,50 (9,00 - 10,00)	9,00 (9,00 - 12,00)	10,00 (9,00 - 12,00)
Abertura dos olhos (dia)	14,00 (13,50 - 15,00)	14,00 (14,00 - 16,00)	14,00 (14,00 - 15,00)	14,00 (13,75 - 15,00)

Valores expressos como mediana (1° e 3° quartil). Número entre colchetes indicam o número de animais do grupo. Kruskal-Wallis, $p > 0,05$, comparado ao grupo controle. DPN: dia pós-natal; CTR (controle): óleo de milho; TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

4.2.3.4. Atividade motora

Os dados da avaliação da atividade motora dos machos e fêmeas (F1 e F2) nos DPN 13, 17 e 21 (locomoção e tempo gasto na área central e periférica) são apresentados na Tabela 16 e 17, respectivamente.

Em ambas as gerações F1 e F2, RMANOVA com correção de Greenhouse-Geisser demonstrou interação significativa refletindo aumento da atividade locomotora no decorrer dos dias ($p < 0,001$) porém, sem interação dia \times tratamento ($p > 0,05$), indicando aumento deste comportamento sem distinção entre os grupos experimentais. Não foi detectado interação dia \times tratamento para o tempo total gasto na área central e periférica em ambas as gerações F1 e F2 (RMANOVA com correção de Greenhouse-Geisser, $p > 0,05$).

Tabela 16. Atividade motora (DPN 13, 17 e 21) da prole masculina das gerações F1 e F2.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
<i>Machos F1</i>	[17]	[14]	[14]	[15]
DPN 13				
Locomoção (n)	17,71 ± 3,32	22,21 ± 4,40	11,57 ± 3,23	27,87 ± 9,00
Tempo gasto na área central (s)	88,96 ± 29,94	116,14 ± 24,30	148,03 ± 51,80	88,75 ± 21,70
Tempo gasto na área periférica (s)	511,04 ± 29,94	483,86 ± 24,30	451,97 ± 51,80	511,25 ± 21,70
DPN 17				
Locomoção (n)	105,24 ± 19,25	111,14 ± 20,40	85,71 ± 15,17	113,27 ± 19,72
Tempo gasto na área central (s)	95,26 ± 19,82	61,49 ± 11,71	91,31 ± 27,20	63,00 ± 14,28
Tempo gasto na área periférica (s)	504,74 ± 19,82	538,51 ± 11,71	508,69 ± 27,20	537,00 ± 14,28
DPN 21				
Locomoção (n)	132,88 ± 8,52	149,14 ± 11,50	152,43 ± 13,26	162,67 ± 13,42
Tempo gasto na área central (s)	165,73 ± 14,13	136,04 ± 17,76	146,16 ± 18,31	135,57 ± 13,57
Tempo gasto na área periférica (s)	434,27 ± 14,13	463,96 ± 17,76	453,84 ± 18,31	464,43 ± 13,57
<i>Machos F2</i>	[14]	[12]	[12]	[11]
DPN 13				
Locomoção (n)	34,21 ± 10,23	19,58 ± 3,05	23,17 ± 5,89	17,91 ± 7,30
Tempo gasto na área central (s)	99,79 ± 27,87	107,50 ± 27,87	103,51 ± 17,88	105,54 ± 36,13
Tempo gasto na área periférica (s)	500,21 ± 27,87	492,50 ± 27,87	496,49 ± 17,88	494,46 ± 36,13
DPN 17				
Locomoção (n)	154,00 ± 24,28	145,25 ± 25,95	150,50 ± 31,30	119,64 ± 19,38
Tempo gasto na área central (s)	72,25 ± 15,15	67,63 ± 15,06	50,79 ± 11,52	46,56 ± 10,65
Tempo gasto na área periférica (s)	527,75 ± 15,15	532,37 ± 15,06	549,21 ± 11,52	553,44 ± 10,65
DPN 21				
Locomoção (n)	164,36 ± 11,62	134,75 ± 9,55	135,50 ± 13,03	134,64 ± 12,50
Tempo gasto na área central (s)	123,65 ± 12,33	89,59 ± 16,41	85,55 ± 11,74	87,65 ± 15,33
Tempo gasto na área periférica (s)	476,35 ± 12,33	510,41 ± 16,41	514,45 ± 11,74	512,35 ± 15,33

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo.

RMANOVA, $p > 0,05$ comparado ao controle. DPN: dia pós-natal; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

Tabela 17. Atividade motora (DPN 13, 17 e 21) da prole feminina das gerações F1 e F2.

	CTR	TCS 0,8	TCS 2,4	TCS 8,0
<i>Fêmeas F1</i>	[15]	[15]	[11]	[16]
DPN 13				
Locomoção (n)	21,20 ± 3,41	24,67 ± 4,38	10,36 ± 3,05	34,13 ± 7,00
Tempo gasto na área central (s)	162,38 ± 39,54	161,59 ± 46,35	163,42 ± 64,35	70,59 ± 13,69
Tempo gasto na área periférica (s)	437,62 ± 39,54	438,41 ± 46,35	435,68 ± 64,35	529,41 ± 13,69
DPN 17				
Locomoção (n)	140,33 ± 21,93	103,20 ± 19,74	109,55 ± 27,71	134,69 ± 24,67
Tempo gasto na área central (s)	77,33 ± 13,07	72,81 ± 17,12	107,09 ± 36,51	100,94 ± 20,98
Tempo gasto na área periférica (s)	504,67 ± 22,00	527,19 ± 17,12	492,91 ± 36,51	499,06 ± 11,54
DPN 21				
Locomoção (n)	169,80 ± 10,09	171,33 ± 15,31	179,27 ± 19,43	164,38 ± 15,63
Tempo gasto na área central (s)	165,58 ± 16,92	147,18 ± 25,60	145,71 ± 17,60	144,66 ± 12,15
Tempo gasto na área periférica (s)	464,43 ± 16,92	425,82 ± 25,60	454,29 ± 17,60	455,34 ± 12,15
<i>Fêmeas F2</i>	[15]	[13]	[13]	[12]
DPN 13				
Locomoção (n)	30,07 ± 8,13	36,62 ± 8,06	23,69 ± 3,98	13,92 ± 4,14
Tempo gasto na área central (s)	140,56 ± 33,77	93,29 ± 34,11	158,91 ± 40,12	108,50 ± 21,63
Tempo gasto na área periférica (s)	459,44 ± 33,77	506,71 ± 34,11	441,09 ± 40,12	491,50 ± 21,63
DPN 17				
Locomoção (n)	161,87 ± 20,37	176,15 ± 17,94	154,08 ± 25,49	137,83 ± 24,39
Tempo gasto na área central (s)	96,58 ± 19,17	95,77 ± 20,78	76,38 ± 23,65	109,23 ± 44,29
Tempo gasto na área periférica (s)	503,42 ± 19,17	504,23 ± 20,78	523,62 ± 23,65	490,77 ± 44,29
DPN 21				
Locomoção (n)	160,40 ± 10,39	132,31 ± 10,11	138,08 ± 8,90	148,58 ± 15,56
Tempo gasto na área central (s)	157,20 ± 18,07	122,67 ± 19,20	106,94 ± 13,09	99,97 ± 18,15
Tempo gasto na área periférica (s)	442,80 ± 18,07	477,33 ± 19,20	493,06 ± 13,09	500,03 ± 18,15

Valores expressos em média ± EPM. Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. RMANOVA, $p > 0,05$ comparado ao controle. DPN: dia pós-natal; Grupo CTR (controle) óleo de milho; Grupo TCS 0,8: triclosan 0,8 mg/kg; Grupo TCS 2,4: triclosan 2,4 mg/kg; Grupo TCS 8,0: triclosan 8,0 mg/kg.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, a atividade (anti)estrogênica do TCS foi avaliada em ratas imaturas após três dias de tratamento (teste uterotrófico), e em um segundo protocolo, foi conduzido um estudo para investigar a toxicidade reprodutiva deste composto em duas gerações de ratos. Apesar da ausência de atividade (anti)estrogênica no teste uterotrófico, a exposição em duas gerações de ratos reduziu a qualidade espermática dos ratos da geração F1, nas ratas reduziu a receptividade sexual em ambas as gerações (P e F1), além de reduzir o consumo de ração durante a lactação e aumentar o cuidado materno nas mães da geração P e reduzir a quantificação folicular no ovário das ratas da geração F1. Todos os efeitos observados no estudo de duas gerações foram detectados nos animais no grupo TCS 2,4 e sugerem um comportamento de curva dose-resposta não monotônica para o TCS. As doses utilizadas neste trabalho foram baseadas na ingestão diária aceitável de TCS permitida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008). Todas as três doses de TCS utilizadas neste estudo foram selecionadas com o objetivo de determinar os possíveis efeitos deste antibacteriano como desregulador hormonal sobre o sistema reprodutor de ratos.

5.1. Machos

O acompanhamento das mudanças no peso corporal e sinais de toxicidade geral são importantes para a avaliação da toxicidade reprodutiva de xenobióticos (JOHNSON, 1981; SELLERS et al., 2007). Várias evidências sugerem que o TCS atua como um desregulador hormonal sobre a tireoide e sua exposição está relacionada à hipotiroxinemia, podendo afetar o estado metabólico e o peso corporal (AXELSTAD et al., 2013; PAUL et al., 2012; WITORSCH, 2014). No presente estudo, ratos expostos ao TCS, durante todo o desenvolvimento intrauterino, lactação, até a vida adulta, não apresentaram alteração de ganho de peso. Esse resultado é consistente com os observados também em ratos Wistar tratados com TCS em doses de que variavam entre 3 a 300 mg/Kg (KUMAR et al., 2009; ZORRILLA et al., 2009), sugerindo que o tratamento com TCS, nas doses utilizadas, não causa toxicidade observada pelo ganho de peso.

O comportamento copulatório e a motivação sexual são regulados por neurotransmissores e hormônios gonadais, dentre eles a testosterona (CANTERAS, 2012; HULL; DOMINGUEZ, 2006). Apesar da evidencia de que o tratamento oral com TCS reduz a concentração plasmática de testosterona em ratos Wistar após 60 dias de tratamento, na dose de 20 mg/kg (KUMAR et al., 2009), ou após 31 dias de tratamento, na dose de 200 mg/kg (ZORRILLA et al., 2009), não foram observadas, no presente estudo, alterações na concentração de testosterona plasmática bem como, sobre o comportamento sexual nos ratos da geração F1. A dose de 8,0 mg/kg utilizada foi, respectivamente, 2,5 e 25 vezes menores do que as doses utilizadas nos estudos de Kumar et al. (2009) e Zorrilla et al. (2009), podendo explicar a ausência de efeitos sobre esses parâmetros.

A análise do peso de órgãos hormônio-dependentes também constitui importante indicador a ser avaliado em um estudo de toxicidade reprodutiva em ratos (PERREAULT; KLINEFELTER; CLEGG, 2007). Neste estudo, o tratamento com TCS não alterou o peso de órgãos dos ratos F1. Dados da literatura demonstram que há uma redução no peso de órgãos hormônio-dependentes (testículos, epidídimos, próstata ventral, ducto deferente e vesículas seminais) em ratos tratados com TCS em doses acima de 10 mg/Kg (Kumar et al. 2009), sugerindo que os efeitos tóxicos do tratamento com TCS sobre o peso de órgãos possui efeito dose-depende em doses superiores as utilizadas no presente estudo.

A redução da qualidade espermática é comumente relacionada aos efeitos tóxicos de uma droga sobre o processo de espermatogênese (KU et al., 1993; POON, 2003), o qual é totalmente dependente da ação do hormônio testosterona (PAKARAINEN et al., 2005). Estudo conduzido em humanos saudáveis (i.e. sem criptorquidismo, varicocele e/ou infertilidade masculina diagnosticados) reforça a relação da exposição ao TCS com diminuição da concentração, contagem e motilidade espermática (ZHU et al., 2016). Em ratos Wistar, o tratamento com TCS em doses superiores a 20 mg/kg reduziu a produção espermática (KUMAR et al., 2009; ZORRILLA et al., 2009). Esses dados são compatíveis com os resultados obtidos em estudo anterior publicado por nosso laboratório (PERNONCINI et al., 2018), em que o tratamento com TCS em doses menores (0,8; 2,4 e 8,0 mg/kg, gavagem) a partir do DPN 49 (geração P) não interferiu em nenhum dos parâmetros espermáticos analisados. Contudo, nos machos F1 do presente estudo, a exposição crônica ao antibacteriano na dose de 2,4 mg/kg reduziu a motilidade e viabilidade espermática, sugerindo que os efeitos do TCS sobre a qualidade espermática podem ser influenciados pela janela de

exposição, uma vez que os animais da geração F1 foram expostos a esse composto durante todo o desenvolvimento intrauterino, lactação, puberdade até a vida adulta. Evidências em mamíferos sugerem que boa parte da programação dos sistemas endócrinos é consolidada durante o desenvolvimento fetal/neonatal (DE KLOET et al., 1988) e que a exposição a xenobióticos nesses períodos pode comprometer o funcionamento adequado desses sistemas de modo permanente (GUTLEB; CAMBIER; SERCHI, 2016; ROCK; PATISAUL, 2018). Nesse sentido, as alterações observadas na viabilidade e motilidade espermática dos ratos F1 deste trabalho reforçam a importância de futuros estudos voltados à compreensão dos efeitos da exposição ao TCS em períodos de desenvolvimento críticos para o sistema reprodutor masculino.

Apesar das alterações observadas nos parâmetros espermáticos, não houve efeito do tratamento crônico com TCS sobre a composição volumétrica, assim como nenhum dos parâmetros biométricos (diâmetro dos túbulos seminíferos e comprimento total dos túbulos seminíferos) do parênquima testicular dos ratos adultos da geração F1 do presente estudo. A ausência de alteração sobre a biometria testicular permite inferir que os efeitos do TCS sobre os parâmetros espermáticos observados possam estar relacionados a ação direta do antibacteriano no epidídimo. O epidídimo possui papel fundamental na transformação funcional dos espermatozoides e no seu armazenamento em estado viável e pronto para a ejaculação (ZHOU et al., 2018). Em ratos Sprague-Dawley (DPN 42), após a administração de dose única de TCS (50 mg/kg, via gavagem), foi observado que, no epidídimo, o TCS apresenta maior tempo de retenção e maior tempo de meia vida de eliminação em comparação ao plasma testículo e próstata, mostrando uma tendência para o acúmulo deste composto no epidídimo e consequente dano histopatológico (LAN et al., 2015). Estes resultados ressaltam a necessidade de mais pesquisas voltadas para a compreensão dos mecanismos pelos quais o TCS afeta a qualidade espermática de ratos e enfatiza o questionamento quanto à segurança do TCS sobre a função reprodutiva para a população, uma vez que, as doses utilizadas nesse trabalho, foram baseadas nos limites máximos de exposição ao TCS pela dieta, preconizados pelas agências reguladoras.

5.2. Fêmeas

Nas fêmeas, o acompanhamento do ciclo estral é utilizado para avaliar o estado funcional do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). *In vitro*, a exposição ao TCS está relacionada com o aumento da secreção de estradiol e progesterona em cultura de células de coriocarcinoma humano JEG-3 (HONKISZ; ZIEBA-PRZYBYLSKA; WOJTOWICZ, 2012). No estudo de Zorrilla, Gibson e Stoker (2010), ratas Wistar tratadas com TCS em doses acima de 37,5 mg/kg apresentaram uma diminuição na concentração plasmática de estradiol, no entanto, esse resultado não foi observado na dose de 9,37 mg/kg. Neste estudo, tanto na geração P, quanto na geração F1, o tratamento com TCS não interferiu no ciclo estral e na concentração plasmática de progesterona, sugerindo que o tratamento prolongado com TCS, nas doses utilizadas, não comprometeu a homeostase de hormônios sexuais de ratas. A ausência de efeitos (anti)estrogênicos observados no teste uterotrófico corroboram com essa hipótese.

Além do ciclo estral, sabe-se que o estradiol e progesterona também atuam sobre o comportamento sexual e materno, interagindo em conjunto com o sistema dopaminérgico na área preóptica medial no hipotálamo (STOLZENBERG; NUMAN, 2011). Neste estudo, o tratamento com TCS diminuiu a receptividade das fêmeas TCS 2,4 em ambas as gerações, P e F1, e, no comportamento materno, aumentou o comportamento de limpeza dos filhotes e reduziu a frequência da mãe fora do ninho nas ratas TCS 2,4 da geração P. Variações no comportamento de limpeza dos filhotes estão diretamente associadas à liberação de oxitocina dependente de dopamina no núcleo accumbens (CHAMPAGNE et al., 2004; SHAHROKH et al., 2010), uma via estimulada pelos eventos hormonais da gravidez e parto (AFONSO et al., 2008). O comportamento materno de ratas também possui efeitos significativos sobre a receptividade sexual da prole feminina, de modo que, mães que apresentam comportamento de limpeza dos filhotes elevado geram fêmeas que, quando adultas, apresentam redução da frequência de lordose (CAMERON et al., 2008; CAMERON; FISH; MEANEY, 2008). Por outro lado, ratas provenientes de mães com comportamento materno elevado, também apresentam o mesmo padrão de comportamento, quando adultas (CAMERON, 2011). Além disso, o ambiente *in útero* também é decisivo para a função reprodutiva e o comportamento da prole feminina (CAMERON, 2011). O TCS é amplamente distribuído em tecidos e se acumula facilmente na placenta em ratas prenhes, conforme observado em fêmeas Sprague-Dawley tratadas com TCS, via gavagem, com 30, 100 e 300 mg/kg/dia, entre os DG 6 ao 20

(FENG et al., 2016). A presença de TCS no cérebro já foi documentada em camundongos B6C3F1, após 12 horas de uma única administração tópica de TCS (10 e 100 mg/kg) (FANG et al., 2014), e suscita preocupação quanto a neurotoxicidade deste composto, mesmo em baixas concentrações (RUSZKIEWICZ et al., 2017). Contudo, apesar da influência transgeracional sobre o comportamento de limpeza dos filhotes (CAMERON, 2011), o aumento deste comportamento nas ratas da geração P não resultou no aumento do comportamento materno das ratas F1. Desse modo, a diminuição da receptividade sexual das fêmeas TCS 2,4, de ambas as gerações, sugere que alterações comportamentais (sexual e materno) observadas neste estudo possam estar relacionadas, pelo menos em parte, aos efeitos diretos do TCS no cérebro, possivelmente nas as vias de motivação no hipotálamo. A ocorrência de efeitos na dose intermediária (grupo TCS 2,4) remete a um efeito de curva dose-resposta não-monotônico para o TCS. De fato, para vários desreguladores hormonais, incluindo o TCS, a relação dose-resposta pode destoar da linearidade em doses orais baixas (VANDENBERG et al., 2012, 2014).

As variações de peso corporal, tanto no período pré-acasalamento, quanto nos períodos de gestação e lactação, foram semelhantes entre os grupos experimentais em ambas as gerações P e F1. Nossos resultados são condizentes com os observados no estudo de Rodríguez e Sanchez (2010), em que a exposição materna ao TCS não alterou o peso corporal durante a gestação e lactação, nas doses de 1, 10 ou 50 mg/kg, embora tenha comprometido o ganho de peso da prole no DPN 20. O efeito do TCS sobre o peso corporal materno é documentado em doses substancialmente maiores (acima de 300 mg/kg), como observado em Axelstad et al. (2013), levando uma redução no peso corpóreo sem efeitos sobre o peso da ninhada. Assim, sugere-se que o TCS, nas doses utilizadas no presente estudo, não apresenta toxicidade sobre o peso corporal materno durante os períodos de gestação e de lactação. Embora a exposição crônica ao TCS não tenha afetado o peso materno, nas fêmeas TCS 2,4 da geração P foi observada uma diminuição no consumo de ração durante a lactação. Durante a lactação, o aumento do neuropeptídeo-Y no hipotálamo dorsomedial possui papel crítico na indução da hiperfagia crônica em ratas Wistar (XU et al., 2009). Sabe-se que TCS pode interferir na expressão de neuropeptídeos orexigênicos, uma vez que, a exposição materna ao TCS (1 mg/kg de ração) em ratas Wistar, nos DG 14 a DL 20, foi capaz de aumentar a expressão do mRNA de neuropeptídeo-Y e proteína relacionada ao Agouti hipotalâmicos na prole feminina, aumentando o consumo de ração dessas fêmeas na idade adulta (RABAGLINO et al., 2016). Embora, na prole o TCS tenha aumentado a expressão desses

neuropeptídios, esses efeitos na mãe ainda são desconhecidos. Apesar da ausência de estudos que investigam os efeitos do TCS na expressão de neuropeptídios orexigênicos durante a lactação, é possível que no presente estudo, esse xenobiótico possa ter afetado os mecanismos hipotalâmicos envolvidos na ingestão de alimentos nesse período.

Em relação aos efeitos do TCS sobre os órgãos reprodutivos femininos (útero e ovários), no presente estudo não foram observadas alterações no peso desses órgãos em ambas as gerações P e F1. Pouca informação relacionada aos efeitos do TCS sobre útero e ovários de roedores está disponível na literatura. No estudo de Feng et al. (2016), ratas Sprague-Dawley prenhes tratadas com TCS na dose de 600 mg/kg entre o DG 6 ao 21 apresentaram redução de peso uterino, enquanto em Yang et al. (2015), a inalação de TCS (0-0,40 mg/L) em ratas com 6 semanas de idade, durante um período de 28 dias (6 h/dia, 5 dias/semana), não afetou os pesos dos ovários. Já em camundongos B6C3F1 (6 semanas de idade), a aplicação tópica de TCS (125 mg/kg) durante 13 semanas diminuiu os pesos de ovários (FANG et al., 2015). Apesar das diferenças em relação ao modelo animal e vias de exposição, os resultados do presente estudo, assim como a ausência de efeitos sobre a concentração plasmática de progesterona, sugerem que o TCS, nas doses testadas, não afeta o peso de órgãos hormônio-dependentes em ratas Wistar.

Evidências de experimentos *in vitro* indicam que o TCS é capaz de aumentar a expressão de algumas moléculas-chave que estimulam a migração celular durante o processo de decidualização do estroma endotelial (FORTE et al., 2016), eventos profundamente regulados pelos hormônios 17β -estradiol e progesterona (PAWAR et al., 2014). Embora *in vitro* o TCS esteja relacionado como um potente antagonista em diferentes ensaios mediados por receptores de estrógenos (ER) e andrógenos (AR) (AHN et al., 2008; GEE et al., 2008; ZIRKIN, 2000), estudos investigando os efeitos da exposição deste composto sobre o epitélio uterino de ratas ainda são escassos na literatura. Em Louis, Hallinger e Stoker (2013), a co-administração, via gavagem, de TCS (18,75 mg/kg) e estradiol (doses de 1, 2 ou 3 μ g/kg) por 3 dias (DPN 19–21) resultou no aumento dose-dependente da altura das células do epitélio luminal de ratas Wistar, indicando efeito estrogênico no útero (NEWBOLD et al., 2001). A ausência de estudos restringe a discussão, contudo, nossos resultados demonstram que a exposição crônica ao TSC nas fêmeas das gerações P e F1, nas doses testadas, não interferiu em nenhum dos parâmetros biométricos analisados no útero, apesar do potencial efeito estrogênico do TCS sobre o epitélio uterino.

Apesar da redução da quantificação dos folículos em crescimento observado na avaliação histológica das ratas TCS 2,4 da geração F1, não houve interferência do tratamento sobre os índices de acasalamento e fertilidade (viabilidade fetal, índice lactacional e perda pós-implantação) das fêmeas, em ambas as gerações P e F1. Os resultados obtidos nesse estudo são consistentes com os relatados em Rodríguez e Sanchez, (2010), onde a exposição materna ao TCS (1, 10 e 50 mg/kg) não afetou os índices de fertilidade investigados (gestacional, comprimento da gestação, tamanho da ninhada, número de pontos de implantação e índice de lactação), embora na dose mais alta (50 mg/kg), tenha diminuído o índice de natalidade e a sobrevivência de 6 dias. Em Axelstad et al. (2013), os efeitos do TCS sobre desenvolvimento materno e descendência também foram investigados em ratas Wistar, após exposição materna ao TCS (75, 150 e 300 mg/kg/dia), do DG 7 a DPN 16, sem efeitos na perda pós-implantação, tamanho da ninhada, peso corporal da prole, distância anogenital, retenção mamilar ou mortes neonatais. Apesar das diferenças nos dados da literatura em relação aos efeitos do TCS sobre o índice de natalidade, os resultados deste estudo demonstram que a exposição ao TCS durante todo o período intrauterino e lactação não apresentou toxicidade materna ou fetal nas doses utilizadas.

Face aos resultados obtidos, observa-se que a maioria dos efeitos deletérios detectados no presente estudo foram identificados nos animais expostos à dose intermediária de TCS (2,4 mg/kg/dia). O efeito de curva dose-resposta de uma substância química é geralmente monotônico, aumentando ou diminuindo de modo linear ao longo do intervalo das doses. No entanto, em um sistema biológico complexo, podem ser observadas relações dose-efeito não-monótonas (bifásicas) para um xenobiótico, mostrando uma diminuição na dose baixa seguida de um aumento na dose alta, ou *vice-versa*, um efeito recorrente com produtos químicos que atuam como desreguladores hormonais, incluindo o TCS (CONOLLY; LUTZ, 2004; VANDENBERG et al., 2012). A não-linearidade na resposta de um desregulador hormonal pode ocorrer por diferentes razões, tais como características no metabolismo e distribuição e/ou a existência de diferentes subtipos de receptores de membrana com afinidades e efeitos diferentes para uma mesma substância, por exemplo (CONOLLY; LUTZ, 2004). Esses achados reforçam a capacidade do TCS em atuar como um desregulador hormonal podendo interferir na função reprodutiva de ratos mesmo em baixas doses.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, o tratamento com TCS em duas gerações de ratos prejudicou a viabilidade e motilidade espermática dos machos F1 do grupo TCS 2,4. Nas fêmeas, houve comprometimento do comportamento sexual nas gerações P e F1, além de redução do consumo de ração durante a lactação e aumento do comportamento de limpeza dos filhotes nas mães P do grupo TCS 2,4 e redução da quantificação de folículos em crescimento nas fêmeas TCS 8,0 da geração F1. Os efeitos do TCS observados neste estudo em diferentes parâmetros reprodutivos na dose de 2,4 mg/kg sugerem que este composto pode atuar como um desregulador hormonal, apresentando toxicidade reprodutiva mesmo em doses que estão abaixo do limite de exposição preconizados pelas autoridades reguladoras.

7. REFERÊNCIAS

AFONSO, V. M. et al. Previous maternal experience affects accumbal dopaminergic responses to pup-stimuli. **Brain research**, v. 1198, p. 115–23, 10 mar. 2008.

ÂGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Research Protocols**, v. 1, n. 2, p. 203–209, maio 1997.

ÂGMO, A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 1, p. 55–68, fev. 2003.

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.

ALAVANJA, M. C. R. et al. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. **American journal of epidemiology**, v. 157, n. 9, p. 800–14, 1 maio 2003.

ALLMYR, M. et al. Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. **The Science of the total environment**, v. 372, n. 1, p. 87–93, 15 dez. 2006.

ALLMYR, M. et al. The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum. **The Science of the total environment**, v. 393, n. 1, p. 162–7, 1 abr. 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.

AXELSTAD, M. et al. Triclosan exposure reduces thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 534–40, set. 2013.

BAGLEY, D. M.; LIN, Y. J. Clinical evidence for the lack of triclosan accumulation from daily use in dentifrices. **American journal of dentistry**, v. 13, n. 3, p. 148–52, jun. 2000.

BALAKRISHNA, K. et al. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 137, n. April 2016, p. 113–120, mar. 2017.

BEACH, F. A. Prolonged hormone deprivation and pretest cage adaptation as factors affecting the display of lordosis by female rats. **Physiology & Behavior**, v. 16, n. 6, p. 807–808, 1976.

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.

BHARGAVA, H. N.; LEONARD, P. A. Triclosan: applications and safety. **American journal of infection control**, v. 24, n. 3, p. 209–18, jun. 1996.

BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 18, n. 4, p. 813–6, 1 abr. 2003.

BLAIR, B. D. et al. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 2116–23, nov. 2013.

BUTTKE, D. E.; SIRCAR, K.; MARTIN, C. Exposures to endocrine-disrupting chemicals and age of menarche in adolescent girls in NHANES (2003-2008). **Environmental health perspectives**, v. 120, n. 11, p. 1613–8, nov. 2012.

CAMERON, N. et al. Maternal programming of sexual behavior and hypothalamic-pituitary-gonadal function in the female rat. **PloS one**, v. 3, n. 5, p. e2210, 21 maio 2008.

CAMERON, N. M. Maternal programming of reproductive function and behavior in the female rat. **Frontiers in evolutionary neuroscience**, v. 3, n. DEC, p. 10, 2011.

CAMERON, N. M.; FISH, E. W.; MEANEY, M. J. Maternal influences on the sexual behavior and reproductive success of the female rat. **Hormones and behavior**, v. 54, n. 1, p. 178–84, jun. 2008.

CANTERAS, N. S. Hypothalamic Goal-directed Behavior – Ingestive, Reproductive and Defensive. In: **The Mouse Nervous System**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 539–562.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & behavior**, v. 79, n. 3, p. 359–71, ago. 2003.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4113–23, 28 abr. 2004.

CHENG, C.-Y.; WANG, Y.-C.; DING, W.-H. Determination of triclosan in aqueous samples using solid-phase extraction followed by on-line derivatization gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 197–202, jan. 2011.

CHISTYAKOV, V. A et al. Effect of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on estrous cycle and 17 β -estradiol level in rats. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 77, n. 12, p. 1382–6, dez. 2012.

CONOLLY, R. B.; LUTZ, W. K. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 151–7, jan. 2004.

DANN, A. B.; HONTELA, A. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 31, n. 4, p. 285–311, maio 2011.

DE KLOET, E. R. et al. Stress, glucocorticoids and development. In: **Progress in Brain Research**. [s.l.: s.n.]. v. 73p. 101–120.

DENG, F. et al. Effects of growth environments and two environmental endocrine disruptors on children with idiopathic precocious puberty. **European journal of endocrinology**, v. 166, n. 5, p. 803–9, 1 maio 2012.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatshafte für Veterinar Medizin**, v. 29, p. 650–652, 1974.

EPA-DENMARK. **Survey of triclosan in cosmetic products**. København: Danish Environmental Protection Agency, 2016.

FANG, J.-L. et al. Absorption and metabolism of triclosan after application to the skin of B6C3F1 mice. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 3, p. n/a-n/a, nov. 2014.

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

FELÍCIO, L. F.; NASELLO, A. G. Effect of acute bromopride treatment on rat prolactin levels and sexual behavior. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 22, n. 8, p. 1011–4, 1989.

FÉLIX-CAÑEDO, T. E.; DURÁN-ÁLVAREZ, J. C.; JIMÉNEZ-CISNEROS, B. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. **The Science of the total environment**, v. 454–455, p. 109–18, 1 jun. 2013.

FENG, Y. et al. Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0154758, 2016.

FERNANDES, G. S. A. et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 106–112, jan. 2007.

FILLER, R. Methods for Evaluation of Rat Epididymal Sperm Morphology. In: **Male Reproductive Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 1993. v. 2p. 334–343.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, H. Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use. Final rule. **Federal register**, v. 81, n. 172, p. 61106–30, 6 set. 2016.

FORTE, M. et al. Triclosan and bisphenol a affect decidualization of human endometrial stromal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 422, p. 74–83, fev. 2016.

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, 1 maio 2003.

GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: Potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

GEE, R. H. et al. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 78–91, jan. 2008.

GEENS, T. et al. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. **Chemosphere**, v. 76, n. 6, p. 755–60, ago. 2009.

GERARDIN, D. et al. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 618–623, abr. 2006.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, abr. 2007.

GUTLEB, A. C.; CAMBIER, S.; SERCHI, T. Impact of Endocrine Disruptors on the Thyroid Hormone System. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 86, n. 4, p. 271–278, 2016.

HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 1420–1426, 15 mar. 2005.

HARDY, D. F.; DEBOLD, J. F. Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. **Physiology & Behavior**, v. 7, n. 4, p. 643–645, out. 1971.

HONKISZ, E.; ZIEBA-PRZYBYLSKA, D.; WOJTOWICZ, A. K. The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 385–392, nov. 2012.

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.

JOHNSON, A. M. Analysis of animal weight gains in chronic toxicity studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 7, n. 2, p. 307–316, 15 fev. 1981.

KNOWER, K. C. et al. Endocrine disruption of the epigenome: a breast cancer link. **Endocrine-related cancer**, v. 21, n. 2, p. T33-55, abr. 2014.

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**, v. 7, n. 4, p. 305–319, jul. 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, 4 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.

LIN, Y. J. Buccal absorption of triclosan following topical mouthrinse application. **American journal of dentistry**, v. 13, n. 4, p. 215–7, ago. 2000.

LORAINÉ, G. A.; PETTIGROVE, M. E. Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 3, p. 687–695, 1 fev. 2006.

LOUIS, G. W.; HALLINGER, D. R.; STOKER, T. E. The effect of triclosan on the uterotrophic response to extended doses of ethinyl estradiol in the weanling rat. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 36, p. 71–7, abr. 2013.

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, fev. 2014.

- MONTAGNINI, B. G. et al. Evaluation of Escitalopram, Sertraline, and Methylphenidate in the Immature Rat Uterotrophic Assay. **International Journal of Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 426–430, 7 nov. 2013.
- MOREIRA, E. G.; VASSILIEFF, I.; VASSILIEFF, V. S. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 5, p. 489–495, set. 2001.
- MORTENSEN, M. E. et al. Urinary concentrations of environmental phenols in pregnant women in a pilot study of the National Children's Study. **Environmental research**, v. 129, p. 32–8, fev. 2014.
- MYERS, M. M. et al. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. **Developmental Psychobiology**, v. 22, n. 1, p. 29–53, jan. 1989.
- NEWBOLD, R. R. et al. Cell response endpoints enhance sensitivity of the immature mouse uterotrophic assay. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 245–252, maio 2001.
- NICNAS. **Priority existing chemical assessment Report No. 30 - triclosan**. Sidney: National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, 2009.
- 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. 2005.
- PAUL FRIEDMAN, K. et al. A predictive data-driven framework for endocrine prioritization: a triazole fungicide case study. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 785–833, 20 out. 2016.
- PAUL, K. B. et al. Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal, and early neonatal thyroxine: a dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. **Toxicology**, v. 300, n. 1–2, p. 31–45, 9 out. 2012.
- PAWAR, S. et al. Minireview: Steroid-Regulated Paracrine Mechanisms Controlling Implantation. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 9, p. 1408–1422, set. 2014.
- PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 17, n. 3, p. 555–557, 1968.

PEREZ, A. L. et al. Triclosan occurrence in freshwater systems in the United States (1999-2012): a meta-analysis. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 32, n. 7, p. 1479–87, jul. 2013.

PERNONCINI, K. V. et al. Evaluation of reproductive toxicity in rats treated with triclosan. **Reproductive Toxicology**, v. 75, p. 65–72, jan. 2018.

PEROBELLI, J. E. et al. Decreased Sperm Motility in Rats Orally Exposed to Single or Mixed Pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 13–14, p. 991–1002, 28 maio 2010.

PERREAULT, S.; KLINEFELTER, G.; CLEGG, E. Assessment of Male Reproductive Toxicity. In: **Principles and Methods of Toxicology, Fifth Edition**. [s.l.] CRC Press, 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, 2009.

POON, R. Short-term Oral Toxicity of Pentyl Ether, 1,4-Diethoxybutane, and 1,6-Dimethoxyhexane in Male Rats. **Toxicological Sciences**, v. 77, n. 1, p. 142–150, 22 dez. 2003.

RABAGLINO, M. B. et al. Maternal Triclosan consumption alters the appetite regulatory network on Wistar rat offspring and predispose to metabolic syndrome in the adulthood. **Endocrine journal**, v. 63, n. 11, p. 1007–1016, 30 nov. 2016.

RAMIREZ, O. A; CARRER, H. F.; NASELLO, A G. Prenatal amphetamine exposure: ovulation, sexual behavior and hypothalamic monoamine content in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 11, n. 6, p. 605–609, 1979.

REIS, A R. et al. Neonatal handling alters the structure of maternal behavior and affects mother-pup bonding. **Behavioural brain research**, v. 265, p. 216–28, 15 maio 2014.

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

ROCK, K. D.; PATISAUL, H. B. Environmental Mechanisms of Neurodevelopmental Toxicity. **Current Environmental Health Reports**, 13 mar. 2018.

RODRÍGUEZ, P. E. A; SANCHEZ, M. S. Maternal exposure to triclosan impairs thyroid homeostasis and female pubertal development in Wistar rat offspring. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 73, n. 24, p. 1678–88, 2010.

ROLLAND, M. et al. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 28, n. 2, p. 462–70, fev. 2013.

RUSZKIEWICZ, J. A. et al. Is Triclosan a neurotoxic agent? **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 20, n. 2, p. 104–117, 17 fev. 2017.

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, maio 1996.

SELLERS, R. S. et al. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 751–755, 6 ago. 2007.

SHAHROKH, D. K. et al. Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2276–86, maio 2010.

SINGER, H. et al. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 23, p. 4998–5004, 1 dez. 2002.

STOLZENBERG, D. S.; NUMAN, M. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 3, p. 826–47, jan. 2011.

THOMPSON, A et al. The Fate and Removal of Triclosan during Wastewater Treatment. **Water Environment Research**, v. 77, n. 1, p. 63–67, 1 jan. 2005.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW 3/4 as Default Method in Derivation of the Oral RfD.** [s.l.: s.n.].

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

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines. OPPTS 890.1600: Uterotrophic Assay.** [s.l.: s.n.].

UMBUZEIRO, G. A. **Guia de potabilidade para substâncias químicas.** São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2012.

UNEP; WHO. **State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals - 2012.** Geneva: UNEP/WHO, 2013.

VANDENBERG, L. N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine reviews**, v. 33, n. 3, p. 378–455, jun. 2012.

VANDENBERG, L. N. et al. Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? **Environmental Health**, v. 13, n. 46, p. 1–7, 2014.

WHO. **Guidelines for Drinking-Water Quality.** 4th. ed. [s.l.] World Health Organization, 2011.

WITORSCH, R. J. Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products. **Critical reviews in toxicology**, v. 44, n. 6, p. 535–55, jul. 2014.

XU, J. et al. Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: role of insulin and leptin. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4231–40, set. 2009.

YANG, Y.-S. et al. Evaluation of toxicity to triclosan in rats following 28 days of exposure to aerosol inhalation. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 259–68, mar. 2015.

YUEH, M.-F.; TUKEY, R. H. Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 251–272, 6 jan. 2016.

ZHOU, W. et al. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. FEB, p. 1–13, 28 fev. 2018.

ZHU, W. et al. Environmental Exposure to Triclosan and Semen Quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 224, 17 fev. 2016.

ZIRKIN, B. R. Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function During Aging. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 977–981, 1 out. 2000.

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, 8 jan. 2009.