



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA PAULA FRANCO PUNHAGUI UMBELINO

**AVALIAÇÃO TRANSGERACIONAL DO EFEITO DA  
EXPOSIÇÃO MATERNA A MISTURA DE FTALATOS SOBRE  
PARÂMETROS TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE  
RATOS MACHOS PRÉ-PÚBERES E ADULTOS**

---

Londrina  
2022

ANA PAULA FRANCO PUNHAGUI UMBELINO

**AVALIAÇÃO TRANSGERACIONAL DO EFEITO DA  
EXPOSIÇÃO MATERNA A MISTURA DE FTALATOS SOBRE  
PARÂMETROS TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE  
RATOS MACHOS PRÉ-PÚBERES E ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa Dra Glaura Scantamburlo  
Alves Fernandes

Co-orientador: Prof Dr Wellerson Rodrigo  
Scarano

Londrina  
2022

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

Punhagui-Umbelino, Ana Paula Franco Punhagui-Umbelino.

AVALIAÇÃO TRANSGERACIONAL DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A MISTURA DE FTALATOS SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE RATOS MACHOS PRÉ-PÚBERES E ADULTOS / Ana Paula Franco Punhagui-Umbelino Punhagui-Umbelino. - Londrina, 2022.  
106 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Coorientador: Wellerson Rodrigo Scarano.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Ftalato - Tese. 2. Desenvolvimento Pós-Natal - Tese. 3. DOHaD - Tese. 4. Sistema Reprodutor - Tese. I. Scantamburlo Alves Fernandes, Glaura. II. Rodrigo Scarano, Wellerson. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 615.9

ANA PAULA FRANCO PUNHAGUI UMBELINO

**AVALIAÇÃO TRANSGERACIONAL DO EFEITO DA  
EXPOSIÇÃO MATERNA A MISTURA DE FTALATOS SOBRE  
PARÂMETROS TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS DE  
RATOS MACHOS PRÉ-PÚBERES E ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa Dra Karen Brajão  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa Dra Marina Trevisan Guerra  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul –  
UFMS

---

Profa Dra Juliana Elaine Perobelli  
Universidade Federal de São Paulo– Unifesp

---

Prof Dr Fernando Henrique Borges  
Universidade Federal de São Paulo– Unifesp

Londrina, 20 de outubro de 2022.

À minha família, que desde o início da jornada acadêmica me incentivaram e nunca desistiram de mim, pelo apoio infinito e amor incondicional a todo o momento.

## **AGRADECIMENTOS**

Gratidão é um sentimento de reconhecimento, uma emoção por saber que uma pessoa fez uma boa ação em favor de outra. Sou grata a cada pessoa que passou pela minha vida nesses últimos anos, aprendi muito com cada uma delas e sou grata pelo auxílio, direto ou indireto, nesta jornada.

À Universidade Estadual de Londrina, UEL, por todo acolhimento e infraestrutura para que esse trabalho fosse possível ser realizado. Obrigada a todos os funcionários que com tanta excelência fazem desta universidade um lar.

À CAPES, pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo, permitindo me dedicar à pesquisa.

À minha orientadora Glaura Scantamburlo Alves Fernandes pelo conhecimento, dedicação e alegria. Obrigada por fazer da rotina de laboratório um ambiente mais leve e prazeroso. Com você aprendi a nunca desistir ou desanimar diante de um resultado não esperado, a sempre erguer a cabeça e fazer de novo, e analisar com precisão os resultados encontrados.

Ao meu co-orientador Wellerson Rodrigo Scarano pelo incentivo à pesquisa, pela realização da parte experimental e pelo acolhimento nas análises. Obrigada por todo conhecimento. Agradeço também ao pessoal do laboratório pelas risadas e conversas inspiradoras.

À coordenadora do curso de Patologia Experimental, Profa Dra Flávia Alessandra Guarnier por toda dedicação e excelência em resolver os problemas e dilemas dos alunos.

À banca examinadora composta pelo aceite do convite para me avaliarem, por toda a atenção e carinho em ler meu trabalho e contribuir grandemente com ele, pelo apoio e ensinamento.

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução, obrigada pelo apoio emocional, por escutar quando estava em crise e por auxiliar em todos os passos do doutorado.

Aos professores do Programa de Patologia Experimental pela excelência em ensinar e transmitir todo o conhecimento para que fosse possível receber esse título.

Aos meus amigos, obrigada por me atuarem de bom e mal humor durante essa jornada, vocês mantiveram minha sanidade e minha psicologia íntegra. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelos conselhos e pelos desabafos durante o curso.

Ao meu marido Giovane pelo carinho, amor e companheirismo em todos os momentos. Obrigada por me apoiar e estar presente nos momentos difíceis e me acolher nos momentos de tristeza. Obrigada por me alegrar com suas piadas e seu

bom humor, além do seu abraço acolhedor sempre. Com certeza, um amor para vida inteira, uma amizade eterna e um companheiro para minha jornada.

Principalmente, aos meus pais, por se dedicarem com tanta firmeza nesses 4 anos de doutorado e me ajudarem a concretizar minha jornada acadêmica. Sem o apoio, amor incondicional e educação de vocês nada disso seria possível. Obrigada por me abrigarem em meio a tempestade, por escutarem meus desabaços e por me abraçarem quando estava em crise existencial. Agradeço também à minha irmã por estar presente e aturar minha irritação, mesmo quando não estava muito disposta.

Aos meus avós, agradeço pelos conselhos, apoio, ajuda e pelo amor demonstrado em todos os passos dessa jornada. Obrigada por se mostrarem orgulhosos durante toda a minha vida acadêmica, vocês são parte fundamental da minha vida. Aos meus avós Antônio e Anísio, que hoje estão na presença de Deus, sei que estão felizes por todas as minhas conquistas, obrigada pelo apoio, broncas e carinho, saudades!

“O dia que você acreditar ter atingido todo o seu potencial é o dia que não aconteceu. Por que você ainda tem o HOJE.”

Nick Vujicic

PUNHAGUI-UMBELINO, Ana Paula Franco. **Avaliação transgeracional do efeito da exposição materna a mistura de ftalatos sobre parâmetros testiculares e epididimários de ratos machos pré-púberes e adultos**. 2022. 104 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

Ftalatos são compostos químicos derivados do ácido ftálico em que são utilizados amplamente na indústria para garantir a flexibilidade do plástico, como em utensílios domésticos, cosméticos e brinquedos. Devido ao aumento na utilização de produtos compostos por ftalatos pelo ser humano diversos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos imediatos, tardios e transgeracionais dos ftalatos em animais pré-púberes e adultos, principalmente os efeitos sobre funções reprodutivas. Isto posto, o objetivo do presente estudo é verificar se a mistura de ftalatos é capaz de alterar o desenvolvimento testicular e epididimário de ratos machos em idade neonatal e adulta em duas gerações. Para isso, a mistura contém dietil-ftalato, di-(2-etilhexil)-ftalato, dibutil-ftalato, di-isononil-ftalato, di-isobutil-ftalato, e benzil-butil-ftalato. As fêmeas grávidas da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 4 grupos e doseadas oralmente diariamente de DG10 a DPN21 com óleo de milho (Control:C) ou a mistura de ftalato em três doses (20µg/kg/d:T1; 200µg/kg/d:T2; 200mg/kg/d:T3). Após o período de tratamento, os machos da geração F1 foram submetidos à eutanásia em dois períodos, com DPN22 e DPN120. Os machos F1 com DPN90 foram acasalados com fêmeas não expostas para obtenção da geração F2, em que os machos com DPN22 foram submetidos à eutanásia. Foram coletados ducto deferente, epidídimo, próstata e testículo para dados de peso. Os testículos e epidídimos foram coletados para análise histológica e gênica. A análise histopatológica dos órgãos manteve semelhante entre os grupos, bem como a morfometria testicular de ratos F1 DPN120. No testículo podemos observar aumento de espermatozoides com anormalidade de cabeça na menor dose e alterações nos estágios da dinâmica espermatogênica em todas as doses de ftalato. A contagem de células de Sertoli não teve alteração significativa nos animais F1 DPN22, reduziu nas menores doses nos animais F1 DPN120 e manteve essa redução nas maiores doses nos animais F2 DPN22. A contagem de células de Leydig aumentou nas maiores doses nos animais F1 DPN22, diminuiu nos animais F1 DPN120 e não teve alteração nos animais F2 DPN22. O diâmetro dos túbulos seminíferos aumentou nos animais de DPN22 em todas as doses de ftalato. O padrão de expressão gênica de *GPR30*, *HSD3B1*, *CYP19A1*, *BCL2* e *PUMA* ficaram praticamente inalterados nos animais F1 DPN22, reduziu nos animais F1 DPN120 e reduziu mais ainda nos animais F2 DPN22. No epidídimo podemos observar remodelamento tecidual na esterologia epididimária, e alteração na expressão gênica de *GPR30*, *GPX3*, *GSR*, *IL10* e *TNFα*. Com isso podemos concluir que a mistura de ftalatos é capaz de causar danos significativos em tecido testicular e epididimário em efeito imediato, tardio e transgeracional.

**Palavra-chave:** ftalatos; transgeracional; testículo; epidídimo.

PUNHAGUI-UMBELINO, Ana Paula Franco. **Transgenerational evaluation of the effect of maternal exposure to mixtures of phthalates on testicular and epididymal parameters of prepuberal and adult male rats**. 2022. 104 p. Thesis (Doctor's Degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

Phthalates are chemical compounds derived from phthalic acid in which they are widely used in industry to ensure the flexibility of plastic, such as in household items, cosmetics and toys. Due to the increase in the use of products composed of phthalates by humans, several studies have been carried out to evaluate the immediate, late and transgenerational effects of phthalates in prepubertal and adult animals, mainly the effects on reproductive functions. That said, the objective of the present study is to verify if the mixture of phthalates is capable of altering the testicular and epididymal development of male rats at neonatal and adult ages in two generations. For this, the mixture contains diethyl-phthalate, di-(2-ethylhexyl)-phthalate, dibutyl-phthalate, diisononyl-phthalate, di-isobutyl-phthalate, and benzyl-butyl-phthalate. Pregnant females of the Sprague-Dawley strain were divided into 4 groups and dosed orally daily from GD10 to PND21 with corn oil (Control:C) or the phthalate mixture in three doses (20µg/kg/d:T1; 200µg/kg /d:T2; 200mg/kg/d:T3). After the treatment period, males of the F1 generation were euthanized in two periods, with PND22 and PND120. F1 males with PND90 were mated with unexposed females to obtain the F2 generation, in which males with PND22 were euthanized. The vas deferens, epididymis, prostate and testis were collected for weight data. The testes and epididymis were collected for histological and genetic analysis. The histopathological analysis of the organs remained similar between the groups, as well as the testicular morphometry of F1 PND120 rats. In the testis, we can observe an increase in spermatozoa with abnormality of the head at the lowest dose and changes in the stages of spermatogenic dynamics at all doses of phthalate. The Sertoli cell count had no significant change in F1 PND22 animals, reduced at lower doses in F1 PND120 animals and maintained this reduction at higher doses in F2 PND22 animals. Leydig cell count increased at higher doses in F1 PND22 animals, decreased in F1 PND120 animals and had no change in F2 PND22 animals. The diameter of the seminiferous tubules increased in the PND22 animals at all phthalate doses. The pattern of gene expression of *GPR30*, *HSD3B1*, *CYP19A1*, *BCL2* and *PUMA* were practically unchanged in F1 PND22 animals, reduced in F1 PND120 animals and further reduced in F2 PND22 animals. In the epididymis we can observe tissue remodeling in epididymal sterology, and alteration in the gene expression of *GPR30*, *GPX3*, *GSR*, *IL10* and *TNFα*. With this we can conclude that the mixture of phthalates is capable of causing significant damage to testicular and epididymal tissue in immediate, late and transgenerational effects.

**Key words:** phthalate; transgeneration; testis; epididymis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Aspecto macroscópico do sistema genital masculino de roedores (adaptado de PEROBELLI, 2012). .....13
- Figura 2** - Esquema representativo do testículo e epidídimo. O testículo está representado com os túbulos seminíferos e a rede testicular. O epidídimo subdivide-se em 3 regiões características (cabeça, corpo e cauda) e o ducto deferente (adaptado de ROBAIRE; HERMO, 1988). .....14
- Figura 3** - Esquema do epitélio germinativo do túbulo seminífero e da área intersticial que circunda o túbulo. Os túbulos seminíferos estão apoiados pela lâmina basal com células mióides contráteis e achatadas. No interstício estão situados vasos sanguíneos e fibroblastos, além das células intersticiais de Leydig. O epitélio possui espermatogônias, espermatócitos (primário e secundário), espermatídes iniciais e tardias que estão localizadas na porção apical às junções oclusivas das células de Sertoli, as quais se projetam da lâmina basal até o lúmen do túbulo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). .....15
- Figura 4** - Ciclo da espermatogênese em ratos. Mostra os diferentes tipos de células germinativas durante cada fase do ciclo. A fase I-VI consiste na fase de maturação da espermatíde tardia (números 15-18), a fase de VII-VIII consiste na fase de espermiacão, em que as espermatídes tardias (número 19) se tornam espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero e as espermatídes imaturas (números 7 e 8) estão de diferenciando em novas espermatídes tardias; a fase IX-XIII é caracterizada pela continuidade da diferenciação das espermatídes imaturas (números 9-13) e pela ausência de espermatozoide no lúmen; a fase XIV é caracterizada pela divisão meiótica nas espermatogônias e nos espermatócitos para completar o epitélio germinativo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). .....16
- Figura 5** - Representação esquemática do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular e a ação hormonal em feedback. O FSH atua sobre as

células de Sertoli, presente nos túbulos seminíferos, e o LH atua sobre as células de Leydig estimulando a liberação de testosterona que atua também sobre as células de Sertoli (adaptado de SHARMA; AGARWAL, 2013).....18

- Figura 6 -** Organização esquemática da maioria dos tipos celulares do epidídimo observadas em microscópio de luz. Os três compartimentos epididimários possuem distribuição relativa de cada tipo celular ilustrada. As funções principais de cada tipo celular está especificado logo abaixo do nome da célula (adaptado de ROBAIRE; HINTON, 2015) .....19
- Figura 7 -** Desenvolvimento do trato genital masculino de ratos durante o período gestacional e pós-natal (ZAMBRANO et al., 2014; traduzido) .....22
- Figura 8 -** Formação de progesterona (HSD3B1) a partir de colesterol com conversão por enzima aromatase (CYP19A1) a estrógeno e testosterona em humanos (traduzido de MENG et al., 2017). .....31
- Figura 9 -** Esquema da ação potencial do estrogênio no epitélio dos ductos eferentes e no epidídimo (JOSEPH; SHUR; HESS, 2011). .....32
- Figura 10 -** Via intrínseca e extrínseca de ativação e inibição da apoptose por ação do gene PUMA e BCL-2 (traduzido de ZHANG; LI; XU, 2013).....34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHT	diidrotestosterona
ABP	proteína de ligação a andrógenos
BHT	barreira hemato-testicular
A1, A2, A3, A4	espermatogônias tipo A diferenciadas
FSH	hormônio folículo estimulante
LH	hormônio luteinizante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
ERRO	espécie reativa de oxigênio
BHE	barreira hemato-epididimária
pH	potencial hidrogeniônico
APE	antígeno prostático específico
DPN	dias pós-natal
DOHaD	Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença
DE	desreguladores endócrinos
PVC	cloreto de polivinila
DBP	dibutil ftalato
DMP	dimetil ftalato
DEP	dietil ftalato
DiBP	di-isobutil ftalato
DEHP	2-etilhexil ftalato
BBzP	butil-benzil ftalato
DiNP	di-isononil ftalato
DnOP	di-n-octil ftalato
DiDP	di-isodecil ftalato
DAG	distância ano-genital
Star	proteína reguladora aguda da esteroidogênese
AR	receptor de andrógeno
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
DNA	ácido desoxirribonucleico

## SUMÁRIO

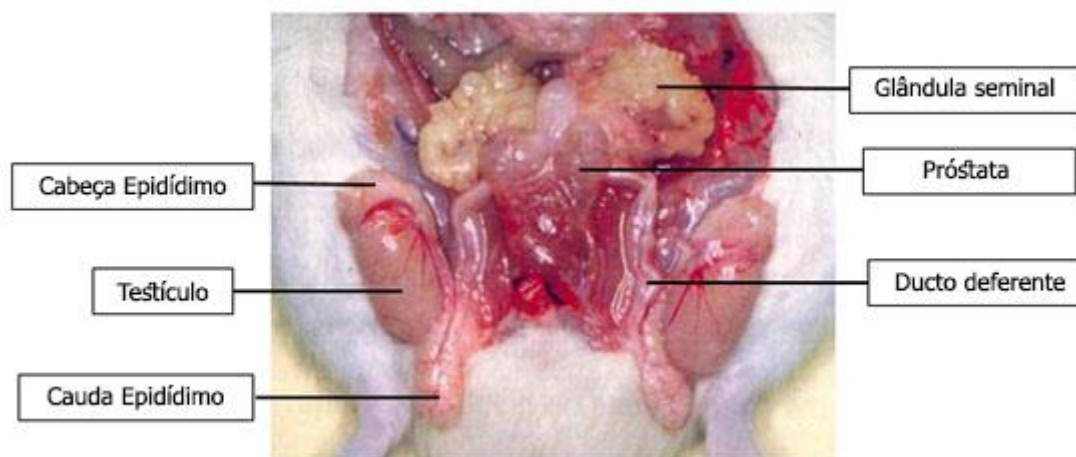
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	SISTEMA GENITAL MASCULINO .....	13
1.2	DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIO .....	22
1.3	FTALATOS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E METABOLISMO .....	25
1.4	FTALATO E REPRODUÇÃO.....	27
1.5	GENÉTICA .....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
3.1	GERAL .....	37
3.2	ESPECÍFICOS.....	37
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>96</b>
	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO</b> .....	<b>97</b>
	<b>ANEXO APROVAÇÃO CEUA</b> .....	<b>104</b>

# 1 INTRODUÇÃO

2

## 3 1.1 SISTEMA GENITAL MASCULINO

4 O sistema genital masculino é composto por testículos, epidídimos,  
5 ductos deferentes, e glândulas sexuais acessórias, como próstata, glândula  
6 seminal (Figura 1), coaguladora, bulbouretral e prepucial. Todos esses órgãos  
7 dependem da ação dos hormônios testosterona e diidrotestosterona (DHT) para  
8 desenvolvimento e manutenção de sua morfologia e função (COSTANZO, 2005).



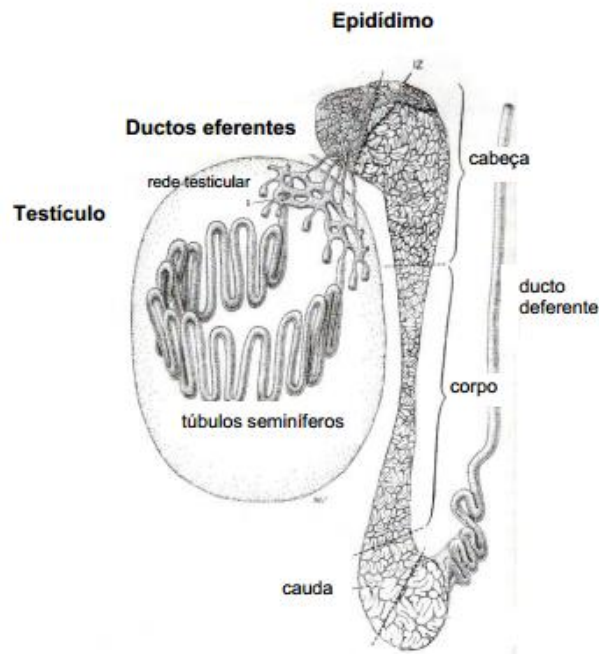
9

10 **Figura 1.** Aspecto macroscópico do sistema genital masculino de roedores  
11 (adaptado de PEROBELLI, 2012).

12 Os testículos possuem duas principais funções: espermatogênese e  
13 produção de testosterona. Ocupam o escroto do animal, fora da cavidade  
14 corpórea, e são mantidos em torno de 34°C. Para manutenção correta da  
15 espermatogênese e esteroidogênese testicular, neste órgão ocorre circulação  
16 contracorrente das artérias e veias testiculares, facilitando a troca de calor  
17 (COSTANZO, 2005).

18 A túnica albugínea é uma cápsula de tecido conjuntivo denso que  
19 envolve os testículos, sendo espessa na região posterior do órgão, formando o  
20 mediastino do qual partem septos fibrosos em sentido radial dividindo o  
21 parênquima testicular em lóbulos piramidais e lóbulos ocupados pelos túbulos  
22 seminíferos, cuja função é a produção de espermatozoides (JUNQUEIRA;  
23 CARNEIRO, 2004). O parênquima testicular de ratos e camundongos é formado  
24 por um conjunto de 20 túbulos seminíferos, em média, que apresenta pouco

1 tecido conjuntivo e isento de lóbulos. Ao final de cada túbulo seminífero existe  
 2 uma região de transição que conectam os túbulos formando a rede testicular  
 3 (Figura 2) (FOLEY, 2001).

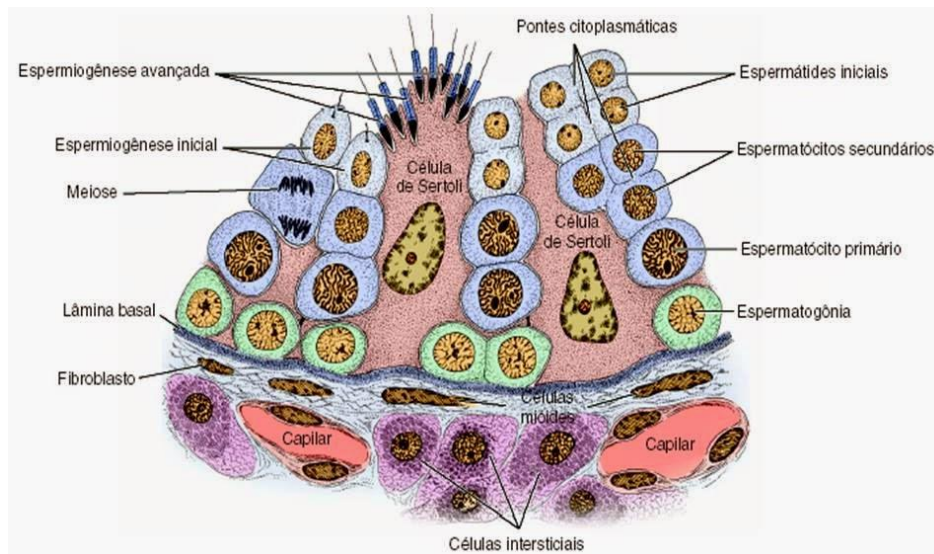


4

5 **Figura 2.** Esquema representativo do testículo e epidídimo. O testículo está  
 6 representado com os túbulos seminíferos e a rede testicular. O epidídimo  
 7 subdivide-se em 3 regiões características (cabeça, corpo e cauda) e o ducto  
 8 deferente (adaptado de ROBAIRE; HERMO, 1988).

9 O epitélio germinativo dos túbulos seminíferos é formado por células  
 10 de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e  
 11 espermátides) apoiadas no tecido peritubular de revestimento (Figura 3)  
 12 (CLERMONT, 1972). As células somáticas de Sertoli interagem quimicamente  
 13 com células germinativas em desenvolvimento, garantindo a sustentação física  
 14 e nutricional dessas células (FOLEY, 2001), além de secretar proteínas inibina,  
 15 activina e de ligação a andrógenos (ABP), realizar fagocitose de restos celulares  
 16 e do excesso de citoplasma das espermátides durante a espermiogênese,  
 17 garantir uma barreira hemato-testicular (BHT), e secretar fluido testicular rico em  
 18 íons e fatores de crescimento. Além disso, forma dois compartimentos nos  
 19 túbulos seminíferos (basal e adluminal) através da BHT por junções oclusivas  
 20 criando um microambiente favorável ao desenvolvimento das células  
 21 germinativas, protegendo os tipos celulares em estágios mais diferenciados

- 1 (COSTANZO, 2005; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2009; KIERSZENBAUM, 2008;  
2 PINEAU; DUPAIX; JÉGOU, 1999).



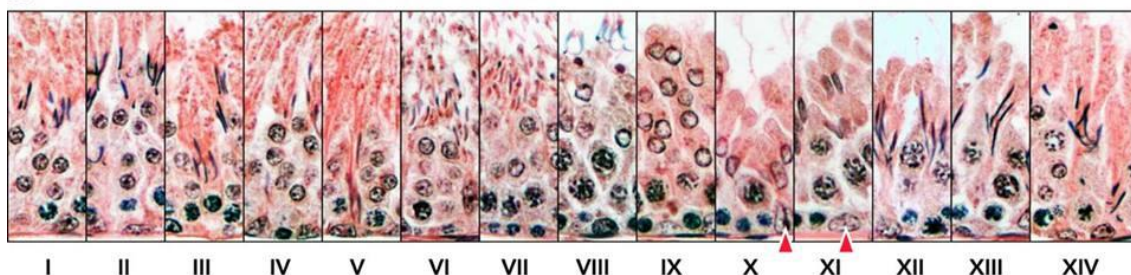
3

4 **Figura 3.** Esquema do epitélio germinativo do túbulo seminífero e da área  
5 intersticial que circunda o túbulo. Os túbulos seminíferos estão apoiados pela  
6 lâmina basal com células mióides contráteis e achatadas. No interstício estão  
7 situados vasos sanguíneos e fibroblastos, além das células intersticiais de  
8 Leydig. O epitélio possui espermatogônias, espermatócitos (primário e  
9 secundário), espermatídeos iniciais e tardias que estão localizadas na porção  
10 apical às junções oclusivas das células de Sertoli, as quais se projetam da lâmina  
11 basal até o lúmen do túbulo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

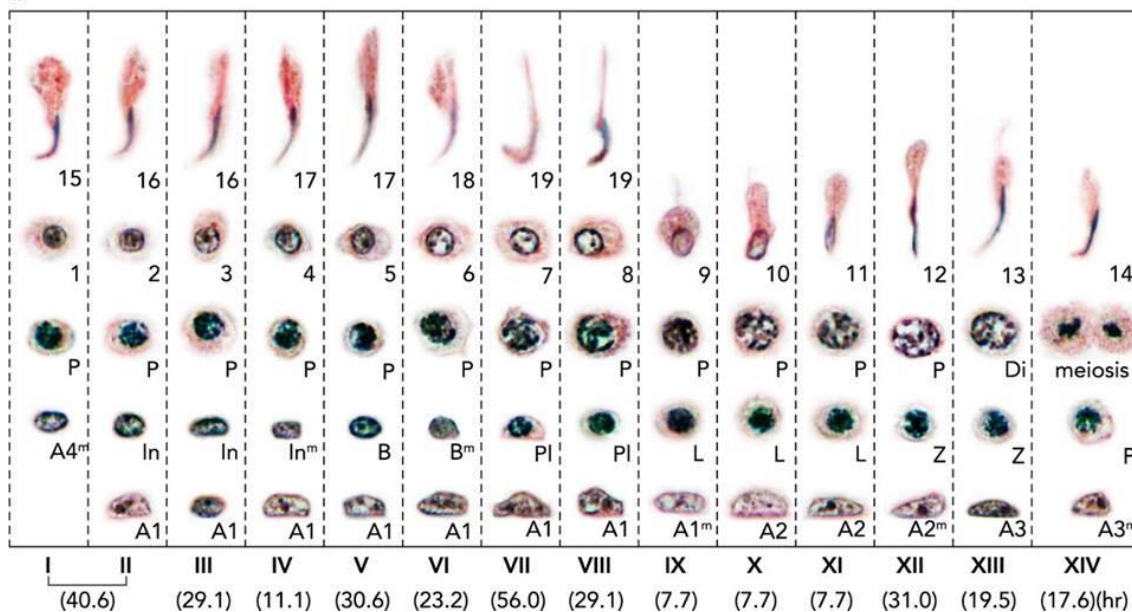
12 O processo de espermatogênese (Figura 4) pode ser dividido em três  
13 fases distintas: proliferativa mitótica, meiótica e diferenciação espermática  
14 (CLERMONT, 1972; RUSSELL et al., 1993). A fase mitótica é caracterizada pela  
15 proliferação das espermatogônias-tronco do tipo A isolada com a finalidade de  
16 aumentar a população espermatogonial, acarretando na origem de diferentes  
17 classes dessas células: tipo A proliferativa (pareada ou alinhada), tipo A  
18 diferenciada (A1, A2, A3, A4), tipo intermediário (In) e tipo B. Parte das  
19 espermatogônias tipo B, que estão ligadas entre si por pontes citoplasmáticas,  
20 iniciam o processo de diferenciação formando os espermatócitos primários  
21 (RAFF; LEVITZKY, 2012; RUSSELL et al., 1993). Na fase meiótica os  
22 espermatócitos primários (diploides) realizam meiose I e originam os  
23 espermatócitos secundários (haploides), que por sua vez sofrem meiose II

1 formando as espermátides iniciais (haploides) (JUNQUEIRA; CARNEIRO,  
 2 2004). Durante a fase de diferenciação espermática, as espermátides iniciais  
 3 passam por um processo de citodiferenciação no qual ocorre condensação do  
 4 material genético, formação do acrossoma, reposicionamento das mitocôndrias,  
 5 perda de citoplasma e formação do flagelo, resultando na formação dos  
 6 espermatozoides (CLERMONT, 1972; RAFF; LEVITZKY, 2012; RUSSELL et al.,  
 7 1993). A duração total da espermatogênese em mamíferos é de  
 8 aproximadamente 30 a 75 dias, sendo baseada em 4,5 ciclos espermáticos  
 9 (SHARPE, 1993)

A



B



10

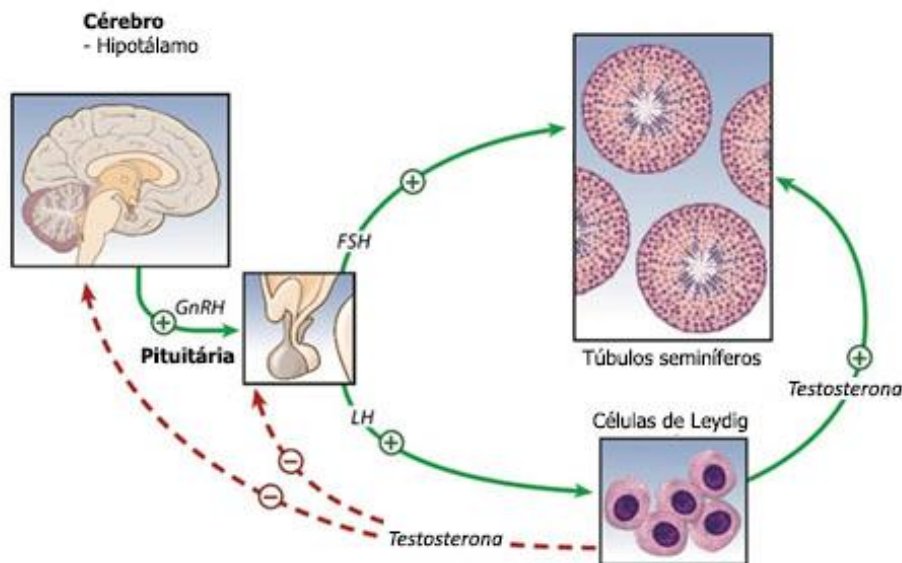
11 **Figura 4.** Ciclo da espermatogênese em ratos. Mostra os diferentes tipos de  
 12 células germinativas durante cada fase do ciclo. A fase I-VI consiste na fase de  
 13 maturação da espermátide tardia (números 15-18), a fase de VII-VIII consiste na  
 14 fase de espermição, em que as espermátides tardias (número 19) se tornam  
 15 espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero e as espermátides imaturas  
 16 (números 7 e 8) estão de diferenciando em novas espermátides tardias; a fase

1 IX-XIII é caracterizada pela continuidade da diferenciação das espermátides  
2 imaturas (números 9-13) e pela ausência de espermatozoide no lúmen; a fase  
3 XIV é caracterizada pela divisão meiótica nas espermatogônias e nos  
4 espermatócitos para completar o epitélio germinativo (JUNQUEIRA;  
5 CARNEIRO, 2004). Figura A: Diferenciação no epitélio germinativo; Figura B:  
6 Diagrama esquemático com as diferenciações celulares. *Legenda:* A =  
7 espermatogônia do tipo A; *In* = estágio intermediário das espermatogônias; B =  
8 espermatogônia do tipo B; *PI* = prófase I; *L* = leptóteno; *Z* = zigóteno; *P* =  
9 paquíteno; *Di* = diplóteno; 1-19 = diferenciação das espermátides iniciais em  
10 tardias.

11 O compartimento intersticial testicular é o compartimento que engloba  
12 a função endócrina do órgão, sendo composto pelas células de Leydig que fazem  
13 a biossíntese de testosterona, macrófagos residentes associados, endotélio e o  
14 espaço linfático testicular (WALKER, 2011). As citocinas e os mediadores  
15 inflamatórios secretados pelos macrófagos residentes são extremamente  
16 importantes para a homeostase fisiológica do interstício testicular,  
17 principalmente para o desenvolvimento e diferenciação das células de Leydig  
18 (HALES, 2002).

19 A regulação da cascata de diferenciação espermatogênica ocorre  
20 através da síntese e secreção de hormônios produzidos pelo eixo hipotalâmico-  
21 hipofisário-testicular (Figura 5). A liberação pela adenohipófise dos hormônios  
22 folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) é induzida pela liberação de  
23 hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. O FSH atua sobre  
24 as células de Leydig estimulando a formação de receptores de LH, além disso,  
25 atua sobre as espermatogônias produzindo uma onda de diferenciação ao longo  
26 do túbulo seminífero de estágios sucessivos da espermatogênese (GARCIA;  
27 FERNÁNDEZ, 2009). O FSH exerce suas funções biológicas sobre a  
28 espermatogênese através do acoplado à proteína-G da membrana plasmática  
29 das células de Sertoli. O LH, por sua vez, atua sobre as células de Leydig para  
30 sintetizar testosterona que exerce seus efeitos biológicos através de receptores  
31 androgênicos (AR) presentes também nas células de Sertoli (RUWANPURA;  
32 MCLACHLAN; MEACHEM, 2010). A testosterona tem efeitos parácrinos,  
33 sustentando a espermatogênese através das células de Sertoli e reforçando a

- 1 ação espermatogênica do FSH, além disso, possui efeitos endócrinos em outros  
2 órgãos como próstata e músculo esquelético (COSTANZO, 2005).



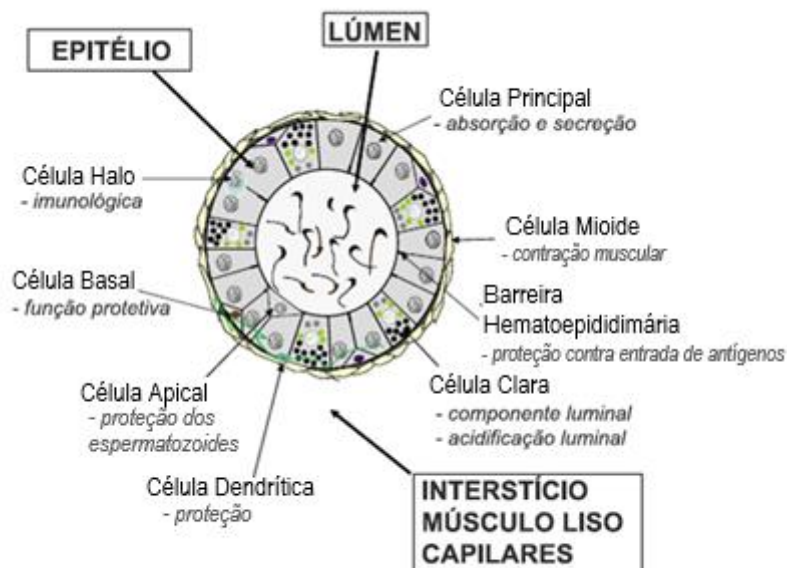
3

- 4 **Figura 5.** Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-testículo e a  
5 ação hormonal em *feedback*. O FSH atua sobre as células de Sertoli, presente  
6 nos túbulos seminíferos, e o LH atua sobre as células de Leydig estimulando a  
7 liberação de testosterona que atua também sobre as células de Sertoli (adaptado  
8 de SHARMA; AGARWAL, 2013)

9 Após a formação dos espermatozoides maduros, estes sofrem o  
10 processo de espermição no lúmen testicular onde são transportados através de  
11 ductos eferentes ao epidídimo, onde ocorre o processo de maturação  
12 espermática funcional (COSTANZO, 2005). O comprimento do ducto  
13 epididimário varia de acordo com a espécie, sendo aproximadamente de 6  
14 metros no humano adulto, 3 metros no rato adulto e 1 metro no camundongo  
15 adulto. Diversos estudos na literatura tem provado que ocorre uma grande  
16 semelhança entre as regiões e tipos celulares entre mamíferos, incluindo o rato,  
17 camundongo e humano (ROBAIRE; HINTON, 2015).

18 Nos roedores, o epidídimo é dividido em segmento inicial, cabeça,  
19 corpo e cauda (ROBAIRE; HINTON, 2015), como mostrado na figura 3. Essas  
20 porções são histologicamente divididas de acordo com a altura do epitélio, e com  
21 a distribuição e quantidade entre os tipos celulares (REID; CLELAND, 1957),

- 1 dentre eles existem as células basais, principais, estreitas, halo, claras e apicais  
 2 (Figura 6) (HERMO; ROBAIRE, 2002).



3

- 4 **Figura 6.** Organização esquemática da maioria dos tipos celulares do epidídimo  
 5 observadas em microscópio de luz. Os três compartimentos epididimários  
 6 possuem distribuição relativa de cada tipo celular ilustrada. As funções principais  
 7 de cada tipo celular estão especificados logo abaixo do nome da célula  
 8 (adaptado de ROBAIRE; HINTON, 2015).

9 Os espermatozoides, ao deixarem o lúmen testicular, possuem sua  
 10 morfologia completa, porém ainda não apresentam motilidade e são incapazes  
 11 de fecundar o ovócito II (DACHEUX; DACHEUX, 2014). A função principal de  
 12 todos os compartimentos do epidídimo é o transporte dos espermatozoides,  
 13 porém, além disso, a região da cabeça possui função sobre a maturação  
 14 espermática, regulando o desenvolvimento da motilidade, a aquisição da  
 15 capacidade de sofrer reação acrossômica e de reconhecer sítios importantes de  
 16 modificações na membrana plasmática dos espermatozoides. Somando a isso,  
 17 o epidídimo protege os espermatozoides de espécies reativas de oxigênio  
 18 (EROs) através da barreira hemato-epididimária (BHE) e faz a estocagem dos  
 19 gametas maduros na região da cauda (COSENTINO; COCKETT, 1986;  
 20 HERMO; ROBAIRE, 2002; GREGORY; CYR, 2014; ROBAIRE; HINTON, 2015)

1 A maturação dos espermatozoides no epidídimo ocorre através da  
2 interação do ambiente epididimário, das células epiteliais, do fluido luminal e dos  
3 espermatozoides (BEDFORD, 1975; ORGEBIN-CHRIST; DANZO; DAVIES,  
4 1975; KEMPINAS; KLINEFELTER, 2010). O processo de maturação consiste em  
5 determinar a qualidade espermática (ROBERTS, 2010), sendo dependente dos  
6 hormônios andrógenos (EZER; ROBAIRE, 2002), ocorrendo através do  
7 remodelamento na membrana do gameta, em que a degradação de  
8 componentes testiculares e integração com componentes secretados pelo  
9 epitélio epididimário e do próprio espermatozoide são cruciais para garantir essa  
10 qualidade (GATTI et al., 2004). Dessa forma o gameta pode adquirir capacidade  
11 funcional (BARRIOS et al., 2005). O microambiente intraluminal possui um  
12 rigoroso controle de atividade secretora e absorviva das células epiteliais  
13 (ROBAIRE; HINTON, 2015).

14 Os gametas permanecem no interior do epidídimo, principalmente  
15 estocados na cauda, em estado quiescente até a ejaculação. Um dos motivos  
16 se deve ao fato do pH ser ácido no ambiente luminal que impede a degradação  
17 das estruturas do espermatozoide (BRETON et al., 1999; PIETREMENT et al.,  
18 2006; ROBAIRE; HINTON, 2015). O fluido luminal do epidídimo contém uma  
19 ampla composição proteica incluindo enzimas, fatores de crescimento, proteínas  
20 de ligação de ferro, proteínas de proteção ao espermatozoide e outras proteínas,  
21 como as lipocalinas e lactoferrina. A composição iônica do fluido epididimário  
22 auxilia no desenvolvimento da motilidade e na manutenção do estado quiescente  
23 dos espermatozoides, sendo composta por concentrações menores de sódio,  
24 cloreto, cálcio e magnésio na região da cabeça, e maiores de fósforo e potássio  
25 quando comparada à composição da cauda (ROBAIRE; HINTON, 2015).

26 Assim como no testículo, no epidídimo a BHE protege os gametas do  
27 sistema imunológico, agentes xenobióticos, EROs, e restringe a passagem de  
28 íons, solutos e macromoléculas, dessa forma garante um microambiente  
29 apropriado para a maturação dos gametas. Os mecanismos de defesa incluem  
30 síntese e secreção de proteínas específicas como as defensinas e antioxidantes,  
31 além de células imunes residentes, como macrófagos, mastócitos e linfócitos  
32 (ROBAIRE; HINTON, 2015).

1 O ducto deferente conecta a porção final da cauda epididimária à  
2 uretra prostática, sendo um tubo muscular revestido internamente por epitélio  
3 pseudoestratificado com células principais, basais, claras e estreitas. Essas  
4 células secretam glicoproteínas e possuem funções de proteção dos  
5 espermatozoides, reabsorvendo fluidos e acidificando o ambiente luminal, sendo  
6 este o término do processo de maturação espermática (KOMÁREK et al., 2000).  
7 O ducto ejaculatório é o segmento do ducto que entra na próstata, possuindo  
8 mucosa semelhante ao ducto deferente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

9 As glândulas sexuais acessórias, como a glândula seminal, próstata,  
10 glândula coaguladora, bulbouretral e prepucial (HASCHEK; ROUSSEAU,  
11 1998), tem por função produzir secreções de nutrição e suporte pós-ejaculação  
12 aos espermatozoides. São dependentes da ação de andrógenos, portanto  
13 refletem qualquer mudança do estado endócrino ou da função testicular (MANN,  
14 1972; CLEGG; PERREAULT; KLINEFELTER, 2001). A secreção da glândula  
15 seminal compõe a maior parte do ejaculado, sendo rica em frutose e  
16 prostaglandinas, e participa do processo de coagulação do ejaculado e  
17 imunoproteção dos espermatozoides (ROBERTS, 2010). A próstata possui uma  
18 secreção líquida alcalina de natureza proteica, sendo rica em zinco, ácido nítrico  
19 e colina, além de conter fosfatase ácida, antígeno prostático específico (APE),  
20 amilase e fibrinolisa (KIERSZENBAUM, 2008; ROBERTS, 2010). O fluido da  
21 glândula bulbouretral neutraliza os vestígios de urina e lubrifica a uretra, sendo  
22 também uma fonte energética para os gametas masculinos (CHUGHTAI et al.,  
23 2005). Por fim, as glândulas prepuciais são glândulas sebáceas modificadas  
24 ricas em óleo que lubrificam a glândula e apresentam ação antibacteriana e  
25 antiviral (HASCHEK; ROUSSEAU, 1998).

26 O pênis é composto pela uretra e três corpos cilíndricos eréteis, sendo  
27 dois corpos cavernosos e outro o corpo esponjoso, localizado na porção ventral  
28 envolvendo a uretra. Toda a estrutura é envolvida por tecido tegumentar. Além  
29 disso, os corpos cavernosos estão envolvidos por tecido conjuntivo denso, túnica  
30 albugínea e o tecido erétil dos corpos eréteis tem espaços separados por fibras  
31 do tecido conjuntivo e células musculares lisas. O processo da ereção é  
32 controlado por impulsos nervosos sobre as artérias e veias da região do pênis.  
33 Dentre os processos envolvidos, os impulsos do sistema nervoso parassimpático

1 causam o relaxamento dos vasos possibilitando o preenchimento dos corpos  
2 cavernosos, produzindo a rigidez do pênis (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3 Os espermatozoides estocados na região da cauda epididimária são  
4 liberados por ação do sistema nervoso simpático pela contração do tecido  
5 muscular, auxiliando na propulsão dos espermatozoides do ducto epididimário  
6 até a saída da uretra, em que os órgãos acessórios são ativados e ocorre a  
7 secreção para a produção do sêmen e a nutrição do espermatozoide  
8 (HASCHEK; ROUSSEAU, 1998).

9

## 10 1.2 DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIO

11 O desenvolvimento sexual em seres humanos finaliza após a  
12 puberdade, inclusive a espermatogênese tem seu desenvolvimento devido a  
13 produção de hormônios nessa fase de desenvolvimento. Em contraponto a isso,  
14 nos ratos o desenvolvimento testicular e epididimário inicia durante o período  
15 embrionário, em que ocorre a abertura dos túbulos seminíferos e epididimário  
16 (MARTY et al., 2003). Segundo a atualização de Sharpe (2010), o  
17 desenvolvimento em roedores do sistema genital masculino pode ser dividido  
18 em: pré-natal (1-7DPN), neonatal (8-21DPN), infantil (22-35DPN), puberdade  
19 (36-55DPN) e adultos, em que cada fase está relacionada à modificações  
20 hormonais. O desenvolvimento das espécies envolve uma sequência de  
21 modificações estruturais e funcionais durante e após o período gestacional  
22 (Figura 7), na qual inclui a maturidade sexual e a suscetibilidade à programação  
23 de tecidos e órgãos (ZAMBRANO, 2009).



24

25 **FIGURA 7** – Desenvolvimento do trato genital masculino de ratos durante o  
26 período gestacional e pós-natal (ZAMBRANO et al., 2014; traduzido)

27

28

O desenvolvimento reprodutivo em animais adultos pode ser afetado por diversas influências ambientais em diferentes estágios de desenvolvimento,

1 visto que as modificações morfofisiológicas dependem de mudanças no eixo  
2 hormonal hipotálamo-hipófise-gônada. Dados experimentais indicam que  
3 distúrbios reprodutivos são influenciados por fatores intrauterinos e exposição  
4 pós natal (DAVIES; NORMAN, 2002).

5 Os hormônios esteroides tem função sobre diversos processos  
6 biológicos em mamíferos, incluindo a capacidade reprodutiva, a reorganização  
7 dos ductos e a produção de células germinativas, sendo eles: progesterona,  
8 estradiol e testosterona, em que mantém o crescimento e função dos tecidos  
9 reprodutivos (ZAMBRANO et al., 2014). A exposição farmacológica incluindo  
10 estrogênio (AMATEAU; MCCARTHY, 2004) e andrógeno (MANIKKAM et al.,  
11 2006; PADMANABHAN et al., 2006) no ambiente fetal impactam a ontogenia de  
12 órgãos-chave, como cérebro (KIM; FOSTER; WOOD, 1999), útero e gônadas  
13 (MANIKKAM et al., 2008), em número e morfologia celular, bem como na  
14 regulação (ativação ou inativação) dos receptores esteroides.

15 Na fase peripuberal ocorrem importantes eventos, tais como: intensa  
16 divisão celular com aumento na proliferação e desenvolvimento das células  
17 germinativas, aumento nos níveis de testosterona e proliferação das células de  
18 Sertoli (SHARPE, 2010). Durante a puberdade ocorrem mudanças no perfil  
19 hormonal, especialmente na síntese e secreção de esteroides em resposta ao  
20 aumento da pulsatilidade do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e ao  
21 aumento da síntese e secreção de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio  
22 folículo estimulante)(OJEDA; SKINNER, 2006).

23 A puberdade é caracterizada por eventos dinâmicos e complexos do  
24 desenvolvimento sexual, com mudanças físicas, comportamentais e hormonais,  
25 através das quais ocorre a aquisição reprodutiva (GOLUB et al., 2008). Tais  
26 modificações são em decorrência de eventos que levam à maturação do eixo  
27 hipotálamo-hipófise-gônada em que ocorre o início do ciclo reprodutivo (OJEDA;  
28 SKINNER, 2006). A definição de puberdade é o período em que se completa o  
29 primeiro ciclo espermatogênico (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2010).

30 O processo de masculinização e diferenciação gonadal é guiado pela  
31 secreção hormonal, principalmente dos níveis de testosterona (HUGHES; DEEB,  
32 2006). No feto humano, a produção de testosterona inicia entre 7 e 8 semanas

1 de gestação, em que o pico desse hormônio ocorre por volta de 12 a 14  
2 semanas, em seguida os níveis de testosterona declinam após 14 semanas  
3 (Prince 2001). Em roedores, a testosterona testicular pode ser detectada em  
4 torno de 15 dias pós-natal, e o pico desse hormônio ocorre em torno de 18 dias  
5 pós-natal (MACLEOD et al., 2010). Essa janela de programação da  
6 masculinização é essencial para a formação de um indivíduo masculino com  
7 características sexuais (MACLEOD et al., 2010; SCOTT et al., 2008), bem como  
8 a diferenciação dos órgãos internos (epidídimo, testículo, próstata, vesícula  
9 seminal e ducto deferente) e a genitália externa (pênis, escroto e períneo), que  
10 inicia no período fetal (GEORGE; WILSON, 1999).

11 A diferenciação sexual do trato genital masculino inicia durante a  
12 gestação e perdura no período perinatal regulado pela diminuição da  
13 aromatização da testosterona para estradiol. A espermatogênese inicia com  
14 aproximadamente 5 dias pós-natal com a diferenciação inicial das  
15 espermatogônias e o desenvolvimento do túbulo seminífero, porém o ciclo  
16 espermático completo tem seu início em torno de 53 dias pós-natal com  
17 aparecimento de espermatozoides no epidídimo com aproximadamente 55 dias  
18 pós-natal (SENGUPTA, 2011).

19 Ratos de 75 DPN apresentam a máxima produção de  
20 espermatozoides nos testículos, e aos 100 DPN tem-se a máxima concentração  
21 de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo, atingindo nesse  
22 período a maturidade sexual plena (ROBB; AMANN; KILLIAN, 1978).

23 Devido ao fato da espermatogênese e a esteroidogênese não estarem  
24 totalmente estabelecidas durante o desenvolvimento sexual, o período  
25 gestacional e neonatal são consideradas fases críticas do desenvolvimento  
26 (JOHNSON et al., 2015); dessa forma, qualquer alteração ou exposição crítica  
27 nesse período pode alterar eventos característicos que ocorrem nesta fase,  
28 podendo acarretar sérios prejuízos e comprometer a formação do  
29 espermatozoide.

30 Isto posto, o objetivo da Origem do Desenvolvimento da Saúde e da  
31 Doença (DOHaD) buscar evidenciar os efeitos de drogas ambientais sobre o  
32 desenvolvimento do ser humano com base em experimentos com modelos

1 animais e *in vitro*, posto que no período de desenvolvimento ocorrem interações  
2 dinâmicas entre o genoma, epigenoma e fatores ambientais frente ao destino  
3 celular, devido a plasticidade fenotípica (BARKER et al., 1989; HO et al., 2017;  
4 ROSENFELD, 2015).

5

### 6 1.3 FTALATOS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E METABOLISMO

7 Segundo a Sociedade de Endocrinologia, os desreguladores  
8 endócrinos (DEs) são moléculas químicas exógenas ou mistura de substâncias  
9 químicas presentes no meio ambiente que são capazes de interferir  
10 negativamente com qualquer mecanismo hormonal (DIAMANTI-KANDARAKIS  
11 et al., 2009), ou seja, essas são substâncias químicas perturbam a homeostase  
12 do organismo e a ligação dos hormônios aos seus receptores. O conhecimento  
13 científico com relação a essas moléculas químicas está bem avançado, visto  
14 que qualquer composto com potencial de alterar ou modificar o mecanismo de  
15 ação do sistema endócrino pode afetar negativamente aspectos reprodutivos,  
16 incluindo biomarcadores de fertilidade e a contagem espermática (ABDOLLAHI  
17 et al., 2004; SIFAKIS et al., 2017).

18 O sistema endócrino tem por função principal a regulação de  
19 importantes função biológicas, tais como o metabolismo, desenvolvimento  
20 cognitivo e sensorial, reprodução e comportamento social. Isto posto, destaca-  
21 se a importância de conhecer quais os efeitos orgânicos e funcionais dos DEs  
22 no organismo (GORE et al., 2015). Com base nesses efeitos, diversos países  
23 restringiram a utilização de DEs devido à extensa utilização em materiais de  
24 consumo industrializados, como a fabricação de plásticos, e o uso de agrotóxicos  
25 na produção agrícola (KNEZ, 2013).

26 Os efeitos adversos dos DEs estão relacionados às concentrações no  
27 ambiente do produto químicos, bem como a lipofilicidade, persistência,  
28 bioacumulação, período e tempo de exposição, e a mecanismos orgânicos de  
29 biotransformação e excreção do organismo, visto que a biotransformação gera  
30 metabólitos ou subprodutos de igual ou maior dano que os compostos originais  
31 (WHO, 2014).

1            Nas últimas décadas tem-se aumentado o consumo de materiais  
2 derivados do plástico, devido ao seu custo barato, durabilidade e versatilidade,  
3 sendo utilizados para conservar alimentos, fornecer benefícios terapêuticos e  
4 outras aplicações médicas e industriais (THOMPSON et al., 2009). Dentre os  
5 compostos químicos utilizados para garantir a maleabilidade dos produtos  
6 plásticos, tem-se os diésteres de ácido 1,2-benzenodicarboxílico, também  
7 chamado de ácido ftálico, comumente conhecido como ftalato, um grupo de  
8 compostos químicos artificiais amplamente utilizado na indústria (HAUSER;  
9 CALAFAT, 2005). Aproximadamente 90% dos produtos industriais de ftalatos  
10 são destinados para uso em plástico PVC (cloreto de polivinila), em que são  
11 utilizados na fabricação de materiais médico-hospitalares e embalagens  
12 comerciais como mamadeiras, brinquedos e garrafas de bebidas  
13 (GERBERDING; FALK, 2002).

14            A molécula química do ftalato apresenta uma ligação molecular  
15 instável e reversível com o material integrante, isto garante maior suscetibilidade  
16 em contaminar o ar, comida e fluidos humanos (HEUDORF; MERSCH-  
17 SUNDERMANN; ANGERER, 2007). No processo de metabolização acontece a  
18 hidrólise, em que ocorre catabolização pelas lipases e esterases no intestino,  
19 principalmente em moléculas de baixo peso molecular; após isso, ocorre a  
20 conjugação por enzimas formando conjugado hidrofílicos de glicuronídeos.  
21 Todos os metabólitos são excretados pelos sistemas urinário e digestório  
22 (MARIANA et al., 2016).

23            Os ftalatos de baixo peso molecular possuem maior incidência de  
24 bioacumulação, como dibutil ftalato (DBP), dimetil ftalato (DMP), dietil ftalato  
25 (DEP) e di-isobutil ftalato (DiBP), sendo utilizados em produtos cosméticos,  
26 lacas, inseticidas e casacos. Enquanto que os ftalatos de alto peso molecular  
27 tem característica de menor bioacumulação biológica, como o 2-etilhexil ftalato  
28 (DEHP), butil-benzil ftalato (BBzP), di-isononil ftalato (DiNP), di-n-octil ftalato  
29 (DnOP) e di-isodecil ftalato (DiDP), sendo amplamente utilizado em materiais de  
30 PVC, impermeáveis, sapatos e dispositivos médicos (MARIANA et al., 2016).

31            Estudos experimentais indicam que os ftalatos DEHP e DBP, podem  
32 induzir alterações negativas no metabolismo e reprodução de animais, indicando  
33 que a fase do desenvolvimento infantil é o período mais crítico de alteração caso

1 o animais seja exposto, sendo a gestação e lactação um exemplo clássico  
2 (LOTTRUP et al., 2006; MARTINO-ANDRADE et al., 2016; MARTINO-  
3 ANDRADE; CHAHOUD, 2010). A fase de desenvolvimento organogênico é o  
4 período mais crítico, visto que simboliza uma fase de maturação e  
5 desenvolvimento de todos os sistemas; porém, não exclui o fato de que a  
6 exposição durante toda a vida do indivíduo pode ocorrer alterações nas  
7 concentrações hormonais ou de outros mecanismos de regulação endócrina,  
8 tornando o indivíduo suscetível ao desenvolvimento de doenças (ROCHA et al.,  
9 2017).

10 A característica lipofílica dos ftalatos aumenta a capacidade de  
11 lixiviação do componente químico, visto que não ocorrem ligações covalentes  
12 entre os ftalatos e a matriz plástica, facilitando o desprendimento e a  
13 contaminação ambiental, sendo otimizado com o calor e solventes orgânicos  
14 (FROMME et al., 2002); conseqüentemente o ser humano irá se contaminar via  
15 ingestão, inalação, absorção tópica ou através de aplicação parentérica,  
16 podendo atingir até a placenta (BAKEN et al., 2019). O primeiro contato com os  
17 ftalato ocorre pela ingestão alimentar devido às características supracitadas,  
18 especialmente em alimentos com alto teor de gordura, ou em formulações  
19 farmacêuticas, como antibióticos, anti-histamínicos e laxantes (LYCHE et al.,  
20 2009).

#### 21 1.4 FTALATO E REPRODUÇÃO

22 Na literatura, o efeito dos ftalatos como desregulador endócrino  
23 avança à medida que há indícios de uma atividade antindrogênica, bem como  
24 atividade agonista e antagonista do hormônio estrógeno (STREET et al., 2018).  
25 Além disso, o DEHP e seus metabólitos têm efeito como mediador do  
26 metabolismo lipídico e adipogênico através da ativação dos receptores, o que  
27 leva a uma contribuição significativa no avanço da obesidade e dislipidemia, em  
28 estudo com camundongo fêmea C3H/N em três doses (0,5, 5 e 500 mg/Kg) por  
29 meio da dieta em duas gerações, sendo a geração F1 exposta durante a  
30 gestação e lactação (SCHMIDT et al., 2012). Sabe-se que o desenvolvimento do  
31 sistema genital possui regulação no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, o que  
32 torna esse período mais suscetível à ação dos ftalatos (LAURETTA et al., 2019).

1 Durante a fase embrionária, o efeito dos ftalatos se torna mais  
2 preocupante, vista às modificações estruturais e orgânicas dos indivíduos em  
3 desenvolvimento, caracterizada por malformações nos órgãos reprodutores  
4 masculino, tanto interno como externos. Diversas alterações já foram descritas,  
5 como a diminuição da distância ano-genital (DAG) (AL-SALEH et al., 2019),  
6 síndrome da disgenesia testicular (SKAKKEBÆK; RAJPERT-DE MEYTS; MAIN,  
7 2001) e a criptorquidia, caracterizando perturbações no sistema genital  
8 masculino (GARDNER; SHOBAC, 2011).

9 Virtanen et al. (2005) utilizando comparação de danos genéticos em  
10 humano com estudos em animais na síndrome da disgenesia testicular, observa  
11 que além do fator genético observado na doença e alterações espermáticas  
12 crônicas, tem-se uma relação positiva com fatores ambientais e de estilo de vida,  
13 em que a exposição fetal a altas doses de dibutil ftalato mostrou causar fenótipo  
14 semelhante à disgenesia em ratos. Em estudos mais avançados com n(dibutil)  
15 ftalato mostraram produção deficiente de andrógenos durante o  
16 desenvolvimento do testículo fetal (SHARPE; SKAKKEBAEK, 2008).

17 A DAG corresponde à distância entre ânus e genitália externa, sendo  
18 relacionada com a atividade androgênica no período fetal durante o  
19 desenvolvimento do sistema genital masculino (ZAREAN et al., 2019). Curi et al.  
20 (2019) utilizando ratas Wistar prenhas expostas ao DiPeP ou ao Di-n-butil ftalato  
21 (0, 125, 250 e 500 mg/Kg/dia) durante a gestação observaram redução dos  
22 níveis de mRNA da expressão de proteínas esteroidogênicas (Star, Cyp11a1,  
23 Cyp17a1, Cyp19a1, Insl3, Ar, Esr1, Esr2 e Gper1) nos testículos fetais,  
24 observaram que a expressão ficou reduzida em diferentes doses bem como a  
25 DAG nos ratos neonatais. Em um estudo com humanos, o mesmo autor realizou  
26 um estudo com mulheres grávidas no primeiro trimestre em que foi dosada a  
27 quantidade de ftalatos na urina, mostrando uma relação inversa entre ftalatos e  
28 DAG (CURI et al., 2019).

29 Durante a gestação, em humanos, ocorre a descida testicular para o  
30 escroto, sendo um processo extremamente regulado por fatores mecânicos e  
31 hormonais (HUTSON et al., 2013). A criptorquidia é a incorreta descida do  
32 testículo, em que a maior causa é a diminuição do hormônio andrógeno durante  
33 o período fetal (GARDNER; SHOBAC, 2011). Quando correlaciona a presença

1 de ftalatos e a criptorquidia em humano, pode-se observar um fator de risco para  
2 defeitos no desenvolvimento (WAGNER-MAHLER et al., 2011).

3 Parabenos são considerados desreguladores endócrinos, assim  
4 como os ftalatos, sendo utilizados na indústria cosmética, farmacêutica e  
5 alimentícia, detectados como contaminantes em fluidos e tecidos. Guerra et al.  
6 (2017) utilizando ratas Wistar prenhas foram tratadas por via subcutânea (10,  
7 100 ou 200 mg/Kg) durante a gestação, e observaram que nas doses utilizadas  
8 não houve perturbação negativa no desenvolvimento sexual e na fertilidade,  
9 porém prejudicou o comportamento sexual, mostrando que maior sensibilidade  
10 dos efeitos no desenvolvimento sexual cerebral.

11 O efeito antiandrogênico dos ftalatos foi observado em estudos com  
12 1106 pacientes homens entre os anos de 2012 e 2016 da população  
13 dinarquesa com idade média de 19 anos, em que foram submetidos à doação  
14 de sêmen e sangue, e realização exames como: distância ano-genital, taxa de  
15 Odds e concentração espermática. Autores observaram que homens com menor  
16 DAG possuem maior risco de infertilidade tendo em vista parâmetros de  
17 concentração do esperma e morfologia do espermatozoide, sendo associada tais  
18 alterações com fatores do período gestacional (PRISKORN et al., 2019).

19 Resultados recentes utilizando a mesma mistura de ftalatos do  
20 presente estudo em ratas prenhas Sprague-Dawley tratadas via gavagem (20 µg,  
21 200 µg e 200mg/Kg) durante o período gestacional e lactacional mostrou uma  
22 diminuição na DAG, no peso da próstata e nos níveis de testosterona na menor  
23 dose, inclusive um aumento inflamatório nos animais adultos. Outro resultado  
24 observado foi uma desregulação gênica em 120 genes na menor dose, dentre  
25 eles: genes de desenvolvimento, diferenciação e oncogenes (SCARANO et al.,  
26 2019).

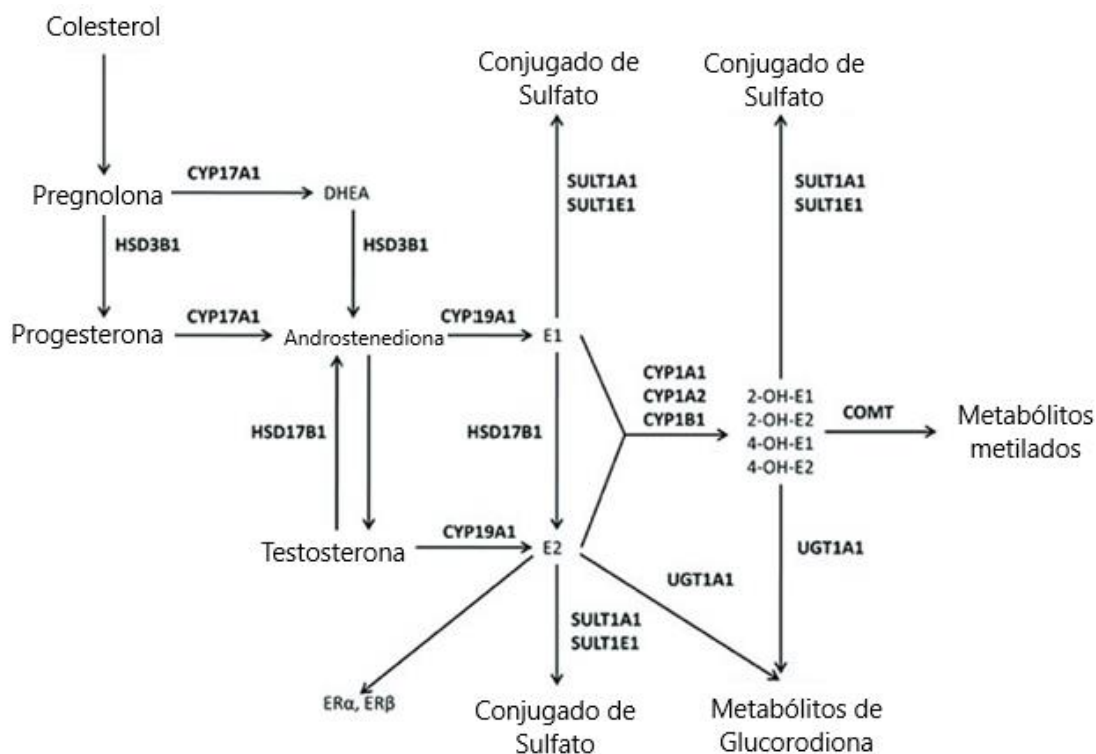
27 Isto posto, pode-se observar que os ftalatos, como desreguladores  
28 endócrinos, têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento masculino e  
29 espermático, tanto em experimentos animais como em humanos, o que sugere  
30 que os ftalatos podem induzir implicações negativas no indivíduo adulto, como a  
31 infertilidade ou deficiências no ejaculado.

## 1.5 EXPRESSÃO GÊNICA

A célula eucariótica é uma unidade morfofuncional que constitui um tecido através da leitura e codificação do material genético pelo processo de diferenciação celular. Durante esse processo, alguns genes reduzem a sua expressão (*downregulation*) enquanto se eleva a expressão (*upregulation*) de genes que são específicos para que esse processo seja eficiente. A determinação celular é uma condição alcançada pela célula no decorrer de sua diferenciação, e somente depois que ela passa por uma série de condições, esta célula terá seu fenótipo definitivo. Esses processos ocorrem no início do desenvolvimento embrionário de mamíferos, no qual uma célula totipotente (zigoto) poderá formar diversos tecidos e órgãos, e dessa forma, formar sistemas orgânicos complexos (PIERCE, 2016).

A determinação sexual envolve quatro etapas: a determinação do sexo cromossômico, que é estabelecida na fertilização; a diferenciação das gônadas em testículos ou em ovários; a diferenciação dos genitais internos e externos masculinos ou femininos a partir de estruturas indiferenciadas presentes no embrião, que é dependente da presença ou ausência de testículos; e a diferenciação sexual secundária, que é a resposta de vários tecidos aos hormônios produzidos pelas gônadas para completar o fenótipo sexual. Todos esses eventos são guiados por múltiplos eventos moleculares que regulam as etapas de migração e diferenciação celular, dessa forma, a célula se torna funcional e responsiva ao estímulo de hormônios androgênicos (MELLO; ASSUMPÇÃO; HACKEL, 2005).

O início da esteroidogênese ocorre através do transporte de colesterol na membrana da mitocôndria por intermédio da proteína StAR (Proteína reguladora aguda da esteroidogênese), com a conversão da aromatase por enzimas da família Cyp (MELLO; ASSUMPÇÃO; HACKEL, 2005). De acordo com GeneCards, a proteína codificada pelo gene *Hsd3b1* é uma enzima que catalisa a conversão oxidativa de precursores delta-5-3-beta-hidroxiesteróides em delta-4-cetoesteróides, levando à produção de todas as classes de hormônios esteróides (NCBI, 2017). Tais enzimas estão expressas no testículo de animais nas células de Leydig, estas responsáveis pela formação e liberação de testosterona, anteriormente citada (Figura 8).



1

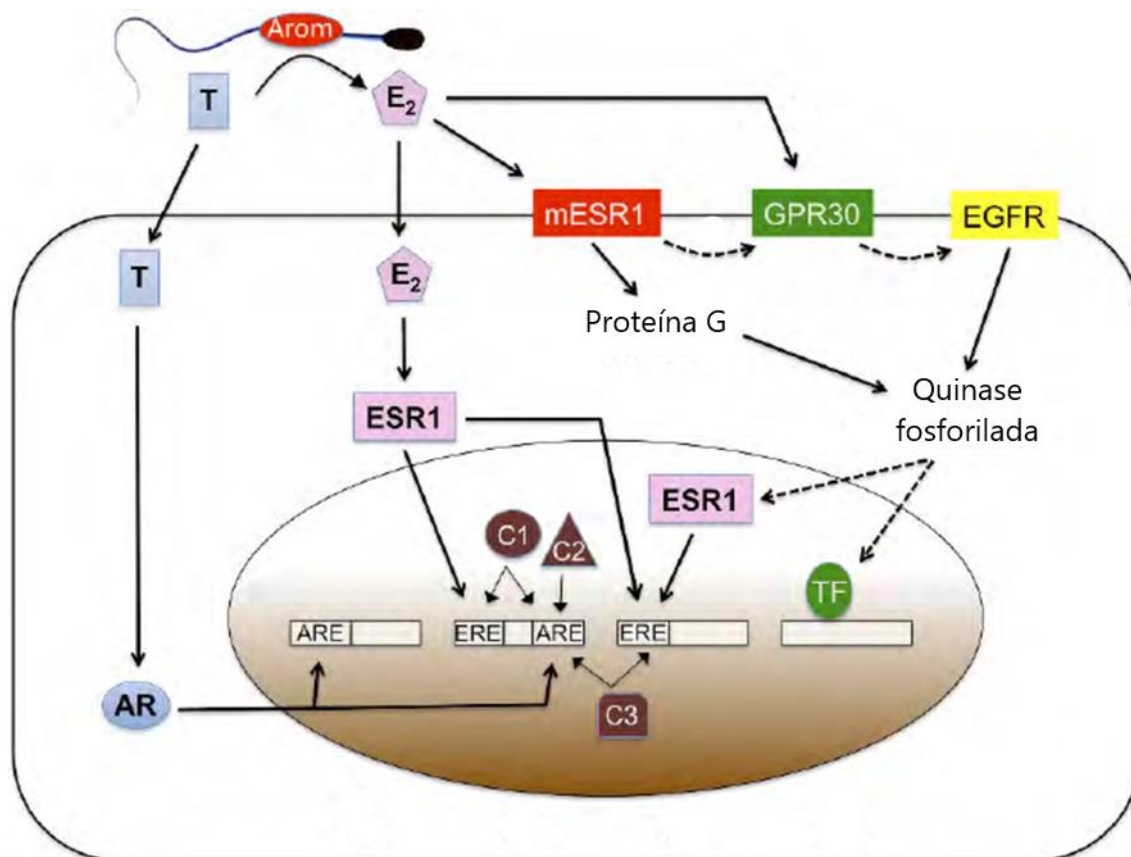
2 **Figura 8.** Formação de progesterona (HSD3B1) a partir de colesterol com  
 3 conversão por enzima aromatase (CYP19A1) a estrógeno e testosterona em  
 4 humanos (traduzido de MENG et al., 2017). *Legenda:* E1, E2 = Estrógeno; ER $\alpha$ ,  
 5 ER $\beta$  = Receptores de estrógeno.

6 Fisiologicamente, hormônios andrógenos e estrógenos atuam no  
 7 crescimento e manutenção de diversos tecidos, incluindo o sistema genital  
 8 masculino, a atuação desses hormônios ocorrem através de um único receptor  
 9 androgênico (AR) que medeia a ação androgênica e os efeitos dos estrogênios  
 10 no organismo, em que a estrutura desses receptores são semelhantes e  
 11 membros da família de receptores nucleares que atuam como fatores de  
 12 transcrição induzíveis por ligantes (NAHOUM; BOURGUET, 2007).

13 O gene Gpr30 associado a um receptor acoplado à proteína G atua  
 14 como receptor de estrogênio transmembrana, com um papel importante na  
 15 proliferação e desenvolvimento de células do sistema reprodutor masculino, visto  
 16 que a conformação bioquímica dos hormônios tem a mesma origem e estruturas  
 17 semelhantes. De acordo com estudo de Lu et al. (2016), o testículo e epidídimo  
 18 de ovelhas de até 12 meses de idade tiveram a expressão relativa de mRNA em

1 todas as partes dos dois órgãos e concluíram que com o passar da idade e a  
 2 aproximação com a puberdade tem-se o aumento desse receptor.

3 Outro estudo utilizando epidídimo de ratos da linhagem Brown,  
 4 Sprague-Dawley e Wistar, demonstram em seus resultados a localização  
 5 celular e o padrão de expressão regional do Gper no epidídimo de múltiplas  
 6 linhagens de ratos e em vários estágios de desenvolvimento, tanto no segmento  
 7 inicial da cabeça como na cauda, sendo presente na célula intersticial e na célula  
 8 principal epididimária. Com os resultados pode-se sugerir que o estrogênio  
 9 possui um papel importante na maturação e proteção do espermatozoide, bem  
 10 como uma ação positiva de proteção durante o desenvolvimento celular, além  
 11 da regulação da função adulta do epidídimo (MARTÍNEZ-TRAVERSO; PEARL,  
 12 2015). Como já se sabe, o desenvolvimento, maturação e formação do  
 13 espermatozoide depende da quantidade de hormônios disponível, inclusive o  
 14 testículo e epidídimo precisam estar responsivos à ação destes hormônios para  
 15 que o espermatozoide seja formado, como mostra a Figura 9.



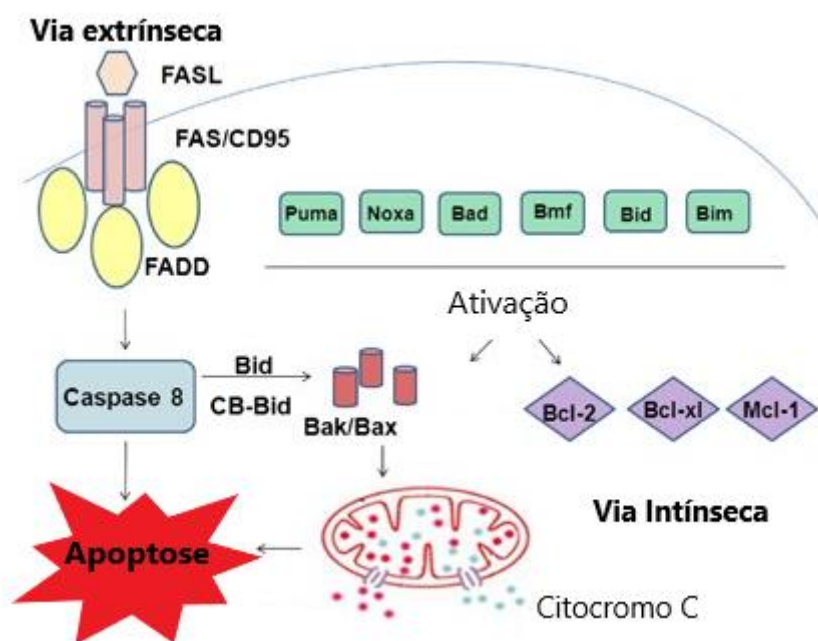
16

17 **Figura 9.** Esquema da ação potencial do estrogênio no epitélio dos ductos  
 18 eferentes e no epidídimo (JOSEPH; SHUR; HESS, 2011). *Legenda:* T =

1 Testosterona; *AR* = Receptor de andrógeno; *E2* = Estrógeno; *EGRF* = Receptor  
 2 do fator de crescimento epidérmico; *ESR1*, *mESR1* = Receptor estrogênico; *C1*,  
 3 *C2* e *C3* = proteínas do complemento; *TF* = Fator de transcrição.

4 A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) é reconhecida  
 5 como uma importante enzima para o metabolismo energético e a produção de  
 6 ATP e piruvato através da glicólise anaeróbica no citoplasma, sendo catalisadora  
 7 de uma das reações glicolíticas e também está envolvida em vários processos  
 8 não glicolíticos, como endocitose, reparo por excisão de DNA e indução de  
 9 apoptose (KURAVSKY et al., 2011). Estudos recentes mostraram que o *GAPDH*  
 10 tem múltiplas funções independentes de seu papel no metabolismo energético  
 11 destacando o papel significativo que essa enzima desempenha na regulação  
 12 tanto da sobrevivência celular quanto da morte apoptótica, estando presente  
 13 tanto em testículos como em epidídimos de mamíferos (NICHOLLS; LI; LIU,  
 14 2012).

15 O gene *BCL-2* codifica uma proteína envolvida no controle do  
 16 processo de apoptose ligado ao citocromo c da mitocôndria através da ativação  
 17 da via das caspases, sendo considerado uma proteína anti-apoptótica  
 18 (DEROSSI et al., 2003); enquanto que o gene *PUMA* (Figura 10) codifica uma  
 19 proteína pró-apoptótica diretamente ativado pelo fator de transcrição *NF-κB* no  
 20 qual contribui com a indução da apoptose pelo *TNF-α* (ZHANG; LI; XU, 2013).



1 **Figura 10.** Via intrínseca e extrínseca de ativação e inibição da apoptose por  
2 ação do gene PUMA e BCL-2 (traduzido de ZHANG; LI; XU, 2013).

3           Todas as células eucarióticas possuem regulação dos mediadores  
4 inflamatórios e do estresse oxidativo, dentre eles a glutathione, que exerce um  
5 papel essencial na proteção dos tecidos através da eliminação de hidroperóxidos  
6 e outras espécies reativas formadas normalmente durante o metabolismo,  
7 controlando os radicais livres de NADPH, sendo uma via de conversão para que  
8 não gere danos oxidativos no tecido (SHAH; KHAN, 2017).

9           Em suma, o metabolismo celular diversos mediadores são requeridos  
10 para que a célula consiga processar a ação de hormônios, utilizar o oxigênio e  
11 produzir energia. Durante a produção de espermatozoides no testículo e  
12 maturação no epidídimo o gasto de energia é grande, visto a necessidade  
13 energética para que haja a formação do gameta. Por isso, faz-se necessário a  
14 investigação de todos os interferentes dentro do metabolismo celular.

## 1 2. JUSTIFICATIVA

2 Durante o desenvolvimento sexual de mamíferos ocorrem  
3 modificações celulares e morfológicas significativas dentro da formação do  
4 sistema genital masculino, em que qualquer perturbação durante o período  
5 gestacional pode acarretar alterações negativas a longo prazo na formação do  
6 espermatozoide. Após o nascimento, durante o período de lactação, a estrutura  
7 do testículo e epidídimo permanece com adaptações fisiológicas para permitir  
8 que o espermatozoide seja viável para fecundar um ovócito secundário. Dessa  
9 forma, a utilização ou a contínua exposição à componentes tóxicos, como os  
10 ftalatos, pode perturbar negativamente a homeostase do organismo, levando a  
11 prejuízos estruturais e fisiológicos no tecido testicular e epididimário.

12 O comportamento alimentar e comercial da população alterou com o  
13 aumento do consumo de produtos industrializados, bem como a utilização de  
14 estabilizantes e conservantes em alimentos altamente processados. A maioria  
15 das embalagens de plástico possui ftalatos em sua composição, visto que este  
16 componente garante a flexibilidade da embalagem. Porém, quando se realiza o  
17 processo de aquecimento ou resfriamento da embalagem, o ftalato se desprende  
18 da embalagem e acaba por contaminar o alimento ou bebida. Autores apontam  
19 que os ftalatos pode ter efeito androgênico mimetizando a ação de hormônios  
20 estrogênicos e androgênicos, e são encontrados na urina de homens e mulheres.  
21 Isto posto, estes compostos químicos durante a gestação e a lactação alteram  
22 negativamente o desenvolvimento regular de órgãos reprodutivos.

23 Dito isso, o presente estudo possui grande aplicabilidade biológica ao  
24 avaliar o efeito transgeracional de uma mistura de ésteres de ftalato na prole de  
25 ratas Sprague-Dawley expostas durante o período gestacional e lactacional. A  
26 prole foi analisada no período pré-púbere (DPN22) e adulto (DPN120) para que  
27 fosse possível verificar o efeito imediato da exposição (F1 22DPN), tardio (F1  
28 120DPN) e transgeracional (F2 22DPN). Diversos estudos na literatura mostram  
29 o efeito de um ou outro tipo de ftalato, mas na indústria e na composição de  
30 utensílios domésticos, por exemplo, são utilizados diversos ftalatos, justificando  
31 a utilização de uma mistura de ftalatos no presente estudo. Dentre eles: dietil-  
32 ftalato, di-(2-etilhexil)-ftalato, dibutil-ftalato, di-isononil-ftalato, di-isobutil-ftalato, e  
33 benzil-butil-ftalato.

1           As doses de efeito foram baseadas em estudos da literatura,  
2 considerando a ingestão via gavagem, e mimetizando a dosagem encontrada na  
3 urina de mulheres grávidas de Illinois (USA) que utilizam produtos com a  
4 composição de ftalatos (ZHOU; FLAWS, 2017). Dessa forma, considerando as  
5 doses de efeito individual de cada ftalato da mistura, estabeleceu-se a dosagem  
6 20 µg/kg/dia, 200 µg/kg/dia e 200 mg/kg/dia, durante a janela de  
7 desenvolvimento sexual do dia gestacional 10 até dia lactacional 21.

8           Com base nisso, o presente estudo tem com justificativa compreender  
9 a ação da mistura de ftalatos sobre o desenvolvimento de testículos e epidídimos  
10 e se essa alteração causou prejuízos significativos em efeito imediato, tardio e  
11 transgeracional na prole de ratas prenhas expostas.

### 1 3. OBJETIVOS

#### 2 3.1 GERAL

3 O objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição materna a uma  
4 mistura de ftalatos foi capaz de alterar os parâmetros testiculares e epididimários  
5 da prole ratos Sprague-Dawley pré-púberes e adultos em duas gerações (F1 e  
6 F2), em efeito imediato (F1 DPN22), tardio (F1 DPN120) e transgeracional (F2  
7 DPN22).

8

#### 9 3.2 ESPECÍFICOS

10 - Compreender a relação entre a mistura de ftalatos sobre a  
11 morfofisiologia testicular através da morfometria, epididimária através da  
12 estereologia e espermática através da morfologia espermática;

13 - Avaliar os aspectos histopatológicos e espermáticos em animais pré-  
14 púberes e adultos através da avaliação de aspecto histológico do tecido;

15 - Analisar a alteração na expressão gênica de genes relacionados à  
16 produção de testosterona (*GPR30*, *HSD3B1* e *CYP19A1*), morte celular (*BCL2*  
17 e *PUMA*), estresse oxidativo (*GPX3* e *GSR*), e inflamação (*IL10* e *TNF $\alpha$* ).

1 **4 ARTIGO 1**

2

3

4

5

6

7

8

9

10 A exposição materna uma mistura de ésteres de ftalato prejudica parâmetros  
11 espermáticos em ratos pré-puberes e adultos em efeito transgeracional.

12

13 Maternal exposure to a mixture of phthalate esters impairs sperm parameters in  
14 prepubertal and adult rats: a transgenerational effect.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28 Artigo submetido à revista "Toxicology"

29 F.I. 2020: 4,22 / Qualis CAPES 2016 (Medicina II): A2

30

1           **Maternal exposure to a mixture of phthalate esters impairs sperm**  
2           **parameters in prepubertal and adult rats: a transgenerational effect.**

3   Ana Paula Franco Punhagui-Umbelino<sup>1,2</sup>; Ariana Musa de Aquino<sup>3</sup>; Barbara  
4   Campos Jorge<sup>3</sup>; Luiz Guilherme Alonso-Costa<sup>3</sup>; Rafaela Pires Erthal<sup>1,2</sup>;  
5   Giovanna Fachetti Frigoli<sup>1</sup>; Arielle Cristina Arena<sup>3</sup>; Wellerson Rodrigo Scarano<sup>3</sup>;  
6   Glaura Scantamburlo Alves Fernandes<sup>1\*</sup>

7   <sup>1</sup> Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of  
8   Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 – Km 380, Campus Universitário,  
9   86057-970, Londrina, PR, Brazil

10   <sup>2</sup> Department of General Pathology, Biological Sciences Center, State University  
11   of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 – Km 380, Campus Universitário,  
12   86057-970, Londrina, PR, Brazil

13   <sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Institute of  
14   Biosciences, Morphology Department, Botucatu, SP, Brazil

15   \*Correspondent author: State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway,  
16   Km 380, Londrina, PN, 86057-970, Brazil. Phone: +55 43 3371-4417. Email:  
17   glaura@uel.br (Glaura Scantamburlo Alves Fernandes)

18

## 1 **Abstract**

2 Exposure to the mixture of phthalate esters causes damage to reproductive  
3 organs such as testis and epididymis, as well as sperm damage during neonatal  
4 and adult development in a uterine and lactational exposure. The aim of the study  
5 is to verify the changes in testis of prepubertal and adult rats of two generations  
6 being indirectly exposed to mixture phthalate. The mixture contains diethyl-  
7 phthalate, di-(2-ethylhexyl)-phthalate, dibutyl-phthalate, di-isononyl-phthalate, di-  
8 isobutyl-phthalate, and benzylbutyl-phthalate. Sprague-Dawley pregnant  
9 females were divided into 4 groups and orally dosed daily from GD10 to PND21  
10 with corn oil (Control:C) or the phthalate mixture at three doses (20µg/kg;  
11 200µg/kg; 200mg/kg). F1 generation animals were euthanized at PND22 and  
12 PND120, where PND90 males were mated with unexposed females to obtain F2  
13 generation, where male rats were euthanized at PND22. Results show  
14 impairment in spermatogenic dynamics of adult rats at all three doses, while  
15 morphometry and histopathology were statistically unchanged. Sperm damage  
16 was evident at lowest dose with increased sperm head damage in PND120.  
17 Sertoli cell count was reduced in lower doses in the F1 PND120 animals and  
18 reduced in the higher doses in F2 PND22 animals, the same relation was found  
19 in the Leydig cell count that increased in the highest doses F1 PND22 animals  
20 and did not change in F2 PND22. *GPR30*, *HSD3B1*, *CYP19A1*, *BCL2* and *PUMA*  
21 genes expression were reduced in testicular tissue in F1 PND120 and F2 PND22  
22 animals in all doses. We conclude that the mixture of phthalates alters and  
23 impairs spermatogenesis and alters the functioning of gene expression  
24 independent of the dose.

25 **Keywords:** Sertoli cell, Leydig cell, *CYP19A1*, spermatozoa.

## 1 **1 Introduction**

2           Phthalates are chemical compounds derived from phthalic acid that  
3 are widely used in industrial products to ensure the flexibility of plastic products  
4 such as housewares and toys (Bošnjir et al., 2003). Due to the large number of  
5 products used by humans, as well as the fact that these compounds detach from  
6 products when heated or cooled, several studies have been conducted to  
7 evaluate the immediate, delayed and trans-generational effects of phthalates on  
8 neonatal, pubertal and adult animals, particularly the effects on reproductive  
9 functions (Fisher, 2004). Some results, using DEHP treatment at 750 mg/kg/day,  
10 show that gestational and lactational exposure to phthalate esters resulted in the  
11 inhibition of testosterone synthesis in fetal and neonatal rats, as well as a  
12 hyperplasia in Leydig cells, which led to a disruption of sexual differentiation  
13 (Parks et al., 2000). Other studies using DEHP phthalate ester doses during  
14 pregnancy were able to observe an increase in leukemia inhibitory factor (LIF)  
15 mRNA levels and testicular testosterone causing alterations in steroidogenic  
16 capacity (Lin et al., 2008). Another alteration found was increased malformations  
17 of the male genital tract, with the presence of seminiferous tubules with cellular  
18 aberrations, in animals DBP treatment at 100 or 500mg/kg/day (Barlow et al.,  
19 2004).

20           Human studies point to a reduction in ano-genital distance in newborn  
21 boys where phthalate mixture concentrations were found in their mothers' urine  
22 (Swan, 2008); others show that testosterone inhibition occurred without alteration  
23 in the Leydig cells, but with positive apoptosis in Sertoli cells and alteration in  
24 spermatogenesis (Desdoits-Lethimonier et al., 2012). In-vitro study using MEHP  
25 phthalate showed no significant change in testosterone levels (Lambrot et al.,

1 2009). Despite contradictory results with humans, there is evidence that  
2 concentrations of mixture phthalate esters in men's urine negatively correlate with  
3 testosterone and estradiol levels (Meeker et al., 2009). The National Health and  
4 Nutrition Examination Survey 1999-2000 published the top seven phthalate  
5 metabolites found in the urine of 2540 participants, being higher in women than  
6 in men (Silva et al., 2004), which corroborates the unprecedented use of the  
7 phthalate mixture in the reproductive development of rats. Another study finds  
8 that younger children have higher exposure to phthalates as well as higher rates  
9 of phthalates in urine than older children (Meeker et al., 2009).

10           Several genes are activated so that the structure of the testis is able  
11 to produce spermatozoa with complete morphology during sexual development  
12 (Mello et al., 2005). The *GPR30* gene encodes a transmembrane protein linked  
13 to G protein that captures estrogen hormone in the membrane of germ cells,  
14 Sertoli and Leydig, facilitating the uptake for the formation of testosterone (Lu et  
15 al., 2016). The *HSD3B1* and *CYP19A1* genes encode enzymes for the  
16 conversion of androsterone to estradiol, which makes testosterone activated and  
17 functional for sperm formation (NCBI, 2017). In view of the guarantee of tissue  
18 homeostasis, the apoptosis process is controlled, especially during sperm  
19 formation, with the anti-apoptotic *BCL2* gene linked to cytochrome C in  
20 mitochondria and the pro-apoptotic *PUMA* gene linked to p53 protein (Derossi et  
21 al., 2003). All these genes facilitate hormone uptake and tissue responsiveness  
22 to sperm morphology.

23           It has been observed that phthalates have a correlation with  
24 spermatogenesis and several antiandrogenic effects in rats and humans,  
25 therefore, it is important to study the clinical, biological and transgenerational

1 effects of phthalate esters on the male reproductive system. Having said that, the  
2 objective of this study is to evaluate testicular parameters of rats exposed to a  
3 mixture of phthalates during gestation and lactation in one generation with direct  
4 exposure (Generation F1) and another generation in an indirect exposure  
5 (Generation F2) to phthalate esters.

6

## 7 **2 Material and Methods**

### 8 *2.1 Animals*

9 Adult males (n=15; 90 days postnatal - PND) and adult females (n=100; PND120)  
10 of the Sprague-Dawley strain from the Multidisciplinary Center for Biological  
11 Research in Laboratory Animal Science (CEMIB/UNICAMP) were kept in the  
12 Small Mammalian Animal Facility of the Morphology Department of IBB/UNESP  
13 under controlled light conditions (12L, 12D photoperiod, lights switched off at 6:00  
14 p. m.) and temperature ( $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) with water and feed *ad libitum*. All  
15 experimental procedures and protocols complied with the Ethical Principles of  
16 Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation,  
17 and were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of  
18 the Biosciences Institute of UNESP de Botucatu (Protocol 1040 / CEUA).

### 19 *2.2 Experimental design*

20 Pregnant female rats were randomly divided into 4 experimental  
21 groups (n=10/group), all treated by gavage: Group 1: control (vehicle: corn oil);  
22 Group 2: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  of the mixture of phthalates diluted in corn oil; Group 3:

1 200µg/kg/day of the mixture of phthalates diluted in corn oil; Group 4:  
2 200mg/kg/day of the mixture of phthalates diluted in corn oil. The mixture of  
3 phthalates was in the following ratio: 19% DEHP (Bis(2-ethylhexyl) phthalate),  
4 36% DEP (Diethylphthalate), 15% DBP (Di-n-butylphthalate), 10% DiBP  
5 (DiisobutylPhthalate), 8% BBzP (Butylbenzylphthalate), and 10% DiNP  
6 (Diisononylphthalate); based on the composition of phthalates detected in urine  
7 samples from pregnant women in Illinois, USA (Zhou and Flaws, 2017).  
8 Treatment in pregnant rats occurred from gestational day 10 (GD10) to postnatal  
9 day 21 (PND21), a critical period for the development of the urogenital apparatus  
10 (Prins and Putz, 2008; Vilamaior et al., 2006). The female rats were kept in  
11 individual cages, being weighed on alternate days for the calculation of the  
12 volume of the phthalate mixture to be administered and the investigation of  
13 clinical signs of toxicity ) (Scarano et al., 2019).

14 **F1 generation:** After PND1, the number of pups was reduced to 8  
15 pups per rat, in a 1:1 ratio between females and males, determined by the ano-  
16 genital distance (AGD) (Welsh et al., 2008). At PND22 5 male rats per group per  
17 litter were anesthetized and euthanized, while the other animals remained until  
18 adulthood (PND 120) to obtain the F2.

19 **F2 generation:** At PND90, 5 male rats from each group (n=20) of the  
20 F1 generation obtained were mated with untreated virgin female rats of the  
21 Sprague-Dawley strain (PND 120), mating being 2 females per male. The F1  
22 generation males were kept until PND 120, then they were anesthetized and  
23 euthanized. F2 offspring were kept until weaning (PND22) and then anesthetized  
24 and euthanized.

1           The testicles of the animals were collected to obtain their weight, as  
2 well as the vas deferens of the adult animals. The right testicle of all animals was  
3 used for histological analyses of morphometry, spermatogenic dynamics,  
4 histopathology, and Sertoli and Leydig cell counts. The left testicle was used for  
5 evaluation of mRNA targets by RT1-PCR, in which it was possible to verify  
6 molecular alterations. The experimental design is summarized in Figure 1

### 7 *2.3 Sperm morphology*

8           The contents of the vas deferens were removed by internal rinsing with  
9 0.3  $\mu$ L of 10% formol saline. Smears on histological slides were prepared from  
10 this solution and observed under a photomicroscope (Opton) at 400X  
11 magnification. One hundred spermatozoa were analyzed per animal.  
12 Morphological analysis was classified into three general categories: normal  
13 morphology, head abnormalities (either a head without characteristic curvature  
14 or an isolated form, i.e., no tail attached) and tail abnormalities (broken, rolled  
15 into a spiral or isolated, i.e., no head attached). This analysis was performed as  
16 described by Punhagui et al. (2016), with minor adaptations.

### 17 *2.4 Histological process*

18           The left testis and the epididymis (5/group) were removed and fixed in  
19 Methacarn (60% Methanol, 30% Chloroform and 10% Glacial Acetic Acid). This  
20 material was then immersed in a few baths (20 min each) of alcohol (95% and  
21 absolute), xylene (40 min) and Paraplast®. The last xylene and Paraplast® baths  
22 were performed in an oven at 65°C, after which the material was sectioned into

1 5 µm semi-serial slices per animal, and stained with hematoxylin and eosin (HE)  
2 (Punhagui et al., 2016).

### 3 *2.4.1 Histopathological analysis of the testis*

4 The testicle tissue was evaluated quantitatively, by counting 200  
5 tubules and classification into normal or abnormal tubules, according to the  
6 presence of immune cells in the epithelium, lumen and interstitial compartment,  
7 and of epithelium vacuolization and inflammatory infiltrate. This analysis was  
8 performed using an Opton microscope (100X and 400X magnification), a light  
9 microscope with four objective lenses (4X, 10X, 40X, and 100x) and an ocular  
10 lens (10X).

### 11 *2.4.2 Seminiferous tubule diameters and seminiferous epithelium height in* 12 *the testis*

13 Ten random testicular cross sections in Stage IX of the seminiferous  
14 epithelium cycle were examined per adult animal. Seminiferous tubule diameters  
15 were measured using an optical light microscope – Opton photomicroscope  
16 (400X magnification), whereas the tubule images were analyzed with BELview  
17 software (version 6.2.3.0 for Windows). Likewise, the seminiferous epithelium  
18 height was measured using the same tubules and methodology mentioned  
19 earlier. The PND22 animals also had the diameter of the seminiferous tubules  
20 measured randomly, since these animals do not yet have spermatogenic kinetics.  
21 The mean of four measures of diameter and height was calculated for each  
22 seminiferous tubule and used in the statistical analysis.

### 23 *2.4.3 Spermatogenic kinetics in the testis*

1           One hundred random tubular sections per adult animal were classified  
2 into four categories: Stages I–VI, VII–VIII, IX–XIII, and XVI of the seminiferous  
3 epithelium cycle, according to Drumond et al. (2011), under a light microscope  
4 (Opton) at 100X and 400X magnification.

#### 5           2.4.4 *Number of Leydig cells*

6           The number of Leydig cell nuclei was counted in 10 random fields of  
7 interstitial tissue in each testis section per rat under a light microscope at 400x  
8 magnification. The Leydig cell morphology was identified according to Erthal et  
9 al. (2020), being polyhedral cells, with spherical or ovoid nucleus.

#### 10          2.4.5 *Number of Sertoli cells*

11          The number of Sertoli cell nuclei was determined in 20 cross-sections  
12 of the seminiferous tubules per testis in each rat, under a light microscope at 400x  
13 magnification (Erthal *et al.*, 2020), being the profile of the triangular core with  
14 recesses. Tubules were counted regardless of spermatogenesis in PND22  
15 animals, while the tubules were counted in phase VII-VIII in PND120 animals,  
16 where spermiation occurs.

#### 17          2.5 *Evaluation of gene expression by Real-Time Polymerase Chain Reaction* 18 *after Reverse Transcription (RT-qPCR): GPR30, CYP19A1, HSD3B1, BCL2 and* 19 *PUMA*

20          Gene expression in testicle cells was evaluated by RT-qPCR related  
21 to cholesterol to testosterone conversion (*GPR30*, *CYP19A1* and *HSD3B1*  
22 *genes*), cell death (*BCL2* gene), and DNA damage (*PUMA* gene). These genes

1 were chosen for their intrinsic relationship with spermatogenesis and  
2 testosterone production. RNA extraction was performed with the Trizol kit  
3 (Ambion, USA) according to the manufacturer's instructions (Table 1). RNA was  
4 quantified by spectrophotometry using the NanoVue equipment (GE Healthcare  
5 Life Sciences, USA). The analysis of RNA quality was obtained by the RNA  
6 integrity number (RNA Integrity Number, RIN), from the analysis of ribosomal  
7 RNAs based on microfluids, using the 2100 Bioanalyzer system (Agilent, USA)  
8 (Becker et al., 2010; Fleige and Pfaffl, 2006). The mRNA Reverse Transcription  
9 Reaction was performed using the High-Capacity RNA-to-cDNA Master Mix kit  
10 (Life Technologies, USA), following the manufacturer's guidelines. For the  
11 reaction, 4  $\mu$ L of Master Mix for reverse transcription was used, to which 1  $\mu$ g of  
12 RNA was added and the volume made up to 20  $\mu$ L with nuclease-free water. The  
13 mixture was incubated under the following conditions: 25 °C for 5 min., 42 °C for  
14 30 min. followed by reverse transcriptase inactivation at 85 °C for 5 min. For each  
15 RT-qPCR reaction for mRNAs, 10  $\mu$ L of GoTaq® qPCR Master Mix, based on  
16 SYBR Green chemistry (Promega, USA), 5  $\mu$ L of the RT reaction and 1  $\mu$ L of  
17 “sense” and “antisense” primers were used at 10  $\mu$ M and the volume was made  
18 up to 20  $\mu$ L with nuclease-free water. Primers for the genes were designed using  
19 the Primer-Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).  
20 Thermocycling was performed in the QuantStudio equipment (Life Technologies,  
21 USA), under the following conditions: GoTag Hot Start Polymerase activation 2  
22 min. at 95°C followed by 40 cycles of 15 sec. at 95°C and 1 min. at 60°C, finally,  
23 a dissociation curve in the range of 60-95°C. An amplification graph was plotted  
24 for each sample showing an increase in fluorescent reporter dye ( $\Delta R_n$ ) in each  
25 PCR cycle. From this graph, the cycle where the reaction crosses the detection

1 threshold (cycle threshold - CT) was determined. The relative quantification of  
2 each gene was performed using the  $2^{-\Delta\Delta}$  CT method according to Livak and  
3 Schmittgen (2001). The values obtained for all samples were normalized by the  
4 ratio obtained between the target genes and the endogenous *GAPDH* gene.

## 5 *2.6 Statistical analysis*

6 One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Dunnett's test,  
7 mean $\pm$ SD, or the non-parametric Kruskal–Wallis test with post hoc Dunn's test  
8 was used, median(Q1-Q3), depending on the data distribution, to compare the  
9 results between the phthalate-treated groups and the control group. The variance  
10 among the experimental groups was compared using Bartlett's test. The Shapiro-  
11 Wilk test was performed to evaluate the normal distribution. When required, the  
12 data were normalized via box-cox transformation. Differences were considered  
13 significant when  $p < 0.05$ . The statistical analyses and graph design for the results  
14 were performed using GraphPad Prism for Windows (version 7.01 – GraphPad  
15 Software, La Jolla, California, USA) and InStat (version 3.01 – GraphPad  
16 Software, La Jolla, California, USA) programs.

17

## 18 **3 Results**

### 19 *3.1 Body and Reproductive organ weight*

20 The body and testis absolute weights were similar among all F1  
21 PND22 groups. The same result occurred with all groups with F1 PND120,  
22 showing statistically similar of body and testis absolute weights. The testis  
23 absolute weight reduces in the F2 PND22 200mg/Kg group and the vas deferens

1 weight increased in the F1 PND120 200 $\mu$ g/Kg of phthalate mixture when compare  
2 with control group (Table 2).

### 3 *3.2 Sperm morphology and histological analysis of the testis*

4 The sperm morphology of PND120 animals (F1 generation) had a  
5 decrease in the amount of normal spermatozoa in the lower dose group  
6 (20 $\mu$ g/Kg), with the abnormality of the head the most common. The other  
7 phthalates-treated groups remained statistically like the control (Table 3).

8 The spermatogenic kinect shows an acceleration in the stage I-VI in  
9 the dose of 200  $\mu$ g/Kg and in the stage XIV in the dose of 20  $\mu$ g/Kg, since there  
10 was a decrease in the seminiferous tubules in these stages when compared to  
11 the control. While, in the higher dose of 200mg/Kg occurred a stagnation of  
12 spermatogenesis in seminiferous tubules in stage IX-XIII, since there was an  
13 increase in the number of tubules at this stage. The seminiferous tubules of all  
14 groups were like each, demonstrating the absence of pathological alterations.  
15 (Table 3).

16 Testicular morphometry had a significant increase in the seminiferous  
17 tubules diameter in all groups treated with the mixture of phthalates in F1 and F2  
18 PND22 animals, while no significant change was observed in adult animals when  
19 compared to the control (Table 4).

20 The Leydig cell count shows an increase in the F1 PND22 animals in  
21 the two highest doses (200  $\mu$ g/Kg and 200mg/Kg), while in the F1 PND120  
22 animals there was a decrease in the count in the same doses. In the F2 PND22

1 animals the count normalized, and all groups remained similar to each other  
2 (Table 4).

3 In Sertoli cell count there was no significant change in F1 PND22  
4 animals, but as adults the F1 PND120 animals had a significant decrease in the  
5 lower doses (20µg/Kg and 200ug/Kg) when compared to the control. The F2  
6 PND22 animals showed a significant decrease in the two highest doses  
7 (200µg/Kg and 200mg/Kg) when compared to the control (Table 4).

### 8 *3.3 Gene expression by RT-qPCR*

9 *GPR30* expression showed no significant change in all doses in F1  
10 PND22 animals, but when these animals reached adulthood (F1 PND120) they  
11 showed a significant reduction in gene expression. This reduction was also  
12 observed in F2 22PND animals at all doses of the phthalate mixture (Figure 2A,  
13 2B, 2C). *HSD3B1* expression followed the same configuration as the *GPR30*  
14 gene, in which there was no change in the F1 PND22 animals and there was a  
15 significant decrease at all doses in the F1 PND120 and F2 PND22 animals  
16 (Figure 2D, 2E, 2F).

17 *CYP19A1* expression was significantly increased only at the highest  
18 dose in F1 22PND animals, while animals treated with the three different doses  
19 of the phthalate mixture decreased gene expression in F1 PND120 and F2  
20 PND22 when compared to the control (Figure 2G, 2H e 2I).

21 *BCL2* expression increased in F1 PND22 animals treated with  
22 200mg/Kg of the phthalate mixture, while in adult animals gene expression  
23 decreased significantly in the two highest doses (200µg/Kg and 200mg/Kg). This

1 decrease also occurred in F2 PND22 animals at all doses of the phthalate mixture  
2 when compared to the control (Figure 2J, 2K, 2L).

3 *PUMA* gene expression was increased in F1 PND22 animals treated  
4 with 200mg/Kg of the phthalate mixture, while F1 PND22 and F2 PND22 animals  
5 had their expression reduced at all doses of the phthalate mixture (Figure 2M,  
6 2N, 2O).

7

#### 8 **4 Discussion**

9 The present study shows a transgenerational relationship of phthalate  
10 testicular damage in animals treated during gestation and lactation exposure to  
11 phthalate esters, it can be affirmed that there was genetic and tissue damage in  
12 pre-pubertal and adult offspring exposed. The tissue damage shows that even  
13 without alterations in the morphometry of the organ or the presence of  
14 pathological damage in the adult animals, there was sperm damage and damage  
15 in the process of spermatogenesis since there were several changes in  
16 spermatogenic dynamics and in the sperm count that functionally sustain sperm  
17 cell differentiation. In the PND22 of both generations, we can infer that testicular  
18 damage was observed with changes in seminiferous tubule diameter and cell  
19 count. Another interesting observation is that the changes in gene expression led  
20 us to understand that the delayed (F1 PND120) and transgenerational (F2  
21 PND22) effect was more damaging to the animals than the immediate effect in  
22 the F1 PND22 offspring, given that genes related to aromatase formation and  
23 release had no change or increased expression, while apoptosis and DNA

1 damage genes had increased expression at the highest dose of the phthalate  
2 ester mixture.

3 Phthalates act as antiandrogenic agents (Fisher, 2004), thus, the  
4 results corroborate by showing changes in gene expression in the process of  
5 converting cholesterol into the active hormone testosterone through *HSD3B1* and  
6 *CYP19A1* genes, in which they were reduced in all doses of phthalate in F1  
7 PND120 and F2 PND22. In view of these structural molecular changes  
8 corroborates with the decrease in serum testosterone levels found at the lowest  
9 dose of the same phthalate mixture in PND22 rats (Scarano et al., 2019). These  
10 findings corroborate the alterations found in the Leydig cell count, being  
11 increased at higher doses of the phthalate mixture in F1 DPN22 animals and  
12 reduced at the same doses in F1 DPN120 animals and stabilizing the number of  
13 cells in transgenerational effect. During the formation of the hormone  
14 testosterone, androsterone is converted to testosterone and then forms the  
15 structure of estradiol by aromatase (Graaf et al., 2004).

16 Alterations in steroidogenesis are of fundamental importance since  
17 sex hormones regulate fetal development. Male sexual differentiation is critically  
18 dependent on testosterone secretion by Leydig cells. Imbalance in androgen  
19 synthesis (or signaling) adversely affects pre- and postnatal sexual development  
20 (Gunnarsson et al., 2008).

21 Previous study from our lab confirm the antiandrogenic action of  
22 phthalates, as there was a reduction in ano-genital distance and in prostate  
23 weight. Oncogenetic and developmental genes were also checked and the data  
24 show changes with increased or decreased expression in immediate or  
25 transgenerational effect in the population(Scarano et al., 2019). The *GPR30* gene

1 is a gene related to the development of the testicular structure cells, it can  
2 observe in the present study that there was no change in gene expression in F1  
3 PND22 animals, but at the end of sexual development the expression decreased  
4 in F1 PND120 animals and remained so in a transgenerational effect in the F2  
5 PND22 animals. With this, we can infer that phthalates can reduce gene  
6 expression in late and transgenerational effects, mimicking the action of  
7 androgenic hormones.

8           During the developmental window it is important to note that any  
9 alteration in gene expression or developmental disruption can lead to systemic  
10 or organic modifications that can lead to organ malfunction in an immediate or  
11 transgenerational effect (Feinberg, 2007; Ho et al., 2017; Rosenfeld, 2015). This  
12 can be proven by the results of the present study in which there was an increase  
13 or decrease in spermatogenesis stages at different doses of the phthalate mixture  
14 in adult animals, however the structure of the organ remained with unchanged  
15 morphometry and absence of pathological alterations. However, the  
16 spermatozoa were sensitive at the lowest dose of the phthalate mixture in which  
17 abnormalities of the head were found.

18           Among the analyses performed we can observe that most of the  
19 testicular alterations found were at the 200 $\mu$ g/Kg dose showing that showing that  
20 phthalates esters have a cytotoxicity in testicular tissue, while higher doses are  
21 metabolized and follow the excretion pathways, since the excess is not absorbed  
22 by the body; studies with other toxic agents such as bisphenol A (Ogo et al., 2017)  
23 and malathion (Erthal et al., 2020) also show marked damage at testicular tissue,  
24 pointing out that environmental and everyday toxics can impair fertility through  
25 different mechanisms of action.

1           The Leydig cells are responsible for producing and releasing the  
2 hormone testosterone in the testicular tissue, this hormone acts on the cells of  
3 the spermatogenic lineage and on the Sertoli cells, ensuring that spermatogenic  
4 differentiation and germinal support occurs, as well as the protection of cells by  
5 the hematotesticular barrier (Golub et al., 2008; Martino-Andrade and Chahoud,  
6 2010). Phthalate caused damage to spermatogenic dynamics due to changes in  
7 Sertoli cell counts and sperm formation, as well as in *GPR30*, *HSD3B1* and  
8 *CYP19A1* genes expression.

9           Sertoli cells proliferate up to two to three weeks after birth within the  
10 testicular structure completion window, being approximately PND21. These cells  
11 present two functional phases: proliferation phase and maturation phase. The  
12 proliferation is controlled by hormones such as FSH and intratesticular  
13 proliferation factors, and is influenced by other estrogenic hormones and genetic  
14 factors (França et al., 2016; Martino-Andrade and Chahoud, 2010). Therefore,  
15 inhibition of the expression of genes controlling cell death (*BCL2* gene) and  
16 activators of apoptosis (*PUMA* gene) lead us to believe that phthalates were able  
17 to induce cell death with a reduction in the number of Sertoli cells throughout  
18 testicular development. in prepubertal animals and with a late effect in adult  
19 animals, in addition to the transgenerational effect causing changes in animals of  
20 the F2 generation.

21

## 22 **5 Conclusion**

23           In conclusion, the mixture of phthalate esters caused significant  
24 damage in the spermatogenesis process as well as in the gene expression of

1 testosterone hormone formation in the apoptosis activation pathway in testicular  
2 cells. Regarding the doses, we can conclude that phthalates had immediate, late  
3 and transgenerational effects in rats, since the damage altered the cellular  
4 structure of the testis, causing a decrease in sperm and genetic quality.

5

## 6 **Acknowledgment**

7 The authors are grateful to CAPES for the scholarship granted to  
8 APFP. WRS received grants from FAPESP (São Paulo State Foundation for  
9 Research Support - process number: 2018/09510-5).

10 The authors declare that there are no conflicts of interest.

11

## 12 **References**

13 Barlow, N.J., McIntyre, B.S., Foster, P.M.D., 2004. Male Reproductive Tract

14 Lesions at 6, 12, and 18 Months of Age Following in Utero Exposure to

15 Di(n-butyl) Phthalate. *Toxicol. Pathol.* 32, 79–90.

16 doi:10.1080/01926230490265894

17 Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., Pfaffl, M.W., 2010. mRNA

18 and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 50, 237–243.

19 doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.010

20 Bošnjir, J., Puntarić, D., Škes, I., Klarić, M., Šimić, S., Zorić, I., 2003. Migration

21 of phthalates from plastic products to model solutions. *Coll. Antropol.* 27,

22 23–30.

- 1 Derossi, D.R., Ito, K., Couto Filho, J.D., Bacchi, C.E., 2003. Bcl-2 protein  
2 expression evaluation in breast cancer: study on fine needle aspirates;  
3 correlation with histologic grade in corresponding surgical material. *J. Bras.*  
4 *Patol. e Med. Lab.* 39. doi:10.1590/S1676-24442003000300010
- 5 Desdoits-Lethimonier, C., Albert, O., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Courant,  
6 F., Lesne, L., Guille, F., Dejucq-Rainsford, N., Jegou, B., 2012. Human  
7 testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum. Reprod.* 27, 1451–  
8 1459. doi:10.1093/humrep/des069
- 9 Drumond, A.L., Meistrich, M.L., Chiarini-Garcia, H., 2011. Spermatogonial  
10 morphology and kinetics during testis development in mice: a high-  
11 resolution light microscopy approach. *Reproduction* 142, 145–155.  
12 doi:10.1530/REP-10-0431
- 13 Erthal, R.P., Staurengo-Ferrari, L., Fattori, V., Luiz, K.G., Cunha, F.Q., Pescim,  
14 R.R., Cecchini, R., Verri, W.A., Guarnier, F.A., Alves Fernandes, G.S.,  
15 2020. Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal  
16 periods impairs testicular and sperm parameters in rats: Role of oxidative  
17 stress and testosterone. *Reprod. Toxicol.* 96, 17–26.  
18 doi:10.1016/j.reprotox.2020.05.013
- 19 Feinberg, A.P., 2007. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human  
20 disease. *Nature* 447, 433–440. doi:10.1038/nature05919
- 21 Fisher, J.S., 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health:  
22 Focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*  
23 127, 305–315. doi:10.1530/rep.1.00025
- 24 Fleige, S., Pfaffl, M.W., 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-

- 1 PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 27, 126–139.  
2 doi:10.1016/j.mam.2005.12.003
- 3 França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C., Griswold, M.D., 2016.  
4 The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*  
5 4, 189–212. doi:10.1111/andr.12165
- 6 Golub, M.S., Collman, G.W., Foster, P.M.D., Kimmel, C.A., Rajpert-De Meyts,  
7 E., Reiter, E.O., Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., 2008. Public  
8 health implications of altered puberty timing. *Pediatrics* 121 Suppl, S218–  
9 S230. doi:10.1542/peds.2007-1813G
- 10 Graaf, L., Brouwers, A.H.P.M., Diemont, W.L., 2004. Is decreased libido  
11 associated with the use of HMG-CoA-reductase inhibitors? *Br. J. Clin.*  
12 *Pharmacol.* 58, 326–328. doi:10.1111/j.1365-2125.2004.02128.x
- 13 Gunnarsson, D., Leffler, P., Ekwurtzel, E., Martinsson, G., Liu, K., Selstam, G.,  
14 2008. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate stimulates basal steroidogenesis by a  
15 cAMP-independent mechanism in mouse gonadal cells of both sexes.  
16 *REPRODUCTION* 135, 693–703. doi:10.1530/REP-07-0460
- 17 Ho, S.-M., Cheong, A., Adgent, M.A., Veevers, J., Suen, A.A., Tam, N.N.C.,  
18 Leung, Y.-K., Jefferson, W.N., Williams, C.J., 2017. Environmental factors,  
19 epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reprod.*  
20 *Toxicol.* 68, 85–104. doi:10.1016/j.reprotox.2016.07.011
- 21 Lambrot, R., Muczynski, V., Lécoreuil, C., Angenard, G., Coffigny, H., Pairault,  
22 C., Moison, D., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2009.  
23 Phthalates Impair Germ Cell Development in the Human Fetal Testis in  
24 Vitro without Change in Testosterone Production. *Environ. Health Perspect.*

- 1 117, 32–37. doi:10.1289/ehp.11146
- 2 Lin, H., Ge, R.-S., Chen, G.-R., Hu, G.-X., Dong, L., Lian, Q.-Q., Hardy, D.O.,  
3 Sottas, C.M., Li, X.-K., Hardy, M.P., 2008. Involvement of testicular growth  
4 factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero.  
5 Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 7218–7222. doi:10.1073/pnas.0709260105
- 6 Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data  
7 Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. Methods 25,  
8 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- 9 Lu, P., Wang, F., Song, X., Liu, Y., Zhang, K., Cao, N., 2016. Relative  
10 abundance of G protein-coupled receptor 30 and localization in testis and  
11 epididymis of sheep at different developmental stages. Anim. Reprod. Sci.  
12 175, 10–17. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.10.002
- 13 Martino-Andrade, A.J., Chahoud, I., 2010. Reproductive toxicity of phthalate  
14 esters. Mol. Nutr. Food Res. 54, 148–157. doi:10.1002/mnfr.200800312
- 15 Meeker, J.D., Calafat, A.M., Hauser, R., 2009. Urinary Metabolites of Di(2-  
16 ethylhexyl) Phthalate Are Associated With Decreased Steroid Hormone  
17 Levels in Adult Men. J. Androl. 30, 287–297.  
18 doi:10.2164/jandrol.108.006403
- 19 Mello, M.P. de, Assumpção, J. de G., Hackel, C., 2005. Genes involved in sex  
20 determination and differentiation. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 49, 14–  
21 25. doi:10.1590/S0004-27302005000100004
- 22 NCBI, 2017. HSD3B1 delta-5-3-beta-hydroxysteroid [WWW Document].  
23 GeneHancer. URL <https://www.genecards.org/cgi->

- 1        bin/carddisp.pl?gene=HSD3B1
- 2        Ogo, F.M., Siervo, G.E., Gonçalves, G.D., Cecchini, R., Guarnier, F.A.,  
3        Anselmo-Franci, J.A., Fernandes, G.S.A., 2017. Low doses of bisphenol A  
4        can impair postnatal testicular development directly, without affecting  
5        hormonal or oxidative stress levels. *Reprod. Fertil. Dev.* 1–10.  
6        doi:10.1071/RD16432
- 7        Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R.,  
8        Barlow, N.J., L. Earl Gray, J., 2000. The Plasticizer Diethylhexyl Phthalate  
9        Induces Malformations by Decreasing Fetal Testosterone Synthesis during  
10       Sexual Differentiation in the Male Rat. *Toxicol. Sci.* 58, 339–349.  
11       doi:10.1093/toxsci/58.2.339
- 12       Prins, G.S., Putz, O., 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate  
13       gland development. *Differentiation* 76, 641–659. doi:10.1111/j.1432-  
14       0436.2008.00277.x.Molecular
- 15       Punhagui, A.P.F., Vieira, H.R., Siervo, G.E.M. de L., Rosa, R. da, Fernandes,  
16       G.S.A., 2016. Ethanol Exposure During Peripubertal Period Increases the  
17       Mast Cell Number and Impairs Meiotic and Spermatic Parameters in Adult  
18       Male Rats. *Microsc. Res. Tech.* 79, 541–549. doi:10.1002/jemt.22664
- 19       Rosenfeld, C.S., 2015. Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of  
20       parental and social behaviors. *Front. Neurosci.* 9.  
21       doi:10.3389/fnins.2015.00057
- 22       Scarano, W.R., Bedrat, A., Alonso-Costa, L.G., Aquino, A.M., Fantinatti, B.E.A.,  
23       Justulin, L.A., Barbisan, L.F., Freire, P.P., Flaws, J.A., Lemos, B., 2019.  
24       Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During

- 1 Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome  
2 Modulation in Rats. *Toxicol. Sci.* 171, 84–97. doi:10.1093/toxsci/kfz141
- 3 Silva, M.J., Barr, D.B., Reidy, J.A., Malek, N.A., Hodge, C.C., Caudill, S.P.,  
4 Brock, J.W., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2004. Urinary levels of seven  
5 phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and  
6 Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ. Health*  
7 *Perspect.* 112, 331–338. doi:10.1289/ehp.6723
- 8 Swan, S.H., 2008. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive  
9 outcomes and other health endpoints in humans. *Environ. Res.* 108, 177–  
10 184. doi:10.1016/j.envres.2008.08.007
- 11 Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., Carvalho, H.F., 2006. Postnatal growth of the  
12 ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study.  
13 *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 885–892.  
14 doi:10.1002/ar.a.20363
- 15 Welsh, M., Saunders, P.T.K., Fiskens, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith,  
16 L.B., Sharpe, R.M., 2008. Identification in rats of a programming window for  
17 reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias  
18 and cryptorchidism. *J. Clin. Invest.* 118, 1479–1490. doi:10.1172/JCI34241
- 19  
20

1 **Figure legends:**

2 **Figure 1.** Experimental design of the present study

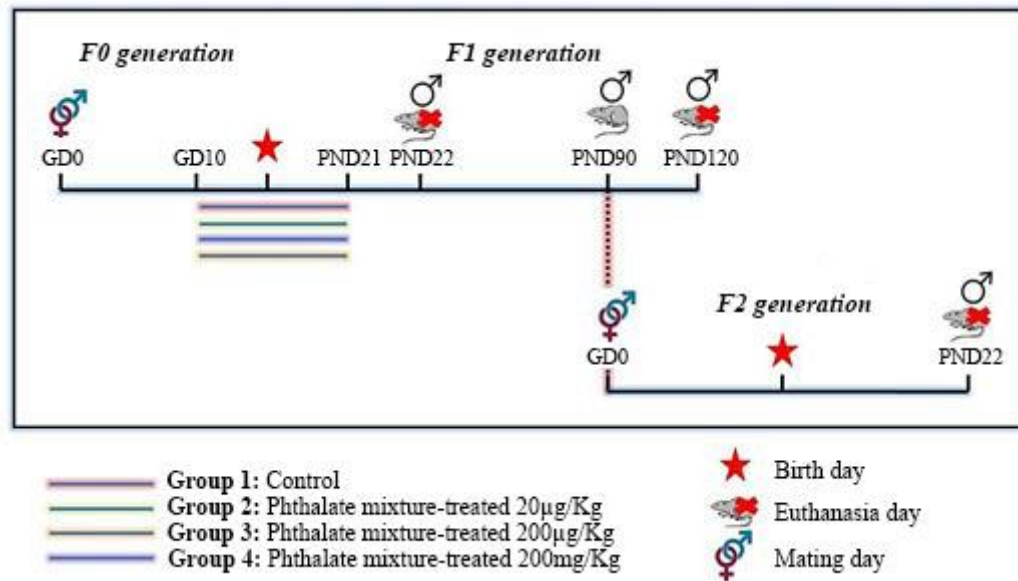
3 *GD* = gestacional day; *PND* = post-natal day

4 **Figure 2.** *GPR30* gene (A, B, C), *HSD3B1* gene (D, E, F), *CYP19A1* gene (G, H,  
5 I), *BCL2* gene (J, K, L) and *PUMA* gene (M, N, O) expression in testicular tissue.

6 Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5); ANOVA One-way test with Dunnett  
7 *post hoc* test. \* Indicate groups that differ statistically from control group (p<0.05).

8

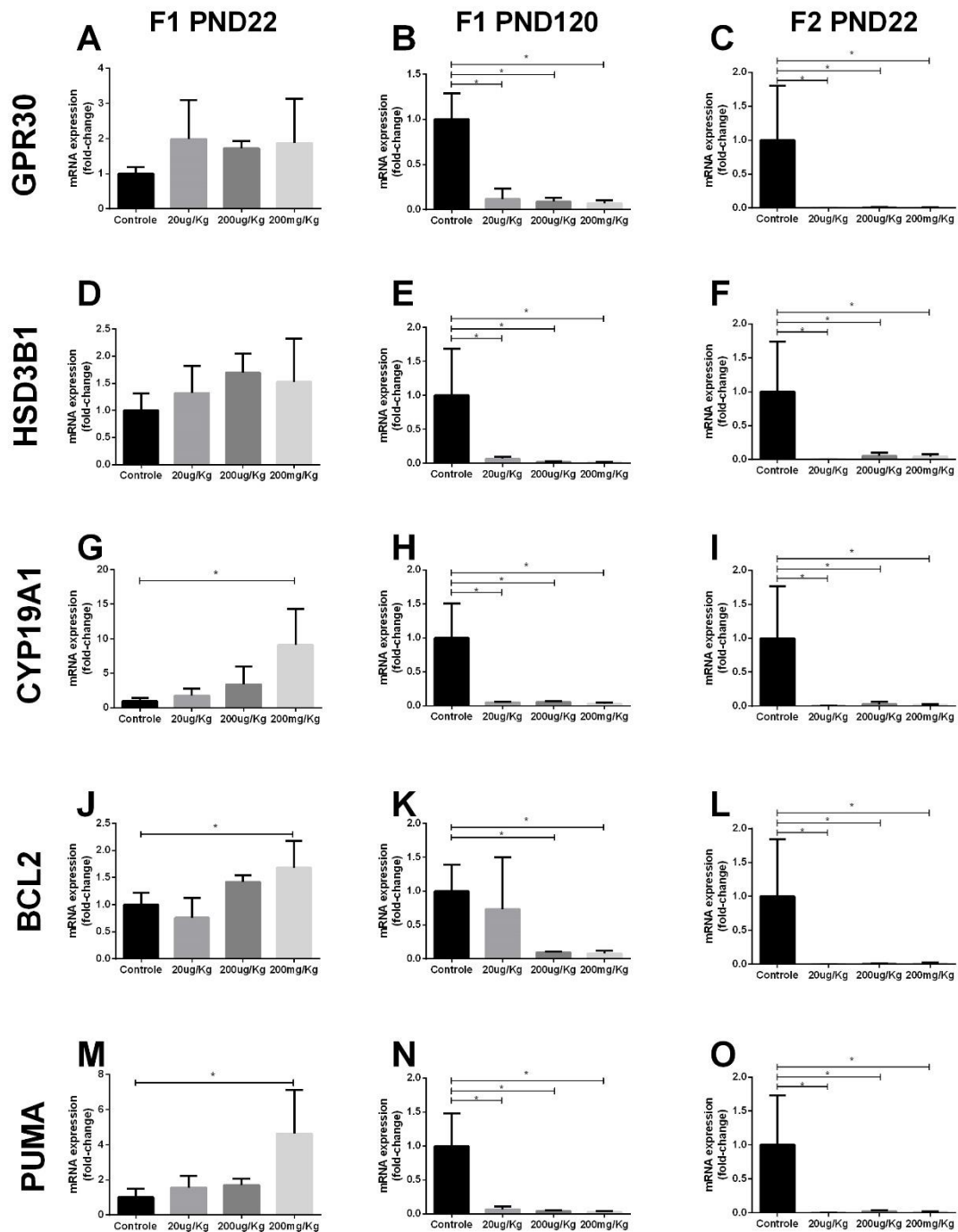
9



1

2 **Figure 1.** Experimental design of the present study3 *GD* = gestacional day; *PND* = post-natal day

4



1

2 **Figure 2.** *GPR30* gene (A, B, C), *HSD3B1* gene (D, E, F), *CYP19A1* gene (G, H,  
3 I), *BCL2* gene (J, K, L) and *PUMA* gene (M, N, O) expression in testicular tissue.

4 Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5); ANOVA One-way test with Dunnett  
5 *post hoc* test. \* Indicate groups that differ statistically from control group (p<0.05).

1 **Table 1.** The target testicular genes and the GAPDH endogenous gene, forward and reverse gene sequence, and the ID number for  
 2 all genes

Gene	ID number	Foward sequence (5'-3')	Reverse sequence (3'-5')
<b>BCL2</b>	NM_016993.1	ACTCTTCAGGGATGGGGTGA	TGACATCTCCCTGTTGACGC
<b>PUMA</b>	NM_173837.2	CAACTAGGTGCCTACACCCG	CAAGGCTGGCAGTCCAGTAT
<b>HSD3B1</b>	NM_001007719.3	TGAACAATTTAGCAGCCCTCC	GGAAACAGATCACAGGCGGA
<b>CYP19A1</b>	NM_017085.2	ATTTTCGCTGAGAGACGTGG	ACTCTGCGATGAGAAGCAACA
<b>GPR30</b>	NM_133573.2	CCTGCCGACTTCGCAAGT	CCACACCGTTCTCTCCTGGAT
<b>Gapdh</b>	NM_017008.4	GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	GAGGCTGGCACTGCACAA

3

1 **Table 2.** Body and organs weight

	Control (n=10)	20µg/Kg (n=10)	200µg/Kg (n=10)	200mg/Kg (n=10)
<b>F1 DPN22</b>				
Body weight (g)	48.760±3.322	48.360±4.525	47.830±3.426	46.460±8.473
Testis weight (g)	0.117±0.015	0.114±0.013	0.124±0.011	0.105±0.020
<b>F1 DPN120</b>				
Body weight (g)	469.7±13.10	432.7±57.86	428.1±24.40	481.3±65.51
Deferens duct weight (g)	0.101±0.012	0.111±0.024	0.120±0.110*	0.108±0.008
Testis weight (g)	1.681±0.116	1.767±0.159	1.731±0.128	1.870±0.137
<b>F2 DPN22</b>				
Body weight (g)	42.18±4.57	41.71±5.33	44.56±6.34	35.56±3.13
Testis weight (g)	0.108±0.013	0.103±0.011	0.122±0.020	0.083±0.019*

2 Mean ± Standard Deviation; ANOVA *post test* Dunnett. \* Indicates groups that differ from the control. It is considered a statistical difference when p<0.05

3

1 **Table 3.** Sperm morphology and Spermatogenic kinetics of F1 120PND animals

	Control (n=6)	20µg/Kg (n=6)	200µg/Kg (n=6)	200mg/Kg (n=6)
<b><sup>A</sup>Spermatogenic kinetics (%)</b>				
Stage I-VI	29.67±3.93	26.40±4.39	20.50±3.20*	26.50±3.39
Stage VII-VIII	37.50±6.18	35.40±4.72	38.33±5.04	32.33±4.67
Stage IX-XIII	26.00±8.14	34.60±5.03	35.00±7.40	36.50±3.93*
Stage XIV	6.83±2.04	3.60±1.14*	6.16±2.63	4.66±1.86
<b>Sperm Morphology (n°)</b>				
<sup>B</sup> Normal Sperm	175.30±5.75	144.90±38.69*	167.60±24.01	159.80±9.45
<sup>A</sup> Head abnormality	3.08±0.22	3.69±0.44*	3.06±0.63	3.57±0.20
<sup>B</sup> Tail abnormality	2.50±2.77	10.86±15.09	7.50±12.41	4.00±2.45

2 Mean ± Standard Deviation; <sup>A</sup>ANOVA *post test* Dunnett, <sup>B</sup>Kruskall-Wallis *post test* Dunn. \* Indicates groups that differ from the control. It is considered a  
3 statistical difference when p<0.05

4

1 **Table 4.** Testicular morphometry, Sertoli cell and Leydig cell count

<b>F1 22PND</b>	<b>Control (n=6)</b>	<b>20µg/Kg (n=6)</b>	<b>200µg/Kg (n=6)</b>	<b>200mg/Kg (n=6)</b>
<sup>A</sup> Sertoli cell(number)	37.73±3.50	40.15±4.67	40.04±4.67	37.70±2.91
<sup>A</sup> Leydig cell (number/mm <sup>2</sup> )	17.70±1.54	16.10±2.18	21.57±2.83*	21.65±2.26*
<sup>A</sup> Seminiferous tubule diameter (µm)	120.10±9.91	129.00±16.31*	129.40±7.93*	129.70±10.85*
<b>F1 120PND</b>	Control	20µg/Kg	200µg/Kg	200mg/Kg
<sup>B</sup> Sertoli cell (number)	21.46±1.89	15.55±0.71*	15.78±1.65*	16.99±1.47
<sup>A</sup> Leydig cell(number/mm <sup>2</sup> )	37.60±5.54	33.80±5.24	29.00±2.93*	28.30±3.91*
<sup>A</sup> Seminiferous tubule diameter (µm)	294.40±21.68	294.70±19.47	285.70±20.59	296.90±19.70
<sup>A</sup> Germinative epithelium height (µm)	84.37±9.65	85.86±8.63	83.41±8.34	87.75±8.38
<b>F2 22PND</b>				
<sup>A</sup> Sertoli cell(number)	36.32±1.88	32.94±1.79	31.50±3.39*	31.41±2.52*
<sup>A</sup> Leydig cell (number/mm <sup>2</sup> )	19.93±2.08	18.67±2.29	18.28±2.74	17.27±2.16
<sup>B</sup> Seminiferous tubule diameter (µm)	134.10±36.71	137.50±6.84*	141.50±9.04*	136.20±11.15*

2 Mean ± Standard Deviation; <sup>A</sup>ANOVA *post test* Dunnett, <sup>B</sup>Kruskall-Wallis *post test* Dunn. \* Indicates groups that differ from the control. It is considered a  
3 statistical difference when p<0.05

1 **5 ARTIGO 2**

2

3

4

5

6

7

8

9

10 Diferentes doses de uma mistura de ésteres de ftalato durante a gestação e  
11 lactação prejudica o tecido epididimário em ratos pré-púberes e adultos: um  
12 estudo transgeracional.

13

14 Different doses of a mixture of phthalate esters during gestation and lactation  
15 impairs epididymal tissue in prepubertal and adult rats: a transgeneral study.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29 Artigo será submetido após o Artigo 1 à revista "Journal of Applied Toxicology"

30 F.I. 2020: 3.446 / Qualis CAPES 2016 (Medicina II): B1

31

1       **Differents doses of a mixture of phthalate esters during gestation and**  
2       **lactation impairs epididymal tissue in prepubertal and adult rats: a**  
3       **transgeneral study.**

4   Ana Paula Franco Punhagui-Umbelino<sup>1,2</sup>, Ariana Musa de Aquino<sup>3</sup>; Barbara  
5   Campos Jorge<sup>3</sup>; Luiz Guilherme Alonso-Costa<sup>3</sup>; Rafaela Pires Erthal<sup>1,2</sup>;  
6   Giovanna Fachetti Frigoli<sup>2</sup>; Arielle Cristina Arena<sup>3</sup>, Wellerson Rodrigo Scarano<sup>3</sup>,  
7   Glaura Scantamburlo Alves Fernandes<sup>1\*</sup>

8   <sup>1</sup> Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of  
9   Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 – Km 380, Campus Universitário,  
10  86057-970, Londrina, PR, Brazil

11  <sup>2</sup> Department of General Pathology, Biological Sciences Center, State University  
12  of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 – Km 380, Campus Universitário,  
13  86057-970, Londrina, PR, Brazil

14  <sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Institute of  
15  Biosciences, Morphology Department, Botucatu, SP, Brazil

16  \*Correspondent author: State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway,  
17  Km 380, Londrina, PR, 86057-970, Brazil. Phone: +55 43 3371-4417. Email:  
18  glaura@uel.br (Glaura Scantamburlo Alves Fernandes)

19

**1 Abstract**

2 Phthalates are chemical compounds used as plasticizers in plastic products,  
3 guaranteeing their flexibility, but the use of this compound causes damage to the  
4 epididymal morphophysiology. The aim is to verify the changes in epididymis of  
5 neonatal and adult rats of two generations. Sprague-Dawley pregnant females  
6 were divided into 4 groups and gavage dosed daily from GD10 to PND21 with  
7 corn oil (Control:C) or the phthalate mixture at three doses (20 µg/kg; 200 µg/kg;  
8 200 mg/kg). F1 generation animals were euthanized at 22PND and 120PND,  
9 where 90PND males were mated with unexposed females to obtain F2  
10 generation, where male rats were euthanized at 22PND. Results showed tissue  
11 remodeling of the compartments at all doses in 22PND animals of both  
12 generations, and that the dose of 200mg/Kg caused alteration, with a decrease  
13 in the epithelium and consequent increase in the lumen in the cauda in F1  
14 PND22. The lumen increased in the caput and cauda, with a reduction only in  
15 interstitium in the cauda at a dose of 200mg/Kg in F2 PND22. The lumen reduced  
16 in the caput and increased in the interstitium at the two highest doses in adult  
17 animals. *GPR30*, *GPX3*, *GSR*, *IL10* and *TNFα* expression was reduced in adult  
18 animals at the highest dose. *GPR30* expression increased at 200mg/Kg dose in  
19 PND22. *TNFα* expression was reduced at all doses in F1 PND22 animals and  
20 significantly increased in F2 PND22 animals at 200ug/Kg and 200mg/Kg doses.  
21 Concluded that phthalates modified the epididymal structure and impaired gene  
22 expression mainly in late effect.

23 **Keywords:** Oxidative stress, Epididymis, PCR, Inflammation.

24

## 1 **1 Introduction**

2           Phthalate ester compounds are used as plasticizers in the industry, as  
3 a guarantee of flexibility and durability of products in order to increase the shelf  
4 life of products, such as: children's toys, car parts, household items, among  
5 others (Bošnjir et al., 2003). Plastic pots and plastic cups as during the heating  
6 and cooling process, phthalates are released and contaminate food and drink  
7 (Fisher, 2004).

8           Studies show harmful changes to reproductive functions in male  
9 humans exposed to phthalates immediately, late and transgenerationally of any  
10 age (Bošnjir et al., 2003; Fisher, 2004). Other studies identify the presence of  
11 phthalate in the blood and urine of pregnant or lactating women, in which it was  
12 possible to detect physiological changes in the newborn, showing the  
13 transgenerational effect (Swan, 2008). Parks et al. (2000) show that male rats  
14 exposed in the gestational and lactational period to phthalate esters had Leydig  
15 cell hyperplasia and sexual differentiation dysfunction, in addition to the animals  
16 showing decreased testosterone synthesis. Other studies point to increased  
17 levels of leukemia inhibitory factor mRNA (LIF) and testicular testosterone with  
18 changes in steroidogenic capacity in male animals exposed to different doses of  
19 phthalate during pregnancy (Lin et al., 2008). Another study shows an increase  
20 in the presence of abnormal seminiferous tubules with cellular aberrations  
21 increasing the rate of male genital tract malformations (Barlow et al., 2004).

22           In-vitro studies using MEHP phthalate observed no change in  
23 testosterone levels in the seminiferous tubules, but with significant changes in  
24 germ cells (Lambrot et al., 2009). Unlike human results that show inhibition of  
25 testosterone, without numerical change in Leydig cells, positive apoptosis in

1 Sertoli cells and unbalance in the proportion of germ cells during  
2 spermatogenesis (Desdoits-Lethimonier et al., 2012).

3 In an experiment with adult male rats using different doses of DBP,  
4 authors show dose-dependent epididymal toxicity with a decrease in glutathione  
5 peroxidase (GSH-Px) and activity of superoxide dismutase (SOD), and an  
6 increase in the level of malondialdehyde (MDA). These authors still show  
7 epididymal tubule atrophy and vascular hyperemia in the epididymal tissue (Zhou  
8 et al., 2011). Epididymal corpus had greater damage to the male reproductive  
9 system (Yurdakok-Dikmen et al., 2019).

10 During the development of the epididymis it is necessary to capture  
11 estrogen through the main and interstitial cells of the organ, through the protein  
12 encoded by the *GPR30* gene, linked to the G protein. and inflammation in the  
13 organ since phthalates have a direct influence on the ionic imbalance in the cell  
14 (Martínez-Traverso and Pearl, 2015). In view of this, we have the *GPX3* and *GSR*  
15 gene with antioxidant action on glutathione, and the *IL10* and *TNF $\alpha$*  gene that  
16 codify pro-inflammatory proteins (Shah and Khan, 2017).

17 That said, phthalates used in any period of life, whether by direct or  
18 indirect action, have a positive correlation with reproductive damage in  
19 spermatogenesis or sperm capacitation with an immediate or transgenerational  
20 effect on development. Thus, the objective of the study is to evaluate epididymal  
21 parameters of rats exposed to a mixture of phthalates during gestation and  
22 lactation in two generations (Generation F1 and F2) to phthalate esters.

## 1 **2 Material and Methods**

### 2 *2.1 Animals*

3           Adult males (n=15; 90 days postnatal - PND) and adult females (n=50;  
4 PND120) of the Sprague-Dawley strain from the Multidisciplinary Center for  
5 Biological Research in Laboratory Animal Science (CEMIB/UNICAMP) were kept  
6 in the Small Mammalian Animal Facility of the Morphology Department of  
7 IBB/UNESP under controlled light conditions (12L, 12D photoperiod, lights  
8 switched off at 6:00 p. m.) and temperature ( $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) with water and feed ad  
9 libitum. All experimental procedures and protocols complied with the Ethical  
10 Principles of Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal  
11 Experimentation, and were approved by the Ethics Committee on the Use of  
12 Animals (CEUA) of the Biosciences Institute of UNESP de Botucatu (Protocol  
13 1040 / CEUA).

### 14 *2.2 Experimental design*

15           Pregnant female rats were randomly divided into 4 experimental  
16 groups (n=10/group), all treated by gavage: Group 1: control (vehicle: corn oil);  
17 Group 2: 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  of the mixture of phthalates diluted in corn oil; Group 3:  
18 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  of the mixture of phthalates diluted in corn oil; Group 4: 200  
19 mg/kg/day of the mixture of phthalates diluted in corn oil. The mixture of  
20 phthalates was in the following ratio: 19% DEHP (Bis(2-ethylhexyl) phthalate),  
21 36% DEP (Diethylphthalate), 15% DBP (Di-n-butylphthalate), 10% DiBP  
22 (Diisobutylphthalate), 8% BBzP (Butylbenzylphthalate), and 10% DiNP  
23 (Diisononylphthalate); based on the composition of phthalates detected in urine

1 samples from pregnant women in Illinois, USA (Zhou and Flaws, 2017).  
2 Treatment in pregnant rats occurred from gestational day 10 (GD10) to postnatal  
3 day 21 (PND21), a critical period for the development of the urogenital apparatus  
4 (Prins and Putz, 2008; Vilamaior et al., 2006). The female rats were kept in  
5 individual cages, being weighed on alternate days for the calculation of the  
6 volume of the phthalate mixture to be administered and the investigation of  
7 clinical signs of toxicity (Scarano et al., 2019).

8           **F1 generation:** After birth, the number of pups was reduced to 8 pups  
9 per rat, in a 1:1 ratio between females and males, determined by the year-genital  
10 distance (AGD) (Welsh et al., 2008). At PND22 5 male rats from each group were  
11 anesthetized and euthanized, while the remaining animals remained until  
12 adulthood (PND 120) to obtain the F2.

13           **F2 generation:** At PND90, 5 male rats from each group (n=20) of the  
14 F1 generation obtained were mated with untreated virgin female rats of the  
15 Sprague-Dawley strain (PND 120) with the same protocol as above. The F1  
16 generation males were kept until PND 120, then they were anesthetized and  
17 euthanized. F2 offspring were kept until weaning (PND22) and then anesthetized  
18 and euthanized.

19           The epididymis of the animals were collected to obtain their weight.  
20 The left epididymis of all animals was used for histological analyses of stereology.  
21 The right epididymis was used for evaluation of mRNA targets by RT1-PCR, in  
22 which it was possible to verify molecular alterations. The experimental design is  
23 summarized in Figure 1.

## 1 *2.3 Histological process*

2           The left epididymis (5/group) were removed and fixed in Methacarn  
3 (60% Methanol, 30% Chloroform and 10% Glacial Acetic Acid). This material was  
4 then immersed in a few baths (20 min each) of alcohol (95% and absolute),  
5 xylene (40 min) and Paraplast®. The last xylene and Paraplast® baths were  
6 performed in an oven at 65°C, after which the material was sectioned into 5 µm  
7 semi-serial slices per animal, and stained with hematoxylin and eosin (HE)  
8 (Punhagui et al., 2016).

### 9 *2.3.1 Epididymal sterology*

10           Ten random epididymal cross-sections from the initial segment 2A and  
11 5A/B regions were obtained per adult animal. The epididymis of neonates were  
12 analyzed without division into regions. This analysis was performed using  
13 Weibel's multipurpose graticulate, with 168 points, to compare the relative  
14 proportion among the epididymal components (epithelium, stroma, and lumen) in  
15 the experimental groups (Punhagui et al., 2016).

## 16 *2.4 Evaluation of gene expression by Real-Time Polymerase Chain Reaction* 17 *after Reverse Transcription (RT-qPCR): GPR30, GPX3, GSR, IL10 and TNF*

18           Gene expression in epididymis cells was evaluated by RT-qPCR  
19 related to testosterone conversion (*GPR30* gene), inflammation (*IL10* and *TNF*  
20 genes), and oxidative stress of glutathione (*GPX3* and *GSR* genes). RNA  
21 extraction was performed with the Trizol kit (Ambion, USA) according to the  
22 manufacturer's instructions. RNA was quantified by spectrophotometry using the  
23 NanoVue equipment (GE Healthcare Life Sciences, USA). The analysis of RNA

1 quality was obtained by the RNA integrity number (RNA Integrity Number, RIN),  
2 from the analysis of ribosomal RNAs based on microfluids, using the 2100  
3 Bioanalyzer system (Agilent, USA) (Becker et al., 2010; Fleige and Pfaffl, 2006).  
4 The mRNA Reverse Transcription Reaction was performed using the High-  
5 Capacity RNA-to-cDNA Master Mix kit (Life Technologies, USA), following the  
6 manufacturer's guidelines. For the reaction, 4  $\mu\text{L}$  of Master Mix for reverse  
7 transcription was used, to which 1  $\mu\text{g}$  of RNA was added and the volume made  
8 up to 20  $\mu\text{L}$  with nuclease-free water. The mixture was incubated under the  
9 following conditions: 25  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min., 42  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min. followed by reverse  
10 transcriptase inactivation at 85  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min. For each RT-qPCR reaction for  
11 mRNAs, 10  $\mu\text{L}$  of GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix, based on SYBR Green chemistry  
12 (Promega, USA), 5  $\mu\text{L}$  of the RT reaction and 1  $\mu\text{L}$  of “sense” and “antisense”  
13 primers were used at 10  $\mu\text{M}$  and the volume was made up to 20  $\mu\text{L}$  with nuclease-  
14 free water. Primers for the genes were designed using the Primer-Blast program  
15 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), present in Table 1.  
16 Thermocycling was performed in the QuantStudio equipment (Life Technologies,  
17 USA), under the following conditions: GoTag Hot Start Polymerase activation 2  
18 min. at 95 $^{\circ}\text{C}$  followed by 40 cycles of 15 sec. at 95 $^{\circ}\text{C}$  and 1 min. at 60 $^{\circ}\text{C}$ , finally,  
19 a dissociation curve in the range of 60-95 $^{\circ}\text{C}$ . An amplification graph was plotted  
20 for each sample showing an increase in fluorescent reporter dye ( $\Delta\text{Rn}$ ) in each  
21 PCR cycle. From this graph, the cycle where the reaction crosses the detection  
22 threshold (cycle threshold - CT) was determined. The relative quantification of  
23 each gene was performed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method according to Livak and  
24 Schmittgen (2001). The values obtained for all samples were normalized by the  
25 ratio obtained between the target genes and the endogenous *GAPDH* gene.

## 1    2.5 *Statistical analysis*

2           One-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Dunnett's test,  
3   mean $\pm$ SD, or the non-parametric Kruskal–Wallis test with post hoc Dunn's test  
4   was used, median(Q1-Q3), depending on the data distribution, to compare the  
5   results between the phthalate-treated groups and the control group. The variance  
6   among the experimental groups was compared using Bartlett's test. The Shapiro-  
7   Wilk test was performed to evaluate the normal distribution. When required, the  
8   data were normalized via box-cox transformation. Differences were considered  
9   significant when  $p < 0.05$ . The statistical analyses and graph design for the results  
10   were performed using GraphPad Prism for Windows (version 7.01 – GraphPad  
11   Software, La Jolla, California, USA) and InStat (version 3.01 – GraphPad  
12   Software, La Jolla, California, USA) programs.

13

## 14    **3 Results**

### 15    3.1 *Body and Reproductive organ weight*

16           The body and absolute epididymis weights were similar among all  
17   groups and animals (Table 2).

### 18    3.2 *Epididymal stereology*

19           The luminal compartment in the caput region increased in F1 PND22  
20   animals at doses of 20ug/Kg and 200ug/Kg, while in the cauda region there was  
21   a decrease in the epithelium and consequent increase in the lumen at the dose  
22   of 200mg/Kg, and an isolated increase in the luminal compartment at a dose of

1 20ug/Kg. In adult animals of the F1 generation, an increase in the interstitium was  
2 observed in the caput region with a consequent decrease in the lumen at doses  
3 of 200ug/Kg and 200mg/Kg, while in the cauda there was an isolated decrease  
4 in the epithelium at the dose of 200ug/Kg (Table 3).

5 In the F2 generation pups, there was an increase in lumen in the caput  
6 at all doses of the phthalate mixture, while in the cauda there was an increase in  
7 lumen at doses of 200ug/Kg and 200mg/Kg, and a consequent decrease in the  
8 interstitial compartment only at the dose of 200mg/kg (Table 3).

### 9 3.3 Gene expression by RT-qPCR

10 GPR30 gene expression was increased in pups in both generations  
11 (Figure 2A and 2C), while it was reduced in adult animals at the same dose of  
12 200mg/Kg (Figure 2B).

13 GPX3 gene expression decreased significantly only in adult animals  
14 at doses of 200ug/Kg and 200mg/Kg (Figure 2E), remaining similar to the control  
15 in puppies (Figure 2D and 2F). Glutathione receptor (GSR) gene expression  
16 decreased in F1 generation animals at doses of 20ug/Kg and 200ug/Kg in pups  
17 (Figure 2G) and only at a dose of 200mg/Kg in adults (Figure 2H), resuming the  
18 similarity between groups in the animals of the F2 generation (Figure 2I).

19 The gene expression of inflammatory mediators such as IL10  
20 decreased in adult animals at a dose of 200mg/Kg (Figure 2K), while the puppies  
21 did not show significant changes (Figure 2J and 2L). TNF $\alpha$  gene expression  
22 decreased at all doses in F1 PND22 animals (Figure 2M), remained reduced only  
23 at the dose of 200mg/Kg in F1 PND120 animals (Figure 2N) and significantly

1 increased at doses of 200ug/Kg and 200mg/Kg in F2 PND22 animals (Figure  
2 2O).

3

#### 4 **4 Discussion**

5           The present study shows that the mixture of phthalate esters harmed  
6 the epididymal tissue, since all doses had different tissue proportions causing  
7 tissue remodeling in immediate, late, and transgenerational effects. In addition,  
8 gene expression was restricted to *GPR30*, *GSR* and *TNF $\alpha$* , showing an oxidative  
9 and inflammatory characteristic of phthalates under the epididymis in PND22  
10 animals, having an increase in *GPR30* gene expression, a decrease in gene  
11 expression *GSR* and a reduction in *TNF $\alpha$*  gene expression in the F1 generation  
12 and an increase in F2. In contrast, in adult animals, only the 200 $\mu$ g dose of  
13 phthalate mixture were able to remodel the epididymal tissue, with an increase in  
14 the interstitial and a decrease in the lumen of the caput region. The epididymal  
15 cauda of these animals showed greater resistance to phthalates actions. Thus,  
16 the study proved that phthalates have a transgenerational effect and that the  
17 blood-epididymal barrier was not able to prevent the damage caused by  
18 phthalates.

19           The male reproductive system has a multitude of receptors so that it  
20 can be responsive to hormonal and metabolic changes in the body, one of the  
21 most important of which is the G protein-coupled receptor 30 (GPR30) (Fisher,  
22 2004). This receptor is a transmembrane protein that acts on the uptake and rapid  
23 effects of estrogen through a nonclassical pathway. Although the action of this  
24 protein on the epididymal tissue is not well defined, animals that showed low

1 regulation of this gene can compromise the structure of the ducts (Joseph et al.,  
2 2011). In this study, the highest dose of the phthalate mixture applied significantly  
3 increased the *GPR30* expression in PND22 animals and decreased the  
4 expression at the same dose in adult animals, relating it to tissue remodeling both  
5 in the head and tail of the epididymis, in addition, after puberty we have the  
6 spermatogenesis cycle and the full functionality of the organ.

7           The prenatal development window is a period in which the formation  
8 of various structures and organs occurs, with their final maturation in the postnatal  
9 period, when the entire genetic code will be read and proteins and receptors will  
10 be formed, therefore, any disturbance to this development can cause  
11 dysfunctions and organic changes in immediate or transgenerational effects  
12 (Feinberg, 2007; Ho et al., 2017; Rosenfeld, 2015). In an excerpt from the same  
13 study, Scarano et al. (2019) showed that reduced genes expression related to  
14 developmental, differentiation, and oncogenesis, induced a decrease in serum  
15 testosterone levels at the lowest dose of the same phthalate mixture in neonatal  
16 rats. In the testis of these animals, it was also possible to observe a decrease in  
17 the gene expression of *CYP19A1* and *HSD3B1* as well as a reduction in the cell  
18 count in neonatal and adult animals (unpublished data Punhagui-Umbelino et al.,  
19 2022). That said, it is observed that the epididymal tissue is also sensitive to the  
20 action of the mixture of phthalate esters since they caused tissue remodeling.

21           Studies with urine samples from pregnant women showed varying  
22 doses of phthalates due to environmental and daily exposure of these women to  
23 products that have phthalates in their composition, in the results the authors point  
24 out that the presence of phthalates in the urine of these women increased the  
25 expression of biomarkers inflammatory and oxidative stress, proving the toxicity

1 of phthalates and the relationship between their presence and increased  
2 inflammation (Van 't Erve et al., 2019). This study corroborates the results found  
3 in the present study, the *GPX3* gene expression did not have an immediate effect  
4 in the F1 PND22, but it reduced in a late glutathione effect in the F1 PND120  
5 animals at 200 $\mu$ g and 200mg doses. In contrast, the *GSR* expression in F1  
6 PND22 animals was reduced at the lowest doses in immediate effect, it was even  
7 lower at the highest dose in adult animals and remained unchanged in the  
8 transgenerational effect. This shows that oxidative stress influences the  
9 generation directly exposed to phthalate, since the exposure was during  
10 pregnancy and lactation through the mothers.

11           Several toxicology studies note that the lowest dose can cause greater  
12 tissue damage, as the body absorbs small amounts of toxicants over time, and  
13 often higher doses are metabolized and most are excreted (Erthal et al., 2020;  
14 Ogo et al., 2017; Scarano et al., 2019). The epididymal tissue has a blood-  
15 epididymal barrier that can guarantee a specialized luminal microenvironment for  
16 sperm maintenance, in which it restricts the passage of ions and  
17 macromolecules, being formed during prenatal development and remodeled at  
18 puberty (Mital et al., 2011; Robaire and Hinton, 2015). That said, the epididymal  
19 tissue of the prepubertal animals was still maturing the blood-epididymal barrier,  
20 which is why all doses of phthalate caused some change in the proportion of  
21 epididymal compartments, but in adult animals in which spermatogenesis is  
22 complete, the greatest doses of the phthalate mixture were able to disrupt tissue  
23 organization.

24           The increase in inflammatory mediators indicates that the body is  
25 responding to a new and foreign substance, which is an acute type of

1 inflammation that involves the production of pro-inflammatory cytokines  
2 (Minihane et al., 2015). Some studies using cells and mice show that exposure  
3 to different phthalates generates increased production of pro-inflammatory  
4 cytokines such as IL-1b (Zheng et al., 2010) and IL-6 (Zhou et al., 2019), resulting  
5 in decreased testosterone production and increased of cellular recruitment of  
6 macrophages (Nishioka et al., 2012). Interleukin 10 is a characteristically anti-  
7 inflammatory cytokine that plays a crucial role in preventing inflammatory and  
8 autoimmune pathologies, but in some inflammatory situations it can increase  
9 local inflammation and all related symptoms. Elevated levels of IL-10 can hamper  
10 the host's response to microbial pathogenesis and prevent resolution of  
11 associated tissue damage and hemodynamic disturbances (Iyer and Cheng,  
12 2012).

13           Other epidemiological studies support this association between  
14 phthalates and inflammation, as elevated urinary concentration of phthalate  
15 metabolites in allergic conditions has been associated with increased immune  
16 response in experimental and patient conditions (Bølling et al., 2020). Study by  
17 Trim et al. (2021) points out that inflammation has no correlation with exposure  
18 to phthalates since there was no positive labeling of inflammatory cytokines in  
19 urinary samples from patients exposed to toxic agents. The results of the present  
20 study show that phthalates reduced the gene expression of pro-inflammatory  
21 cytokines  $TNF\alpha$  in immediate effect, remained reduced only at the highest dose  
22 of phthalate in adult animals and increased its expression at the highest doses of  
23 phthalate, showing a strong relationship between the presence of phthalates and  
24 inflammation in F2 animals.

## 1 **5 Conclusion**

2 Our data confirm that the postnatal period is an important  
3 developmental window and that any disturbance to the internal maternal  
4 environment causes harmful effects on the offspring, since the prepubertal  
5 animals of the F1 and F2 generation were more sensitive to the action of  
6 phthalates when compared to adult animals that already have immune maturity.  
7 In this study it was also possible to observe the transgenerational effect of  
8 phthalates and the change in gene expression can be carried to the next  
9 generation of animals previously exposed to environmental toxicants.

10

## 11 **Acknowledgment**

12 The authors are grateful to CAPES for the scholarship granted to  
13 APFP. WRS received grants from FAPESP (São Paulo State Foundation for  
14 Research Support - process number: 2018/09510-5).

15 The authors declare that there are no conflicts of interest.

16

## 17 **References**

- 18 Barlow, N.J., McIntyre, B.S., Foster, P.M.D., 2004. Male Reproductive Tract  
19 Lesions at 6, 12, and 18 Months of Age Following in Utero Exposure to  
20 Di(n-butyl) Phthalate. *Toxicol. Pathol.* 32, 79–90.  
21 doi:10.1080/01926230490265894
- 22 Bølling, A.K., Sripada, K., Becher, R., Bekö, G., 2020. Phthalate exposure and  
23 allergic diseases: Review of epidemiological and experimental evidence.

- 1 Environ. Int. 139, 105706. doi:10.1016/j.envint.2020.105706
- 2 Bošnjir, J., Puntarić, D., Škes, I., Klarić, M., Šimić, S., Zorić, I., 2003. Migration  
3 of phthalates from plastic products to model solutions. *Coll. Antropol.* 27,  
4 23–30.
- 5 Desdoits-Lethimonier, C., Albert, O., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Courant,  
6 F., Lesne, L., Guille, F., Dejuçq-Rainsford, N., Jegou, B., 2012. Human  
7 testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum. Reprod.* 27, 1451–  
8 1459. doi:10.1093/humrep/des069
- 9 Erthal, R.P., Staurengo-Ferrari, L., Fattori, V., Luiz, K.G., Cunha, F.Q., Pescim,  
10 R.R., Cecchini, R., Verri, W.A., Guarnier, F.A., Alves Fernandes, G.S.,  
11 2020. Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal  
12 periods impairs testicular and sperm parameters in rats: Role of oxidative  
13 stress and testosterone. *Reprod. Toxicol.* 96, 17–26.  
14 doi:10.1016/j.reprotox.2020.05.013
- 15 Feinberg, A.P., 2007. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human  
16 disease. *Nature* 447, 433–440. doi:10.1038/nature05919
- 17 Fisher, J.S., 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health:  
18 Focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*  
19 127, 305–315. doi:10.1530/rep.1.00025
- 20 Ho, S.-M., Cheong, A., Adgent, M.A., Veevers, J., Suen, A.A., Tam, N.N.C.,  
21 Leung, Y.-K., Jefferson, W.N., Williams, C.J., 2017. Environmental factors,  
22 epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reprod.*  
23 *Toxicol.* 68, 85–104. doi:10.1016/j.reprotox.2016.07.011

- 1 Iyer, S.S., Cheng, G., 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in  
2 Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 23–63.  
3 doi:10.1615/CritRevImmunol.v32.i1.30
- 4 Joseph, A., Shur, B.D., Hess, R.A., 2011. Estrogen, Efferent Ductules, and the  
5 Epididymis. *Biol. Reprod.* 84, 207–217. doi:10.1095/biolreprod.110.087353
- 6 Lambrot, R., Muczynski, V., Lécoreuil, C., Angenard, G., Coffigny, H., Pairault,  
7 C., Moison, D., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2009.  
8 Phthalates Impair Germ Cell Development in the Human Fetal Testis in  
9 Vitro without Change in Testosterone Production. *Environ. Health Perspect.*  
10 117, 32–37. doi:10.1289/ehp.11146
- 11 Lin, H., Ge, R.-S., Chen, G.-R., Hu, G.-X., Dong, L., Lian, Q.-Q., Hardy, D.O.,  
12 Sottas, C.M., Li, X.-K., Hardy, M.P., 2008. Involvement of testicular growth  
13 factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero.  
14 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7218–7222. doi:10.1073/pnas.0709260105
- 15 Martínez-Traverso, G.B., Pearl, C.A., 2015. Immunolocalization of G protein-  
16 coupled estrogen receptor in the rat epididymis. *Reprod. Biol. Endocrinol.*  
17 13, 48. doi:10.1186/s12958-015-0042-z
- 18 Minihane, A.M., Vinoy, S., Russell, W.R., Baka, A., Roche, H.M., Tuohy, K.M.,  
19 Teeling, J.L., Blaak, E.E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdle, H.J., Kremer,  
20 B.H.A., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M.M., Williams, C.M.,  
21 Calder, P.C., 2015. Low-grade inflammation, diet composition and health:  
22 current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.* 114, 999–1012.  
23 doi:10.1017/S0007114515002093
- 24 Mital, P., Hinton, B.T., Dufour, J.M., 2011. The Blood-Testis and Blood-

- 1 Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. *Biol. Reprod.*  
2 84, 851–858. doi:10.1095/biolreprod.110.087452
- 3 Nishioka, J., Iwahara, C., Kawasaki, M., Yoshizaki, F., Nakayama, H.,  
4 Takamori, K., Ogawa, H., Iwabuchi, K., 2012. Di-(2-ethylhexyl) phthalate  
5 induces production of inflammatory molecules in human macrophages.  
6 *Inflamm. Res.* 61, 69–78. doi:10.1007/s00011-011-0390-x
- 7 Ogo, F.M., de Lion Siervo, G.E.M., Staurengo-Ferrari, L., de Oliveira Mendes,  
8 L., Luchetta, N.R., Vieira, H.R., Fattori, V., Verri, W.A., Scarano, W.R.,  
9 Fernandes, G.S.A., 2017. Bisphenol A Exposure Impairs Epididymal  
10 Development during the Peripubertal Period of Rats: Inflammatory Profile  
11 and Tissue Changes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 122, 262–270.  
12 doi:10.1111/bcpt.12894
- 13 Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R.,  
14 Barlow, N.J., L. Earl Gray, J., 2000. The Plasticizer Diethylhexyl Phthalate  
15 Induces Malformations by Decreasing Fetal Testosterone Synthesis during  
16 Sexual Differentiation in the Male Rat. *Toxicol. Sci.* 58, 339–349.  
17 doi:10.1093/toxsci/58.2.339
- 18 Punhagui, A.P.F., Vieira, H.R., Siervo, G.E.M. de L., Rosa, R. da, Fernandes,  
19 G.S.A., 2016. Ethanol Exposure During Peripubertal Period Increases the  
20 Mast Cell Number and Impairs Meiotic and Spermatogenic Parameters in Adult  
21 Male Rats. *Microsc. Res. Tech.* 79, 541–549. doi:10.1002/jemt.22664
- 22 Robaire, B., Hinton, B.T., 2015. The epididymis, in: Zeleznik, A.J., Plant, T.M.  
23 (Eds.), *Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 691–771.
- 24 Rosenfeld, C.S., 2015. Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of

- 1 parental and social behaviors. *Front. Neurosci.* 9.  
2 doi:10.3389/fnins.2015.00057
- 3 Scarano, W.R., Bedrat, A., Alonso-Costa, L.G., Aquino, A.M., Fantinatti, B.E.A.,  
4 Justulin, L.A., Barbisan, L.F., Freire, P.P., Flaws, J.A., Lemos, B., 2019.  
5 Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During  
6 Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome  
7 Modulation in Rats. *Toxicol. Sci.* 171, 84–97. doi:10.1093/toxsci/kfz141
- 8 Shah, N.A., Khan, M.R., 2017. Increase of glutathione, testosterone and  
9 antioxidant effects of *Jurenia dolomiaea* on CCl<sub>4</sub> induced testicular toxicity  
10 in rat. *BMC Complement. Altern. Med.* 17, 206. doi:10.1186/s12906-017-  
11 1718-z
- 12 Swan, S.H., 2008. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive  
13 outcomes and other health endpoints in humans. *Environ. Res.* 108, 177–  
14 184. doi:10.1016/j.envres.2008.08.007
- 15 Trim, A., Hankinson, S.E., Liu, S., Shadyab, A.H., Meliker, J., Bao, W., Luo, J.,  
16 Liu, B., Manson, J.E., Tinker, L., Bigelow, C., Reeves, K.W., 2021.  
17 Biomarkers of phthalates and inflammation: Findings from a subgroup of  
18 Women’s Health Initiative participants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 234,  
19 113743. doi:10.1016/j.ijheh.2021.113743
- 20 Van ’t Erve, T.J., Rosen, E.M., Barrett, E.S., Nguyen, R.H.N., Sathyanarayana,  
21 S., Milne, G.L., Calafat, A.M., Swan, S.H., Ferguson, K.K., 2019.  
22 Phthalates and Phthalate Alternatives Have Diverse Associations with  
23 Oxidative Stress and Inflammation in Pregnant Women. *Environ. Sci.*  
24 *Technol.* 53, 3258–3267. doi:10.1021/acs.est.8b05729

- 1 Yurdakok-Dikmen, B., Stelletta, C., Tekin, K., Kuzukiran, O., Daskin, A., Filazi,  
2 A., 2019. Effects of phthalates on bovine primary testicular culture and  
3 spermatozoa. *Cytotechnology* 71, 935–947. doi:10.1007/s10616-019-  
4 00336-z
- 5 Zheng, S., Tian, H., Cao, J., Gao, Y., 2010. Exposure to di(n-butyl)phthalate  
6 and benzo(a)pyrene alters IL-1 $\beta$  secretion and subset expression of  
7 testicular macrophages, resulting in decreased testosterone production in  
8 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248, 28–37. doi:10.1016/j.taap.2010.07.008
- 9 Zhou, D., Wang, H., Zhang, J., 2011. Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure  
10 induces oxidative stress in epididymis of adult rats. *Toxicol. Ind. Health* 27,  
11 65–71. doi:10.1177/0748233710381895
- 12 Zhou, L., Chen, H., Xu, Q., Han, X., Zhao, Y., Song, X., Zhao, T., Ye, L., 2019.  
13 The effect of di-2-ethylhexyl phthalate on inflammation and lipid metabolic  
14 disorder in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 391–398.  
15 doi:10.1016/j.ecoenv.2018.12.009
- 16
- 17

1 **Figure legends:**

2 **Figure 1.** Experimental design of the present study

3 *GD* = gestacional day; *PND* = post-natal day

4 **Figure 2.** *GPR30* gene (A, B, C), *GPX3* gene (D, E, F), *GSR* gene (G, H, I), *IL10*  
5 gene (J, K, L) and *TNF $\alpha$*  gene (M, N, O) expression in epididymal tissue.

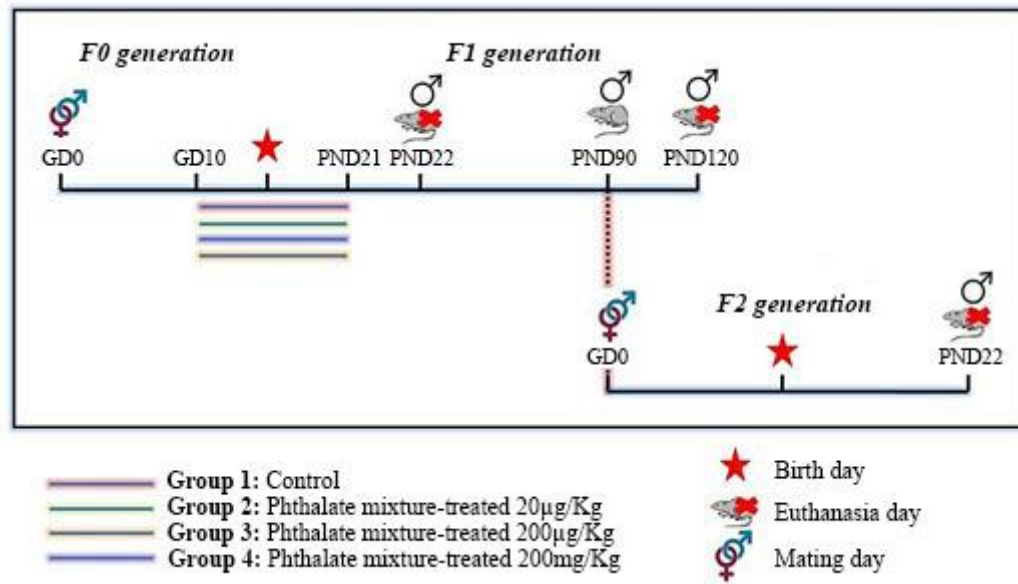
6 Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5); ANOVA One-way test with Dunnett  
7 *post hoc* test. \* Indicate groups that differ statistically from control group (p<0.05).

8

9

10

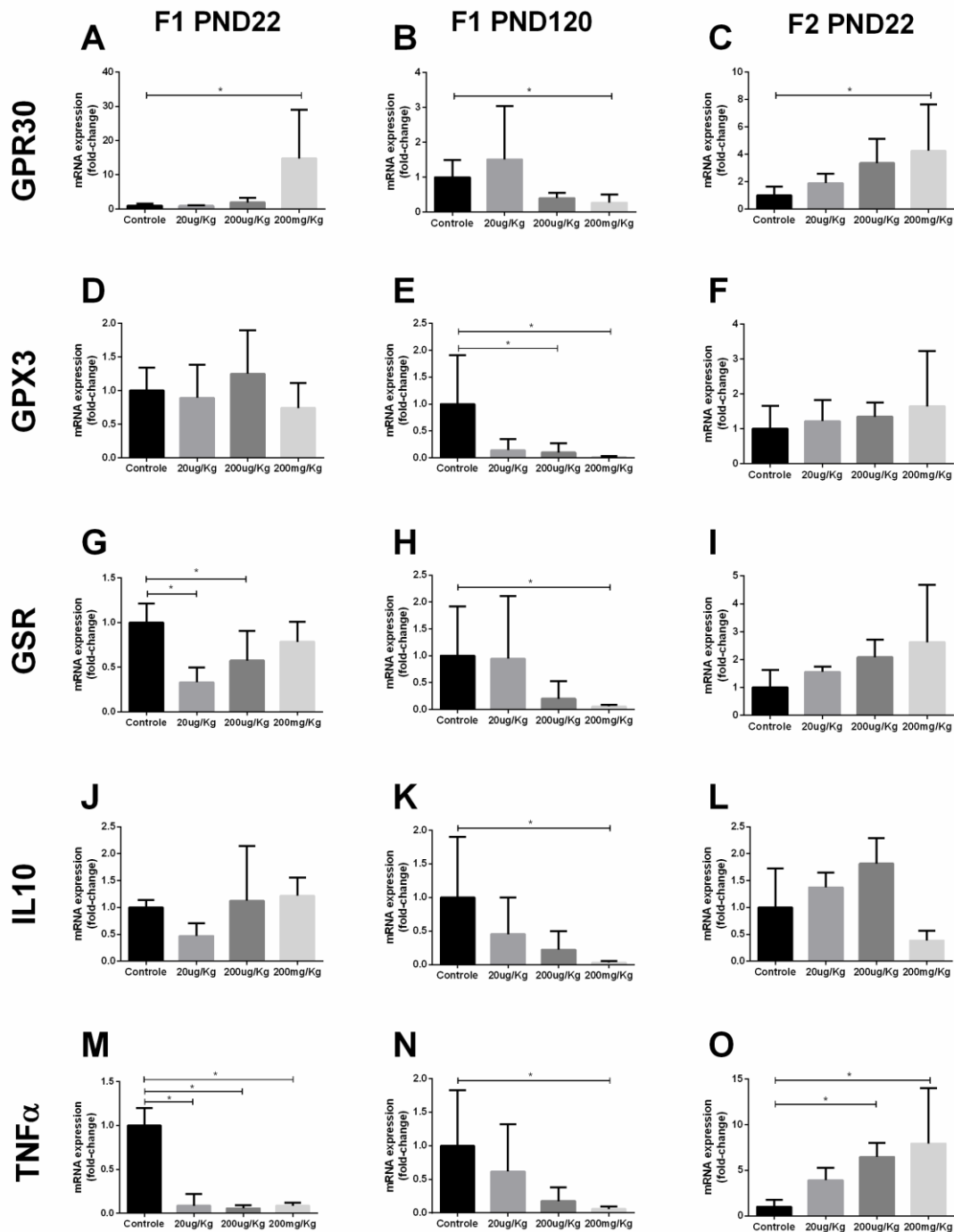
11



1

2 **Figure 1.** Experimental design of the present study3 *GD* = gestacional day; *PND* = post-natal day

4



1

2 **Figure 2.** *GPR30* gene (A, B, C), *GPX3* gene (D, E, F), *GSR* gene (G, H, I), *IL10*  
3 gene (J, K, L) and *TNF $\alpha$*  gene (M, N, O) expression in epididymal tissue.

4 Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5); ANOVA One-way test with Dunnett  
5 *post hoc* test. \* Indicate groups that differ statistically from control group (p<0.05)

1 **Table 1.** The target epididymal genes and the GAPDH endogenous gene, forward and reverse gene sequence, and the ID number  
 2 for all genes

Gene	ID number	Foward sequence	Reverse sequence
<b>GPX3</b>	NM_022525.4	CTTCTCACCCCAGTTGCGAT	AGTCTATGGGCGAGTTTCCG
<b>GSR</b>	NM_053906.2	CGGAAACTCGCCCATAGACTT	ATGGACGGCTTCATCTTCAGT
<b>IL-10</b>	NM_012854.2	TGCGACGCTGTCATCGATTT	TGGCCTTGTAGACACCTTTGT
<b>TNF</b>	L19123.1	GGTCTCATCTCCGCCTTTGT	CCCAAATCCTGCCCTGTCA
<b>GPR30</b>	NM_133573.2	CCTGCCGACTTCGCAAGT	CCACACCGTTCTCTCCTGGAT
<b>Gapdh</b>	NM_017008.4	GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	GAGGCTGGCACTGCACAA

3

1 **Table 2.** Body and epididymis weight

	Control (n=5)	20µg/Kg (n=5)	200µg/Kg (n=5)	200mg/Kg (n=5)
<b>F1 22DPN</b>				
Body weight (g)	48.760±3.322	48.360±4.525	47.830±3.426	46.460±8.473
Epididymis weight (g)	0.015±0.003	0.016±0.003	0.015±0.001	0.014±0.004
<b>F1 120DPN</b>				
Body weight (g)	469.7±13.10	432.7±57.86	428.1±24.40	481.3±65.51
Epididymis weight (g)	0.567±0.044	0.534±0.115	0.601±0.028	0.599±0.034
<b>F2 22DPN</b>				
Body weight (g)	42.18±4.57	41.71±5.33	44.56±6.34	35.56±3.13
Epididymis weight (g)	0.013±0.003	0.011±0.003	0.014±0.001	0.011±0.002

2 Mean ± Standard Deviation; ANOVA *post test* Dunnett.

3

1 **Table 3.** Epididymal stereology

		Control (n=5)	20µg/Kg (n=5)	200µg/Kg (n=5)	200mg/Kg (n=5)
F1 22DPN	<b>Caput</b>				
	Epithelium	33.93(24.11-38.69)	30.95(24.70-36.31)	31.55(19.64-36.76)	27.38(22.62-34.52)
	Interstitium	60.12(54.17-68.01)	58.93(51.49-60.71)	57.14(49.55-65.03)	59.23(54.32-66.07)
	Lumen	6.84(4.76-9.97)	10.71(7.14-15.92)*	11.90(8.92-14.73)*	11.31(7.14-14.88)*
	<b>Cauda</b>				
	Epithelium	27.68(21.73-34.52)	28.57(23.21-34.52)	27.38(18.75-33.78)	19.35(15.48-24.26)*
	Interstitium	62.20(55.06-70.39)	58.93(52.98-63.10)	63.10(56.40-71.43)	64.88(59.67-66.96)
	Lumen	7.73(5.80-10.71)	11.61(7.58-16.52)*	8.33(5.95-10.57)	15.77(12.50-19.64)*
	F1 120DPN	<b>Caput</b>			
Epithelium		20.83(18.45-23.81)	21.73(19.05-23.81)	20.83(18.15-25.60)	20.83(18.75-24.70)
Interstitium		13.69(9.67-19.49)	14.29(11.31-21.13)	25.60(16.07-32.14)*	19.05(14.88-26.49)*
Lumen		65.18(57.29-70.98)	62.20(54.02-68.30)	55.36(38.39-65.48)*	60.71(50.60-64.29)*
<b>Cauda</b>					
Epithelium		16.07(11.01-19.79)	12.50(8.78-16.22)	6.54(3.27-12.20)*	14.88(9.52-19.49)
Interstitium		18.15(10.71-22.17)	19.35(15.33-26.19)	17.26(9.82-25.00)	20.54(14.43-25.45)
Lumen		67.56(60.57-76.34)	66.37(61.16-75.00)	72.62(64.58-84.52)	65.18(58.04-72.47)
F1 22DPN		<b>Caput</b>			
	Epithelium	32.44(24.70-36.90)	30.36(25.60-35.42)	31.55(20.68-36.31)	27.98(22.62-32.59)
	Interstitium	58.33(54.17-65.48)	58.63(52.83-60.71)	58.04(51.19-63.24)	59.52(55.36-65.03)
	Lumen	8.92(5.95-10.71)	10.71(7.14-15.03)*	11.90(9.37-14.29)*	11.31(8.63-14.43)*
	<b>Cauda</b>				
	Epithelium	32.44(24.70-36.90)	30.36(25.60-35.42)	31.55(20.68-36.31)	27.98(22.62-32.59)
	Interstitium	64.58(58.18-69.64)	62.20(55.06-70.39)	64.88(59.67-66.96)	58.93(52.98-63.10)*
	Lumen	8.33(6.54-10.12)	7.73(5.80-10.71)	15.77(12.50-19.64)*	11.61(7.58-16.52)*

2 Median (Q1-Q3), Kruskal-Wallis *post test* Dunn. \* Indicates groups that differ from the control. It is considered a statistical difference when  $p < 0.05$

## 1 **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2            Nas condições experimentais do presente trabalho, concluímos que a  
3 exposição materna no período gestacional e lactacional a uma mistura de  
4 ésteres de ftalato teve impacto negativo sobre a prole evidente na morfologia  
5 espermática e a estrutura celular do epitélio germinativo testicular. Além disso, a  
6 as diversas doses de ftalato utilizada causou prejuízos tanto no testículo em  
7 diversas análises como na remodelação tecidual do epidídimo. Ao passo que, a  
8 expressão gênica ficou mais alterada em efeito tardio (F1 DPN120), do que  
9 imediato (F1 DPN22), e essas modificações, principalmente no tecido testicular  
10 se mantiveram em efeito transgeracional, mostrando que os ftalatos modificaram  
11 a expressão principalmente de genes relacionados à via de produção da  
12 testosterona. Os genes BCL2 e PUMA tiveram sua expressão inibida na F1  
13 DPN120 e F2 DPN22, mostrando que houve um desbalanço na regulação de  
14 sobrevivência e ativação do processo de apoptose. No epidídimo ocorreu  
15 perturbação na fisiologia do órgão com a remodelação dos compartimentos  
16 luminal, epitelial e estroma, principalmente nas maiores doses em efeito tardio e  
17 transgeracional.

18            Isto posto, espera-se com este trabalho elucidar os efeitos prejudiciais  
19 reprodutivos da utilização de ftalatos durante a gestação e a extensão desse  
20 dano na prole, visto que os danos foram imediatos, tardio e transgeracionais em  
21 doses distintas de uma mistura de ftalatos, quando comparados a outros estudos  
22 na literatura.

## 1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO

- 2 ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical science monitor :**  
3 **international medical journal of experimental and clinical research**, v. 10, n. 6, p. RA141-7,  
4 jun. 2004.
- 5 AL-SALEH, I. et al. Couples exposure to phthalates and its influence on in vitro fertilization  
6 outcomes. **Chemosphere**, v. 226, p. 597–606, jul. 2019.
- 7 AMATEAU, S. K.; MCCARTHY, M. M. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental  
8 masculinization of sex behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 643–650, 23 jun. 2004.
- 9 BAKEN, K. A. et al. A strategy to validate a selection of human effect biomarkers using adverse  
10 outcome pathways: Proof of concept for phthalates and reproductive effects. **Environmental**  
11 **Research**, v. 175, p. 235–256, ago. 2019.
- 12 BARKER, D. J. P. et al. Weight inf infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**,  
13 v. 334, n. 8663, p. 577–580, 1989.
- 14 BARRIOS, B. et al. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two  
15 Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of**  
16 **Andrology**, v. 26, n. 4, p. 539–549, 2005.
- 17 BEDFORD, J. M. Male Reproductive System. In: HAMILTON, D. W.; GREEP, R. O. (Eds.). .  
18 **Handbook of Physiology**. Washington DC: American Physiology Society, 1975. p. 303–318.
- 19 BRETON, S. et al. Postnatal development of H+ATPase (proton-pump)-rich cells in rat  
20 epididymis. **Histochem Cell Biol**, v. 111, p. 97–105, 1999.
- 21 CHUGHTAI, B. et al. A neglected gland : a review of Cowper’s gland. **International Journal of**  
22 **Andrology**, v. 28, p. 74–77, 2005.
- 23 CLEGG, E. D.; PERREAULT, S. D.; KLINEFELTER, G. R. Assessment of male reproductive  
24 toxicology. In: WALLACE, H. (Ed.). . **Principles and methods of toxicology**. Philadelphia: Taylor  
25 & Francis, 2001. p. 1263–1299.
- 26 CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and  
27 spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, n. 1, p. 198–236, 1972.
- 28 COSENTINO, M. J.; COCKETT, A. T. K. Structure and Function of the Epididymis. **Urological**  
29 **Research**, v. 14, p. 229–240, 1986.
- 30 COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 3ª ed. São Paulo: Elsevier, 2005.
- 31 CURI, T. Z. et al. In Utero and Lactational Exposure to Diisopentyl Phthalate Induces Fetal  
32 Toxicity and Antiandrogenic Effects in Rats. **Toxicological Sciences**, v. 171, n. 2, p. 347–358, 1  
33 out. 2019.
- 34 DACHEUX, J.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm  
35 maturation. **Reproduction**, v. 147, p. 27–42, 2014.
- 36 DAVIES, M.; NORMAN, R. Programming and reproductive functioning. **Trends in Endocrinology**  
37 **and Metabolism**, v. 13, n. 9, p. 386–392, 1 nov. 2002.
- 38 DEROSI, D. R. et al. Bcl-2 protein expression evaluation in breast cancer: study on fine needle  
39 aspirates; correlation with histologic grade in corresponding surgical material. **Jornal Brasileiro**  
40 **de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 3, set. 2003.
- 41 DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society

- 1 Scientific Statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, 1 jun. 2009.
- 2 EZER, N.; ROBAIRE, B. Androgenic regulation of the Structure and Functions of the Epididymis.  
3 In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. (Eds.). . **The Epididymis: from Molecules to Clinical Practice**.  
4 New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2002. p. 279–316.
- 5 FOLEY, G. L. Overview of Male Reproductive Pathology. **Toxicology Pathology**, v. 29, n. 1, p.  
6 49–63, 2001.
- 7 FROMME, H. et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water**  
8 **Research**, v. 36, n. 6, p. 1429–1438, mar. 2002.
- 9 GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- 10 GARDNER, D.; SHOBAC, D. **Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**. Ninth Edit ed. [s.l.]  
11 McGraw-Hill Education, 2011.
- 12 GATTI, J.-L. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction**  
13 **Science**, v. 82–83, p. 321–339, 2004.
- 14 GEORGE, F.; WILSON, J. Gonads and ducts in mammals. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. (Eds.). . **The**  
15 **Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press New York, 1999. p. 3–28.
- 16 GERBERDING, J. L.; FALK, H. **Agency for Toxic Substances & Disease Registry**. Disponível em:  
17 <<https://www.atsdr.cdc.gov/hs/hsees/annual2002.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2022.
- 18 GOLUB, M. S. et al. Public health implications of altered puberty timing. **Pediatrics**, v. 121  
19 Suppl, p. S218–S230, 2008.
- 20 GORE, A. C. et al. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific  
21 Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 6, p. 593–602, 1  
22 dez. 2015.
- 23 GREGORY, M.; CYR, D. G. The blood-epididymis barrier and inflammation. **Spermatogenesis**, v.  
24 4, n. 2, p. 1–13, 2014.
- 25 GUERRA, M. T. et al. Long-term effects of in utero and lactational exposure to butyl paraben in  
26 female rats. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 776–788, mar. 2017.
- 27 HALES, D. B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **Journal of**  
28 **Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1–2, p. 3–18, 2002.
- 29 HASCHEK, W.; ROUSSEAU, C. . Male reproductive system. In: HASCHEK, W.; ROUSSEAU, C.  
30 (Eds.). . **Fundamentals of toxicologic pathology**. San Diego, California: Academic Press, Inc.,  
31 1998. p. 443–484.
- 32 HAUSER, R.; CALAFAT, A. Phthalates and Human Health. **Occupational and Environmental**  
33 **Medicine**, v. 62, n. 11, p. 806–818, 1 nov. 2005.
- 34 HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal Cell Types and their Functions. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.  
35 T. (Eds.). . **The Epididymis: from Molecules to Clinical Practice**. New York, NY: Kluwer  
36 Academic/Plenum, 2002. p. 81–102.
- 37 HEUDORF, U.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; ANGERER, J. Phthalates: Toxicology and exposure.  
38 **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, n. 5, p. 623–634, out.  
39 2007.
- 40 HO, S.-M. et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive  
41 disorders. **Reproductive Toxicology**, v. 68, p. 85–104, mar. 2017.

- 1 HUGHES, I. A.; DEEB, A. Androgen resistance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology**  
2 **& Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 577–598, dez. 2006.
- 3 HUTSON, J. M. et al. The Regulation of Testicular Descent and the Effects of Cryptorchidism.  
4 **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 5, p. 725–752, 1 out. 2013.
- 5 JOHNSON, L. et al. Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System and Potential  
6 Targets of Toxicants. In: BOEKLEHEIDE, K. et al. (Eds.). . **Reference Module in Biomedical**  
7 **Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 5–61.
- 8 JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. **Biology of**  
9 **Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 207–217, 1 fev. 2011.
- 10 JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara  
11 Koogan, 2004.
- 12 KEMPINAS, W. G.; KLINEFELTER, G. R. The epididymis as a target for toxicants. In:  
13 **Comprehensive Toxicology**. Oxford: Academic Press, Inc., 2010. p. 149–66.
- 14 KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma Introdução à Patologia**. Rio de  
15 Janeiro: Elsevier Ltd, 2008.
- 16 KIM, S.-J.; FOSTER, D. L.; WOOD, R. I. Prenatal Testosterone Masculinizes Synaptic Input to  
17 Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in Sheep1. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 3, p.  
18 599–605, 1 set. 1999.
- 19 KNEZ, J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. **Reproductive**  
20 **BioMedicine Online**, v. 26, n. 5, p. 440–448, maio 2013.
- 21 KOMÁREK, V. et al. Synopsis of the organ anatomy. In: KRINKE, G. J. (Ed.). . **The laboratory rat**  
22 **– The Handbook of Experimental Rats**. London: Academic Press, Inc., 2000. p. 283–322.
- 23 KURAVSKY, M. L. et al. Testis-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: origin and  
24 evolution. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 160, 10 dez. 2011.
- 25 LAURETTA, R. et al. Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on Endocrine Glands. **Frontiers in**  
26 **Endocrinology**, v. 10, 21 mar. 2019.
- 27 LOTTRUP, G. et al. Possible impact of phthalates on infant reproductive health. **International**  
28 **Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 172–180, fev. 2006.
- 29 LU, P. et al. Relative abundance of G protein-coupled receptor 30 and localization in testis and  
30 epididymis of sheep at different developmental stages. **Animal Reproduction Science**, v. 175,  
31 p. 10–17, dez. 2016.
- 32 LYCHE, J. L. et al. Reproductive and Developmental Toxicity of Phthalates. **Journal of**  
33 **Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 12, n. 4, p. 225–249, 28 ago. 2009.
- 34 MACLEOD, D. J. et al. Androgen action in the masculinization programming window and  
35 development of male reproductive organs. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 2, p.  
36 279–287, abr. 2010.
- 37 MANIKKAM, M. et al. Fetal Programming: Prenatal Testosterone Treatment Leads to Follicular  
38 Persistence/Luteal Defects; Partial Restoration of Ovarian Function by Cyclic Progesterone  
39 Treatment. **Endocrinology**, v. 147, n. 4, p. 1997–2007, 1 abr. 2006.
- 40 MANIKKAM, M. et al. Developmental Programming: Impact of Prenatal Testosterone Excess on  
41 Pre- and Postnatal Gonadotropin Regulation in Sheep1. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 4, p.  
42 648–660, 1 abr. 2008.

- 1 MANN, T. Secretory Function of the Prostate, Seminal Vesicle and Other Male Accessory Organs  
2 of Reproduction. **J Reprod Fert**, v. 37, p. 179–188, 1972.
- 3 MARIANA, M. et al. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A  
4 review. **Environment International**, v. 94, p. 758–776, set. 2016.
- 5 MARTÍNEZ-TRAVERSO, G. B.; PEARL, C. A. Immunolocalization of G protein-coupled estrogen  
6 receptor in the rat epididymis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 48, 27  
7 dez. 2015.
- 8 MARTINO-ANDRADE, A. J. et al. Timing of prenatal phthalate exposure in relation to genital  
9 endpoints in male newborns. **Andrology**, v. 4, n. 4, p. 585–593, jul. 2016.
- 10 MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular**  
11 **Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 1, p. 148–157, jan. 2010.
- 12 MARTY, M. S. et al. Development and maturation of the male reproductive system. **Birth**  
13 **Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 125–136,  
14 abr. 2003.
- 15 MELLO, M. P. DE; ASSUMPÇÃO, J. DE G.; HACKEL, C. Genes involved in sex determination and  
16 differentiation. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 1, p. 14–25,  
17 fev. 2005.
- 18 MENG, Y. et al. CYP19A1 polymorphisms associated with coronary artery disease and  
19 circulating sex hormone levels in a Chinese population. **Oncotarget**, v. 8, n. 57, p. 97101–  
20 97113, 14 nov. 2017.
- 21 NAHOUM, V.; BOURGUET, W. Androgen and estrogen receptors: Potential of crystallography in  
22 the fight against cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 7–  
23 8, p. 1280–1287, jul. 2007.
- 24 NCBI. **HSD3B1 delta-5-3-beta-hydroxysteroid**. Disponível em:  
25 <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HSD3B1>>.
- 26 NICHOLLS, C.; LI, H.; LIU, J.-P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. **Clinical**  
27 **and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 8, p. 674–679, ago. 2012.
- 28 OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the rat. In: **Knobil and Neill's Physiology of**  
29 **Reproduction**. [s.l.: s.n.].
- 30 ORGBIN-CHRIST, M. C.; DANZO, B. J.; DAVIES, J. Endocrine control of the development and  
31 maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: GREEP, R. O.; ASTWOOD, E. B.  
32 (Eds.). **Handbook of Physiology**. volume 5 ed. Washington DC: American Physiology Society,  
33 1975. p. 319–338.
- 34 PADMANABHAN, V. et al. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic  
35 dysfunction in the female. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, n. 1–2, p. 165–174,  
36 fev. 2006.
- 37 PEROBELLI, J. E. **Morfofisiologia do Sistema Genital Masculino de Ratos Púberes e Adultos**  
38 **após Privação Androgênica durante a Pré-Puberdade**. [s.l.] Universidade Estadual de  
39 Campinas, 2012.
- 40 PIERCE, B. A. **Genética - Um enfoque conceitual**. 5ª edição ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2016.
- 41 PIETREMENT, C. et al. Distinct Expression Patterns of Different Subunit Isoforms of the V-  
42 ATPase in the Rat Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 185–194, 2006.

- 1 PRISKORN, L. et al. Anogenital distance is associated with semen quality but not reproductive  
2 hormones in 1106 young men from the general population. **Human Reproduction**, v. 34, n. 1,  
3 p. 12–24, 1 jan. 2019.
- 4 RAFF, H.; LEVITZKY, M. G. **Fisiologia Médica**. 1ª ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 2012.
- 5 REID, B. L.; CLELAND, K. W. The structure and Function of the Epididymis: The histology of the  
6 rat epididymis. **Australian Journal of Zoology**, v. 5, n. 3, p. 223–251, 1957.
- 7 ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and Vas deferens: structure, functions, and  
8 their regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (Eds.). . **The Physiology of Reproduction**. New York:  
9 Raven Press, 1988. p. 82.
- 10 ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. The epididymis. In: ZELEZNIK, A. J.; PLANT, T. M. (Eds.). . **Physiology**  
11 **of Reproduction**. Fourth edi ed. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 691–771.
- 12 ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm  
13 reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103–  
14 107, 1 set. 1978.
- 15 ROBERTS, K. P. What are the components of male reproductive system? In: THE AMERICAN  
16 SOCIETY OF ANDROLOGY (Ed.). . **Handbook of Andrology**. 2 edition ed. Lawrence: Allen Press,  
17 2010. p. 1–5.
- 18 ROCHA, B. A. et al. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and  
19 their association with oxidative DNA damage. **Science of The Total Environment**, v. 586, p.  
20 152–162, maio 2017.
- 21 ROSENFELD, C. S. Sex-Specific Placental Responses in Fetal Development. **Endocrinology**, v.  
22 156, n. 10, p. 3422–3434, out. 2015.
- 23 RUSSELL, L. D. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International**  
24 **Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 83, 1993.
- 25 RUWANPURA, S. M.; MCLACHLAN, R. I.; MEACHEM, S. J. Hormonal regulation of male germ cell  
26 development. **Journal of Endocrinology**, v. 205, p. 117–131, 2010.
- 27 SCARANO, W. R. et al. Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During  
28 Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in Rats.  
29 **Toxicological Sciences**, v. 171, n. 1, p. 84–97, 1 set. 2019.
- 30 SCHMIDT, J.-S. et al. Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Female Fertility and  
31 Adipogenesis in C3H/N Mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 8, p. 1123–1129,  
32 ago. 2012.
- 33 SCOTT, H. M. et al. Relationship between Androgen Action in the “Male Programming  
34 Window,” Fetal Sertoli Cell Number, and Adult Testis Size in the Rat. **Endocrinology**, v. 149, n.  
35 10, p. 5280–5287, 1 out. 2008.
- 36 SENGUPTA, P. A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in  
37 Comparison with Human Age? **Biomedicine International**, v. 2, p. 81–89, 2011.
- 38 SHAH, N. A.; KHAN, M. R. Increase of glutathione, testosterone and antioxidant effects of  
39 Jurenia dolomiaea on CCl4 induced testicular toxicity in rat. **BMC Complementary and**  
40 **Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 206, 8 dez. 2017.
- 41 SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis : An Overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. (Eds.). .  
42 **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted**

- 1 **Reproduction**. Cleveland, USA: Springer Science+Business Media, 2013. p. 19–44.
- 2 SHARPE, R. M. Declining sperm counts in men - is there an endocrine cause? **Journal of**  
3 **Endocrinology**, v. 136, p. 357–360, 1993.
- 4 SHARPE, R. M. Development and maturation of the normal male reproductive system. In:  
5 WOODRUFF, T. J. et al. (Eds.). . **Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility**.  
6 Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 48–59.
- 7 SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and  
8 potential new downstream effects. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 2, p. e33–e38, fev. 2008.
- 9 SIFAKIS, S. et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and  
10 female reproductive systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 56–70,  
11 abr. 2017.
- 12 SKAKKEBÆK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an  
13 increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. **Human**  
14 **Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 972–978, 2001.
- 15 STREET, M. et al. Current Knowledge on Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) from Animal  
16 Biology to Humans, from Pregnancy to Adulthood: Highlights from a National Italian Meeting.  
17 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1647, 2 jun. 2018.
- 18 TERADA, N. et al. Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell  
19 interaction. **Reproduction**, v. 139, p. 883–892, 2010.
- 20 THOMPSON, R. C. et al. Plastics, the environment and human health: current consensus and  
21 future trends. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological**  
22 **sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2153–66, 27 jul. 2009.
- 23 VIRTANEN, H. et al. Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of  
24 male reproductive disorders. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2, p. 501–505,  
25 1 set. 2005.
- 26 WAGNER-MAHLER, K. et al. Prospective study on the prevalence and associated risk factors of  
27 cryptorchidism in 6246 newborn boys from Nice area, France. **International Journal of**  
28 **Andrology**, v. 34, n. 5pt2, p. e499–e510, out. 2011.
- 29 WALKER, W. H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis.  
30 **Spermatogenesis**, v. 1, n. 2, p. 116–120, 2011.
- 31 WHO, W. H. O. **Identification of risks from exposure to ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICALS**  
32 **at the country level**. UN City, Marmorvej: WHO Regional Office for Europe, 2014.
- 33 ZAMBRANO, E. The transgenerational mechanisms in developmental programming of  
34 metabolic diseases. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de**  
35 **la Nutricion**, v. 61, n. 1, p. 41–52, 2009.
- 36 ZAMBRANO, E. et al. Fetal programming of sexual development and reproductive function.  
37 **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 538–549, jan. 2014.
- 38 ZAREAN, M. et al. The role of exposure to phthalates in variations of anogenital distance: A  
39 systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 172–179, abr. 2019.
- 40 ZHANG, L.-N.; LI, J.-Y.; XU, W. A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis,  
41 therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Gene Therapy**, v. 20, n.  
42 1, p. 1–7, 23 jan. 2013.

- 1 ZHOU, C.; FLAWS, J. A. Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured
- 2 mouse antral follicles. **Toxicological Sciences**, v. 156, n. 1, p. 217–229, 2017.

3

## 1 ANEXO APROVAÇÃO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Biociências de Botucatu

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da exposição perinatal a uma mistura de ftalatos sobre o envelhecimento e incidência de lesões prostáticas e mamárias", protocolada sob o CEUA nº 9748091019 (ID 0000121), sob a responsabilidade de **Wellerson Rodrigo Scarano e equipe; Luis Fernando Barbisan; Luis Antonio Justulin Junior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 25/11/2019.

We certify that the proposal "Effect of perinatal exposure to a phthalate mixture on aging and incidence of prostate and mammary lesions", utilizing 224 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 9748091019 (ID 0000121), under the responsibility of **Wellerson Rodrigo Scarano and team; Luis Fernando Barbisan; Luis Antonio Justulin Junior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 11/25/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2019](#) a [11/2021](#) Área: [Ciências Biomédicas](#)

Origem: [CEMIB - UNICAMP](#)  
 Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [90 a 120 dias](#) N: [224](#)  
 Linhagem: [Sprague Dawley](#) Peso: [200 a 250 g](#)

Local do experimento: Biotério do Departamento de Morfologia - IBB/UNESP

Botucatu, 22 de setembro de 2021

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual Paulista

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual Paulista