



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA (PPGO) – MESTRADO



GUILHERME BITENCOURT

Caracterização dos efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, na morfofisiologia uterina da prole feminina de rato

Cascavel-PR
2018

GUILHERME BITENCOURT

Caracterização dos efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, na morfofisiologia uterina da prole feminina de rato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim

Coorientadora: Profa. Dra. Elaine Manoela Porto Amorim

Cascavel-PR
2018

Bitencourt, Guilherme

Caracterização dos efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, na morfofisiologia uterina da prole feminina de rato / Guilherme Bitencourt; orientador(a), João Paulo de Arruda Amorim; coorientador(a), Elaine Manoela Porto Amorim, 2018.

47 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2018.

1. Triclosan. 2. Disruptores endócrinos. 3. Útero . 4. Ratos. I. Amorim, João Paulo de Arruda. II. Amorim, Elaine Manoela Porto. III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

GUILHERME BITENCOURT

Caracterização dos efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, na morfofisiologia uterina da prole de rato

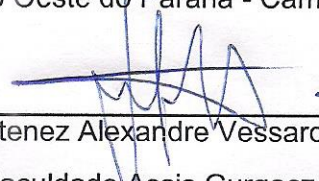
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Patologia Aplicada À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - Joao Paulo de Arruda Amorim

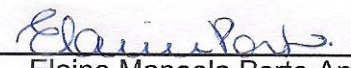
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Mauro Carlos Agner Busato

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Sóstenez Alexandre Vessaro da Silva

Faculdade Assis Gurgacz (FAG)


Elaine Manoela Porto Amorim

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 19 de março de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que me proporcionou, e por me capacitar a realizar esta pós-graduação.

À minha família, meus pais Carlos Leopoldo de Paula Bitencourt e Neresi Darlete Claro Bitencourt, e minha irmã Ana Paula Bitencourt, por todo o amor e cuidado que sempre recebi, e pelo suporte e incentivo para que mais este desafio fosse vencido.

Ao Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim, meu orientador, pelo convívio, pela paciência e pelos ensinamentos, importantes para o meu crescimento. É, para mim, um grande exemplo de Professor.

À Profa. Dra. Elaine Manoela Porto Amorim, pela orientação.

Aos colegas Eduardo Deon Fortunato, Romário Willian Welter, Michael Aparecido Machado e Clislaine Aparecida Tavares, pelo grande auxílio na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Caracterização dos efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, na morfofisiologia uterina da prole feminina de rato

RESUMO

O Triclosan (TCS) é um agente antimicrobiano amplamente utilizado em produtos industrializados, especialmente de cuidado pessoal e higiene oral. Estudos comprovam que ele altera a homeostase de diversos organismos, sendo, portanto, considerado um desregulador endócrino. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos decorrentes da exposição materna ao TCS durante a prenhez e lactação na morfofisiologia uterina da prole de ratas. Para tanto, trinta e duas ratas prenhes foram divididas em 4 grupos de 8 ratas cada, tratadas uma vez ao dia, por via oral, durante a prenhez e lactação, da seguinte forma: Grupo I – controle (GI): somente óleo de milho; Grupo II (GII): TCS diluído em óleo de milho, na dose de 75 mg/kg/dia; Grupo III (GIII): TCS diluído em óleo de milho, na dose de 150 mg/kg/dia; Grupo IV (GIV): TCS diluído em óleo de milho, na dose de 300 mg/kg/dia. Um filhote do sexo feminino de cada mãe foi selecionado, e aos 90 dias, os filhotes foram eutanasiados, para pesagem e coleta do útero para análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que o peso médio da ninhada foi significativamente menor em todos os grupos tratados com TCS, quando comparados ao controle. A prole de todos os grupos expostos ao TCS apresentou desregulação do ciclo estral, comparados ao controle. A análise da estrutura histológica uterina demonstrou que todas as camadas do útero foram afetadas pela administração de TCS, e a análise morfométrica mostrou aumento de todas as camadas uterinas nos grupos tratados. A contagem de leucócitos apresentou aumento do infiltrado inflamatório nos grupos de 150 e 300 mg de TCS, em comparação aos demais grupos. Conclui-se que a exposição materna ao TCS, durante a prenhez e lactação, provoca diminuição do peso médio da ninhada, desregula o ciclo estral e causa alteração da estrutura uterina da prole.

Palavras-chave: Triclosan, disruptores endócrinos, útero, ratos.

Characterization of the effects of maternal exposure to Triclosan during pregnancy and lactation on uterine morphology of female offspring

ABSTRACT

Triclosan (TCS) is an antimicrobial agent widely used in manufactured products, especially in personal care and oral hygiene products. Studies prove that it changes the homeostasis of several organisms and is therefore considered an endocrine disruptor. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of maternal exposure to TCS during pregnancy and lactation in the uterine morphology of the rat offspring. For this, thirty-two pregnant rats were divided into 4 groups of 8, treated once daily orally, during pregnancy and lactation, as follows: Group I - control (GI): corn oil; Group II (GII): TCS diluted in corn oil at a dose of 75 mg/kg/day; Group III (GIII): TCS diluted in corn oil at a dose of 150 mg/kg/day; Group IV (GIV): TCS diluted in corn oil at a dose of 300 mg/kg/day. A female cub of each mother was selected, and at 90 days the pups were euthanized for weighing and collection of the uterus for histomorphometric analysis. The results showed that the mean litter weight was minor in all the groups treated with TCS, when compared to control. The offspring of all groups exposed to TCS presented estrous cycle dysregulation, compared to control. Analysis of the uterine histological structure demonstrated that all layers of the uterus were affected by the administration of TCS, and the morphometric analysis showed increased uterine layers in the treated groups. The leukocyte count showed an increase in inflammatory infiltrate in the groups of 150 and 300 mg of TCS, in comparison to the other groups. It is concluded that maternal exposure to TCS, during pregnancy and lactation, causes a decrease in the mean weight of the litter, deregulates the estrous cycle and causes a change in the uterine structure of the offspring.

Keywords: Triclosan, endocrine disruptors, uterus, rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AR – Receptor de andrógeno
DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano
DE – Desregulador endócrino
DL50 – Dose letal media
E2 – 17 β -estradiol
EE – Etililestradiol
ENR – Enoil-ACP redutase
EPA – *Environmetal Protection Agency*
ER – Receptore de estrógeno
FabI – Isoforma de ENR
FSH – Hormônio folículo estimulante
GCH – Gonadotrofina coriônica humana
K⁺ – Íon potássio
LH –Hormônio luteinizante
NAD⁺ – Coenzima dicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NHANES– *The National Health and Nutrition Examination Survey*
PR – Receptor de progesterona
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
T3 – Triiodotironina
T4–Tiroxina
TCDD – 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TCS –Triclosan
TH – Hormônio da tireoide
TR – Receptore de tiroxina
TSH – Hormônio tireoestimulante
USPTO – *United States Patent and Trademark Office*

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas das publicações científicas:

Environmental Toxicology

Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/15227278>

SUMÁRIO

1.Introdução geral	9
1.1Triclosan (TCS).....	9
1.2Desreguladores endócrinos e Triclosan	11
1.3Anatomia e fisiologia do sistema reprodutor feminino	15
1.4Desreguladores endócrinos e o sistema reprodutor feminino	16
2.Referências da introdução geral.....	18
3.Artigo	23
4.Anexo	45

1.Introdução geral

1.1Triclosan (TCS)

O TCS é um éter difenil e pode ser chamado de 5-cloro-2-(2-diclorofenoxi) fenol ou éter 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil. Comercialmente, está disponível na forma sólida como um pó cristalino branco a esbranquiçado, com odor aromático pouco detectável (DANN & HONTELA, 2011). Os principais nomes comerciais são Irgasan[®] DP300 e Irgacare[®]. Fibras impregnadas e polímeros têm nomes como UltraFresh[®], Amicor[®], Microban[®], Monolith[®], Bactonix[®] e Sanitized[®] (ADOLFSON-ERICI *et al.*, 2002).

Este composto sintético foi desenvolvido no início dos anos 1970 para uso em hospitais, na lavagem das mãos antes de procedimentos cirúrgicos (COONEY, 2010). É um agente químico lipossolúvel, de amplo espectro de atividade sobre bactérias (Gram-positivas e a maior parte das Gram-negativas) (FANG *et al.*, 2010). Por ser um antimicrobiano de amplo espectro, o TCS é utilizado em larga escala na indústria, como componente de produtos de higiene pessoal (dentifrícios, enxaguatórios bucais, sabonetes, desodorantes, cremes, xampus, entre outros), itens domésticos (tábuas de corte, utensílios de cozinha, têxteis, materiais de embalagens, entre outros), e dispositivos médicos (FANG *et al.*, 2010; STOKER *et al.*, 2010; DANN & HONTELA, 2011).

Em produtos de higiene pessoal, sua concentração está na faixa de 0,1-0,3% do peso do produto (SABALIUNAS *et al.*, 2003). Nos dentifrícios e enxaguatórios bucais, a concentração é de 0,3 e 0,2%, respectivamente (PANCER *et al.*, 2016). Ele é o agente antibacteriano mais comumente utilizado em formulações de higiene oral (VAN DEN BROEK *et al.*, 2008). Suas propriedades antibacteriana e anti-inflamatória reduzem o biofilme e a gengivite, além de desacelerar a progressão da doença periodontal (CULLINAN *et al.*, 2003; GUNSOLLEY, 2006).

Em baixas concentrações, tem ação bacteriostática, e em altas doses, se torna bactericida (YAZDANKHAH *et al.*, 2006). Concentrações subletais inibem a biossíntese de ácidos graxos através da inibição da enzima ENR (enoil-ACP redutase – FabI), pela formação de um complexo não-covalente com NAD⁺ no sítio ativo de FabI (HEATH *et al.*, 1998). Como FabI é essencial para a divisão celular normal, sua inibição mediada pelo TCS suprime efetivamente o crescimento de numerosas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em altas concentrações, o TCS induz o escape de K⁺, levando a uma desestabilização da membrana e um rápido efeito bactericida (ESCALADA *et al.*, 2005).

O uso do TCS tem geralmente sido bem tolerado e seguro. Por esta razão, os fabricantes o tem adicionado às suas fórmulas, pelas últimas décadas, esperando promover proteção antibacteriana de longa duração (YUEH & TUKEY, 2016). Segundo o Escritório de Marcas e Patentes dos Estados Unidos (*United States Patent and Trademark Office – USPTO*) até o ano de 2008, 2.385 patentes continham a palavra “Triclosan” (FANG *et al.*, 2010). O extenso uso do TCS pode ser verificado através dos grandiosos números que envolvem sua produção e aplicação. Acredita-se que sejam produzidas mais de 1.500 toneladas por ano em todo o mundo, sendo os Estados Unidos e Europa os principais produtores e consumidores deste composto. Na União Europeia, cerca de 85% do volume total de TCS é utilizado em produtos de higiene pessoal (dentifrício, sabonete, xampu e cosméticos, entre outros), 5% é usado para os têxteis (tecidos antialérgicos) e 10% em plásticos e materiais que entram em contato com alimentos (AXELSTAD *et al.*, 2013; KOEPPE *et al.*, 2013).

Como resultado, o uso generalizado do TCS permite que essa substância esteja no meio ambiente através de muitas vias. Sua natureza aromática e alta quantidade de cloro o tornam resistente à degradação e, como consequência, persistente no meio ambiente (YUEH & TUKEY, 2016). Ele tem sido encontrado como contaminante ambiental pela sua bioacumulação na biota; presente na água após o tratamento de potabilidade, rios, lagos, mares, em águas residuais e sedimentos, bem como na bile de peixes selvagens, confirmando a extensa contaminação dos mananciais e da fauna aquática (TATARAZAKO *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2010). Durante o processo de tratamento de águas residuais, o TCS pode se converter em outros derivados: pode ser metilado biologicamente em metiltriclosan (BALMER *et al.*, 2004) e/ou ser transformado durante a desinfecção de águas residuais com cloro livre em derivados clorados de TCS, que possuem maior grau de persistência ambiental do que seu composto original por causa de sua lipofilicidade e resistência à biodegradação. Além disso, é relatado que os derivados clorados de TCS são mais tóxicos do que o TCS em si, e seu valor médio de dose letal (DL50) diminui à medida que o número de substituições de cloro aumenta (KANETOSHI *et al.*, 1992).

Segundo um programa de estudos americano, que avalia o estado de saúde e o estado nutricional de adultos e crianças (*The National Health and Nutrition Examination Survey – NHANES*), o contato com produtos que contenham TCS está diretamente ligado com a idade, bem como com a classe econômica do indivíduo; ao passo em que há o aumento da idade e do poderio econômico do cidadão, maior é seu contato com a substância. Este dado leva a crer que a exposição contínua ao TCS poderia levar ao seu acúmulo e sua detecção em diferentes fluidos e partes do corpo humano (HONKISZ *et al.*, 2012). A exposição ao TCS ocorre através da

ingestão da substância, inalação ou ainda pelo contato dermatológico (FANG *et al.*, 2010), sendo a água contaminada e os produtos cosméticos e de higiene os principais responsáveis pela interação indivíduo-substância (ADOLFSSON-ERICI *et al.*, 2002; ALLMYR *et al.*, 2006).

Diferentes trabalhos têm encontrado e quantificado a presença de TCS em humanos, em amostras de urina (CALAFAT *et al.*, 2008; KOEPPE *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2015; WEISS *et al.*, 2015; BUCKLEY *et al.*, 2016), leite materno (ADOLFSSON-ERICI *et al.*, 2002; ALLMYR *et al.*, 2006; DAYAN, 2007), plasma sanguíneo (ALLMYR *et al.*, 2006; SHEKHAR *et al.*, 2016) e líquido amniótico (SHEKHAR *et al.*, 2016). Por ser um composto lipofílico, sofre bioacumulação no tecido adiposo (GEENS *et al.*, 2015). Em seguida à absorção, a maior fração do TCS é excretada na urina; no entanto, a excreção urinária total do TCS varia entre os indivíduos, com 24 a 83% da dose sendo eliminada durante os primeiros 4 dias após a exposição (FANG *et al.*, 2010; DANN & HONTELA, 2011).

1.2 Desreguladores endócrinos e Triclosan

O sistema endócrino é representado por um conjunto de órgãos que apresentam como atividade característica a produção e secreção de hormônios, substâncias químicas que são lançadas na corrente sanguínea e que irão atuar em órgãos ou tecidos-alvos específicos do organismo, controlando ou auxiliando o controle de sua função. O sistema endócrino influencia todos os aspectos da saúde e bem-estar do organismo animal, incluindo desenvolvimento, crescimento, as funções reprodutivas, cognitivas, metabólicas e aspectos comportamentais (ROMJIN, 1999).

Uma gama de substâncias químicas de origem natural (metais como cádmio e chumbo), sintética ou antropogênica (poluentes ambientais), já foram caracterizadas e classificadas como desreguladores endócrinos (DEs) devido aos seus efeitos adversos sobre o sistema endócrino. Incluem-se nesta lista os agentes fenólicos parabenos (encontrados nas formulações cosméticas), cetonas aromáticas (formulação de protetores solares), 2,5-diclorofenol (usado na fabricação de desodorantes, desinfetantes e pesticidas), fenóis alquila (agentes espumantes), bifenóis-policlorados (solventes e lubrificantes industriais), dicloro-difenil-tricloroetano (encontrado em pesticidas), bisfenol-A (plásticos para embalagem de alimentos) e o TCS (encontrado em formulações antibacterianas) (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; BUCKLEY *et al.*, 2016; SHEKHAR *et al.*, 2016). Ademais, outras centenas de compostos ainda necessitam de investigação (PATIASUL & ADEWLE, 2009).

Segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA), desregulador endócrino é qualquer agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, metabolismo,

ligação, ou eliminação de hormônios naturais que estão presentes no organismo e são responsáveis pela homeostase, reprodução, e processo de desenvolvimento (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).

No ano de 1930, o naturalista Charles Broley descreveu os primeiros registros da literatura sobre desregulação endócrina, referindo-se a observações de declínio populacional, anormalidades reprodutivas e comportamentais de pássaros nos Estados Unidos e no Canadá. Logo depois, em 1936, Beans associou estas anormalidades observadas nos pássaros com a exposição de peixes ao pesticida DDT (dicloro-difenil-tricloroetano). Seguindo a mesma teoria, Rachel Carson, em 1962, descreveu observações similares dos efeitos da desregulação endócrina em pássaros em seu famoso livro “*Silent Spring*”, responsável pela maior revolução ecológica dos Estados Unidos e do mundo na época do lançamento (EPSTEIN, 2014).

A comunidade científica vem sugerindo o TCS como uma substância potencial entre os DEs por seus efeitos de toxicidade observados inicialmente na fauna aquática (ORVOS *et al.*, 2002; TATARAZAKO *et al.*, 2004; CAPDEVIELLE *et al.*, 2008). Em estudos envolvendo ratos e humanos, foram descritos vários efeitos indesejáveis em consequência do uso do TCS, que incluem dermatite, reações de imunotoxicidade e neurotoxicidade (GLASER, 2004; SAVAGE *et al.*, 2012).

O contato com substâncias potencialmente DEs pode acontecer em qualquer fase da vida de um animal. A exposição poderia acarretar diversas anormalidades estruturais e funcionais durante o desenvolvimento, bem como doenças no animal adulto (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; COSTER & LAREBEKE, 2012). Em suma, a desregulação endócrina causada por substâncias exógenas não afetaria apenas o organismo exposto; poderia afetar seus descendentes através de modificações epigenéticas do genoma, extrínsecas ou intrínsecas à linhagem de células germinativas (CHIAM *et al.*, 2009).

Um dos primeiros relatos de desregulação endócrina causado pelo TCS é de FORAN *et al.* (2000), que verificaram a exposição de peixes (espécie *Oryzias latipes*) ao TCS por um período de 14 dias, iniciando dois dias após a eclosão dos ovos. A contaminação com a substância foi associada a um aumento no tamanho das nadadeiras, além de diminuição da atividade androgênica. ISHIBASHI *et al.* (2004), demonstraram que esta mesma espécie de peixe, quando exposta ao TCS durante as fases iniciais de desenvolvimento, apresentou atividade estrogênica capaz de induzir vitelogênese nos machos.

Outra evidência que suporta o TCS como DE é sua estrutura molecular (Fig. 1) semelhante à de outros DEs conhecidos, tais como o bifenil-policlorado, difenil-éteres-polibromados, bisfenol-A, dioxinas e também com o hormônio tireoidiano (ALLMYR *et al.*,

2009; DANN & HONTELA, 2011; WANG & TIAN, 2015), todas moléculas com dois anéis benzênicos.

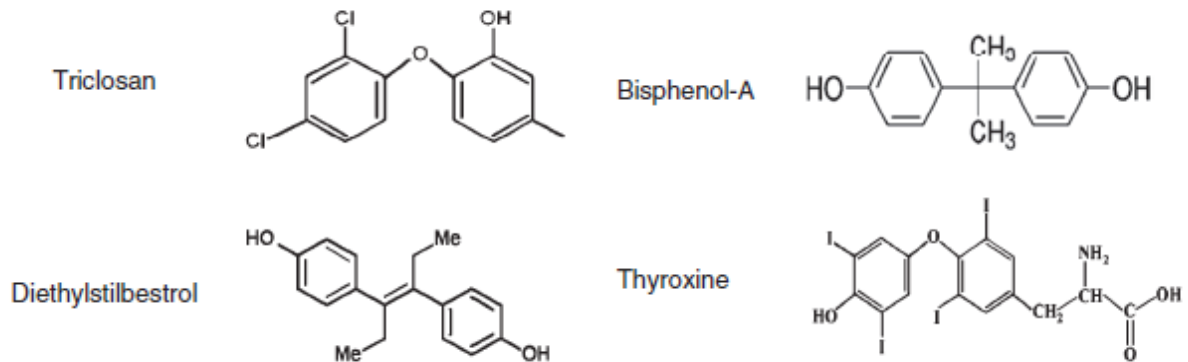


Figura 1. Semelhança estrutural entre o TCS, bisfenol-A, dietilestilbestrol e a tiroxina (adaptado de: DANN & HONTELA, 2011).

De acordo com VELDHOEN *et al.* (2006), a exposição ao TCS em concentrações ambientalmente relevantes induz mudanças no processo de metamorfose de rãs, que é mediado pelo hormônio da tireoide (TH). CROFTON *et al.*, em 2007, observaram, em ratas, que a exposição ao TCS diminuiu os níveis séricos de tiroxina (T4), proporcionalmente à dose, demonstrando desregulação da homeostase.

PAUL *et al.* (2010) testaram a hipótese que o TCS diminuiria as concentrações de tiroxina (T4) circulante através de modificações no catabolismo e transporte de células hepáticas. Ratas fêmeas, recém desmamadas, receberam o composto (0-1000 mg/kg/dia) durante 4 dias através de sonda gástrica; foram eutanasiadas e amostras de sangue e dos tecidos hepáticos foram coletados para análise. Os níveis de T4, triiodotironina (T3) e hormônio tireoestimulante (TSH) foram verificados, bem como a atividade microsossomal hepática, atividade enzimática, RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) e citocromos. Houve uma diminuição dos níveis de T4 em mais de 40% e de T3 em mais de 75%, comparados com o grupo controle. Os níveis de atividade microsossomais, enzimáticas e de citocromos de células hepáticas aumentaram drasticamente. O estudo concluiu que o hipotireoidismo em ratos pode estar envolvido com *upregulation* do catabolismo hepático, induzindo a uma ativação enzimática em células do fígado.

O estudo de PAUL *et al.* (2012), no qual ratas foram expostas ao TCS do 6° dia de gestação ao 21° dia pós-natal (durante a prenhez e lactação), demonstrou indução de

hipotiroxinemia nas mães, fetos e prole neonata, e proveu o primeiro relato da importância da exposição transplacentária.

Dados epidemiológicos revelam que, nos últimos 50 anos, observa-se um crescimento no número de casos de doenças em que os DEs poderiam estar envolvidos: neoplasias de mama, testículo e próstata, diabetes, obesidade e diminuição da fertilidade (COSTER & LAREBEKE, 2012).

Em se tratando da exposição humana a um agente DE, um exemplo clássico na literatura é o dietilestilbestrol, um estrógeno sintético, não esteroide, desenvolvido no ano de 1938, prescrito para mulheres grávidas a fim de evitarem-se abortos espontâneos (PALMLUND, 1996). Posteriormente, nas décadas de 70 e 80, verificou-se que as filhas de mulheres que foram tratadas com dietilestilbestrol durante a gestação apresentavam grande incidência de câncer vaginal e de colo do útero, fertilidade reduzida e grandes riscos de infertilidade, além de complicações gestacionais (PALMLUND *et al.*, 1993; PALMLUND, 1996).

A exposição aos DEs nas fases iniciais da vida parece interferir na adipogênese e no equilíbrio energético dos indivíduos, acarretando em risco maior de obesidade. BUCKLEY *et al.* (2016) avaliaram a ação da exposição a agentes desreguladores durante a gestação em crianças com idade entre 4-9 anos. Amostras de urina foram coletadas das mães durante o terceiro trimestre de gestação e as crianças avaliadas através da escala Tanita para medição da massa gorda. No presente estudo, TCS e bisfenol-A não foram associados com aumento da massa gorda; no entanto, a exposição intrauterina a benzofenona (cetona aromática) foi relacionada com aumento da massa gorda em crianças do sexo feminino, sugerindo maiores investigações.

Porém, o mecanismo de ação dos DEs não está completamente esclarecido. Acredita-se que essas moléculas atuem em receptores hormonais presentes no núcleo celular, receptores de hormônios esteroides na membrana citoplasmática, receptores de neurotransmissores (como os receptores de serotonina, dopamina e noradrenalina), receptores órfãos (receptores de hidrocarbonetos aromáticos), receptores de estrógeno (ERs), receptores de andrógenos (ARs), receptores de progesterona (PRs), receptores de tiroxina (TRs) e receptores retinóicos (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).

Para tentar elucidar o mecanismo de ação do TCS em mamíferos, KUMAR *et al.*, (2009) trataram ratos adultos por um período de 10 semanas, com três diferentes doses do composto. Os resultados deste trabalho claramente apontaram para a ação anti-androgênica do TCS, demonstrada por sua capacidade em diminuir síntese de andrógenos, por causar danos

histopatológicos nos testículos e glândulas sexuais acessórias, reduzir a produção diária de espermatozoides, e perturbar o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

Em 2016, no 36º Simpósio Internacional sobre Poluentes Orgânicos Halogenados Persistentes, em Florença, Itália, foi apresentada a Declaração de Florença, que documenta o consenso de mais de 200 cientistas e profissionais médicos sobre os perigos e a falta de benefício demonstrado do uso comum do TCS e Triclocarban. Nela, são apresentadas evidências sobre os efeitos deletérios dessas substâncias aos seres humanos e ecossistemas, e recomendações, com a intenção de prevenir futuros danos dessas e de outras substâncias antimicrobianas com propriedades e efeitos similares (HALDEN *et al.*, 2016).

A grande dificuldade em estudar os efeitos da desregulação endócrina nos animais e nos seres humanos decorre do fato de que os riscos são muitas vezes específicos da espécie e dependem de uma série de variáveis. Destacam-se aí, entre outros fatores, a latência entre exposição e o efeito observado, o tempo e a natureza da exposição, a dose, a idade, o sexo, a susceptibilidade individual de cada organismo (PATIASUL & ADEWLE, 2009).

1.3 Anatomia e fisiologia do sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor é responsável por produzir e transportar os gametas para a reprodução sexual e, nas fêmeas, atua também protegendo e nutrindo o embrião (WALKER & HOMBERGER, 1997). Nas ratas, o sistema reprodutor é formado basicamente por vagina, útero, ovários e tubas uterinas (ANDERSON *et al.*, 2004). O útero é um órgão em forma de Y, formado por um par de cornos uterinos, independentes entre si. As tubas e os ovários estão localizados nas suas extremidades craniais. Caudalmente, esses cornos são rodeados por musculatura, formando um pequeno corpo uterino, e logo inferiormente encontra-se a cervix uterina (WALKER & HOMBERGER, 1997).

A parede uterina é composta por endométrio, miométrio e perimétrio. O endométrio é composto por epitélio cilíndrico simples (epitélio luminal) e pelo estroma, que abriga as glândulas tubulares simples e ramificadas que se estendem até o miométrio. O miométrio é constituído por duas camadas musculares, a longitudinal (externa) e a circular (interna). E a camada mais externa, o perimétrio, é uma serosa (MARTINEZ *et al.*, 1999).

Os folículos, juntamente com o corpo lúteo, são glândulas endócrinas. Os folículos desenvolvem-se sob estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH), secretado pela adenohipófise. Assim que se tornam maduros, secretam estrógeno, responsável pelo crescimento uterino e desenvolvimento endometrial. O corpo lúteo, responsável pela produção de progesterona, desenvolve-se por influência do hormônio luteinizante (LH), também

secretado pela adenohipófise. A progesterona é fundamental para o desenvolvimento final e aumento da vascularização do endométrio, preparando-o para uma possível implantação do óvulo fertilizado. Também está envolvida na manutenção do endométrio proliferado e da placenta nos primeiros estágios de prenhez. As ratas são poliétricas, com ciclo reprodutivo de duração de 4 a 5 dias e com 4 a 12 oócitos liberados por ciclo (WALKER & HOMBERGER, 1997).

1.4 Desreguladores endócrinos e o sistema reprodutor feminino

Alguns DEs parecem exercer atividade hormonal, alterando a homeostase e a regulação das funções do sistema reprodutor feminino. O TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), um composto organoclorado encontrado em pesticidas e como produto de combustão em incêndios, provoca a perda da função reprodutiva precocemente na idade adulta, através da diminuição dos níveis séricos de estrógeno e da perda da regularidade do ciclo reprodutivo (JABLONSKA *et al.*, 2010).

O trabalho de HONKISZ *et al.* (2012) avaliou a influência do TCS sobre a secreção de progesterona, estradiol e gonadotrofina coriônica humana (GCH) em cultura de células; bem como a viabilidade e proliferação celular, além de efeito apoptótico da exposição ao TCS. Os resultados obtidos evidenciaram grande efeito citotóxico, anti-proliferativo e apoptótico do TCS em maiores concentrações, e aumento da secreção de estradiol e progesterona, bem como efeitos adversos na secreção de GCH. Os autores concluíram que o TCS pode afetar o crescimento da placenta e, por consequência, do feto, já que contribuiu indiretamente na alteração da síntese de hormônios esteroidais.

O estudo de JUNG *et al.* (2012), observou que o TCS induz o aumento do peso uterino e dos níveis de expressão da calbindina-D e do complemento C3 mediados por uma via envolvendo receptor de estrogênio. A calbindina-D é um biomarcador para detecção de DEs. Seu gene é expresso em vários tecidos, incluindo o útero, e sua regulação neste tecido é modulada por hormônios esteroidais sexuais. O complemento C3 é um marcador estrogênio-sensível no útero. Esses resultados sugerem que o composto possui estrogenicidade como um DE.

LOUIS *et al.* (2013) relataram o efeito potencializador do TCS sobre o anticoncepcional etinilestradiol (EE), uma substância derivada do 17 β -estradiol (E2), o principal estrógeno endógeno nos seres humanos. Seu experimento não obteve resultados significativos quando o TCS foi administrado unicamente; entretanto, demonstrou um

crescimento atípico das células uterinas do rato na administração concomitante de TCS e EE, bem como aumento do peso das células epiteliais e mudança na expressão de genes de estrógeno.

WANG *et al.* (2015) relataram em seu trabalho a influência do TCS no aumento do número de casos de aborto em um modelo em humanos e em ratos. O estudo selecionou pacientes do Hospital da Universidade de Nanjing, China. O grupo controle consistia de mulheres que não tinham histórico de aborto espontâneo e possuíam pelo menos um filho. Os resultados revelaram que o nível urinário de TCS em 28,3% das amostras de mulheres que tiveram aborto precocemente foi 11,3 vezes maior em comparação com gestações normais. A dose de 10 mg/kg/dia administrada em ratas leva a uma concentração urinária de TCS equivalente à encontrada nas mulheres com alta concentração que tiveram aborto. A morte fetal, em ratos, foi dose-dependente, a qual se verificou através da formação de trombos placentários, aumento da agregação plaquetária e necrose tecidual, ao passo que a prole viva teve diminuição do peso ao nascimento proporcionalmente ao aumento da exposição ao TCS. Os níveis séricos de estrógeno e da proteína estrógeno sulfotransferase (responsável pela sulfonação de estrógeno durante a gestação) não foram alterados, no entanto verificou-se uma redução drástica na conjugação entre as duas moléculas. Os autores concluíram que a exposição ao TCS causaria o aborto através da inibição da conjugação entre estrógeno e estrógeno sulfotransferase, que atuaria na produção da trombose placentária.

Embora as informações disponíveis atualmente sejam, por vezes, contraditórias e incompletas, os trabalhos experimentais suportam a teoria de que o TCS é um DE do sistema reprodutor feminino. Fatores como a perturbação do metabolismo hormonal, deslocamento de hormônios a partir dos receptores hormonais e a interrupção da ação de enzimas relacionadas com a síntese de estrógeno têm contribuído para afirmar a ação desreguladora do TCS na homeostase do sistema reprodutor feminino (WANG & TIAN, 2015).

2.Referências da introdução geral

- ADOLFSSON-ERICI, M.; PETTERSON, M.; PARKKONEN, J. et al. Triclosan, a commonly used bactericide found in human breast milk and in the aquatic environment in Sweden. **Chemosphere**, New York, v.46, n.9-10, p.1485-9, Mar. 2002.
- ALLMYR, M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; MCLACHLAN, M.S. et al. Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. **Sci Total Environ**, Amsterdam, v.372, n.1, p.87-93, Dec. 2006.
- ALLMYR, M.; PANAGIOTIDIS, G.; SPARVE, E. et al. Human exposure to triclosan via toothpaste does not change CYP3A4 activity or plasma concentrations of thyroid hormones. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Copenhagen, v.105, n.5, p.339-44, Nov. 2009.
- ANDERSON, M.L. et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. 1ª ed. São Paulo, **Universidade Federal de São Paulo**, p.82-119, 2004.
- AXELSTAD, M.; BOBERG, J.; VINGGAARD, A.M. et al. Triclosan exposure reduces thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. **Food Chem Toxicol**, New York, v.59, p.534-40, Sep. 2013.
- BALMER, M.E.; POIGER, T.; DROZ, C. et al. Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. **Environ Sci Technol**, Washington, v.38, n.2, p.390-5, Jan. 2004.
- BUCKLEY, J.P.; HERRING, A.H.; WOLFF, M.S. et al. Prenatal exposure to environmental phenols and childhood fat mass in the Mount Sinai children's environmental health study. **Environ Int**, Amsterdam, v.91, p.350-6, May. 2016.
- CALAFAT, A.M.; YE, X.; WONG, L.Y. et al. Urinary concentrations of triclosan in U.S. population: 2003-2004. **Environ Health Perspect**, Durhan, v.116, n.3, p.303-7, Mar. 2008.
- CAPDEVIELLE, M.; VAN EGMOND, R.; WHELAN, M. et al. Consideration of exposure and species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. **Integr Environ Assess Manag**, Pensacola, v.4, n.1, p.15-23, Jan. 2008.
- CHIAM, K.; TILLEY, W.D.; BUTLER, L.M. et al. The dynamic and static modification of the epigenome by hormones: a role in the developmental origin of hormone related cancers. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, n.1795, p. 104-109, Apr. 2009.
- COONEY, C.M. Triclosan comes under scrutiny. **Environ Health Perspect**, v.118, n.6, p.242, Jun. 2010.
- COSTER, S. D.; LAREBEKE, N.V. Endocrine-disruptors chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. **J Environ Public Health**, New York, v.2012, p.1-52, Sep. 2012.
- CROFTON, K.M.; PAUL, K.B.; DEVITO, M.J. et al. Short-term *in vivo* exposure to water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environ Toxicol Pharmacol**, Amsterdam, v.24, n.2, p.194-7, Sep. 2007.

CULLINAN, M.P.; WESTERMAN, B.; HAMLET, S.M. et al. G.J. The effect of a triclosan-containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.30, p.414-419, 2003.

DANN, A.B.; HONTELA, A. Triclosan: enviromental exposure, toxicity and mechanisms of action. **J Appl Toxicol**, Philadelphia, v.31, n.4, p.285-311, May. 2011.

DAYAN, A.D. Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. **Food Chem Toxicol**, New York, v.45, n.1, p.125-9, Jan. 2007.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J.P.; GIUDICE, L.C. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr Rev**, Baltimore, v.30, n.4, p.293-342, Jun. 2009.

EPSTEIN, L. Fifty years since Silent Spring. **Annu Rev Phytopathol**, Palo Alto, v.52, p.377-402, 2014.

ESCALADA, M.G.; RUSSELL, A.D.; MAILLARD, J.-Y. et al. Triclosan-bacteria interactions: single or multiple target sites? **Lett Appl Microbiol**, v.41, n.6, p.476-81, 2005.

FANG, J.L.; STINGLEY, R.L.; BELAND, F.A. et al. Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, New York, v.28, n.3, p.147-71, Jul. 2010.

FORAN, C.M.; BENNETT, E.R.; BENSON, W.H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. **Mar Environ Res**, Kidlington, v.50, n.1-5, p.153-6, Dec. 2000.

GEENS, T.; DIRTU, A.C.; DIRINCK, E. et al. Daily intake of bisphenol A and triclosan and their association with anthropometric data, thyroid hormones and weight loss in overweight and obese individuals. **Environ Int**, Amsterdam, v.76, p.98-105, Mar. 2015.

GLASER, A. The ubiquitous Triclosan: a common antibacterial agent exposed. **Pesticides and you**, n.24, p.12-7, 2004.

GUNSOLLEY, J.C. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. **J Am Dent Assoc**, London, v.137, n.12, p.1649-1657, Dec. 2006.

HEATH, R.J.; YU, Y.T.; SHAPIRO, M.A. et al. Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. **J Biol Chem**, v.273, n.46, p.30316-30320, Nov. 1998.

HONKISZ, E.; ZIEBA-PRZYBYLSKA, D.; WOJTOWICZ, A.K. The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells. **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.34, n.3, p.385-92, Nov. 2012.

ISHIBASHI, H.; MATSUMURA, N.; HIRANO, M. et al. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v.67, n.2, p.167-79, Apr. 2004.

JABLONSKA, O.; SHI, Z.; VALDEZ, K.E. et al. Temporal and anatomical sensitivities to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin leading to premature acyclicity with age in rats. **Int J Androl**, Copenhagen, v.33, n.2, p.405-12, Apr. 2010.

JUNG, E.M.; AN, B.S.; CHOI, K.C. et al. Potential estrogenic activity of triclosan in the uterus of immature rats and rat pituitary GH3 cells. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v.208, n.2, p.142-8, Jan. 2012.

KANETOSHI, A.; KATSURA, E.; OGAWA, H. et al. Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan DP300) and its chlorinated derivatives. **Arch Environ Contam Toxicol**, New York, v.23, n.1, p.91-8, Jul. 1992.

KOEPPE, E.S.; FERGUSON, K.K.; COLACINO, J.A. et al. Relationship between urinary triclosan and paraben concentrations and serum thyroid measures in NHANES 2007–2008. **Sci Total Environ**, Amsterdam, v.445–446, p.299–305, Feb. 2013.

KUMAR, V.; CHAKRABORTY, A.; KURAL, M.R. et al. Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.27, n.2, p.177-85, Apr. 2009.

LOUIS, G.W.; HALLINGER, D.R.; STOKER, T.E. The effect of triclosan on the uterotrophic response to extended doses of ethinyl estradiol in the weanling rats. **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.36, p.71-7, Apr. 2013.

MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J. et al. Morphometric analysis of the endometrial epithelium of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic experimental alcoholism. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v.31, p.469-475, 1999.

ORVOS, D.R.; VERSTEEG, D.J.; INAUEN, J. et al. Aquatic toxicity of triclosan. **Environ Toxicol Chem**, New York, v.21, n.7, p.1338-49, Jul. 2002.

PALMLUND, I. Exposure to a xenoestrogen before birth: the diethylstilbestrol experience. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, Utrecht, v.17, n.2, p.71-84, Jun. 1996.

PALMLUND, I.; APFEL, R.; BUITENDIJK, S. et al. Effects of diethylstilbestrol (DES) medication during pregnancy: report from a symposium at the 10th international congress of ISPOG. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, Utrecht, v.14, n.1, p.71-89, Mar. 1993.

PANCER, B.A.; KOTT, D.; SUGAI, J.V. et al. Effects of triclosan on host response and microbial biomarkers during experimental gingivitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.43, n.5, p.435-44, May. 2016.

PATIASUL, H.B.; ADEWLE, H.B. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. **Front Behav Neurosc**, Lousanne, p.3-10, Jun. 2009.

PAUL, K.B.; HEDGE, J.M.; DEVITO, M.J. et al. Short-term exposure to triclosan decreases thyroxine in vivo via upregulation of hepatic catabolism in young Long–Evans rats. **Toxicol Sci**, Orlando, v.113, n.2, p.367–379, Feb. 2010.

PAUL, K.B.; HEDGE, J.M.; BANSAL, R. et al. Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. **Toxicology**, Amsterdam, v.300, n.1-2, p.31-45, Oct. 2012.

ROMIJN, J.A. Endocrinology in the 21st century: unmasking the mysteries of biology. **Neth J Med**, Haarlem, v.55, n.6, p.271-75, Dec. 1999.

SABALIUNAS, D.; WEBB, S.F.; HAUKE, A. et al. Environmental Fate of Triclosan in the River Aire Basin, Uk. **Water Res.** v.37, n.13, p.3145-3154, Jun. 2003.

SAVAGE, J.H.; MATSUI, E.C.; WOOD, R.A. et al. Urinary levels of triclosan and parabens are associated with aeroallergen and food sensitization. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v.130, n.2, p.453-60, Aug.2012.

SHEKHAR, S.; SOOD, S.; SHOWKAT, S. et al. Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. **Gen Comp Endocrinol**, New York, n.16, May. 2016.

STOKER, T.E.; GIBSON, E.K.; ZORRILA, L.M. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rats. **Toxicol Sci**, Orlando, v.117, n.1, p.45-53, Sep. 2010.

TATARAZAKO, N.; ISHIBASHI, H.; TESHIMA, K. et al. Effects of triclosan on various aquatic organisms. **Environ Sci**, Tokyo, v.11, n.2, p.133-140, 2004.

VAN DEN BROEK, A.M.; FEENSTRA, L.; DE BAAT, C. A review of the current literature on management of halitosis. **Oral Dis**. Copenhagen, v.14, n.1, p.30-9, Jan. 2008.

VELDHOEN, N.; SKIRROW, R.C.; OSACHOFF, H. et al. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v. 80, n.3, p.217-27, Dec.2006.

WALKER, W.F.J.R.; HOMBERGER, D.G. Anatomy & Dissection of the rat. 3^a ed. New York, W.H. Freeman and Company, p.122, 1997.

WANG, C.F.; TIAN, Y. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. **Environ Pollut**, Toronto, v.206, p.195-201, Nov. 2015.

WANG, X.; CHEN, X.; FENG, X. et al. Triclosan causes spontaneous abortion accompanied by decline of strongen sulfotransferase activity in humans and mice. **Sci Rep**, London, v.5, p. 507-13. Dec. 2015.

WEISS, L.; ARBUCKLE, T.E.; FISHER, M. et al. Temporal variability and sources of triclosan exposure in pregnancy. **Int J Hyg Environ Health**, Jena, v.218, n.6, p.507-13, Aug. 2015.

XUE, J.; WU, Q.; SAKTHIVEL, S. et al. Urinary levels of endocrine disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens and triclosan in obese and non-obese Indian children. **Environ Res**, Amsterdam, v.137, p.120-8, Feb. 2015.

YAZDANKHAH, S.P.; SCHEIE, A.K.; HOIBY, E.A. et al. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. **Microb Drug Resist**, Larchmont, v.12, n.2, p.83-90, 2006.

YUEH, M.F.; TUKEY, R.H. Triclosan: a widespread environmental toxicant with many biological effect. **Annul Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v.56, p.251-72, Jan. 2016.

3.Artigo

O presente trabalho originou o seguinte artigo:

Maternal exposure of triclosan cause fetal development restriction, dysregulation of the estrous cycle and changes of uterine tissue in rat offspring

Guilherme Bitencourt¹, Romário Willian Welter¹, Eduardo Deon Fortunato¹, Michael Aparecido Machado¹, Elaine Manoela Porto Amorim¹, João Paulo de Arruda Amorim^{1*}.

¹State University of Western Parana (UNIOESTE), Cascavel-PR, Brazil.

¹Universitária Street, 2069 – Universitário, Cascavel/PR, Brazil. Zip code: 85819-110.

*Tel.: +55 45 3220-7402; fax: +55 45 3220-3131

E-mail address: amorimjpa@yahoo.com.br

1 **Resumo**

2 O Triclosan (TCS) é um agente antimicrobiano amplamente utilizado em produtos
3 industrializados, especialmente de cuidado pessoal e higiene oral. Estudos comprovam que ele
4 altera a homeostase de diversos organismos, sendo, portanto, considerado um desregulador
5 endócrino. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos decorrentes da
6 exposição materna ao TCS durante a prenhez e lactação na morfofisiologia uterina da prole de
7 ratas. Para tanto, trinta e duas ratas prenhes foram divididas em 4 grupos de 8, tratadas uma vez
8 ao dia, por via oral, durante a prenhez e lactação, da seguinte forma: Grupo I – controle (GI):
9 somente óleo de milho; Grupo II (GII): TCS diluído em óleo de milho, na dose de 75 mg/kg/dia;
10 Grupo III (GIII): TCS diluído em óleo de milho, na dose de 150 mg/kg/dia; Grupo IV (GIV):
11 TCS diluído em óleo de milho, na dose de 300 mg/kg/dia. Um filhote do sexo feminino de cada
12 mãe foi selecionado, e aos 90 dias os filhotes foram eutanasiados, para pesagem e coleta do
13 útero para análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que o peso médio da ninhada
14 foi significativamente menor em todos os grupos tratados com TCS, quando comparados ao
15 controle. A prole de todos os grupos expostos ao TCS apresentou desregulação do ciclo estral,
16 comparados ao controle. A análise da estrutura histológica uterina demonstrou que todas as
17 camadas do útero foram afetadas pela administração de TCS, e a análise morfométrica mostrou
18 aumento das camadas uterinas nos grupos tratados. A contagem de leucócitos apresentou
19 aumento do infiltrado inflamatório nos grupos de 150 e 300 mg de TCS, em comparação aos
20 demais grupos. Conclui-se que a exposição materna ao TCS, durante a prenhez e lactação,
21 provoca diminuição do peso médio da ninhada, desregula o ciclo estral e causa alteração da
22 estrutura uterina da prole.

23 **Palavras-chave:** Triclosan, desreguladores endócrinos, útero, ratos.

24 **Introdução**

25 O Triclosan (TCS) é um antimicrobiano de amplo espectro utilizado em larga escala
26 na indústria como componente de produtos de higiene pessoal (dentifrícos, enxaguatórios
27 bucais, sabonetes, desodorantes, cremes, xampus, entre outros), itens domésticos (tábuas de
28 corte, utensílios de cozinha, têxteis, materiais de embalagens, entre outros), e dispositivos
29 médicos (FANG *et al.*, 2010; STOKER *et al.*, 2010; DANN & HONTELA, 2011).

30 Ele tem sido encontrado como contaminante ambiental pela sua bioacumulação na
31 biota; presente na água após o tratamento de potabilidade, rios, lagos, mares, em águas residuais
32 e sedimentos, bem como na bile de peixes selvagens, confirmando a extensa contaminação dos
33 mananciais e da fauna aquática (TATARAZAKO *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2010). A exposição
34 ao TCS ocorre através da ingestão da substância, inalação ou ainda pelo contato dermatológico
35 (FANG *et al.*, 2010), sendo a água contaminada e os produtos cosméticos e de higiene os
36 principais responsáveis pela interação indivíduo-substância (ADOLFSSON-ERICI *et al.*, 2002;
37 ALLMYR *et al.*, 2006).

38 A identificação e quantificação desse composto, em humanos, na urina (CALAFAT *et*
39 *al.*, 2008; KOEPPE *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2015; WEISS *et al.*, 2015; BUCKLEY *et al.*, 2016),
40 no leite materno (ADOLFSSON-ERICI *et al.*, 2002; ALLMYR *et al.*, 2006; DAYAN, 2007),
41 plasma sanguíneo (ALLMYR *et al.*, 2006; SHEKHAR *et al.*, 2016) e líquido amniótico
42 (SHEKHAR *et al.*, 2016) confirma constante exposição. Por ser um composto lipofílico, sofre
43 bioacumulação no tecido adiposo (GEENS *et al.*, 2015).

44 Na Odontologia, o TCS é utilizado em dentifrícios e enxaguatórios bucais, nas
45 concentrações de 0,3 e 0,2%, respectivamente (PANCER *et al.*, 2016). Suas propriedades
46 antibacteriana e também anti-inflamatória reduzem o biofilme e a gengivite, além de
47 desacelerar a progressão da doença periodontal (CULLINAN *et al.*, 2003; GUNSOLLEY,
48 2006).

49 A facilidade de exposição ao TCS, bem como sua comprovada presença em tecidos e
50 fluidos corporais, poderia trazer impactos sobre a saúde humana (CALAFAT *et al.*, 2008).
51 Diversos estudos apontam o TCS como um desregulador endócrino (DE), em cultura de células
52 (HONKISZ *et al.*, 2012), peixes (FORAN *et al.*, 2000; ISHIBASHI *et al.*, 2004), rãs
53 (VELDHOEN *et al.*, 2006), ratos (CROFTON *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2009; PAUL *et al.*,
54 2010a; JUNG *et al.*, 2012; PAUL *et al.*, 2012, LOUIS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015) e
55 humanos (WANG *et al.*, 2015). Desregulador endócrino é qualquer substância exógena capaz
56 modificar o controle homeostático do organismo (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).

57 O TCS é capaz de alterar o equilíbrio do hormônio da tireoide, causando
58 hipotiroxinemia (VELDHOEN *et al.*, 2006; PAUL *et al.*, 2010a; PAUL *et al.*, 2012), pela
59 similaridade entre as estruturas químicas da tiroxina (T4) e do TCS, já que ambos são éteres
60 com dois anéis aromáticos halogenados. Portanto, o TCS pode mimetizar a presença de tiroxina
61 (T4) circulante pelo corpo. Outros trabalhos demonstraram sua ação anti-androgênica sobre o
62 sistema reprodutor masculino de ratos (KUMAR *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2016). Recentes
63 trabalhos, em cultura de células e modelos animais, relatam a possível atuação do TCS durante

64 a gestação, sobre o feto em desenvolvimento (HONKISZ *et al.*, 2012; PAUL *et al.*, 2012;
65 WANG *et al.*, 2015) e sobre o sistema reprodutor feminino (JUNG *et al.*, 2012; LOUIS *et al.*,
66 2013).

67 Considerando-se que dados quanto aos efeitos da exposição indireta ao TCS ainda são
68 escassos, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos decorrentes da exposição materna
69 ao TCS durante a prenhez e lactação, na morfofisiologia uterina da prole de ratas.

70 **Metodologia**

71 **Delineamento experimental**

72 *Animais*

73 Doze ratos machos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g), e trinta
74 e duas fêmeas adultas (90 dias de idade, pesando aproximadamente 250g), da variedade *Wistar*,
75 foram adquiridos do Biotério Central da Unioeste, e adaptados e mantidos no Biotério Setorial
76 do Laboratório de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade
77 Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR, em gaiolas coletivas de polietileno
78 (43x30x15 cm), acomodados individualmente ou em duplas, sob condições controladas de
79 temperatura, entre 22° e 25°C, umidade relativa próxima de 55% e fotoperíodo de 12 horas
80 (período de luz 7:00-19:00h). Os procedimentos experimentais estão de acordo com os
81 Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de
82 Experimentação Animal (COBEA) e foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética na
83 Experimentação Animal (CEEAA) da UNIOESTE.

84 *Acasalamento e obtenção de fêmeas prenhes*

85 Os acasalamentos naturais foram realizados no período escuro do ciclo, colocando
86 duas fêmeas na caixa de cada macho, ao final da tarde. Na manhã subsequente, foram colhidos
87 lavados vaginais, e a presença de espermatozoides associada à fase do ciclo estral foram
88 utilizadas como fator indicativo de prenhez, considerado dia zero da gestação. As fêmeas
89 prenhes foram divididas em quatro grupos experimentais, conforme descrito abaixo.

90 *Grupos experimentais, droga, dose e via de administração*

91 O tratamento com Triclosan se deu a partir do 8° dia gestacional (DG8), até o 21° dia
92 pós-natal (DPN21). As fêmeas prenhes foram tratadas uma vez ao dia (entre 8:00-9:00h), por
93 via oral (gavagem intragástrica), durante a prenhez e lactação da seguinte forma: Grupo I (GI):

94 composto por 8 ratas do grupo controle que receberam somente óleo de milho nas mesmas
95 condições experimentais dos demais grupos; Grupo II (GII): composto por 8 ratas que
96 receberam TCS (CAS#3380-34-5, $\geq 97,0\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em
97 óleo de milho, na dose de 75 mg/kg/dia; Grupo III (GIII): composto por 8 ratas que receberam
98 TCS diluído em óleo de milho, na dose de 150 mg/kg/dia; Grupo IV (GIV): composto por 8
99 ratas que receberam TCS diluído em óleo de milho, na dose de 300 mg/kg/dia. As três doses
100 selecionadas foram escolhidas baseadas em estudo toxicológico prévio conduzido por
101 AXELSTAD *et al.* (2013) e estão abaixo da dose letal mediana para ratos (via oral, LD50: 5000
102 mg/kg), conforme descrito por BHARGAVA & LEONARD (1996).

103 Para a avaliação indireta da toxicidade materna e ajuste da dose, as ratas foram pesadas
104 em dias alternados para controle de ganho de peso. A partir do 20º dia de prenhez (DG20), as
105 ratas foram monitoradas quanto ao nascimento dos filhotes. Em seguida, o número de filhotes
106 por ninhada foi reduzido para oito, procurando sempre manter o maior número de fêmeas
107 possível. O desmame foi realizado no 21º dia pós-natal. Após o desmame, as ratas mães foram
108 eutanasiadas por decapitação em guilhotina.

109 *Avaliação dos sinais físicos externos da prole*

110 Os recém-nascidos foram avaliados quanto à presença de malformações externas, de
111 acordo com metodologia descrita por SMART & DOBBING (1971). Para evitar rejeição
112 materna (HOLEMANS *et al.*, 1999), o peso corporal da prole foi avaliado a partir do DPN 3 e
113 monitorado até a eutanásia.

114 *Grupos experimentais da prole*

115 Grupo controle (n = 8, sendo um indivíduo da prole feminina por rata) e grupos
116 tratados com TCS nas diferentes doses (n = 8 para cada grupo de rata tratada, sendo um
117 indivíduo da prole feminina por rata).

118 *Análise do ciclo estral*

119 Para se investigar a regularidade do ciclo estral, foram colhidos lavados vaginais de
120 todos os filhotes. Para tanto, sempre no mesmo horário, uma ponteira contendo 10µL de solução
121 fisiológica (NaCl 0,9%) acoplada a um pipetador automático foi introduzida na vagina das ratas,
122 e o líquido transferido e logo depois aspirado (MARCONDES *et al.*, 2002). Em seguida, os
123 lavados vaginais foram espalhados sobre lâminas histológicas limpas e previamente
124 identificadas com o número do animal e analisados com o auxílio de um microscópio óptico. A

125 regularidade do ciclo estral que, na rata, dura em média 4 a 5 dias, foi estudada em todas as
126 ratas a partir do DPN 69 até o 90. A classificação da fase do ciclo em proestro, estro, metaestro
127 e diestro, foi baseada nos parâmetros descritos por GOLDMAN *et al.* (2007).

128 ***Eutanásia e coleta de material biológico***

129 Na idade adulta (90 dias de idade), as fêmeas em estro foram pesadas e eutanasiadas
130 por decapitação em guilhotina. Os animais foram submetidos a laparotomia abdômino-pélvica
131 para remoção dos órgãos reprodutores (útero, ovários e tubas uterinas) que foram pesados
132 separadamente em balança analítica.

133 ***Processamento das peças, confecção das lâminas e obtenção das imagens***

134 Os úteros foram fixados em formalina 10% e processados com metodologia adequada
135 para microscopia de luz, com inclusão em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich, USA). Para as
136 análises histológicas, foram realizados cortes seriados no plano longitudinal com 5µm de
137 espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de
138 aço. Foi selecionada uma secção uterina e desprezadas outras três subsequentes ao longo de
139 todo o órgão, perfazendo-se uma média de 10 repetições/fêmea/grupo. Os cortes obtidos foram
140 desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de coloração
141 hematoxilina-eosina (HE) para análise. Na obtenção das imagens, foi utilizado microscópio
142 óptico (Olympus BX61) equipado com câmera digital Olympus DP71 e software DP Controller
143 3.2.1.276.

144 ***Análise histológica e morfométrica do útero***

145 A estrutura uterina foi analisada comparando as características histológicas das
146 camadas do útero entre os grupos tratados com TCS e o grupo controle, de acordo com as
147 descrições propostas por MARTINEZ *et al.* (1999). Foram mensuradas as espessuras em
148 micrômetros (µm) do epitélio luminal, estroma endometrial, miométrio e perimétrio nas
149 porções proximal, média e distal em relação ao ovário. Para mensuração das espessuras do
150 epitélio luminal e perimétrio, foi utilizada a objetiva de 10x, e para as espessuras de estroma e
151 miométrio, a objetiva de 4x (CAMARGO *et al.*, 2009). Após captura das imagens, as regiões
152 foram analisadas no programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

153 ***Contagem de leucócitos***

154 A quantificação foi realizada em cortes histológicos semi-seriados com 5 µm de
155 espessura da região do estroma do útero. A contagem foi determinada pela quantidade total de
156 leucócitos presentes por campo microscópico (objetiva de 40x), padronizado em cinco campos
157 microscópicos aleatórios por corte, cinco cortes por animal e cinco animais por grupo. A
158 contagem foi realizada utilizando microscópio óptico (Olympus CBC).

159 **Análise dos Resultados**

160 Foi utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com teste “a
161 posteriori” de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando
162 $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa SigmaPlot versão 11.0 (Systat
163 Software Inc., San Jose, CA, USA).

164 **Resultados**

165 **Parâmetros maternos e da prole**

166 A média do peso corporal das mães foi semelhante entre os grupos no início do período
167 experimental; entretanto, o peso corporal no final do período da prenhez foi menor nas mães
168 do grupo de 300 mg de TCS, quando comparadas ao grupo controle (tabela 1).

169 Nenhum dos grupos experimentais apresentou presença de malformações externas. O
170 peso médio da ninhada foi significativamente menor em todos os grupos tratados com TCS,
171 quando comparados ao controle (tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros maternos e da ninhada nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Massa corpórea no início da gestação (g)	241,63±7,52 ^a	240,33±5,71 ^a	238,45±6,15 ^a	240,45±8,05 ^a
Massa corpórea no final da gestação (g)	293,34±16,16 ^a	287,09±17,52 ^a	293,33±18,58 ^a	264,51±15,13 ^b
Número de animais por ninhada DPN 0	11,3±0,87 ^a	10,01±1,01 ^a	9,45±0,98 ^a	11,02±0,89 ^a
Peso médio (g) da ninhada DPN 3	8,40±0,67 ^a	5,95±0,84 ^b	6,5±0,61 ^b	6,09±0,71 ^b

Valores expressos em média ± desvio padrão. DPN= dia pós-natal. N materno= 8 animais/grupo. N da prole= 6 animais/grupo. Análise de variância – ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes ^{a,b}= p<0,05.

172 **Análise do ciclo estral da prole**

173 A prole de todos os grupos expostos ao TCS durante a gestação e lactação apresentou
 174 desregulação do ciclo estral. Os resultados demonstram que os animais de todos os grupos
 175 tratados tiveram redução do número de ciclos estrais, diminuição da frequência da fase proestro
 176 e aumento da frequência na fase metaestro, quando comparados com o grupo controle (tabela
 177 2).

Tabela 2. Duração do ciclo estral e frequência em cada fase do ciclo no período de 21 dias consecutivos da prole feminina exposta ao TCS durante a gestação e lactação.

Ciclo estral	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Duração do ciclo estral (dias)	4,00±0,10 ^a	5,68±0,23 ^b	5,88±0,20 ^b	5,48±0,19 ^b
Frequência em proestro (dias)	5,30±0,15 ^a	3,63±0,15 ^b	3,42±0,10 ^b	3,25±0,10 ^b
Frequência em estro (dias)	5,50±0,16 ^a	4,83±0,56 ^a	4,43±0,56 ^a	4,41±0,56 ^a
Frequência em metaestro (dias)	0,70±0,26 ^a	3,36±0,43 ^b	3,43±0,23 ^b	3,48±0,16 ^b
Frequência em diestro (dias)	9,50±0,16 ^a	9,18±0,67 ^a	9,72±0,47 ^a	9,86±0,56 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. N= 10 animais/ grupo. Análise de variância – ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes ^{a,b}= p<0,05.

178 **Avaliação histológica da estrutura uterina da prole**

179 A análise da estrutura histológica uterina demonstrou que todas as camadas do útero
 180 foram afetadas pela administração de TCS. No grupo controle, o epitélio luminal do tipo colunar
 181 simples se caracterizou pelo aspecto retilíneo (Figura 2A). O estroma endometrial, de aspecto
 182 solto ou fibrocelular, apresentou leucócitos dispersos e glândulas de aspecto tortuoso e tubular.
 183 O miométrio constituiu-se de duas camadas de músculo liso bem organizado, uma camada
 184 circular interna e outra camada longitudinal externa, com uma camada vascular entre elas. O
 185 perimétrio constituiu-se de epitélio escamoso (Figura 2B). Nos grupos tratados com TCS, o
 186 epitélio luminal do tipo colunar simples apresentou aspecto papilífero (Figura 2C, E e G), com
 187 vacuolização e aumento da altura das células (Figura 2D, F e H). O estroma endometrial, o
 188 miométrio e o perimétrio apresentaram aumento da espessura (Figura 2C, E e G). No grupo
 189 tratado com 75 mg de TCS, o estroma endometrial apresentou leucócitos dispersos (Figura 3A),
 190 como no grupo controle (Figura 2B). Os demais grupos tratados com TCS apresentaram maior
 191 quantidade de infiltrado inflamatório (Figura 3B e C).

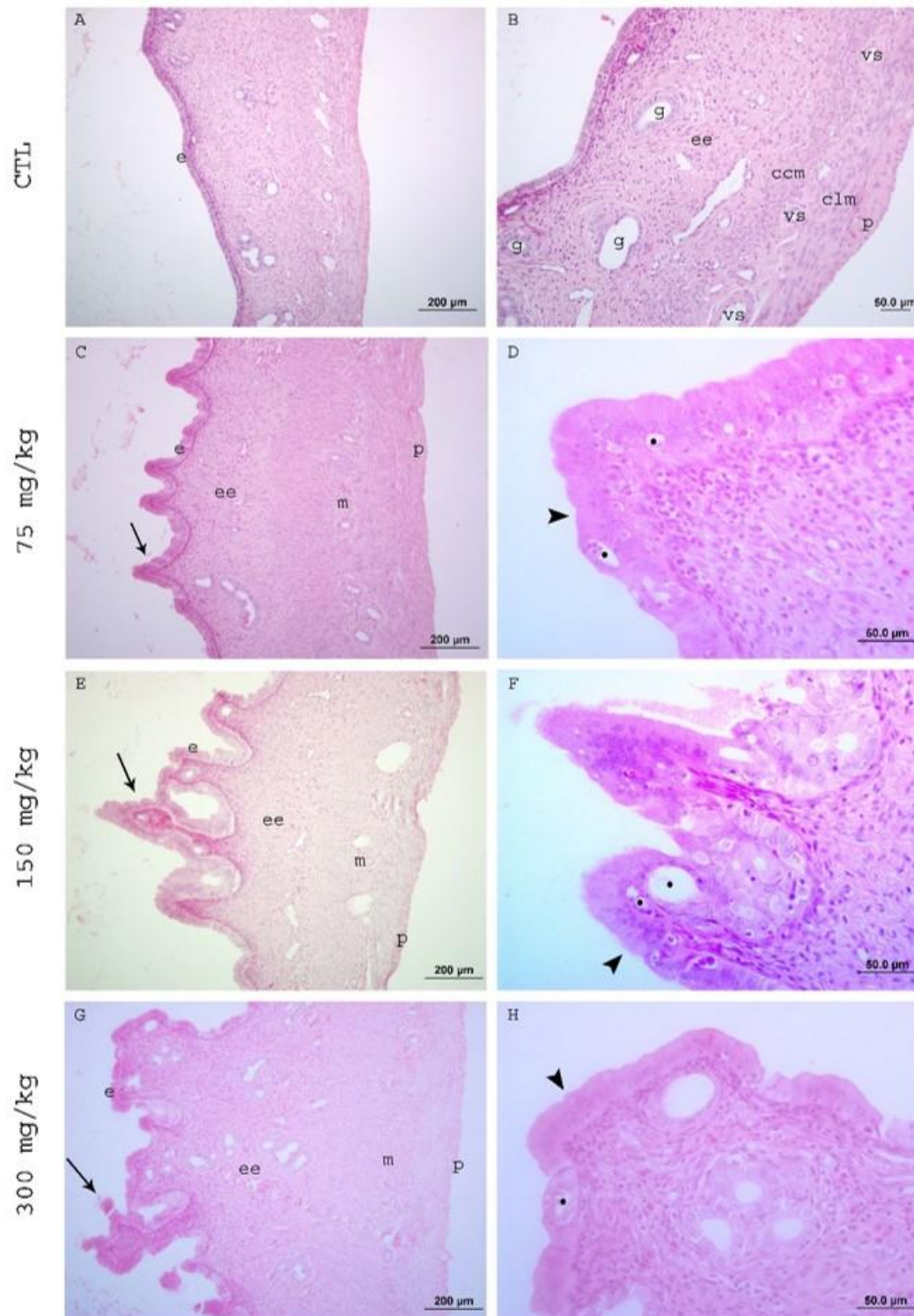


Figura 2. Fotomicrografia da parede uterina dos animais dos diferentes grupos experimentais. A. Epitélio luminal (e). B. Estroma endometrial (ee) com glândulas de aspecto tortuoso e tubular (g); camadas musculares do miométrio, circular (ccm) e lisa (clm), separadas por uma camada vascular (vs); perimétrio (p). C, E e G. Aspecto papilífero do epitélio luminal (setas); espessura aumentada do estroma endometrial (ee), miométrio (m) e perimétrio (p). D, F e H. Epitélio luminal com vacuolização (esferas) e aumento da altura das células (pontas de seta). Coloração: Hematoxilina-eosina.

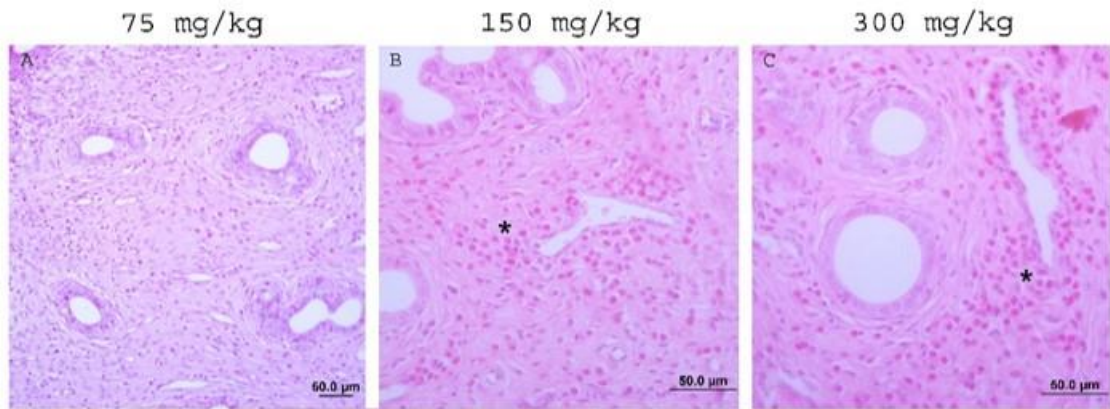


Figura 3. Fotomicrografia do estroma endometrial dos animais dos grupos tratados. A. Estroma endometrial com quantidade normal de infiltrado inflamatório – leucócitos dispersos. B e C. Estroma endometrial com aumento do infiltrado inflamatório (*). Coloração: Hematoxilina-eosina.

192 **Análise morfométrica da estrutura uterina da prole**

193 A prole de todos os grupos expostos ao TCS durante a prenhez e lactação apresentou
 194 aumento da espessura das camadas uterinas. Os resultados demonstram que mesmo na dose
 195 mais baixa já ocorre desestruturação das camadas uterinas, apresentando diferenças entre os
 196 grupos tratados, bem como quando comparados com o grupo controle (tabela 3).

Tabela 3. Espessura do epitélio luminal, estroma, miométrio e perimétrio do útero de ratas dos diferentes grupos experimentais expostos ao TCS durante a prenhez e lactação.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Espessura do Epitélio (μm)				
Proximal	29,60 \pm 1,48 ^a	34,85 \pm 1,54 ^b	38,04 \pm 1,28 ^b	38,65 \pm 1,26 ^b
Médio	28,14 \pm 1,23 ^a	43,16 \pm 2,35 ^b	34,40 \pm 1,59 ^c	29,48 \pm 0,79 ^{ac}
Distal	27,37 \pm 0,73 ^a	38,85 \pm 1,80 ^b	39,77 \pm 1,33 ^b	39,41 \pm 1,05 ^b
Espessura do Estroma (μm)				
Proximal	279,80 \pm 14,41 ^a	452,53 \pm 29,18 ^b	439,60 \pm 36,38 ^b	519,44 \pm 15,42 ^b
Médio	217,57 \pm 19,09 ^a	491,63 \pm 28,40 ^b	508,94 \pm 27,46 ^b	514,30 \pm 27,71 ^b
Distal	228,94 \pm 11,71 ^a	460,21 \pm 24,43 ^b	461,56 \pm 34,95 ^b	526,47 \pm 16,76 ^b
Espessura do Miométrio (μm)				
Proximal	233,77 \pm 9,88 ^a	351,87 \pm 13,08 ^b	335,32 \pm 10,14 ^b	328,81 \pm 9,26 ^b
Médio	256,02 \pm 9,87 ^a	420,26 \pm 20,01 ^b	369,41 \pm 14,83 ^c	326,82 \pm 10,09 ^c
Distal	257,16 \pm 5,28 ^a	457,65 \pm 15,55 ^b	394,12 \pm 15,50 ^c	407,64 \pm 14,86 ^c
Espessura do Perimétrio (μm)				
Proximal	14,96 \pm 0,87 ^a	23,82 \pm 1,41 ^b	18,57 \pm 1,08 ^c	20,06 \pm 0,87 ^{bc}
Médio	13,05 \pm 0,62 ^a	22,29 \pm 1,07 ^b	22,88 \pm 1,02 ^b	19,82 \pm 0,76 ^b
Distal	13,79 \pm 0,67 ^a	28,21 \pm 1,49 ^b	21,37 \pm 1,63 ^c	20,36 \pm 0,74 ^c

Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise de variância – ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes ^{a,b,c}= p<0,05.

197 **Contagem de leucócitos**

198 Os animais do grupo tratado com 75 mg de TCS não apresentaram diferenças
 199 estatisticamente significativas no número de leucócitos presentes no estroma, quando
 200 comparado com o grupo controle. Já os grupos tratados com 150 e 300 mg de TCS apresentaram
 201 aumento significativo do infiltrado inflamatório, quando comparados com o grupo controle e
 202 75 mg de TCS (tabela 4).

Tabela 4. Contagem de leucócitos no estroma do útero de ratas dos diferentes grupos experimentais expostos ao TCS durante a prenhez e lactação.

Parâmetro	Controle	75 mg/kg/dia	150 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia
Número de leucócitos/campo de 400x	60,21±38,60 ^a	58,44±32,81 ^a	103,70±60,25 ^b	116±53,96 ^b

Valores expressos em média ± desvio padrão. N= 5 animais/grupo. Análise de variância – ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey. Letras diferentes ^{a,b}= p<0,05.

203 **Discussão**

204 Durante o desenvolvimento dos tecidos e órgãos, o genoma pode sofrer remodelação,
 205 por ser um período de sensibilidade às exposições ambientais. A exposição aos desreguladores
 206 endócrinos pode reprogramar o genoma dos tecidos em desenvolvimento, aumentando a
 207 susceptibilidade a doenças que se manifestam na vida adulta, processo denominado
 208 “reprogramação do desenvolvimento” ou “programação fetal” (Walker, 2016).

209 Em nosso estudo, o peso médio da ninhada foi significativamente menor em todos os
 210 grupos tratados com TCS, quando comparados com o grupo controle. Sabe-se que os hormônios
 211 da tireoide, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), têm papel essencial no crescimento e
 212 desenvolvimento fetal; uma das complicações do hipotireoidismo materno é o baixo peso fetal
 213 (Karakosta *et al.*, 2012). Pesquisadores têm demonstrado que a exposição de ratas prenhes ao
 214 TCS produz diminuição nos níveis séricos de T3 e T4; mesmo uma baixa dose (8 mg/kg/dia)
 215 de TCS já é capaz de induzir o hipotireoidismo materno (Wang *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2017).
 216 O TCS inibe a atividade da tireoide peroxidase, uma proteína crítica envolvida na síntese dos

217 hormônios da tireoide (Wu, Beland & Fang, 2015). Ainda, o hipotireoidismo induzido pelo
218 TCS pode ser parcialmente causado por regulação ascendente de catabolismo hepático,
219 facilitada pelo aumento na atividade da pentoxiresofurina-O-desetilase (PROD) (Paul *et al.*,
220 2010a).

221 O peso corporal fetal também está relacionado com o desenvolvimento da placenta e
222 a capacidade de transferência de nutrientes durante a última metade da gestação (Cao *et al.*,
223 2017). Durante o desenvolvimento da placenta em ratas, o pico da atividade proliferativa celular
224 na zona basal, da glândula metrial e na zona do labirinto acontecem no dia gestacional 11, 12 e
225 13, respectivamente (Coan *et al.*, 2006). A capacidade proliferativa da zona do labirinto é a
226 mais intensa e duradoura entre elas. Sabe-se que a administração de TCS diminui
227 significativamente a capacidade proliferativa desta zona, pela baixa expressão dos marcadores
228 de proliferação celular (PCNA e Ciclina D3) (Cao *et al.*, 2017).

229 A hipotiroxinemia pode contribuir para a patofisiologia da hipoplasia placentária
230 (Vasilopoulou *et al.*, 2010). O hormônio da tireoide ativa rapidamente as vias de sinalização da
231 proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e da proteína quinase B (Akt) (via Akt-
232 mTOR) que induzem a proliferação da célula trofoblástica (Wen *et al.*, 2005; Kenessey &
233 Ojamaa, 2006). A exposição ao TCS durante a prenhez e lactação diminui os níveis séricos do
234 hormônio da tireoide na rata mãe e na prole. Porém, na prole, a diminuição é transitória, até o
235 4º dia pós-natal, possivelmente por fatores toxicocinéticos de distribuição do TCS que limitam
236 sua transferência pelo leite materno (Paul *et al.*, 2010b). A redução do hormônio da tireoide em
237 ratas tratadas com TCS é um evento iniciador do retardamento do crescimento do feto (Paul *et*
238 *al.*, 2012).

239 Outro fator responsável pelo baixo peso ao nascer é o aumento do estrógeno causado
240 pelo TCS. Essa condição provém do efeito inibidor do TCS sobre a proteína estrógeno
241 sulfotransferase (EST), que desempenha papel crítico na modulação da atividade estrogênica
242 no plasma materno-fetal. A inibição da EST aumenta a agregação e ativação plaquetária e cria
243 um estado procoagulante que causa hemorragia placentária e necrose. A distribuição de
244 oxigênio e nutrientes ao feto em desenvolvimento é altamente dependente da manutenção do
245 fluxo sanguíneo uterino (Wang *et al.*, 2015). O hipotireoidismo materno, sua contribuição para
246 a hipoplasia placentária e o aumento do estrógeno no plasma materno-fetal causados pelo TCS
247 podem explicar a restrição de crescimento dos fetos em nosso estudo.

248 Em nosso experimento, os animais da prole feminina expostos as TCS (75, 150 e 300
249 mg), apresentaram desregulação do ciclo estral, com redução do número de ciclos, diminuição
250 da frequência da fase proestro e aumento da frequência da fase metaestro, quando comparados

251 ao grupo controle. Sabe-se que a exposição ao TCS durante a prenhez e lactação diminui as
252 concentrações do hormônio da tireoide na mãe e na prole (Paul et al., 2010b; Paul et al., 2012).
253 Já foi demonstrado que o hipotireoidismo induz ciclos estrais irregulares (Hatsuta *et al.*, 2004;
254 Lutsyk & Sogomonian, 2012). Essa condição se deve ao fato de que a expressão de hormônio
255 liberador de tireotropina (TRH), que regula a secreção do hormônio tireoestimulante (TSH) e
256 da prolactina, é influenciada pelo hipotireoidismo, havendo aumento da sua secreção por
257 feedback negativo. A prolactina promove a produção de progesterona (P4) (Hatsuta *et al.*,
258 2004), que por sua vez reduz a resposta da hipófise ao hormônio liberador de LH (LHRH)
259 (Stradtman, 1993). A redução da secreção de LHRH através do aumento da prolactina pode
260 prejudicar a secreção de LH, ocasionando distúrbios no ciclo estral (Hatsuta *et al.*, 2004), o que
261 provavelmente aconteceu com os animais do nosso estudo.

262 A análise morfométrica da estrutura uterina da prole demonstrou que todos os grupos
263 expostos ao TCS apresentaram aumento da espessura das camadas uterinas. Estudos
264 demonstram que o TCS modula a concentração de estrógeno exógeno e endógeno (Stoker,
265 Gibson & Zorrilla, 2010; Pollock *et al.*, 2016), pela capacidade de se ligar aos subtipos de
266 receptores de estrógeno, ER α e ER β (Henry & Fair, 2013). A exposição ao TCS induz efeitos
267 estrogênicos pela ativação direta do receptor de estrógeno, ou alterando um coativador da
268 interação receptor ligante para aumentar a resposta do esteróide (Stoker, Gibson & Zorrilla,
269 2010; Pollock *et al.*, 2016). O TCS também aumenta potencialmente a ação do estrógeno pela
270 diminuição do catabolismo, inibindo a atividade da enzima sulfotransferase hepática (Stoker,
271 Gibson & Zorrilla, 2010). Em amostras de fígado humano *in vitro*, baixas concentrações de
272 TCS podem inibir a estrona e a sulfonação de estradiol pela interação não-competitiva com
273 várias isoformas da sulfotransferase (James et al., 2010). Já que uma considerável porção do
274 TCS presente no organismo está localizada no fígado (Geens, Neels & Covaci, 2012), é
275 sugerido que o TCS pode interagir com as sulfotransferases hepáticas para inibir a conjugação
276 de estradiol exógeno e endógeno para suas formas biologicamente inativas (Pollock et al.,
277 2016).

278 Ainda, a expressão uterina da proteína de ligação ao cálcio (CaPB-9k), um
279 biomarcador comum regulado pelo estrógeno no útero, é aumentada com a administração de
280 TCS, indicando que ele desencadeia efeitos estrogênicos no útero de rata (Jung et al., 2012). O
281 estrógeno estimula a expressão da aromatase CYP19A1 através da ligação ao receptor de
282 estrógeno ER β nas células granulosa-luteínicas. A CYP19A1, por sua vez, estimula a síntese
283 de estrógeno e a liberação de prolactina (PRL) (Bao et al., 2000). Concentrações elevadas de
284 prolactina podem ser responsáveis pelo aumento do RNAm do ER β , somado ao fato de que o

285 hipotireoidismo induzido pelo TCS pode ter efeito direto sobre o aumento do RNAm do ER β ,
286 ocasionando aumento de estrógeno e prolactina (Hapon *et al.*, 2010). Sabe-se que o estrógeno
287 pode estimular o crescimento uterino (Kong *et al.*, 2015), e que a altura das células do epitélio
288 luminal é um indicador para estrogenicidade de xenobióticos (Newbold *et al.*, 2001), o que pode
289 explicar o aumento da espessura das camadas uterinas dos animais tratados em nosso estudo.

290 A contagem de leucócitos no estroma endometrial demonstrou aumento do infiltrado
291 inflamatório nos grupos tratados com 150 e 300 mg de TCS, em relação aos demais grupos. Os
292 receptores relacionados às respostas imunes no trato reprodutor feminino e, por consequência,
293 a infiltração de células do sistema imune no útero, são regulados pelos níveis plasmáticos dos
294 hormônios esteroides estrógeno e progesterona (Jones *et al.*, 2004; Lea & Sandra, 2007). A
295 presença leucocitária estromal seria dependente, especialmente, de altas concentrações de
296 progesterona (Camargo *et al.*, 2009). O aumento do infiltrado inflamatório, em nosso trabalho,
297 pode ser explicado pelo aumento da concentração de progesterona por ação indireta do TCS, já
298 que esse DE induz hipotireoidismo na mãe e na prole (Paul *et al.*, 2010b; Paul *et al.*, 2012),
299 influenciando a expressão do hormônio liberador de tireotropina (TRH), que aumenta a
300 secreção da prolactina, promovendo a produção de progesterona (Hatsuta *et al.*, 2004).

301 **Conclusão**

302 Conclui-se que a exposição materna ao TCS, durante a prenhez e lactação, provoca
303 diminuição do desenvolvimento intrauterino, desregula o ciclo estral e causa alteração da
304 estrutura uterina da prole.

305 **Agradecimentos**

306 Nós agradecemos a Clislaine Aparecida Tavares pelo suporte técnico laboratorial e à CAPES
307 pelo suporte financeiro.

308 **Conflito de interesses**

309 Os autores declaram que não existe conflito de interesses.

310 **Referências bibliográficas**

- 311 ADOLFSSON-ERICI, M.; PETTERSON, M.; PARKKONEN, J. et al. Triclosan, a commonly
312 used bactericide found in human breast milk and in the aquatic environment in Sweden.
313 **Chemosphere**, New York, v.46, n.9-10, p.1485-9, Mar. 2002.
- 314 ALLMYR, M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; MCLACHLAN, M.S. et al. Triclosan in plasma and
315 milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. **Sci Total**
316 **Environ**, Amsterdam, v.372, n.1, p.87-93, Dec. 2006.
- 317 ALLMYR, M.; PANAGIOTIDIS, G.; SPARVE, E. et al. Human exposure to triclosan via
318 toothpaste does not change CYP3A4 activity or plasma concentrations of thyroid hormones.
319 **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Copenhagen, v.105, n.5, p.339-44, Nov. 2009.
- 320 ANDERSON, M.L. et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. 1ª
321 ed. São Paulo, **Universidade Federal de São Paulo**, p.82-119, 2004.
- 322 AXELSTAD, M.; BOBERG, J.; VINGGAARD, A.M. et al. Triclosan exposure reduces
323 thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. **Food**
324 **Chem Toxicol**, New York, v.59, p.534-40, Sep. 2013.
- 325 BALMER, M.E.; POIGER, T.; DROZ, C. et al. Occurrence of methyl triclosan, a
326 transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland.
327 **Environ Sci Technol**, Washington, v.38, n.2, p.390-5, Jan. 2004.
- 328 BAO, B.; KUMAR, N.; KARP, R.M. et al. Estrogen receptor-beta expression in relation to the
329 expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian
330 follicles. **Biol Reprod**, Champaign, v.63, n.6, p.1747-1755, 2000.
- 331 BHARGAVA, H.N.; LEONARD, P.A. Triclosan: applications and safety. **Am J Infect**
332 **Control**, St. Louis, v.24, p.209-218, 1996.
- 333 BUCKLEY, J.P.; HERRING, A.H.; WOLFF, M.S. et al. Prenatal exposure to environmental
334 phenols and childhood fat mass in the Mount Sinai children's environmental health study.
335 **Environ Int**, Amsterdam, v.91, p.350-6, May. 2016.
- 336 CALAFAT, A.M.; YE, X.; WONG, L.Y. et al. Urinary concentrations of triclosan in U. S.
337 population: 2003-2004. **Environ Health Perspect**, Durhan, v.116, n.3, p.303-7, Mar. 2008.
- 338 CAMARGO, I.C.; GASPAR, A.L.; FREI, F. et al. Effects of androgenic anabolic steroids on
339 the uterus and reproductive parameters of adult female rats. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.31,
340 n.9, p.453-460, Sep. 2009.
- 341 CAO, X.; HUA, X.; WANG, X. et al. Exposure of pregnant mice to triclosan impairs placental
342 development and nutrient transport. **Sci Rep**, London, Mar. 2017.
- 343 CAPDEVIELLE, M.; VAN EGMOND, R.; WHELAN, M. et al. Consideration of exposure and
344 species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. **Integr Environ Assess Manag**,
345 Pensacola, v.4, n.1, p.15-23, Jan. 2008.

- 346 CHIAM, K.; TILLEY, W.D.; BUTLER, L.M. et al. The dynamic and static modification of the
 347 epigenome by hormones: a role in the developmental origin of hormone related cancers.
 348 **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, n.1795, p.104-109, Apr. 2009.
- 349 COAN, P.M.; CONROY, N.; BURTON, G.J. et al. Origin and characteristics of glycogen cells
 350 in the developing murine placenta. **Dev Dyn**, New York, v.235, n.12, p.3280-94, Dec. 2006.
- 351 COONEY, C.M. Triclosan comes under scrutiny. **Environ Health Perspect**, v.118, n.6, p.242,
 352 Jun. 2010.
- 353 COSTER, S.D.; LAREBEKE, N.V. Endocrine-disruptors chemicals: Associated disorders and
 354 mechanisms of action. **J Environ Public Health**, New York, v.2012, p.1-52, Sep. 2012.
- 355 CROFTON, K.M.; PAUL, K.B.; DEVITO, M.J. et al. Short-term *in vivo* exposure to water
 356 contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environ Toxicol Pharmacol**,
 357 Amsterdam, v.24, n.2, p.194-7, Sep. 2007.
- 358 CULLINAN, M.P.; WESTERMAN, B.; HAMLET, S.M. et al. G.J. The effect of a triclosan-
 359 containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. **J Clin**
 360 **Periodontol**, Copenhagen, v.30, p.414-419, 2003.
- 361 DANN, A.B.; HONTELA, A. Triclosan: enviromental exposure, toxicity and mechanisms of
 362 action. **J Appl Toxicol**, Philadelphia v.31, n.4, p.285-311, May. 2011.
- 363 DAYAN, A. D. Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. **Food Chem**
 364 **Toxicol**, New York, v.45, n.1, p.125-9, Jan. 2007.
- 365 DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C. et al. Endocrine-
 366 disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr Rev**, Baltimore, v.30,
 367 n.4, p.293-342, Jun. 2009.
- 368 ESCALADA, M.G.; RUSSELL, A.D.; MAILLARD, J.-Y. et al. Triclosan-bacteria
 369 interactions: single or multiple target sites? **Lett Appl Microbiol**, v.41, n.6, p.476-81, 2005.
- 370 EPSTEIN, L. Fifty years since Silent Spring. **Annu Rev Phytopathol**, Palo Alto, v.52, p.377-
 371 402, 2014.
- 372 FANG, J.L.; STINGLEY, R.L.; BELAND, F.A. et al. Occurrence, efficacy, metabolism, and
 373 toxicity of triclosan. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, New York,
 374 v.28, n.3, p.147-71, Jul. 2010.
- 375 FORAN, C.M.; BENNETT, E.R.; BENSON, W.H. Developmental evaluation of a potential
 376 non-steroidal estrogen: triclosan. **Mar. Environ. Res**, Kidlington, v.50, n.1-5, p.153-6, Dec.
 377 2000.
- 378 GEENS, T.; DIRTU, A.C.; DIRINCK, E. et al. Daily intake of bisphenol A and triclosan and
 379 their association with anthropometric data, thyroid hormones and weight loss in overweight
 380 and obese individuals. **Environ Int**, Amsterdam, v.76, p.98-105, Mar. 2015.

- 381 GLASER, A. The ubiquitous Triclosan: a common antibacterial agent exposed. **Pesticides and**
382 **you**, n.24, p.12-7, 2004.
- 383 GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of
384 vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B**, n.80, p.84–97,
385 2007.
- 386 GUNSOLLEY, J.C. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis
387 agents. **J Am Dent Assoc**, London, v.137, n.12, p.1649-1657, Dec. 2006.
- 388 HAPON, M.B.; GAMARRA-LUQUES, C.; JAHN, G.A. Short term hypothyroidism affects
389 ovarian function in the cycling rat. **Reprod Biol Endocrinol**, London, v.8, n.14, Feb. 2010.
- 390 HATSUTA, M.; ABE, K.; TAMURA, K. et al. Effects of hypothyroidism on the estrous cycle
391 and reproductive hormones in mature female rat. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.486, n.3,
392 p.343-8, Feb. 2004.
- 393 HEATH, R.J.; YU, Y.T.; SHAPIRO, M.A. et al. Broad spectrum antimicrobial biocides target
394 the FabI component of fatty acid synthesis. **J Biol Chem**, v.273, n.46, p.30316-30320, Nov.
395 1998.
- 396 HOLEMANS, K.; GERBER, R.; MEURRENS, K. et al. Maternal food restriction in the second
397 half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. **Br J**
398 **Nutr**, v.81, n.1, p.73-79, 1999.
- 399 HONKISZ, E.; ZIEBA-PRZYBYLSKA, D.; WOJTOWICZ, A.K. The effect of triclosan on
400 hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells. **Reprod Toxicol**,
401 Elmsford, v.34, n.3, p.385-92, Nov. 2012.
- 402 ISHIBASHI, H.; MATSUMURA, N.; HIRANO, M. et al. Effects of triclosan on the early life
403 stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. **Aquat**
404 **Toxicol**, Amsterdam, v.67, n.2, p.167-79, Apr. 2004.
- 405 JABLONSKA, O.; SHI, Z.; VALDEZ, K.E. et al. Temporal and anatomical sensitivities to the
406 aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin leading to premature
407 acyclicity with age in rats. **Int J Androl**, Copenhagen, v.33, n.2, p.405-12, Apr. 2010.
- 408 JONES, R.L.; HANNAN, N.J.; KAITU'U, T.J. et al. Identification of chemokines important
409 for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and
410 menstruation. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v.89, n.12, p.6155-67, Dec. 2004.
- 411 JUNG, E.M.; AN, B.S.; CHOI, K.C. et al. Potential estrogenic activity of triclosan in the uterus
412 of immature rats and rat pituitary GH3 cells. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v.208, n.2, p.142-8,
413 Jan. 2012.
- 414 KANETOSHI, A.; KATSURA, E.; OGAWA, H. et al. Acute toxicity, percutaneous absorption
415 and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl
416 ether (Irgasan DP300) and its chlorinated derivatives. **Arch Environ Contam Toxicol**, New
417 York, v.23, n.1, p.91-8, Jul. 1992.

- 418 KARAKOSTA, P.; ALEGAKIS, D.; GEORGIU, V. et al. Thyroid dysfunction and
419 autoantibodies in early pregnancy are associated with increased risk of gestational diabetes and
420 adverse birth outcomes. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, n.97, v.12, p.4464-72, Dec.
421 2012.
- 422 KENESSEY, A.; OJAMAA, K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the
423 cardiomyocyte by activating Akt-mTOR and p70S6K pathways. **J Biol Chem**, Baltimore,
424 v.281. n.30, p.20666-72, Jul. 2006.
- 425 KOEPPE, E.S.; FERGUSON, K.K.; COLACINO, J.A. et al. Relationship between urinary
426 triclosan and paraben concentrations and serum thyroid measures in NHANES 2007–2008. **Sci**
427 **Total Environ**, Amsterdam, v.445–446, p.299–305, Feb. 2013.
- 428 KONG, L.; WEI, Q.; FEDAIL, J.S. et al. Effects of thyroid hormones on the antioxidative status
429 in the uterus of young adult rats. **J Reprod Dev**, Tokyo, v.61, n.3, p.219-27, 2015.
- 430 KUMAR, V.; CHAKRABORTY, A.; KURAL, M.R. et al. Alteration of testicular
431 steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan.
432 **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.27, n.2, p.177-85, Apr. 2009.
- 433 LEA, R.G.; SANDRA, O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation.
434 **Reproduction**, Cambridge, v.134, n.3, p.389-404, Sep. 2007.
- 435 LOUIS, G.W.; HALLINGER, D.R.; STOKER, T.E. The effect of triclosan on the uterotrophic
436 response to extended doses of ethinyl estradiol in the weanling rats. **Reprod Toxicol**, Elmsford,
437 v.36, p.71-7, Apr. 2013.
- 438 LUTSYK, A.; SOGOMONIAN, E. Structural, functional, and lectin histochemical
439 characteristics of rat ovaries and endometrium in experimental hyper- and hypothyroidism,
440 **Folia Histochem Cytobiol**, Warszawa, v.50, n.3, p.331-9, Oct. 2012.
- 441 MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases
442 of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v.62 4A, p.609-614, 2002.
- 443 MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J. et al. Morphometric analysis of the
444 endometrial epithelium of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic experimental
445 alcoholism. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v.31, p.469-475, 1999.
- 446 NEWBOLD, R.R.; JEFFERSON, W.N.; PADILLA-BANKS, E. et al. Cell response endpoints
447 enhance sensitivity of the immature mouse uterotrophic assay. **Reprod Toxicol**, Elmsford, v.15,
448 n.3, p.245-52, May-Jun. 2001.
- 449 ORVOS, D.R.; VERSTEEG, D.J.; INAUEN, J. et al. Aquatic toxicity of triclosan. **Environ**
450 **Toxicol Chem**, New York, v.21, n.7, p.1338-49, Jul. 2002.
- 451 PALMLUND, I. Exposure to a xenoestrogen before birth: the diethylstilbestrol experience. **J**
452 **Psychosom Obstet Gynaecol**, Utrecht, v.17, n.2, p.71-84, Jun. 1996.

- 453 PALMLUND, I.; APFEL, R.; BUITENDIJK, S. et al. Effects of diethylstilbestrol (DES)
454 medication during pregnancy: report from a symposium at the 10th international congress of
455 ISPOG. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, Utrecht, v.14, n.1, p.71-89, Mar. 1993.
- 456 PANCER, B.A.; KOTT, D.; SUGAI, J.V. et al. Effects of triclosan on host response and
457 microbial biomarkers during experimental gingivitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.43,
458 n.5, p.435-44, May. 2016.
- 459 PATISAUL, H.B.; ADEWLE, H.B. Long-term effects of environmental endocrine disruptors
460 on reproductive physiology and behavior. **Front Behav Neurosc**, Lousanne, p.3-10, Jun. 2009.
- 461 PAUL, K.B.; HEDGE, J.M.; DEVITO, M.J. et al. Short-term exposure to triclosan decreases
462 thyroxine in vivo via upregulation of hepatic catabolism in young Long–Evans rats. **Toxicol**
463 **Sci**, Orlando, v.113, n.2, p.367–379, Feb. 2010.
- 464 PAUL, K.B.; HEDGE, J.M.; DEVITO, M.J. et al. Developmental triclosan exposure decreases
465 maternal and neonatal thyroxine in rats. **Environ Toxicol Chem**, Pensacola, v.29, n.12, p.2840-
466 4, Dec. 2010.
- 467 PAUL, K.B.; HEDGE, J.M.; BANSAL, R. et al. Developmental triclosan exposure decreases
468 maternal, fetal and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a putative
469 mode-of-action. **Toxicology**, Amsterdam, v.300, n.1-2, p.31-45, Oct. 2012.
- 470 ROMIJN, J.A. Endocrinology in the 21st century: unmasking the mysteries of biology. **Neth J**
471 **Med**, Haarlem, v.55, n.6, p.271-75, Dec. 1999.
- 472 SABALIUNAS, D.; WEBB, S.F.; HAUKE, A. et al. Environmental Fate of Triclosan in the River
473 Aire Basin, Uk. **Water Res.** v.37, n.13, p.3145-3154, Jun. 2003.
- 474 SAVAGE, J.H.; MATSUI, E.C.; WOOD, R.A. et al. Urinary levels of triclosan and parabens
475 are associated with aeroallergen and food sensitization. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis,
476 v.130, n.2, p.453-60, Aug.2012.
- 477 SHEKHAR, S.; SOOD, S.; SHOWKAT, S. et al. Detection of phenolic endocrine disrupting
478 chemicals from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population.
479 **Gen Comp Endocrinol**, New York, n.16, May. 2016.
- 480 SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional
481 deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research.**, v.28,
482 p. 85-95, 1971.
- 483 STOKER, T.E.; GIBSON, E.K.; ZORRILA, L. M. Triclosan exposure modulates estrogen-
484 dependent responses in the female wistar rats. **ToxicolSci**, Orlando, v.117, n.1, p.45-53, Sep.
485 2010.
- 486 STRADTMAN, E.W. Thyroid dysfunction and ovulatory disorders. Textbook of Reproductive
487 Medicine Norwalk: AppletonCarr BR, Blackwell RE 1993, 297-321.
- 488 TATARAZAKO, N.; ISHIBASHI, H.; TESHIMA, K. et al. Effects of triclosan on various
489 aquatic organisms. **Environ Sci**, Tokyo, v.11, n.2, p.133-140, 2004.

- 490 VAN DEN BROEK, A.M.; FEENSTRA, L.; DE BAAT, C. A review of the current literature
491 on management of halitosis. **Oral Dis**. Copenhagen, v.14, n.1, p.30-9, Jan. 2008.
- 492 VASILOPOULOU, E.; LOUBIERE, L.S.; MARTIN-SANTOS, A. et al. Differential
493 triiodothyronine responsiveness and transport by human cytotrophoblasts from normal and
494 growth-restricted pregnancies. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v.95, n.10, p.4762-70,
495 Oct. 2010.
- 496 VELDHOFEN, N.; SKIRROW, R.C.; OSACHOFF, H. et al. The bactericidal agent triclosan
497 modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran
498 development. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v. 80, n.3, p.217-27, Dec.2006.
- 499 WALKER, W.F.J.R.; HOMBERGER, D.G. Anatomy & Dissection of the rat. 3^a ed. New York,
500 W.H. Freeman and Company, p.122, 1997.
- 501 WALKER, C.L. Minireview: Epigenomic Plasticity and Vulnerability to EDC Exposures. **Mol**
502 **Endocrinol**, Baltimore, v.30, n.8, p.848-55, Aug. 2016.
- 503 WANG, C.F.; TIAN, Y. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population
504 exposure, present evidence and potential mechanisms. **Environ Pollut**, Toronto, v.206, p.195-
505 201, Nov. 2015.
- 506 WANG, X.; CHEN, X.; FENG, X. et al. Triclosan causes spontaneous abortion accompanied
507 by decline of strongen sulfotransferase activity in humans and mice. **Sci Rep**, London, v.5, p.
508 507-13. Dec. 2015.
- 509 WEISS, L.; ARBUCKLE, T.E.; FISHER, M. et al. Temporal variability and sources of triclosan
510 exposure in pregnancy. **Int J Hyg Environ Health**, Jena, v.218, n.6, p.507-13, Aug. 2015.
- 511 WEN, H.Y.; ABBASI, S.; KELLEMS, R.E. et al. mTOR: a signaling growth placental sensor.
512 **Placenta**, Amsterdam, v.26, suppl A, S63-69, Apr. 2005.
- 513 XUE, J.; WU, Q.; SAKTHIVEL, S. et al. Urinary levels of endocrine disrupting chemicals,
514 including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens and triclosan in
515 obese and non-obese Indian children. **Environ Res**, Amsterdam, v.137, p.120-8, Feb. 2015.
- 516 YAZDANKHAH, S.P.; SCHEIE, A.K.; HOIBY, E.A. et al. Triclosan and antimicrobial
517 resistance in bacteria: an overview. **Microb Drug Resist**, Larchmont, v.12, n.2, p.83-90, 2006.
- 518 YUEH, M.F.; TUKEY, R.H. Triclosan: a widespread environmental toxicant with many
519 biological effect. **Annul Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v.56, p.251-72, Jan. 2016.
- 520 ZHU, W.; ZHANG, Z.; TONG, C. et al. Enviromental exposure to triclosan and semen quality.
521 **Int J Environ Res Public Health**, Basel, v.13, n.2, p.224, Feb. 2016.

4.ANEXO

Parecer de protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIOESTE



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Estudo dos efeitos decorrentes da exposição materna ao triclosan, durante a prenhez e lactação nos tecidos orais e função reprodutiva na prole feminina de rato Wistar", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 01/12/2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Fariña', is written over a faint circular stamp.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE