



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Nível Mestrado**

**CAMILA STACHESKI MACHADO**

**“EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO TRICLOSAN, DURANTE  
A PREENHEZ E LACTAÇÃO, NO DESENVOLVIMENTO FÍSICO,  
SEXUAL INICIAL E FUNÇÃO TESTICULAR DA PROLE  
MASCULINA DE RATO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Odontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Elaine Manoela Porto Amorim**  
**Coorientador: Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim**

CASCADEL-PR  
2016

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M13e Machado, Camila Stacheski  
“Efeitos da exposição materna ao Triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, sexual inicial e função testicular da prole masculina de rato”. /Camila Stacheski Machado. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2016.

71f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Manoela Porto Amorim

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2016

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

1. Triclosan. 2. Desregulador endócrino. 3. Puberdade. 4. Espermatogênese. 5. Rato. I. Amorim, Elaine Manoela Porto. II. Amorim, João Paulo de Arruda. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 21.ed. 617.6

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9ª/965



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



## CAMILA STACHESKI MACHADO

Efeitos da exposição materna ao triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento físico, sexual inicial e função testicular da prole masculina 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:

Joao Paulo de Arruda Amorim

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

Patricia Oehlmeyer Nassar

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

Lucila Piasecki

Universidade Paranaense - UNIPAR (UNIPAR)

Cascavel, 14 de março de 2016

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó Maria Stacheski (saudades eternas), meus pais Suely T. Stacheski Machado, Luiz Carlos Machado e meu noivo Maurício A. Pauly.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, por guiar meus passos, por estar presente em todas as ocasiões, por me dar força e inteligência em momentos difíceis que passei.

As professoras, Profa. Dra. Daniela de Cássia Faglioni Boleta Ceranto, por todo o apoio e orientação durante a graduação para a execução de projetos de iniciação científica e Profa. Dra. Lucila Piasecki, pelos incentivos durante a graduação e pela colaboração que me concedeu de maneira direta durante o mestrado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim, pela sua paciência e ensinamentos durante a fase laboratorial e conclusão deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia pela oportunidade de realizar o mestrado.

A secretária Zeli Becker da Luz, excelente pessoa e profissional extremamente dedicada ao programa e aos alunos. Muito obrigada.

Aos alunos do curso de graduação Romário Willian Welter, Michael Aparecido Machado e Alessandra Ribeiro, pela colaboração nas rotinas do biotério.

Aos meus colegas da linha de patologia, Claudia Camila Peruzzo, Raphael Henrique Palczewski, Helouise Righi da linha de materiais dentários e aos demais, pelos exemplos, dificuldades superadas e bons momentos compartilhados.

As minhas colegas de graduação e amigas sinceras, Kaohana Thais da Silva, Sabrina Basso, Ane Caroline de Marchi, Julia Cerutti de Andrade e Suelen Mari, pelo apoio, incentivo e compreensão durante estes dois anos, os quais foram essenciais.

A todos os funcionários da Unioeste, o meu sincero agradecimento, em especial a técnica Clislaine Aparecida Tavares, pela colaboração direta nas rotinas de laboratório.

Agradeço em especial a minha orientadora, Profa. Dra. Elaine Manoela Porto Amorim, exemplo de dedicação que guiou os passos desta obra e minha formação. Muito obrigada.

### **EQUIPE EXECUTORA ORIENTADORA**

Elaine Manoela Porto Amorim. Doutora em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Professora adjunta e docente efetivo do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – Campus de Cascavel – PR.

### **COORIENTADOR**

João Paulo de Arruda Amorim. Doutor em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Professor adjunto da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – Campus de Francisco Beltrão. Docente efetivo do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNIOESTE – Campus de Cascavel – PR.

### **MESTRANDA**

Camila Stacheski Machado. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – UNIOESTE – Campus de Cascavel – PR.

### **COLABORADORES**

Romário Willian Welter. Acadêmico do 3º ano do Curso de Odontologia da UNIOESTE – Campus de Cascavel-PR.

Michael Aparecido Machado. Acadêmico do 3º ano do Curso de Odontologia da UNIOESTE – Campus de Cascavel-PR.

Alessandra T. Ribeiro. Acadêmica do 1º ano do Curso de Odontologia da UNIOESTE – Campus de Cascavel-PR.

### **LOCAIS DE REALIZAÇÃO**

Laboratório de Histologia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR.

Biotério Setorial do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

|           |   |
|-----------|---|
| DE:       | Desregulador endócrino                      |
| TCS:      | Triclosan                                   |
| CCBS:     | Centro de Ciências Biológicas e da Saúde    |
| UNIOESTE: | Universidade Estadual do Oeste do Paraná    |
| DDT:      | Dicloro-difenil-tricloroetano               |
| DES:      | Dietilestilbestrol                          |
| FTD:      | Fator determinante testicular               |
| SRY:      | Gene determinante sexual do cromossomo Y    |
| DHT:      | Diidrotestosterona                          |
| AR:       | Receptor de andrógeno                       |
| T:        | Testosterona                                |
| GnRH:     | Hormônio Liberador de Gonadotrofina         |
| FSH:      | Hormônio Folículo Estimulante               |
| LH:       | Hormônio Luteinizante                       |
| TSH:      | Hormônio Tireoestimulante                   |
| T3:       | Triiodotironina                             |
| T4:       | Tiroxina                                    |
| TR:       | Receptor de hormônio tireoidiano            |
| PCBs:     | Bifenilopoliclorado                         |
| PBDEs:    | Difenil-éteres-polibromados                 |
| UE:       | União Européia                              |
| COBEA:    | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| CEUA:     | Comitê de Ética no uso de Animais           |
| DG:       | Dia gestacional                             |
| DPN:      | Dia pós-natal                               |
| GI:       | Grupo controle                              |
| GII:      | Grupo tratado com triclosan - 75 mg/kg/dia  |
| GIII:     | Grupo tratado com triclosan-150 mg/kg/dia   |
| GIV:      | Grupo tratado com triclosan-300 mg/kg/dia   |

## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b> ....   | <b>26</b> |
| Semelhança estrutural entre TCS, Bisfenol A, dietilestilbestrol e tiroxina          |           |
| <b>Figura 2.</b> ....   | <b>42</b> |
| Avaliação do desenvolvimento sexual inicial dos animais.                            |           |
| <b>Figura 3.</b> ....   | <b>45</b> |
| Classificação dos estágios do epitélio seminífero dos animais aos 60 dias de idade. |           |
| <b>Figura 4.</b> ....   | <b>46</b> |
| Classificação dos estágios do epitélio seminífero dos animais aos 90 dias de idade. |           |
| <b>Figura 5.</b> ....   | <b>47</b> |
| Número de células de Sertoli.   |           |



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros maternos avaliados nas ratas dos diferentes grupos experimentais ..... **40**
- Tabela 2.** Peso corporal da ninhada e avaliação dos sinais do desenvolvimento físico da prole ..... **41**
- Tabela 3.** Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 60 dias de idade .....**43**
- Tabela 4.** Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 90 dias de idade .....**44**

## SUMÁRIO

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1)</b>  | Resumo.....   | <b>11</b> |
| <b>2)</b>  | Abstract.....   | <b>13</b> |
| <b>3)</b>  | Introdução.....   | <b>15</b> |
| <b>4)</b>  | Revisão de Literatura.....  | <b>19</b> |
|            | 4.1 Desreguladores endócrinos e reprodução masculina .....                                      | <b>22</b> |
|            | 4.2 Desenvolvimento sexual do macho, andrógenos e desreguladores<br>endócrinos .....            | <b>23</b> |
|            | 4.3 Triclosan e a desregulação endócrina .....  | <b>26</b> |
| <b>5)</b>  | Objetivos.....  | <b>31</b> |
|            | 5.1 Gerais .....  | <b>32</b> |
|            | 5.2 Específicos.....  | <b>32</b> |
| <b>6)</b>  | Materiais e Métodos.....  | <b>33</b> |
|            | 6.1 Animais.....  | <b>34</b> |
|            | 6.2 Acasalamento e obtenção das fêmeas prenhes .....  | <b>34</b> |
|            | 6.3 Grupos experimentais, droga, dose e via de administração .....                              | <b>35</b> |
|            | 6.4 Avaliação dos sinais externos do desenvolvimento físico da prole<br>.....                   | <b>35</b> |
|            | 6.5 Avaliação do desenvolvimento sexual da prole masculina .....                                | <b>36</b> |
|            | 6.6 Grupo pubere e grupo adulto .....   | <b>36</b> |
|            | 6.7 Coleta dos órgãos .....   | <b>36</b> |
|            | 6.8 Avaliação dos estágios da espermatogênese .....   | <b>37</b> |
|            | 6.9 Contagem do número de células de Sertoli por túbulo seminífero .....                        | <b>37</b> |
|            | 6.9.1 Análise estatística .....   | <b>37</b> |
| <b>7)</b>  | Resultados .....  | <b>39</b> |
|            | 7.1 Parâmetros maternos .....   | <b>40</b> |
|            | 7.2 Avaliação da prole .....  | <b>41</b> |
|            | 7.3 Avaliação do desenvolvimento sexual dos animais .....                                       | <b>42</b> |
|            | 7.4 Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 60 dias de idade<br>.....                    | <b>43</b> |
|            | 7.5 Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 90 dias de idade<br>.....                    | <b>44</b> |
|            | 7.6 Classificação dos estágios do epitélio seminífero dos animais aos<br>60 dias de idade ..... | <b>45</b> |
|            | 7.7 Classificação dos estágios do epitélio seminífero dos animais aos<br>90 dias de idade ..... | <b>46</b> |
|            | 7.8 Números de células de Sertoli .....   | <b>47</b> |
| <b>8)</b>  | Discussão .....   | <b>48</b> |
| <b>9)</b>  | Conclusões .....  | <b>56</b> |
| <b>10)</b> | Referências bibliográficas .....  | <b>58</b> |
| <b>11)</b> | Anexos .....  | <b>70</b> |

## 1. RESUMO

O triclosan (TCS) é um agente bactericida amplamente utilizado em produtos de higiene pessoal. No contexto da odontologia, esta substância tem se mostrado eficaz em reduzir a placa dentária e gengivite, além de controlar a progressão da doença periodontal crônica. Entretanto, questiona-se o real benefício da utilização em larga escala do TCS em diferentes produtos, uma vez que este composto tem sido incluído na lista dos desreguladores endócrinos (DE). A crescente observação da prevalência de contaminantes ambientais com propriedades para a desregulação endócrina tem gerado considerável debate entre os cientistas, agências regulatórias e público em geral, sobre os potenciais riscos que estas substâncias representam para a saúde reprodutiva do homem e dos animais e muitos destes compostos estão presentes em nosso cotidiano. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos decorrentes da exposição ao TCS, durante a prenhez e lactação das ratas mães, no desenvolvimento físico, sexual inicial e função testicular da prole masculina na puberdade e vida adulta. Para tanto, foram utilizadas 16 ratas *Wistar* prenhes separadas em quatro grupos experimentais, com 4 animais em cada: GI- receberam óleo de milho diariamente por gavagem; GII - receberam TCS, na dose de 75 mg/kg/dia; GIII- receberam TCS, na dose de 150 mg/kg/dia e GIV- receberam TCS, na dose de 300 mg/kg/dia. As ratas foram pesadas em dias alternados ao longo de todo o período experimental, para ajuste da dose, e monitoradas quanto ao nascimento dos filhotes. Ao nascimento, a ninhada foi pesada e avaliada quanto ao desenvolvimento físico inicial: idades de descolamento das orelhas, nascimento de pêlos, erupção dos incisivos e abertura dos olhos. Os filhotes machos foram mantidos e monitorados quanto aos parâmetros físicos externos do desenvolvimento sexual inicial (idades da descida testicular e separação prepucial). Aos 60 dias de idade (puberdade) e 90 dias de idade (maturidade sexual), foram pesados e sacrificados para a coleta e pesagem de órgãos e análise histológica dos estágios da espermatogênese e contagem de células de Sertoli. Os resultados indicaram que o ganho de peso corporal das ratas ao longo da gestação foi semelhante entre os grupos experimentais. Entretanto, houve diminuição do peso corporal, ao final do período experimental, das ratas do grupo GIV,

quando comparado ao grupo GI. O tempo médio da gestação e tamanho da ninhada foi semelhante entre os grupos. O peso médio das ninhadas das ratas tratadas com TCS, nas diferentes doses, foi menor ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo GI. O desenvolvimento físico inicial e as idades de descida testicular foram semelhantes entre os grupos experimentais. Na prole exposta ao TCS, durante a gestação e lactação, foi observado um atraso no tempo (dias) da separação prepucial. Na puberdade (60 dias), foi observada uma diminuição significativa no peso da glândula seminal nos grupos GIII e GIV, quando comparado ao grupo GI. Aos 90 dias de idade, foi observada diminuição do peso do fígado e um aumento no peso da próstata dos animais do grupo GIV, quando comparado aos animais do grupo GI. A análise dos estágios do ciclo do epitélio seminífero dos animais de 60 dias mostrou aumento dos estágios I-VI nos animais tratados com TCS 300mg/Kg/dia quando comparado ao grupo GI ( $p < 0,01$ ). Aos 90 dias de idade os animais mostraram aumento dos estágios VII-VIII, IX-XIII e diminuição na frequência do estágio XIV da espermatogênese nos animais tratados com diferentes doses de TCS quando comparado ao grupo GI ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença na contagem do número de células de Sertoli entre os animais dos diferentes grupos experimentais. Foi possível concluir que, a exposição materna ao TCS durante a gestação e lactação causa efeitos na prole masculina, tais como: Restrição de desenvolvimento intrauterino, atraso na instalação da puberdade, alteração do peso da glândula seminal nos animais com 60 dias, como também, alteração no peso do fígado e da próstata nos animais com 90 dias e desregulação no ciclo do epitélio seminífero em ambas as idades.

**PALAVRAS CHAVE:** triclosan, desregulador endócrino, puberdade, espermatogênese, rato.

## 2. ABSTRACT

The triclosan (TCS) is a bactericidal agent widely used in personal hygiene products, in the context of odontology, this substance has been showing itself efficient in reducing the dental plaque and gingivitis, besides controlling the progression of periodontal disease. However, it's questionable the real benefits of using the TCS in large scale in different products, once this compound has been included on the list of endocrine disrupters. The growing observation of the prevalence of environmental contaminant with properties for the endocrine disrupting has been generating a considerable debate between the scientists, regulatory agencies and general public, about the potential risks which these substances represent to the man's and animal's productive health. Many of these compounds are present in our daily routine. The objective of this study was to evaluate the effects resulted from the exposure to TCS bactericidal, during pregnancy and lactation of mother rats, on the physical development, initial sexual and testicular function of the male son on the following phase of the development: puberty and sexual maturity. For this, 16 rats Wistarprehenes were used, separated in four experimental groups, with 4 animals each one: GI- received corn oil daily by gavage; GII - received TCS, at a dose of 75 mg/kg/day. GIII- received TCS, at the dose of 150 mg/kg/day and GIV - received TCS, at the dose 300 mg/kg/day. The rats where weighed in alternate days throughout the experimental period, to the adjustment of the dose and monitored about the birth of the offspring. At birth, the offspring was weighed and evaluated about the initial physical development: age of the ears' detachment, hair onset, and eruption of incisors and eyes opening. The male offspring were kept and monitored about the external physical parameter of initial sexual development (descended testicles age and prepuce separation). When they're 60 (puberty) days and 90 (sexual maturity) years old, they were weighed and sacrificed to the organs collecting and weighing and histological analysis of the spermatogenesis stages and Sertoli cells counting. The results showed that the gain of body weight of the female rats during the pregnancy was similar to the experimental groups. However, there was a body weight-loss in the end of the experimental period, of the rats of group GIV in comparison to

group GI. The pregnancy average time and size of the offspring were similar between the groups. The average weigh of the offspring treated with TCS, in different doses was smaller ( $p < 0,05$ ), in comparison to group GI. The initial physical development and the descended testiscles were similar between the experimental groups. The offspring exposed to TCS, during pregnancy and lactation, it was observed a delay (days) on the prepucial separation. In puberty (60 days), it was observed a meaningful weight-loss of the seminal gland on groups GIII and GIV, in comparison to group GI. When they were 90 days old, it was observed liver weight-loss and a weight gain of the prostate of the animals of group GIV, in comparison to the animals of group GI. The analysis of the stages of the seminiferous epithelium cycle of the 60 days animals showed an increase of the stages I-VI on the animals treated with TCS 300mg/kg/day in comparison to group GI ( $p < 0,01$ ). The 90 days animals showed an increase of the stages VII-VIII, IX-XIII and decrease on the frequency of the stage XIV of the animal spermatogenesis treated with different doses of TCS when compared to group GI ( $p < 0,01$ ). There was no difference on the number counting of Sertoli cells between the animals of the different experimental groups. We concluded that the maternal exposition to TCS during the gestation period and lactation causes on the male offspring, intrauterine development restriction, delay on the puberty installation, change the weight of the seminal gland in animals at 60 days, as well, changes in liver weight and prostate in animals with 90 days, and disrupting the seminiferous epithelial cycle in both age.

**KEY WORDS:** triclosan, endocrine disrupter, puberty, spermatogenesis, rat.

## ***Introdução***

### 3. INTRODUÇÃO

O triclosan (2,4,4'-triclóro-2-hidroxi-difeniléter) (TCS) é um agente bactericida de amplo espectro. É frequentemente utilizado na indústria farmacêutica e de produtos de higiene pessoal como anti-sépticos, dentífricos, sabonetes, cosméticos, produtos de limpeza, além de brinquedos e produtos têxteis (Eui-Man *et al.*, 2012; Honkisz *et al.*, 2012; Axelstad *et al.*, 2013).

Devido ao seu uso em larga escala e em diferentes produtos, o TCS é frequentemente encontrado como um poluente nas águas dos rios e mares, sugerindo extensa contaminação dos ecossistemas aquáticos e bioacumulação na biota. A quantificação de TCS no plasma, leite materno e urina em seres humanos (Zorilla *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010) confirma seu uso em larga escala e a exposição humana a esta substância. Em humanos, a principal via de absorção é através da mucosa oral e do trato gastrointestinal. Apesar da meia-vida biológica no plasma e na urina ser de 21 e 11 horas, respectivamente, este composto, solúvel em gordura, sofre bioacumulação no tecido adiposo (Honkisz *et al.*, 2012).

Na odontologia, o TCS utilizado em dentífricos e enxaguatórios bucais, tipicamente na concentração de 0,3%, tem se mostrado eficaz em reduzir o biofilme dental e gengivite (Riley & Lamnot, 2013), além de controlar a progressão da doença periodontal crônica (Culliman *et al.*, 2003) e evitar a periodontite recorrente (Rosling *et al.*, 1997). Estas propriedades estão relacionadas a ação do TCS contra uma ampla variedade de bactérias formadoras do biofilme dental (Nabi *et al.*, 1989). Gilbert e Williamns (1987) em seu trabalho, avaliaram 12 voluntários do sexo masculino, saudáveis, com



idade entre 19 e 37 anos, para investigar a farmacocinética do TCS através da escovação utilizando 1g de dentifrício contendo 0,02% de TCS, onde, a retenção oral de TCS foi de 36% da dose e a permanência no biofilme dental foi de pelo menos 8 horas após a aplicação e em mucosa oral por durante 3 horas.

Uma série de efeitos indesejáveis foram relacionados ao uso do TCS, tais como: dermatite, irritação da pele, reações de imunotoxicidade e neurotoxicidade (Glaser, 2004). Esta substância tem sido incluída na lista dos desreguladores endócrinos (DE) por seus efeitos observados inicialmente na fauna aquática (Orvos *et al.*, 2002; Capdevielle *et al.*, 2008). Por definição, DE é “qualquer agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais”, resultando assim em um desvio do controle homeostático normal do organismo (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

O tratamento de animais experimentais com TCS causou reduções nas concentrações séricas de hormônios tireoidianos, (Zorrilla *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010; Axelstad *et al.*, 2013). Kumar *et al.* (2009) demonstraram que, ratos adultos tratados com TCS por um período de 60 dias, com três diferentes doses do composto, apresentaram diminuição da síntese de andrógenos, danos histopatológicos nos testículos e glândulas sexuais acessórias, redução da produção diária de espermatozóides e alteração do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Por outro lado, Zorrilla *et al.* (2009), verificaram que o tratamento de ratos durante o período de desenvolvimento puberal, não alterou parâmetros andrógeno-dependentes, nem prejudicou o início da puberdade nestes animais, mas significativamente reduziu as concentrações dos

hormônios tireoidianos. Essas evidências sugerem que o TCS afeta adversamente a função endócrina e reprodutiva dos animais.

Os DE, dentre eles o TCS, constituem uma classe de compostos que podem causar disfunções reprodutivas importantes no sexo masculino. Existe um crescente interesse, por parte de vários países, em se estudar estes agentes químicos, pois muitos são encontrados com frequência na natureza e em produtos utilizados no cotidiano. O conceito de que a exposição à fatores ambientais, incluindo os DE, durante o período fetal e neonatal, pode interagir com o genoma e influenciar o desenvolvimento de doenças que aparecem tardiamente na vida do indivíduo, incluindo câncer e infertilidade, tem ganhado uma grande importância (Bruin *et al*, 1998; Godfrey & Barker, 2001; Van Meeuwen *et al*, 2007; Patisaul & Adewle, 2009). Assim, o presente trabalho, além de atual, tem importância aplicada, pois a preocupação com os danos que o homem vem causando ao ambiente vem crescendo e um dos aspectos que mais vem sofrendo com este fato é a função reprodutiva.

## ***Revisão de Literatura***

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

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, funções reprodutivas, cognitivas, metabólicas e aspectos comportamentais (Romjin, 1999).

Nos últimos anos, provavelmente nenhuma outra questão de toxicologia ambiental tenha chamado mais a atenção da comunidade científica, das agências regulatórias e do público em geral do que o fenômeno da desregulação endócrina (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

A exposição aos DE pode acontecer em qualquer fase da vida de um animal, o que pode acarretar em diversas anormalidades estruturais e funcionais no desenvolvimento, assim como doenças no adulto (Dickerson *et al.*, 2007; Nilsson *et al.*, 2008; Grün & Blumberg, 2009). Além disso, a desregulação endócrina causada por substâncias exógenas não afeta apenas o organismo exposto, mas também pode afetar seus descendentes através de modificações epigenéticas do genoma, extrínsecas ou intrínsecas a linhagem de células germinativas (Guerrero-Bosagna & Skinner, 2009). Na natureza, as populações humana e animal estão expostas a uma ampla mistura de substâncias com potencialidade para a desregulação endócrina, o que pode afetar múltiplos sistemas e órgãos do organismo (van Meeuwen *et al.*, 2007).

Centenas de substâncias químicas de origem natural, tais como metais, ou antropogênicas (ex: poluentes ambientais), já foram caracterizadas e classificadas como DE, devido aos seus efeitos adversos sobre o sistema endócrino. Outras centenas necessitam de investigação (Patisaul & Adewle, 2009).

A dificuldade em se 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, tais como: 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, dentre outros (Jacobson-Dickman e Lee, 2009; Patisaul & Adewle, 2009).

O fenômeno da desregulação endócrina não é novo em si. Os primeiros relatos registrados na literatura referem-se a observações de declínio populacional e anormalidades reprodutivas e comportamentais de pássaros nos Estados Unidos e Canadá, em 1930, feitas pelo naturalista Charles Broley. Posteriormente, Beans (1996) associou estas anormalidades observadas nos pássaros com a exposição de peixes ao pesticida DDT (dicloro-difeniltricloroetano). Estas observações iniciais do fenômeno da desregulação endócrina foram confirmadas em diversos grupos de invertebrados (Hall *et al.*, 2008; David *et al.*, 2009) e vertebrados (Kloas *et al.*, 2009).

No que se refere à exposição humana, um exemplo clássico na literatura é o dietilestilbestrol (DES), um estrógeno sintético não esteroide, produzido em 1938, prescrito para mulheres grávidas para evitar abortos

espontâneos (Palmlund, 1996). Posteriormente, nas décadas de 70 e 80, verificou-se que as filhas de mulheres que foram tratadas com DES durante a gestação, apresentavam grande incidência de câncer vaginal e cervical (Rubin, 2007), reduzida fertilidade e grandes riscos de infertilidade e complicações gestacionais (Palmlund, 1993; Palmlund *et al.*, 1996). Além disso, quando analisada a descendência masculina, a exposição *in utero* ao DES foi associada a malformações do trato urogenital, criptorquidismo, câncer testicular e de próstata, baixa concentração espermática e redução da fertilidade (Palmer *et al.*, 2006).

Assim, o fenômeno da desregulação endócrina é um assunto de grande interesse nos meios científicos e de extrema importância em saúde pública, animal e ambiental, que deve ser cuidadosa e extensivamente investigada e debatida pela comunidade científica e pelo público em geral.

#### **4.1 Desreguladores endócrinos e reprodução masculina**

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais têm sugerido os fatores ambientais como a possível causa para o aumento na incidência de anormalidades reprodutivas e queda de fertilidade (Phillips & Tanphaichitr, 2008; Mocarrelli *et al.*, 2008; Steinberg *et al.*, 2008), assim como diversos tipos de câncer hormônio-dependente (Olesen, 2007; Soto *et al.*, 2008; Prins, 2008), em ambos os sexos.

No que se refere à saúde reprodutiva masculina, há um intenso debate sobre a queda na quantidade e qualidade espermática dos homens nas últimas décadas, relacionadas às mudanças ambientais e desenvolvimento industrial ocorridos nos últimos 50 anos (Skakkebaek *et al.*,

2001). “*Cada homem nesta sala é metade do homem que foi seu avô*”, foram as palavras ditas durante a abertura de uma conferência realizada nos Estados Unidos, para se discutir os dados sobre o declínio da qualidade e quantidade espermática humana. Estima-se que a concentração espermática em homens saudáveis diminuiu de  $113 \times 10^6/\text{ml}$  em 1938 para  $66 \times 10^6/\text{ml}$  em 1990, (Phillips & Tanphaichitr, 2008).

Os efeitos adversos decorrentes da exposição de machos aos DE vão desde feminilização, queda da fertilidade, malformações do trato urogenital, desordens neurocomportamentais, aumento na incidência de câncer de próstata e testicular, criptorquidismo, hipospadia, desenvolvimento sexual anormal, prejuízo do desenvolvimento puberal, alteração das funções tireoidianas e hipofisárias, imunossupressão e disfunções sexuais (Wang & Baskin, 2008; Eustache *et al.*, 2009; Jacobson-Dickman & Lee, 2009).

A maioria dos estudos relacionados na literatura investigaram os efeitos da exposição às substâncias estrogênicas em diferentes fases do desenvolvimento, sobre o sistema reprodutor masculino (Guillette, 2006). Entretanto, apenas recentemente as pesquisas têm focado os efeitos da exposição às substâncias anti androgênicas em relação ao desenvolvimento sexual e função reprodutiva dos órgãos, bem como do sistema nervoso e comportamental (Larsson *et al.*, 2014).

#### **4.2 Desenvolvimento sexual do macho, andrógenos e desreguladores endócrinos**

A formação, diferenciação e maturação do sistema reprodutivo masculino ocorre em diferentes fases do desenvolvimento embrionário e pós-

natal. Nos mamíferos, o sexo cromossômico é estabelecido no momento da concepção, dependendo do cromossomo sexual que é transmitido pelo espermatozóide (X ou Y). A formação das gônadas, a partir de um estágio indiferenciado (gônada primordial) será determinada, nos indivíduos do sexo masculino, pela produção de uma proteína denominada fator determinante testicular (FTD), transcrita pelo gene SRY localizado no braço curto do cromossomo Y. O FTD, por sua vez, estimula o desenvolvimento dos testículos fetais a partir da gônada indiferenciada. Os testículos iniciam a produção e secreção de testosterona, hormônio esteróide produzido pelas células de Leydig. Este hormônio será essencial para o desenvolvimento e diferenciação das genitálias interna e externa, assim como pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias (Kandel *et al.*, 1997).

O período crítico de diferenciação sexual é próprio para cada espécie e é fundamental para a diferenciação e desenvolvimento completo do macho. Dados experimentais em ratos demonstraram que o período crítico ocorre após a diferenciação das células de Leydig e o início da produção de testosterona (Weisze Ward, 1980). Nesses animais, os testículos iniciam a síntese de andrógenos por volta do 13º dia de desenvolvimento fetal e continuam a produzir até o 10º dia após o nascimento (Bakker *et al.*, 2004). Em ratos, a alteração do ambiente hormonal durante o período crítico de desenvolvimento pré e ou neonatal altera permanentemente tanto a estrutura quanto a função dos órgãos relacionados à reprodução (Hass *et al.*, 2007; Culty *et al.*, 2008; Cowin *et al.*, 2008).

Os hormônios sexuais são moléculas hidrofóbicas e, para serem transportados no sangue para os tecidos-alvos, ligam-se a proteínas



transportadoras e se difundem facilmente através das membranas celulares por difusão simples. No interior do núcleo da célula, ligam-se a receptores altamente específicos, cuja distribuição varia amplamente nos vários órgãos envolvidos com a reprodução e comportamento sexual, promovendo modificações na expressão gênica e metabolismo. Os andrógenos (testosterona e seu metabólico ativo, a diidrotestosterona ou DHT) exercem suas funções via receptores de andrógeno (AR), que por sua vez tem a função de regular a transcrição de genes associados a vários aspectos do desenvolvimento sexual masculino. A testosterona (T) e a DHT promovem a diferenciação de ductos internos e da genitália externa, respectivamente, para o sexo masculino, enquanto na ausência deles, se expressa o processo de desenvolvimento para o sexo feminino (Nelson & Cox, 2004).

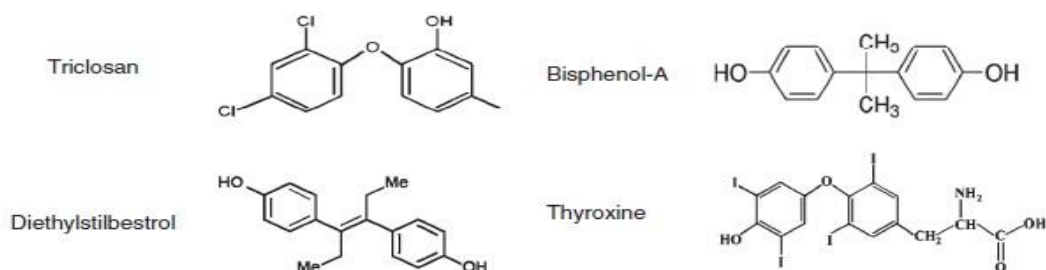
Por sua vez, o processo de maturação sexual é um evento fisiológico complexo, coordenado por fatores genéticos e ambientais. É bem conhecida a função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, no processo de maturação sexual e função reprodutiva, no homem e em várias espécies de animais e inúmeros são os locais neste sistema que podem sofrer interferência e modulação (Odell & Swerdloff, 1976).

Trabalhos recentes têm demonstrado que vários compostos sintéticos não esteroidais, por diferentes mecanismos de ação, tem a capacidade de alterar as funções andrógeno-dependente (Sultan *et al.*, 2001; Uzumcu *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2008; Laguë & Tremblay, 2008). Estas substâncias podem afetar o desenvolvimento sexual masculino por interferirem com a sinalização androgênica durante períodos críticos (*in útero* e peripuberal) da diferenciação e maturação sexual (Wilson *et al.*, 2008). Dependendo da fase

do desenvolvimento em que ocorre a exposição, os anti-androgênicos podem afetar múltiplos órgãos e processos dependentes de andrógeno, alterando o desenvolvimento neuroendócrino e o comportamental normal, causando redução do peso dos órgãos reprodutivos, prostatite, malformações da genitália externa e problemas de fertilidade. Este fato é de particular interesse, pois, muitos destes compostos estão presentes em nosso dia-dia e são encontrados como poluentes na natureza (Hass *et al.*, 2007; Cowin *et al.*, 2008).

### 4.3 Triclosan e a desregulação endócrina

O triclosan (TCS) (2,4,4'-triclora-2'-hidroxi-difenil-éter;  $C_{12}H_7Cl_3O_2$ ), peso molecular 289,53 KDa, é um agente bactericida bifenólico com amplo espectro de atividade sobre bactérias Gram positivas e a maior parte das Gram negativas (Dann & Hontela, 2011). A estrutura molecular do TCS (Fig.1) é semelhante á de outros DE conhecidos, tais como o bifenilopoliclorado (PCBs), difenil-éterespolibromados (PBDEs), bisfenol-A, dioxinas e também com a Tiroxina (T4), (Veldhoen *et al.*, 2006; Crofton *et al.*, 2007; Allmyr *et al.*, 2009), moléculas com dois anéis aromáticos.



**Figura 1.** Semelhança estrutural entre TCS, Bisfenol A, dietilestilbestrol e tiroxina (T4). (Dann & Hontela, 2011).

Este composto foi originalmente sintetizado em 1972 e desde então tem sido utilizado em diversos produtos tais como dentifrícios, enxaguatórios bucais, sabonetes, desodorantes, produtos têxteis, brinquedos, instrumentos médicos, e utensílios de cozinha (Glaser, 2004), tipicamente nas concentrações de 0,1-0,3%. Na União Européia (UE), cerca de 85% do volume total de TCS é utilizado em produtos de higiene pessoal (dentifrício, sabonete, shampoo e cosméticos), 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). A produção mundial anual de TCS em 2005 foi estimada em 1.500 toneladas (Bestler, 2005).

No contexto da Odontologia o TCS utilizado nos dentifrícios e enxaguatórios bucais, tipicamente na concentração de 0,3%, tem se mostrado eficaz em reduzir o biofilme dental e gengivite (Riley & Lamnot 2013), além de controlar a progressão da doença periodontal crônica (Cullinan *et al.*, 2003) e evitar a periodontite recorrente (Rosling *et al.*, 1997). Estas propriedades estão relacionadas a ação do TCS contra uma ampla variedade de bactérias formadoras do biofilme dental (Nabi *et al.*, 1989), como por exemplo: *A. Aggregatibacter*, *P. Intermedi* e *F. Nucleatun* (Gaffar *et al.*, 1990). O TCS, o qual é um composto solúvel em lipídios, pode penetrar a pele e membranas mucosas (Black *et al.*, 1975) e tem, além de suas propriedades antibacterianas, propriedades antiinflamatórias, que colaboram para reduzir a inflamação gengival (Kjaerheim *et al.*, 1995).

Trabalhos tem demonstrado que as concentrações sanguíneas de TCS em humanos após o uso de enxaguatórios bucais ou dentifrícios pode variar de 1,4nM a 1,4Mm (Bagley & Lin, 2000; Sandborgh-Englund *et al.*, 2006). Após

a absorção, a maior fração do TCS é excretada na urina. No entanto, a excreção urinária total do TCS variou entre os indivíduos, com 24% a 83% da dose sendo eliminada durante os primeiros 4 dias após a exposição (Sandborgh-Englund *et al.*, 2006).

Entretanto, questiona-se o real benefício da utilização em larga escala do TCS em diferentes produtos. Recentemente, tem sido demonstrado que a utilização indiscriminada do TCS pode levar a resistência bacteriana (Aiello *et al.*, 2007) ou interferir com funções endócrinas em diferentes mamíferos (Paul *et al.*, 2010; Stoker *et al.*, 2010). A exposição humana ao TCS dá-se através da absorção, devido a utilização de produtos que contém este composto químico e também por inalação (Fang *et al.*, 2010).

A quantificação de substâncias químicas na urina é uma importante ferramenta de biomonitoramento para avaliação da exposição humana (Queckenberg *et al.*, 2010). Calafat *et al.* (2008), verificaram que 75% de 2.500 amostras de urina da população americana apresentavam concentrações do TCS ao redor de 2,4 ng/ml. A presença do TCS e seus metabólitos em concentrações detectáveis na urina, no sangue (Hovander *et al.*, 2002) e no leite (Almyr *et al.*, 2006; Dayan, 2007) confirma o seu uso em larga escala e a exposição humana a este contaminante. Nos Estados Unidos, o TCS foi detectado no leite materno (100-2.100 mg/kg lipídio) em 51 de 62 amostras coletadas em bancos de leite na Califórnia e no Texas (Dayan, 2007). Tem sido observada que a exposição máxima de bebês através do leite materno é de aproximadamente 7,4 mg/kg de peso corporal por dia (Dayan, 2007).

O mecanismo de ação do TCS como DE é controverso. A exposição de peixes (*Oryzias latipes*) ao TCS, por um período de 14 dias, iniciando dois dias

após a eclosão dos ovos, foi associada a um aumento no tamanho das nadadeiras relacionado à uma fraca atividade androgênica (Foran *et al.*, 2000). Por outro lado, Ishibashi *et al.* (2004), demonstraram que esta mesma espécie de peixe, quando exposta ao TCS, durante as fases iniciais de desenvolvimento, foi caracterizada pela atividade estrogênica capaz de induzir vitelogênese nos machos.

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, causar danos histopatológicos nos testículos e glândulas sexuais acessórias, reduzir a produção diária de espermatozoides e perturbar o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Estudos *in vitro* também tem demonstrado os efeitos anti-androgênicos do TCS em roedores (Kumar *et al.*, 2008).

Zorrilla *et al.* (2009), verificaram que o tratamento de ratos durante o período de desenvolvimento puberal não alterou parâmetros andrógeno-dependentes, nem prejudicou o início da puberdade nestes animais, mas significativamente reduziu as concentrações dos hormônios tireoidianos. Recentes revisões têm demonstrado que a alteração da secreção de hormônios por parte da tireoide adversamente afeta a reprodução e fertilidade, com importante impacto sobre o sistema reprodutivo masculino (Holsberger & Cooke, 2005; Wagner *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2015).

O tratamento de ratas durante a prenhez e lactação também tem demonstrado efeitos adversos maternos e na prole (Paul *et al.*, 2010; Axelstad

*et al.*, 2013). O efeito mais comum desta exposição é a redução nas concentrações de hormônios tireoidianos maternos (Paul *et al.*, 2010; Rodrigues & Sanchez, 2010), o que pode levar a sérias consequências na prole, tais como prejuízo do desenvolvimento motor e cognitivo (Ghassabian *et al.*, 2011). Weiss *et al.* (2015) avaliaram a exposição e possível contaminação de gestantes ao TCS, analisando as concentrações urinárias a esta substância. Esses autores demonstraram que a exposição das gestantes aconteceu durante todo o período gestacional e no pós-parto e a principal via de contaminação foi através de produtos para higiene bucal e sabonetes.

Assim, diferentes estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos têm gerado um grande debate sobre a contaminação animal, ambiental e humana ao TCS e as possíveis consequências desta exposição (Bedoux *et al.*, 2012; Larsson *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Atenção especial tem sido dada à exposição materna durante a gestação e lactação, a qual poderá afetar permanentemente a saúde e desenvolvimento fetal. Neste sentido, estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação do TCS e o seu efeito sobre o desenvolvimento dos animais, visando o debate e o estabelecimento de práticas e condutas, por parte dos governos, populações e agências regulatórias, que diminuam a exposição dos humanos e animais aos DEs.

## ***Objetivos***

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos Gerais**

Avaliar os efeitos decorrentes da exposição ao triclosan (TCS), durante a gestação e lactação em ratas mães, no desenvolvimento e função reprodutiva do filho macho nas fases de: puberdade e maturidade sexual.

### **5.2 Objetivos específicos**

Avaliar os efeitos da exposição ao TCS sobre:

- ✓ O desenvolvimento físico inicial da prole;
- ✓ Idades da descida testicular e separação prepucial da prole;
- ✓ Pesos corporal e dos órgãos reprodutores aos 60 (puberdade) e 90 dias de vida (maturidade sexual) da prole masculina;
- ✓ Quantidade de células de Sertoli e fases dos estágios da espermatogênese.



## ***Materiais e métodos***

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 Animais**

Seis ratos machos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g), e dezesseis fêmeas adultas (60 dias de idade, pesando aproximadamente 200g), da linhagem *Wistar*, foram adquiridos do Biotério Central da Unioeste. Os animais foram adaptados e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-CCBS, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR, em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sendo acomodados individualmente ou em duplas, sob condições controladas de temperatura, mantida entre 22° e 25° C, umidade relativa próxima de 55% e luminosidade-fotoperíodo de 12 horas (período de luz 7:00 ~19:00h). Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram analisados e aprovados para realização pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE.

### **6.2 Acasalamento e obtenção de fêmeas prenhes**

Os acasalamentos naturais foram realizados no período escuro do ciclo colocando de duas a três fêmeas na caixa de cada macho, ao final da tarde. Na manhã subsequente, foram colhidos lavados vaginais e a presença de espermatozoides associado à fase do ciclo estral foram utilizados como fatores indicativos de prenhez e este, considerado dia zero de gestação (DG 0). As fêmeas prenhes foram separadas em quatro grupos experimentais, conforme descrito abaixo.

### **6.3 Grupos experimentais, droga, dose e via de administração**

O início do tratamento se deu a partir do oitavo dia gestacional (DG 8). As fêmeas prenhes foram tratadas uma vez ao dia (entre 9:00-10:00h), por via oral (gavage intragástrica), durante a prenhez e lactação da seguinte forma: Grupo I (GI), composto por 4 ratas que receberam óleo de milho via oral; Grupo II (GII) composto por 4 ratas que receberam triclosan (TCS) (CAS#3380-34-5, Calbiochem, 99,5% de pureza) diluído em óleo de milho, na dose de 75mg/kg/dia; Grupo III (GIII) composto por 4 ratas que receberam(TCS) diluído em óleo de milho, na dose de 150mg/kg/dia e Grupo IV (GIV), composto por 4 ratas que receberam TCS diluído em óleo de milho, na dose de 300mg/kg/dia. As três doses selecionadas foram escolhidas baseadas no trabalho de Axelstad *et al.* (2013).

Para a avaliação indireta da toxicidade materna, e ajuste da dose, as ratas foram pesadas em dias alternados para controle de ganho de peso durante toda a gestação e lactação. A partir do 20º dia de prenhez, as ratas foram monitoradas quanto ao nascimento dos filhotes. Em seguida, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, procurando-se sempre manter os filhotes do sexo masculino. O desmame foi realizado no 21º dia após o nascimento e as ratas foram sacrificadas.

### **6.4 Avaliação dos sinais externos do desenvolvimento físico da prole**

A ninhada foi pesada no terceiro dia pós-natal (DPN 3) e avaliada diariamente quanto aos sinais externos do desenvolvimento físico, no qual, se

avaliou as idades de descolamento das orelhas, surgimento dos pêlos, erupção dos dentes incisivos e abertura dos olhos.

### **6.5 Avaliação do desenvolvimento sexual da prole masculina**

Determinou-se, nos filhotes do sexo masculino, em todos os grupos experimentais, o dia em que ocorreu a descida dos testículos, através da palpação diária da bolsa escrotal, a partir do 15º dia pós-natal. A separação prepucial foi investigada a partir do 33º dia pós-natal, através da retração manual do prepúcio.

### **6.6 Grupo púbere e grupo adulto**

O grupo púbere foi composto por 20 filhotes machos de ratas controle e tratadas com TCS nas diferentes doses, que foram sacrificados com 60 dias de idade (puberdade). Já o grupo adulto, foi composto por 20 filhotes machos de ratas controle e tratadas com TCS nas diferentes doses, que foram sacrificados com 90 dias de idade (maturidade sexual).

### **6.7 Coleta de órgãos**

A prole masculina dos diferentes grupos experimentais foi pesada e sacrificada aos 60 dias (puberdade) e 90 dias (maturidade sexual) de vida, sendo 5 animais/grupo/idade, totalizando 40 animais. O testículo, epidídimo, ducto deferente, glândula seminal, próstata ventral, fígado e adrenal foram removidos e pesados.

Os testículos esquerdos dos animais foram fixados em Alfac (85% de álcool 80º, 10% de formol e 5% de ácido acético), por um período de 24 horas, quando a solução foi substituída por álcool 80º, onde as peças permaneceram

até o início do processamento. Após este período, as amostras foram desidratadas em série crescente de alcoóis, diafanizada em xilol e incluídas em Paraplast. Para as análises histomorfológicas, foram realizados cortes seriados com 5µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de aço. Os cortes obtidos foram desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de coloração: hematoxilina-eosina (HE) para análise.

### **6.8 Avaliação dos estágios da espermatogênese**

A avaliação dos estágios da espermatogênese foi realizada, observando 100 secções de túbulos seminíferos dos testículos dos animais da prole masculina na puberdade e maturidade sexual, classificando-os em fases de I-VI (presença de duas gerações de espermátides), VII-VIII (espermátides maduras presentes no lúmen), IX-XIII (presença de uma geração de espermátide) XIV (presença de espermátocito secundário). (Ferreira, *et al.*, 1967).

### **6.9 Contagem do número de células de Sertoli por túbulo seminífero**

Foram contados os núcleos de células de Sertoli em 20 cortes transversais de túbulos seminíferos por rato (n=5 animais por grupo), no estágio VII da espermatogênese classificado de acordo com LEBLOND & CLERMONT (1952). As avaliações foram realizadas com o auxílio de microscópio de luz no aumento de 200X.

### **6.9.1 Análise estatística**

Para a análise dos dados foi utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Dunnett ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no programa InStat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

***Resultados***

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Parâmetros maternos

A média do peso corporal foi semelhante entre os grupos no início do período experimental. O ganho de peso corporal ao longo da gestação foi semelhante entre os grupos experimentais. Entretanto, o peso corporal ao fim do período da lactação foi menor nas ratas do grupo GIV, quando comparadas ao grupo GI. O tempo médio de gestação, assim como o tamanho da ninhada não diferiu entre os grupos experimentais (tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros maternos avaliados nas ratas dos diferentes grupos experimentais.

|   | <i>GI</i>    | <i>GII</i>   | <i>GIII</i>  | <i>GIV</i>    |
|---|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Peso corporal inicial (g)                       | 241,63±7,52  | 240,33±5,71  | 238,45±6,15  | 240,45±8,05   |
| Ganho de peso corporal (g) na gestação (G21-G0) | 89,33±10,34  | 87,25±13,15  | 88,12±8,67   | 84,56±9,65    |
| Peso corporal final (g)                         | 293,34±16,16 | 287,09±17,52 | 293,33±18,58 | 264,51±15,13* |
| Tempo (dias) de gestação                        | 22,05±1,34   | 23,12±1,04   | 22,55±0,98   | 23,06±1,02    |
| Tamanho da ninhada                              | 11,3±0,87    | 10,01±1,01   | 9,45±0,98    | 11,02±0,89    |

Valores expressos em média±DP. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia. N= 4 animais por grupo. \* p<0,05, comparado ao grupo GI. Teste de Dunett.



## 7.2 Avaliação da prole

O peso médio na ninhada foi significativamente menor em todos os grupos tratados com triclosan (TCS), quando comparados ao GI. As idades de descolamento das orelhas, nascimento de pêlos, erupção dos dentes incisivos e abertura dos olhos foram semelhantes entre os grupos experimentais (tabela 2).

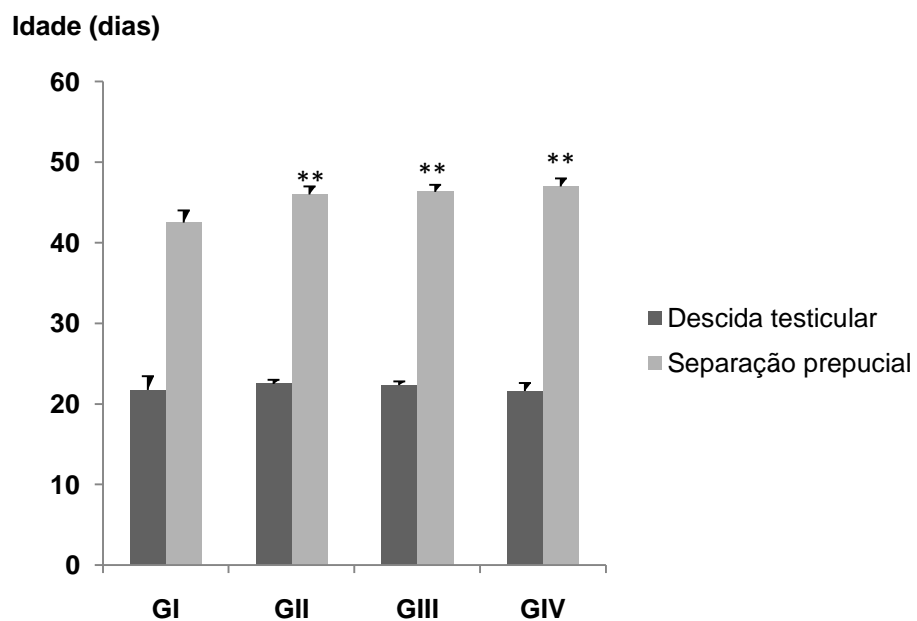
Tabela 2. Peso corporal da ninhada e avaliação dos sinais do desenvolvimento físico da prole.

|  | <i>GI</i>  | <i>GII</i> | <i>GIII</i> | <i>GIV</i> |
|--|------------|------------|-------------|------------|
| Peso médio (g) da ninhada PND3               | 8,40±0,67  | 5,95±0,84* | 6,5±0,61*   | 6,09±0,71* |
| Idade (dias) de descolamento das orelhas     | 2,83±0,41  | 3,01±0,20  | 2,85±0,38   | 3,00±0,40  |
| Idade (dias) Nascimento de pêlos             | 7,16±1,36  | 7,98±0,95  | 7,80±0,77   | 7,20±1,25  |
| Idade (dias) de erupção dos dentes incisivos | 7,50±1,19  | 8,05±1,21  | 8,50±1,15   | 7,89±0,99  |
| Idade (dias) de abertura dos olhos           | 13,01±0,85 | 13,04±0,87 | 13,25±0,88  | 14,01±0,85 |

Valores expressos em média ± DP. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia. N= 4 ninhadas por grupo. \* p<0,05, comparado ao grupo GI. Teste de Dunnett.

### 7.3 Avaliação do desenvolvimento sexual dos animais

A idade média em que ocorreu a descida testicular foi semelhante entre os grupos experimentais, entretanto a exposição ao TCS durante a gestação e lactação, nas três doses testadas, acarretou em um aumento da idade em que ocorreu a separação prepucial dos animais (figura 2).



**Figura 2.** Avaliação do desenvolvimento sexual inicial dos animais. Valores expressos em média  $\pm$  DP. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia. N= 5animais por grupo. \*\*  $p < 0,01$ , comparado ao grupo GI. Teste de Dunnett.

#### 7.4 Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 60 dias de idade

Aos 60 dias de idade (puberdade) a média do peso corporal dos animais foi semelhante entre os grupos experimentais. Houve uma diminuição estatisticamente significativa no peso da glândula seminal dos animais dos grupos GIII e GIV, quando comparado aos animais o grupo GI. O peso dos demais órgãos reprodutivos não diferiu entre os grupos (tabela 3).

**Tabela 3.** Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 60 dias de idade.

|                               | GI           | GII          | GIII         | GIV          |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Peso corporal (g)             | 257,24±22,28 | 259,25±20,22 | 256,83±25,79 | 242,49±19,35 |
| Peso do fígado (g)            | 11,95±1,32   | 12,05±1,01   | 11,17±1,45   | 11,25±1,35   |
| Peso das adrenais (mg)        | 0,04±0,01    | 0,04±0,03    | 0,04±0,01    | 0,04±0,05    |
| Peso do testículo (g)         | 1,25±0,06    | 1,18±0,09    | 1,27±0,07    | 1,29±0,13    |
| Peso do epidídimo (mg)        | 0,31±0,04    | 0,29±0,01    | 0,28±0,05    | 0,30±0,04    |
| Peso da próstata (mg)         | 0,27±0,06    | 0,26±0,04    | 0,29±0,09    | 0,29±0,05    |
| Peso da glândula seminal (mg) | 0,73±0,04    | 0,64±0,07    | 0,55±0,07**  | 0,52±0,10**  |
| Peso (mg) ducto deferente     | 0,08±0,01    | 0,07±0,014   | 0,08±0,98    | 0,07±0,05    |

Valores expressos em média ± DP. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia. N= 5 animais por grupo. \*\* p<0,01, comparado ao grupo GI. Teste de Dunnett.

### 7.5 Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 90 dias de idade

Aos 90 dias de idade (maturidade sexual) a média do peso corporal dos animais foi semelhante entre os grupos experimentais. Houve uma diminuição estatisticamente significativa no peso do fígado dos animais do grupo GIV, quando comparado aos animais o grupo GI. A avaliação do peso dos órgãos reprodutivos demonstrou um aumento no peso da próstata dos animais do grupo GIV, quando comparado aos animais o grupo GI. O peso dos demais órgãos reprodutivos não diferiu entre os grupos (tabela 4).

**Tabela 4.** Peso corporal e peso de órgãos dos animais aos 90 dias de idade.

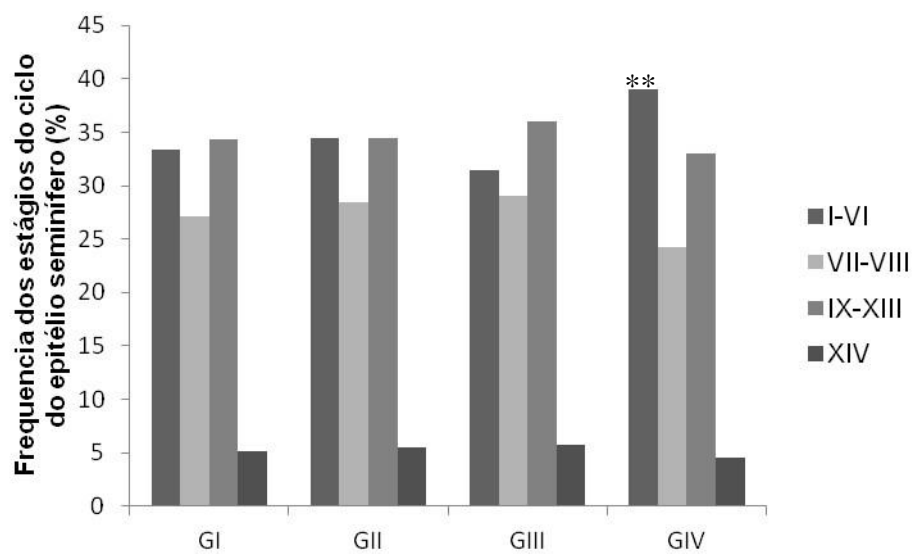
|                               | <i>GI</i>    | <i>GII</i>  | <i>GIII</i>  | <i>GIV</i>                |
|-------------------------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|
| Peso corporal (g)             | 321,34±10,87 | 334,33±9,22 | 311,16±16,08 | 309,08±12,75              |
| Peso do fígado (g)            | 11,35±0,87   | 12,71±0,98  | 10,89±0,54   | 9,51±0,55 <sup>***a</sup> |
| Peso das adrenais (mg)        | 0,07±0,04    | 0,09±0,02   | 0,06±0,01    | 0,07±0,01                 |
| Peso do testículo (g)         | 1,44±0,13    | 1,41±0,07   | 1,48±0,06    | 1,44±0,05                 |
| Peso do epidídimo (mg)        | 0,51±0,05    | 0,54±0,04   | 0,49±0,08    | 0,55±0,06                 |
| Peso da próstata (mg)         | 0,38±0,04    | 0,37±0,05   | 0,35±0,05    | 0,55±0,06 <sup>***b</sup> |
| Peso da glândula seminal (mg) | 0,87±0,08    | 0,85±0,18   | 0,88±0,04    | 0,95±0,09                 |
| Peso Ducto deferente (mg)     | 0,10±0,02    | 0,10±0,03   | 0,09±0,08    | 0,10±0,01                 |

Valores expressos em média ± DP. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia. N= 5 animais por grupo. \*\* p<0,01, comparado ao grupo GI.<sup>a</sup>Teste de Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup>Teste de Dunett.

## 7.6 Classificação dos estágios do epitélio seminífero dos animais aos 60 dias de idade

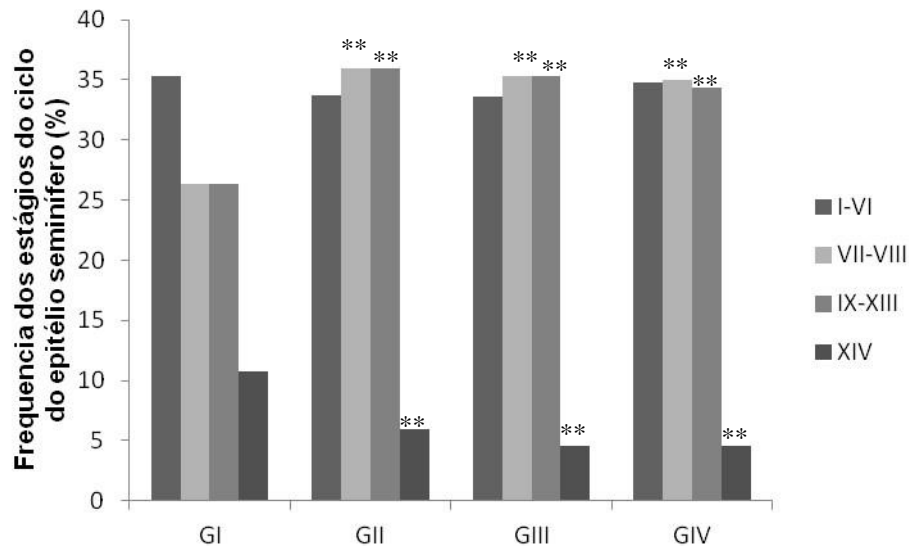
A análise dos estágios do ciclo do epitélio seminífero dos animais de 60 dias mostrou um aumento estatisticamente significativo dos estágios I-VI nos animais tratados com 300mg/Kg/dia de TCS quando comparado ao grupo GI (figura 3).



**Figura 3.** Frequência dos estágios do ciclo do epitélio seminífero dos animais. Valores expressos em porcentagem. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia. N= 5 animais por grupo. \*\*  $p < 0,01$ , comparado ao grupo GI. Teste de Dunnett.

## 7.7 Classificação dos estágios do epitélio seminífero dos animais aos 90 dias de idade

A análise dos estágios do ciclo do epitélio seminífero dos animais de 90 dias mostrou um aumento estatisticamente significativo dos estágios VII-VIII, IX-XIII e uma diminuição na frequência de túbulos no estágio XIV da espermatogênese dos animais tratados com diferentes doses de TCS quando comparados ao grupo GI (Figura 4).

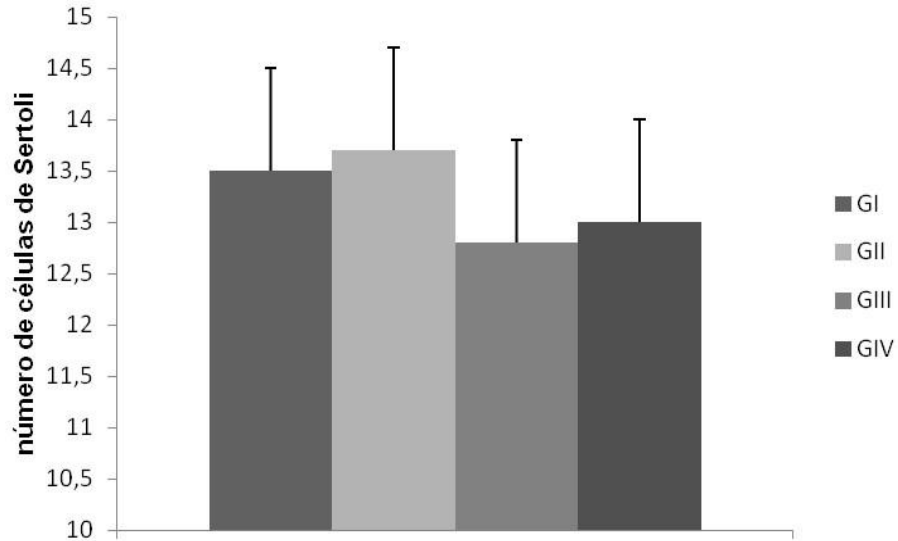


**Figura 4.** Frequência dos estágios do ciclo do epitélio seminífero dos animais. Valores expressos em porcentagem. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia.

N= 5 animais por grupo. \*\* p< 0,01, comparado ao grupo GI. Teste de Dunett.

### 7.8 Número de células de Sertoli

Não houve diferença na contagem do número de células de Sertoli entre os animais dos diferentes grupos experimentais (figura 5).



**Figura 5.** Contagem do número de células de Sertoli nos animais. Valores expressos como média  $\pm$  DP. GI: controle; GII: 75 mg/kg/dia; GIII: 150 mg/kg/dia; GIV: 300 mg/kg/dia. N= 5 animais por grupo. Teste de Dunett.

***Discussão***



## 8. DISCUSSÃO

O sistema endócrino desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase do organismo e é frequentemente afetado por estímulos exógenos. Uma ampla variedade de compostos sintéticos (drogas, pesticidas, etc) e também naturais (ex: flavonóides, fitoestrógenos) possuem a capacidade de interagir com sistema endócrino, devido às semelhanças estruturais com os hormônios endógenos, e quando esta interação produz efeitos adversos à saúde de um organismo ou a sua prole, estas substâncias são classificadas como "desreguladores endócrinos" (DE). A atividade de desregulação endócrina pode ocorrer ao alterar as concentrações hormonais normais, inibindo ou estimulando a produção e o metabolismo de hormônios, ou mudando a forma como os hormônios circulam através do corpo, afetando assim as funções que esses hormônios controlam (Schug *et al.*, 2011).

No presente estudo, o tratamento das ratas prenhes com diferentes doses de triclosan (TCS) não alterou o peso corporal ao longo da gestação. Entretanto, foi observado ao final do período experimental, uma diminuição no peso corporal das ratas tratadas com a maior dose, sugerindo que o tratamento diário dos animais com 300mg de TCS/kg/dia, causa moderada toxicidade materna (Axelstad *et al.*, 2013).

Por outro lado, o tempo médio de gestação e o tamanho da ninhada, não foram alterados pelo tratamento com TCS, nas diferentes doses testadas. Estudos experimentais com tratamento de ratas prenhes com diferentes doses de TCS durante a gestação também não tem demonstrado qualquer interferência da droga sobre a taxa de prenhez, tempo médio de gestação,

morte neonatal ou tamanho da ninhada (Paul *et al.*, 2010; Rodrigues & Sanches *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2012; Axelstad *et al.*, 2013; Manservisi *et al.*, 2015). Nesses trabalhos o tratamento dos animais, assim como no presente estudo, iniciou após o período de implantação dos embriões. Entretanto, Crawford & Decatanaro, (2012) demonstraram que o tratamento de camundongos prenhes com TCS nos dias 1 ao 3 após a fertilização, ou seja, no período pré-implantação, causou uma diminuição no número de sítios de implantação dos blastocistos, sugerindo um possível efeito estrogênico da droga. Sabe-se que concentrações ideais de estrógenos são essenciais para o sucesso dos eventos que acontecem antes da implantação dos embriões e pequenas elevações nas concentrações estrogênicas podem alterar o transporte pela tuba uterina, a integridade do útero e o desenvolvimento do embrião (Valbuena *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003).

Quando avaliado, os filhotes das ratas tratadas com TCS, independente da dose, foi possível observar que eles apresentaram baixo peso ao nascimento, o que caracteriza a restrição de crescimento intra-uterino. Trabalhos têm demonstrado que o TCS durante a gestação reduz as concentrações de hormônios tireoidianos maternos (Paul *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2012; Axelstad *et al.*, 2013). Sabe-se, que o hipotireoidismo materno está associado a complicações gestacionais (anemia, pré-eclâmpsia), morte fetal, parto prematuro, sofrimento fetal em trabalho de parto, baixo peso ao nascimento, hipotireoidismo congênito e déficits neurocognitivos em crianças (Saki *et al.*, 2014).

Em animais experimentais, o tratamento de ratas durante a gestação e lactação, com drogas antireoidianas, também tem demonstrado efeito negativo

sobre o crescimento fetal (Shibutani *et al.*, 2009). A relação entre hipotireoidismo materno e a restrição de crescimento intra-uterino observado na prole pode ser explicada devido a função essencial que os hormônios tireoidianos maternos exercem sobre o crescimento e maturação de muitos tecidos do feto tais como o cérebro, os ossos e os músculos (Rivkees *et al.*, 1988). Neste estudo, a avaliação dos parâmetros corporais relacionados ao desenvolvimento físico, não demonstrou qualquer alteração que pudesse ser atribuída ao tratamento dos animais com TCS.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado uma associação entre o baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Hoete Hanson, 1999; Zambrano *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2006). Essa relação entre prejuízo no crescimento fetal e o desenvolvimento de doenças na vida adulta é explicado pela hipótese da “programação fetal”, segundo a qual, um estímulo ou insulto durante o período de gestação afetaria permanentemente a estrutura, fisiologia e metabolismo do feto levando ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (Godfrey e Barker, 2001). Prejuízo no crescimento durante a vida fetal está associado a aumento no risco de desordens reprodutivas tais como câncer ovariano, menopausa prematura, câncer testicular, criptorquidismo, diminuição da qualidade espermática (Barker *et al.*, 1995). Em humanos, é observado que a restrição de crescimento intra-uterino prejudica o desenvolvimento folicular, caracterizado por uma perda prematura de folículos ovarianos, sugerindo que meninas que nascem com baixo peso ao nascimento poderão ter problemas de fertilidade na vida adulta (Bruin *et al.*, 1998). Estes estudos demonstram que fatores ambientais, os quais influenciam a trajetória do crescimento pré-natal e

fisiologia de muitos órgãos do organismo, podem programar mudanças persistentes no eixo reprodutivo fetal e, em parte, explicar problemas de fertilidade na vida adulta.

A programação do eixo hipotálamo-hipófise-gonada também ocorre durante fases críticas do desenvolvimento fetal e pode ser afetado pelo retardo de crescimento intra-uterino, levando a mudanças no início e progressão da puberdade (Hokken-Koèlega, 2002; Van Weissenbruch *et al.*, 2005). Neste estudo, as idades da descida testicular e separação prepucial, foram utilizadas como diagnóstico do desenvolvimento sexual inicial no rato. Em roedores, é estabelecido que a descida testicular ocorre a partir do 15<sup>o</sup> dia pós-natal. A separação prepucial, observada quando o prepúcio se separa da glândula do pênis, normalmente ocorre ao redor do 39<sup>o</sup> dia pós-natal (Korenbrodt *et al.*, 1977). Neste trabalho, o tratamento das ratas durante a gestação e lactação não modificou a idade de descida testicular da prole, entretanto aumentou a idade de separação prepucial dos animais, sugerindo que a exposição dos filhotes durante o período fetal e neonatal ao TCS, atrasa a instalação da puberdade desses animais. Shibutani *et al.*, (2009), também verificaram que o hipotireoidismo materno causou um retardo na instalação da puberdade da prole masculina.

É bem conhecido que a testosterona exerce um papel importante no desenvolvimento e maturação sexual (Ojeda & Urbansk, 1994). Neste estudo, os animais expostos ao TCS apresentaram aos 60 dias de idade uma redução no peso da glândula seminal. Sabe-se que a glândula seminal é um órgão dependente de andrógeno e a diminuição do peso deste órgão pode ser um indicativo indireto de alteração na produção de testosterona nos animais. Além

disso, a restrição de crescimento intra-uterino está relacionada a um atraso no desenvolvimento puberal devido a um prejuízo na secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Ojeda & Urbansk, 1994).

Diversos trabalhos apontam para diminuição dos níveis plasmáticos de T4 na prole de ratas expostas ao TCS durante a gestação e lactação, caracterizando hipotireoidismo congênito (Paul *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2012; Axelstad *et al.*, 2013). Essa exposição indireta ocorre através da placenta e do leite materno, e causa diminuição considerável dos níveis de T4 no período fetal até o 4º dia pós natal, período crucial no desenvolvimento da estrutura testicular (Canale *et al.*, 2001; Allmyr *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010).

Na contagem do número das células de Sertoli, este estudo não demonstrou diferenças significativas entre os animais dos diferentes grupos experimentais. Entretanto, sabe-se que a tiroxina é responsável pela proliferação e diferenciação de células de Sertoli e Leydig durante o desenvolvimento testicular, pela espermatogênese e a esteroidogênese, e seus distúrbios estão relacionados com disfunção reprodutiva masculina (Ramos & Zamoner, 2014), o que indica que, mesmo não apresentando alteração na quantidade de células, não podemos descartar possíveis prejuízos na função das células de Sertoli.

No presente estudo, o ciclo do epitélio seminífero foi avaliado nos animais com 60 e 90 dias. Verificou-se que, os animais com 60 dias, expostos a maior dose de TCS (300 mg/kg/dia), apresentaram aumento significativo na ocorrência da fase I-VI da espermatogênese quando comparados aos animais do grupo G1. Sabe-se que os efeitos nucleares dos hormônios tireoidianos são mediados por receptores (TRa e TRb), membros da superfamília de receptores

de hormônios da tireóide (Tsai & O'Malley, 1994). A ativação destes receptores modula a transcrição do gene essencial para iniciar mudanças intranucleares no metabolismo da célula (Yen *et al.*, 2006; Patrick, 2009). Dentro do epitélio seminífero as células de Sertoli expressam duas isoformas de dois principais receptores: TRa1 e TRa2 (Subbaramaiah *et al.*, 2011). A idade da puberdade (60 dias) é um dos períodos de maior expressão de TRa1 e TRa2 em células de Sertoli, demonstrando janela crítica para a ação dos hormônios tireoidianos nos testículos (Jannini *et al.*, 1999), devido ao aumento da atividade esteroidogênica pelas células de Leydig (Manna *et al.*, 1999). Essa condição explica a elevação na frequência da fase do I-VI da espermatogênese nos animais púberes deste estudo, pois é nessa fase que ocorre a maior presença de espermátides jovens e maduras.

Nos animais com 90 dias, observou-se aumento significativo dos estágios VII, VIII e IX-XIII e diminuição do estágio XIV em todos os grupos tratados, quando comparados ao grupo GI. Sabe-se que a conversão da espermátide jovem para madura (espermiogênese), é dependente de testosterona (T), ocorrendo principalmente durante as fases I-VI, VII-VIII e IX-XII, (O'Donnell *et al.*, 1994).

Opostamente as demais, a fase XIV, é caracterizada por ser uma etapa de diferenciação celular a partir da espermatogônia, e é uma etapa dependente do hormônio folículo estimulante (FSH), por ter nesta fase a expressão máxima de receptores de FSH nas células de Sertoli (Ranniko *et al.*, 1996; D' Souza *et al.*, 2005). Estudos demonstram que os níveis normais de testosterona são insuficientes para manutenção da espermatogênese, por isso o FSH induz as células de Sertoli a sintetizarem e liberarem a proteína ligadora de andrógeno

(ABP), a qual, se liga a testosterona, evitando sua saída do túbulo seminífero e elevando o nível de testosterona intratesticular, resultando na manutenção na espermatogênese (Gartner & Hiatt, 1999). Estudos apontam que a Tiroxina age inibindo a produção de ABP (Fugassa *et al.*, 1987). Como os filhotes de mães expostas ao TCS durante a gestação e lactação desenvolvem hipotireoidismo congênito (Saki *et al.*, 2014), esses animais podem apresentar hiperprodução de ABP, causando elevação dos níveis de testosterona intratesticular, resultando no aumento da quantidade de espermátides jovens e maduras no epitélio seminífero dos animais deste estudo. Essa condição reflete na elevação das frequências das fases do VII-VIII e IX-XII e diminuição da fase XIV da espermatogênese, resultando na desregulação do ciclo do epitélio seminífero e conseqüente impacto na fertilidade nos animais de 90 dias.

***Conclusão***



## **9. Conclusão**

Foi possível concluir que, a exposição materna ao triclosan durante a gestação e lactação causa efeitos na prole masculina, tais como: Restrição de desenvolvimento intrauterino, atraso na instalação da puberdade, alteração do peso da glândula seminal nos animais com 60 dias, alteração no peso do fígado e da próstata nos animais com 90 dias e desregulação no ciclo do epitélio seminífero em ambas as idades.

## ***Referências Bibliográficas***

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIELLO, A. E.; LARSON, E. L.; LEVY, S. B. Consumer antibacterial soaps: effective or just risky? **Clin. Infect. Dis.**, n. 45, p. 137-47, 2007.
- ALLMYR, M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; MCLACHLAN, M.S., *et al.* Triclosan in plasma and milk from Swedish nurse. **Sci. Total Environ.**, n. 372, p. 87–93, 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.**, n. 105, p. 339-44, 2009.
- 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 and Chemic. Toxicol.**, n. 59, p. 534–540, 2013.
- BAGLEY, D. M.; LIN, Y. J. Clinical evidence for the lack of triclosan accumulation from daily use in dentifrices. **Am. J. Dent.**, n. 13, p. 148-52, 2000.
- BAKKER, J.; HONDA, S.; HARADA, N.; *et al.* Restoration of male sexual behavior by adult exogens in male aromatase knockout mice. **Horm. Behav.**, n. 46, p. 1-10, 2004.
- BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **B. M. J.**, n. 15, p. 171-4, 1995.
- BEANS, B. E. Eagle's plume: the struggle to preserve the life and haunts of American's bald eagle. **Lincoln University of Nebraska Press**, 1996.
- BEDOUX, G.; ROIG, B.; THOMAS, O.; *et al.* Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, n. 19, p. 1044-1065, 2012.
- BESTER, K. Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, n. 49, p. 9-17, 2005.
- BLACK, J. G.; HOWES, D. Percutaneous absorptions of Triclosan from toilet preparations. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, n. 26, p. 205-215, 1975.

- BRUIN, J. P.; DORLAND, M.; BRUINSE, H. W.; *et al.* Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. **Early Hum Dev.**, n. 51, p. 39-46, 1998.
- CALAFAT, A. M.; YE, X.; WONG, L. Y.; *et al.* Urinary concentrations of triclosan in the US population. **Environ. Health. Perspect.**, n. 116, p. 306-7, 2008.
- CANALE, D.; AGOSTINI, M.; GIORGILLI, G.; *et al.* Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. **J Androl.** n., 22, p. 284-8, 2001.
- 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.**, n. 4, p. 15-23, 2008.
- CHEN, L.; WANG, Z.; JING, Z.; *et al.* Accumulation and Risk of Triclosan in Surface Sediments Near the Outfalls of Municipal Wastewater Treatment Plants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, n. 95, p. 525–529, 2015.
- COWIN, P.A.; FOSTER, P.; PEDERSEN, J.; *et al.* Early-onset endocrine disruptor induced prostatitis in the rat. **Environ. Health. Perspect.**, n. 116, p. 923-9, 2008.
- CRAWFORD, B. R.; DECATANZARO, D. Disruption of blastocyst implantation by triclosan in mice: impacts of repeated and acute doses and combination with bisphenol-A. **Reprod. Toxicol.**, n. 34, p- 607-13, 2012.
- CROFTON, K. M.; PAUL, K. B.; DEVITO, M. J.; *et al.* Short-term *in vivo* exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, n. 24, p. 194–197, 2007.
- CULLINAN, M. P.; WESTERMAN, B.; HAMLET, S. M.; *et al.* The effect of a triclosan containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. **J. Clin. Periodontol.**, n. 30, p. 414-419, 2003.
- CULTY M, THUILLIER R, LI W., *et al.* In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. **Biol. Reprod.**, n. 78, p. 1018-28, 2008.
- DANN, A. B.; HONTELA, A. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. **J. Appl. Toxicol.**, n. 31, p. 285–311, 2011.

- DAVID, A.;FENET, H.;GOMEZ, E. Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations. **Mar. Pollut. Bull.**, n. 58, p. 95360, 2009.
- DAYAN, A.D. Risk assessment triclosan (Irgasan®) in human breast milk. **Food Chem. Toxicol.**, n. 45, p. 125-29, 2007.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C., *et al.* Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr. Rev.**, n. 30, p. 293-342, 2009.
- DICKERSON, S.M.; GORE, A. C. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, n. 8, p. 143-159, 2007.
- D' SOUZA, R.; MANJIT, K.; GRILL-SHARMA; *et al.* Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. **Molecular and Cellular Endocrinol.**, n. 241, p. 41–48, 2005.
- EUI-MAN, J.; BEUM-SOO, A.; KYUNG-CHUL, C.; *et al.* Potential estrogenic activity of triclosan in the uterus of immature rats and rat pituitary GH3 cells. **Toxicol. Letters**, n. 208, p. 142–148, 2012.
- EUSTACHE, F.; MONDON, F.; CANIVENC-LAVIER, M. C.; *et al.* Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. **Environ. Health. Perspect.**, n. 117, p. 1272-9, 2009.
- 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.**, n. 28, 147-71, 2010.
- FORAN, C. M.; BENNETT, E. R.; BENSON, W. H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. **Mar. Environ. Res.**, n. 50, p. 153-6, 2000.
- FUGASSA, E.; PALMERO, S.; GALLO, G. Triiodothyronine decreases the production of androgen binding protein by rat Sertoli cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, n. 143, p. 241-7, 1987.
- GAFFAR, A.; NABI, N.; KASHUBA B.; *et al.* Antiplatelet effects of dentifrices containing triclosan/copolymer/NaF System versus triclosan dentifrices without copolymer. **American. J. Dent.**, n. 3, p. 7-14, 1990.

- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. 1999. **Tratado de Histologia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 472.
- GHASSABIAN, A.; BONGERS-SCHOKKING, J. J. HENRICHS, J.; *et al.* Maternal thyroid function during pregnancy and behavioral problems in the offspring: the generation R study. **Pediatr. Res.**, n.69, p. 454–459, 2011.
- GLASER, A. The ubiquitous Triclosan: a common antibacterial agent exposed. **Pesticid.andyou.**, n. 24, p. 12-7, 2004.
- GODFREY K. M.; BARKER, D. J. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutr.**, n. 4, p. 611-24, 2001.
- GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupters as obesogens. **Mol. Cell. Endocrinol.**, n. 304, p. 19-29, 2009.
- GUERRERO-BOSAGNA, C.M.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational effects of endocrine disruptors on male reproduction. **Semin. Reprod. Med.**, n. 27, p. 403-8, 2009.
- GUILLETTE JR, L. J. Endocrine disrupting contaminants – beyond the dogma. **Environ. Healt. Perspect.**, n. 114, p. 9-12, 2006.
- HALL, C.M.;RHIND, S.M.;WILSON, M.J. The potential for use of gastropod molluscs as bioindicators of endocrine disrupting compounds in the terrestrial environment.**J. Environ. Monit.**, n. 11, p. 491-7, 2008.
- HASS, U.; SCHOLZE, M., CHRISTIANSEN, S. *et al.* Combined exposure to anti androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat.**Environ. Health. Perspect.**, n. 1, p. 122-8, 2007.
- HOET, J. J., HANSON, M. A. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. **J. Physiol.**, n. 514, p. 617-27, 1999.
- HOKKEN-KOÈLEGA, A. C. Timing of puberty and fetal growth. **Best. Pract. Res. Clin.Endocrinol. Metab.**, n. 16, p. 65-71, 2002.
- HOLSBERGER, D.R.; COOKE, P. S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. **Cell. Tissue Res.**, n.322, p. 133– 40, 2005.
- HONKISZ, E.; ZIEBA-PRZYBYLSKA, D.; WOJTOWICZ, A. K. The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells. **Reproductive Toxicology**, n. 34, p. 385– 392, 2012.

- HOVANDER, L.; MALMBERG, T.; ATHANASIADOU, M.; *et al.* Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, n. 42, p. 105-117, 2002.
- 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.**, n. 67, p. 167-79, 2004.
- JACOBSON-DICKMAN, E.; LEE, M. M. The influence of endocrine disruptors on pubertal timing. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, n. 16, p. 25-30, 2009.
- JANNINI, E. A.; CAROSA, E.; RUCCI, N.; *et al.* Ontogeny and regulation of variant thyroid hormone receptor isoforms in developing rat testis. **J Endocrinol Invest.**, n. 22, p. 843-8, 1999.
- KANDEL, E. R.; SCHAWARTZ, J. H.; JESSEL, M. T. (1997). Sexo e cérebro. Capítulo 31 **de Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**, 1ª ed, pp. 465-473. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- KJAERHEIM, V.; BARKVOLL, P.; WAALER, S.M.; *et al.* Triclosan inhibits histamine-induced inflammation in human skin. **J. Clin. Periodontol.**, n. 6, p 423-426, 1995.
- KLOAS, W.; URBATZKA, R.; OPITZ, R.; *et al.* Endocrine disruption in aquatic vertebrates. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, n. 1163, p. 187-200, 2009.
- 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. **Scienc. of the Total Environ.**, n. 445–446, p. 299–305. 2013.
- KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I. T., WEINER, R. I. Prepubertal separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biol Reprod.**, n. 17, p. 298-303.
- KUMAR, V.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. **Toxicol.**, n. 250, p. 124-31, 2008.
- 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.**, n. 27, p. 177-85, 2009.

- LAGUË, E.; TREMBLAY, J. J.; Antagonistic effects of testosterone and the endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate on INSL3 transcription in Leydig cells. **Endocrinol.**, n. 149, p. 4688-94, 2008.
- LAN, Z.; KIM, H. T.; BI, K. S.; *et al.* Triclosan exhibits a tendency to accumulate in the epididymis and shows sperm toxicity in male Sprague-dawley rats. **Environ. Toxicol.** n. 1, p. 83-91, 2015.
- LARSSON, K.; BJORKLUND, K. L.; PALM, B; *et al.* Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children. **Environ. Internat.**, n. 73, p. 323-333, 2014.
- LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann. NY Acad. Sci.**, n. 55, p. 548–573, 1952.
- MA, W. G.; SONG, H.; PARIA, B. C.; *et al.* Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, n. 100, p 2963-8, 2003.
- MANNA, P. R.; TENA-SEMPERE, M.; HUHTANIEMI, I. T. Molecular mechanisms of thyroid hormone-stimulated steroidogenesis in mouse leydig tumor cells. Involvement of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. **J. Biol. Chem.**, n. 274, p. 590918, 1999.
- MANSERVISI, F.; GOPALAKRISHNAN, K.; TIBALDI, E.; *et al.* Effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on reproduction and mammary gland development in female Sprague-Dawley rats. **Reproduct. Toxicol.**, n. 54, p. 110–119, 2015.
- MOCARELLI, P.; GERTHOUX, P. M.; PATTERSON, D. G. JR.; *et al.* Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. **Environ. Health. Perspect.**, n. 116, p. 70-7, 2008.
- NABI, N.; MUKERJEE, C.; SCHMID, R.; *et al.* In vitro and in vivo studies on triclosan/PVM/MA copolymer/NaF combination as an anti-plaque agent. **Am. J; Dent.**, n. 2, p. 197-206, 1989.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Regulation of the transcription by steroid hormones. In: **Lehninger – Principles of Biochemistry**, 1a ed. New



- York and Basingstoke: WH Freeman and CO, 2004. Cap. 12. P. 460-462.
- NILSSON, E.; E.; ANWAY, M. D.; STANFIELD, J.; *et al.* Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. **Reproduct.**, n. 135, p. 713-21, 2008.
- O'DONNELL, L.; MCLACHLAN, R. I.; WREFORD, N.; *et al.* Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. **Endocrinology**, n.135, p. 2608–2614, 1994.
- ODELL, W. D.; SWERDLOF, R. S. Etiologies of sxuk maturation: A model system based on de sexually maturing rat. **Recent. Prog. Horm. Res.**, n. 32, p. 245-288, 1976.
- OJEDA, S. R., AND URBANSKI, H. F. (1994). Puberty in the rat. In **The Physiology of Reproduction** (E. Knobil and J. Neill, Eds.), Raven Press, New York, pp. 363-409.
- OLESEN IA, SONNE SB, HOEI-HANSEN CE, *et al.* Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, n. 21, p. 462-78, 2007.
- ORVOS DR, VERSTEEG DJ, INAUEN J. *et al.* Aquatic toxicity of triclosan. **Environ. Toxicol. Chem.**; n. 21, p. 1338-49, 2002.
- PALMER, J.R.; WISE, L. A.; HATCH, E. E.; *et al.* Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark Prev.**, n. 15, p. 1509–1514, 2006.
- 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.**, n. 14, p. 71-89, 1993.
- PALMLUND, I. Exposure to a xenoestrogen before birth: the diethylstilbestrol experience. **J. Psychosom. Obstet. Gynaecol.**, n. 17, p. 71-84, 1996.
- PATISAUL, H. B.; ADEWLE, H. B. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. **Front. Behav. Neurosc.**, n. 29, p. 3-10, 2009.

- PATRICK, L.; Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health. **Altern. Erro! A referência de hiperlink não é válida.Med. Rev.**, n. 14, p. 326-46, 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.**, n. 113, p. 367–379, 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.**, n. 300, p. 31-45,2012.
- PHILLIPS, K. P.; TANPHAICHITR, N. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality.**J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.**, n. 11, p. 188-220, 2008.
- PRINS, G. S. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endocr. Relat. Cancer.**, n. 15, p. 649-56, 2008.
- QUECKENBERG, C.; MEINS, J.; WACHALL, B.; *et al.* Absorption, pharmacokinetics, and safety of triclosan after dermal administration. **Antimicrob. Agents. Chemother.**,n. 54, p. 570-2, 2010.
- RAMOS, C. F.; ZAMONER, A. Thyroid hormone and leptin in the testis. **Front. Endocrinol.**, n. 5, p 1-12, 2014.
- RANNIKO, A.; PENTITILA, T.L.; ZHANG, F.P.; *et al.* Stage specific expression of the FSH receptor in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. **J. Endocrinol.** n. 151, p. 29–35, 1996.
- RILEY, P.; LAMONT, T. Triclosan/copolymer containing toothpastes for oral health. **Cochrane Database Syst Rev.**, n. 5, p. 12, 2013.
- RIVKEES, S. A.; BODE, H. H.;CRAWFORD, J. D.Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. **N. Engl. J. Med.**, n. 318, p. 599-602,1988.
- RODRIGUEZ, P. E. A.; SANCHEZ, M. S. Maternal exposure to triclosan impairs homeostasis and female pubertal development in wistar rat offspring. **J. Tox. Env. Hlth.**, n. 73, p. 1678-1688, 2010.
- ROMIJN, J. A. Endocrinology in the 21st century: unmasking the mysteries of biology. **Neth. J. Med.**, n. 55, p. 271-75, 1999.

- ROSLING, B.; WANNFORS, B.; VOLPE, A. R.; *et al.* The use of a triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, n. 24, p. 873–880, 1997.
- RUBIN, M. M. Antenatal exposure to des: lessons learned... future concerns. **Obstet. Gynecol. Surv.** n. 62, p. 548-555, 2007.
- SAKI, F.; DABBAGHMANESH, M. H.; GHAEMI, S. Z.; *et al.* Thyroid function in pregnancy and its influences on maternal and fetal outcomes. **Int. J. Endocrinol. Metab.**, n. 12, p. 1-7, 2014.
- SANDBORGH - ENGLUND, G.; ADOLFSSON - ERICI, M.; *et al.* Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. **J. Toxicol. Environ. Health. A.**, n. 69, p. 1861–1873, 2006.
- SHIBUTANI, M.; WOO, G. H.; FUJIMOTO, H.; *et al.* Assessment of developmental effects of hypothyroidism in rats from in utero and lactation exposure to anti-thyroid agents. **Reprod Toxicol.**, n. 28, p. 297-307, 2009.
- SCHUG, T. T.; JANESICK, A.; BLUMBERG, B.; *et al.* Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, n. 127, p. 204-15, 2011.
- SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE, M.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human. Reprod.**, n. 16, p. 972-78, 2001.
- SRINIVASAN, M.; AALINKEEL, R.; SONG, F.; *et al.* Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, n. 290, p. 129-134, 2006.
- SOTO, A. M.; MAFFINI, M. V.; SONNENSCHNEIN, C. Neoplasia as development gone awry: the role of endocrine disruptors. **Int. J. Androl.**, n. 31, p. 288-93, 2008.
- STEINBERG, R. M.; WALKER, D. M.; JUENGER, T. E.; *et al.* Effects of perinatal polychlorinated biphenyls on adult female rat reproduction: development, reproductive physiology, and second generational effects. **Biol. Reprod.**, n. 78, p. 1091-101, 2008.

- STOKER, T. E.; GIBSON, E. K.; ZORILLA, L. M. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat. **Toxicol. Sci.**, n. 1, p. 45-53, 2010.
- SUBBARAMAIAH, K.; HOWE, L. R.; BHARDWAJ, P.; *et al.* Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. **Cancer Prev. Res.**, n. 4, p. 329-46, 2011.
- SULTAN, C.; PARIS, F.; TEROUANNE B, *et al.* Disorders linked to insufficient androgen action in male children. **Hum. Reprod. Update.**, n. 7, p. 314-22, 2001.
- TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annu. Rev. Biochem.**, n. 63, p. 451-86, 1994.
- UZUMCU, M.; SUZUKI, H.; SKINNER, M. K. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function. **Reprod. Toxicol.**, n. 18, p. 765-74, 2004.
- VALBUENA, D.; MARTIN, J.; DE PABLO, J. L.; *et al.* Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. **Fertility and Sterility.**, n. 76, p. 962-8, 2001.
- VAN MEEUWEN, J. A.; TER BURG, W.; PIERSMA, A. H.; *et al.* Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells. **Food. Chem. Toxicol.**, n. 45, p. 2319-30, 2007.
- VAN WEISSENBRUCH, M. M., ENGELBREGT, M. J., VEENING M.A.; *et al.*; Fetal nutrition and timing of puberty. **Endocr. Dev.**, n. 8, p. 15-33, 2005.
- 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.** n. 80, p. 217-227, 2006.
- WAGNER, M. S.; WAJNER, S. M.; MAIA, A. L. The role of thyroid hormone in testicular development and function. **J. Endocrinol.**, n. 199, p. 351-65, 2008.
- WANG, M. H.; BASKIN, L. S. Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias. **J. Androl.**, n. 29, p. 499-505, 2008.

- WEISZ, J.; WARD, I. L. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses and neonatal offspring. **Endocrinol.**, n. 106, p. 306-316, 1980.
- WEISS, L.; ARBUCKER, T. E.; FISHER, M.; *et al.* Temporal variability and sources of triclosan exposure in pregnancy. **Int. J. Hyg. Environ Health.**, n. 6, p. 507-13, 2015.
- WILSON, V. S.; BLYSTONE, C. R.; HOTCHKISS, A. K.; *et al.* Diverse mechanisms of anti-androgen action: impact on male rat reproductive tract development. **Int. J. Androl.**, n. 31, p. 178-87, 2008.
- YEN, P. M.; ANDO, S.; FENG, X.; *et al.* Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. **Mol. Cell. Endocrinol.**, n. 246, 121-7, 2006.
- ZAMBRANO, E.; BAUTISTA, C. J.; DEÁS, M.; *et al.* A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **J. Physiol.**, n. 15, p. 221-230, 2006.
- ZORRILLA, L. M.; GIBSON, E. K.; JEFFAY, S. C. *et al.* The Effects of Triclosan on Puberty and Thyroid Hormones in Male Wistar Rats. **Toxicol. Sci.**, n. 107, p. 56-64, 2009.



## 11. Anexo:

**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 ao bactericida triclosan, durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento e função reprodutiva da prole masculina de rato", 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, 17/04/2015

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