

AVALIAÇÃO TESTICULAR DE RATOS MACHOS SPRANGUE DAWLEY EXPOSTOS A MISTURA DE FTALATOS

*Karen Gabriela Favaro de Souza*¹; *Ariana Musa de Aquino*²; *Barbara Campos Jorge*²; *Luiz Guilherme Alonso-Costa*²; *Arielle Cristina Arena*³; *Wellerson Rodrigo Scarano*³; *Glaura Scantamburlo Alves Fernandes*⁴; *Ana Paula Franco Punhagui Umbelino*⁵

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Londrina/PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI-UniCesumar. gabrielakaren24@gmail.com

²Acadêmica da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Biociência, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, Brazil. arianamusa-15-09@hotmail.com; barbaracjorge93@gmail.com; luiz.alonso@unesp.br

³Pesquisador da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Biociência, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, Brazil. arielle.arena@unesp.br; wrscarano@gmail.com

⁴Pesquisadora da Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência Biológicas, Londrina, PR. Coorientadora do projeto. glaura@uel.br

⁵Orientadora, Mestre, Departamento de Ciências Biológicas, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. Doutoranda pelo Departamento de Patologia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR. ana.punhagui@unicesumar.edu.br

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi identificar se a exposição materna gestacional e lactacional a diferentes concentrações de uma mistura de ftalato pode na geração F1. Para isto, ratas prenhas da linhagem Sprague-Dawley (120DPN) foram divididas aleatoriamente em 4 grupos experimentais: C: controle (veículo); T1: grupo tratado com 20 µg/kg/dia, T2: 200 µg/kg/dia e T3: 200 mg/kg/dia de uma mistura de ftalatos; via gavagem. A mistura de ftalato foi constituída por: 21% DEHP (Bis (2-etilhexil) ftalato), 35% DEP (dietilftalato), 15% DBP (Di-n-butilftalato), 8% DiBP (Diisobutilftalato), 5% BBzP (Butilbenzilftalato), e 15% de DiNP (diisonilftalato). Os animais foram tratados desde o dia 10 de gestação (DG10) até o dia 21 pós-natal (21DPN). Uma parte dos machos da geração F1 foram sacrificados em 22DPN, a outra parte seguiu até a fase adulta, submetidos à eutanásia com 120DPN. Por meio da análise dos resultados verificamos que a menor dose fora mais prejudicial que as demais doses de ftalato, apontando que, ocorreria dano testicular e espermático, além disto, mostrou que na geração F1 houve um atraso da puberdade em relação a distância ano genital. Com isso, conclui-se que os ftalatos alteraram a estrutura testicular na exposição materna ao tóxico, além disso, a redução encontrada prejudica a espermatogênese.

PALAVRAS-CHAVE: Ftalato; Célula de Sertoli; Espermatogênese.

1 INTRODUÇÃO

Os ftalatos são elementos químicos originados de diésteres do ácido ftálico, são utilizados na indústria como plastificantes para aumentar a flexibilidade dos produtos plásticos, este composto é utilizado em diversas áreas, como por exemplo, em materiais de construção, vestuário, embalagens alimentares, automóveis, entre outros (BOŠNIR et al., 2003). Os ftalatos não se aderem covalentemente ao produto plástico, podendo se desprender facilmente e contaminar por via dérmica, gástrica ou aérea, sendo classificado como desreguladores endócrino devido sua atividade antiandrogênica (CHRISTEN et al., 2012). Os DEs são compostos naturais ou sintéticos capazes de interferir na biossíntese, no armazenamento, liberação, transporte e ligação dos hormônios endógenos aos seus receptores. (WHO, 2012).

Silva et al. (2004) realizou um estudo com pacientes acima de 6 anos nos Estados Unidos em amostras de urina, como resultado observou que todas as amostras possuíam alta concentração de MEP, além disso, 99% das amostras continham MBP, 97% com MBzP, e cerca de 78% com DEHP (MEHP); outros ftalatos como MCHO, MOP e MINP foram encontradas em concentrações menores. Todos os compostos encontrados nesse estudo estão entre os ftalatos mais comuns (KWAK et al., 2009).

O sistema genital masculino é influenciado por diversos eventos controlados por hormônios e pela genética do indivíduo, iniciando desde a vida intrauterina e continuando após o nascimento, e a exposição a determinados compostos químicos durante esse

período pode ocasionar alterações significativas no desenvolvimento sexual que podem levar a infertilidade na fase adulta (JOHNSON; HEGER; BOEKELHEIDE, 2012).

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição a uma mistura de ftalatos na fase gestacional e lactacional, ou seja, no período crítico de desenvolvimento do sistema genital da prole, poderá ocasionar alterações significativas na contagem das células de Sertoli, na morfologia testicular e no desenvolvimento do sistema genital masculino.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o experimento, ratas prenhes da linhagem Sprague-Dawley (dia pós-natal 120 - PND120) foram divididas aleatoriamente em 4 grupos experimentais: C: controle (veículo); T1: 20 µg/kg/dia, T2: 200 µg/kg/dia e T3: 200 mg/kg/dia de uma mistura de ftalatos; via gavagem. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Protocolo 1040 / CEUA). O experimento foi realizado no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do IBB/UNESP, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23-25°C) e receberão água e ração para roedores à vontade. A mistura de ftalato era constituída por 21% DEHP (Bis (2-etilhexil) ftalato), 35% DEP (dietilftalato), 15% DBP (Di-n-butilftalato), 8% DiBP (Diisobutilftalato), 5% BBzP (Butilbenzilftalato) e 15% de DiNP (Diisononilftalato); e com base em trabalhos anteriores que avaliaram a concentração desses metabólitos na urina de mulheres grávidas. Os animais foram tratados desde o dia 10 de gestação (DG10) até 21DPN. Para obtenção da geração F1. Os machos da geração F1 foram submetidos à eutanásia em 22DPN e 120DPN. Foram retirados os testículos dos animais para análises espermatogênicas e estruturais do órgão.

As análises foram realizadas comparando os grupos tratados com o grupo controle, utilizando-se os testes estatísticos ANOVA pós-teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis pós-teste de Dunn, de acordo com a variável.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CÉLULAS DE SERTOLI

Os resultados mostraram que a contagem de células de Sertoli não foi estatisticamente diferente em animais com 22DPN, enquanto foi reduzido em animais tratados com doses de 20 µg/kg e 200µg/kg com 120DPN, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Contagem de células de Sertoli F1

	Controle	20µg/Kg	200µg/Kg	200mg/Kg
Célula de Sertoli (n° célula) 120DPN	21.46±1.89	15.55±0.71*	15.78±1.65*	16.99±1.47
Célula de Sertoli (n° célula) 22DPN	37.73±3.50	40.15±4.67	40.04±4.67	37.70±2.91

Média ± Desvio Padrão; ANOVA *post test* Dunnett, p>0.05.

3.2 ANÁLISES ESPERMÁTICAS

A morfologia dos espermatozoides teve uma diminuição na contagem de espermatozoides normais com um aumento nos espermatozoides com anormalidade na cabeça em animais tratados com uma dose de 20µg/Kg (Tabela 2).

Houve uma diminuição dos túbulos no estágio XIV em animais tratados com uma dose de 20 µg/Kg, uma redução dos túbulos no estágio I-VI com uma dose de 200 µg/Kg e um aumento dos túbulos no estágio IX-XIII com uma dose de 200 mg/Kg na dinâmica

espermatogênica. A altura do epitélio germinativo, o diâmetro do túbulo seminífero e a histopatologia testicular não apresentaram diferença estatística (Tabela 2).

Tabela 2: Análise epididimária geração F1 120DPN

	Controle	20µg/Kg	200µg/Kg	200mg/Kg
^AMorfometria (µm)				
Diâmetro túbulo	294.40±21.68	294.70±19.47	285.70±20.59	296.90±19.70
Altura epitélio	84.37±9.65	85.86±8.63	83.41±8.34	87.75±8.38
^ADinâmica espermatogênica(%)				
Estágio I-VI	29.67±3.93	26.40±4.39	20.50±3.20*	26.50±3.39
Estágio VII-VIII	37.50±6.18	35.40±4.72	38.33±5.04	32.33±4.67
Estágio IX-XIII	26.00±8.14	34.60±5.03	35.00±7.40	36.50±3.93*
Estágio XIV	6.83±2.04	3.60±1.14*	6.16±2.63	4.66±1.86
^BHistopatologia (%)				
Túbulo Normal	98.00±0.63	97.00±2.00	94.50±3.93	95.50±2.58
Túbulo Anormal	2.00±0.63	3.00±2.00	5.50±3.93	4.50±2.58
Morfologia Espermática				
Espermatozoide Normal ^B	175.30±5.75	144.90±38.69*	167.60±24.01	159.80±9.45
Anormalidade de cabeça ^A	3.08±0.22	3.69±0.44*	3.06±0.63	3.57±0.20
Anormalidade de cauda ^B	2.50±2.77	10.86±15.09	7.50±12.41	4.00±2.45

Média ± Desvio Padrão; ^A ANOVA *post test* Dunnett, ^B Kruskal-Wallis *post test* Dunn. * Indicam grupos que diferem do controle. Considera-se diferença estatística quando p<0.05

Com esses resultados, podemos observar uma alteração testicular em que a dinâmica espermatogênica ficou alterada, mostrando um atraso na espermição, estágio VII-VIII.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a atividade normal da célula de Sertoli é fundamental para uma boa produção espermática e o resultado da contagem das células de Sertoli mostrou que os ftalatos alteraram a estrutura testicular na exposição materna à toxina, e a redução encontrada na contagem das células de Sertoli pode prejudicar a espermatogênese, tendo em vista que, as células de Sertoli são essenciais para sustentar a linhagem espermatogênica. (SCARANO et al., 2010)

A pesquisa ainda não foi concluída, entretanto, espera-se com os resultados do presente estudo, contribuir no esclarecimento da extensão multigeracional da influência do efeito da exposição materna à mistura de ftalatos sobre testículos da prole, principalmente por dano tecidual do trato genital masculino.

REFERENCIAS

BOŠNIR, J. et al. Migration of phthalates from plastic products to model solutions. *Collegium antropologicum*, v. 27, n. 1, p. 23–30, 2003.

CHRISTEN, V. et al. Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: Validity of concentration addition. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 259, n. 2, p. 169–176, 2012.

KWAK, E. S. et al. Phthalates, Pesticides, and Bisphenol-A Exposure and the Development of Nonoccupational Asthma and Allergies: How Valid Are the Links? *The Open Allergy Journal*, v. 2, n. 1, p. 45–50, 11 set. 2009

SILVA, E. J. R. et al. Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: insights into the adrenal control of male reproduction. *Andrology*, v. 2, n. 6, p. 835–846, 2014.

SCARANO, W. R. et al. Functional and Morphological Reproductive Aspects in Male Rats Exposed to Di- n -Butyl Phthalate (DBP) in Utero and During Lactation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 73, n. 13–14, p. 972–984, 28 maio 2010.

WHO, W. H. O. State of Science of Endocrine Disrupting Chemicals. WHO Library Cataloguing, p. 289, 2012.