



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Leandro Alves dos Santos**

**Exposição materna a mistura de ftalatos: efeitos  
sobre o desenvolvimento e função da tireoide na  
prole de machos e fêmeas Sprague-Dawley**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

**Botucatu  
2022**

Leandro Alves dos Santos

Exposição materna a mistura de ftalatos: efeitos sobre o desenvolvimento e função da tireoide na prole de machos e fêmeas Sprague-Dawley

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Botucatu  
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Leandro Alves dos.

Exposição materna a mistura de ftalatos : efeitos sobre o desenvolvimento e função da tireoide na prole de machos e fêmeas Sprague-Dawley / Leandro Alves dos Santos. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luís Fernando Barbisan  
Capes: 40105008

1. Ratos Sprague-Dawley. 2. Tireoide. 3. Exposição materna. 4. Poluentes orgânicos persistentes - Efeitos colaterais.

Palavras-chave: Descendência; Exposição materna; Ftalatos; Poluentes orgânicos persistentes; Tireoide.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LEANDRO ALVES DOS SANTOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA.**

Aos 01 dias do mês de fevereiro do ano de 2022, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LEANDRO ALVES DOS SANTOS, intitulada **Exposição materna a mistura de ftalatos: efeitos sobre o desenvolvimento e função da tiroide na prole de machos e fêmeas Sprague-Dawley**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP - Câmpus de Botucatu - IB/Unesp, Prof. Dr. CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE (Participação Virtual) do(a) Depto. de Fisiologia e Patologia / FO/Araraquara - Unesp, Prof. Dr. LUCAS TADEU BIDINOTTO (Participação Virtual) do(a) Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) / Hospital de Câncer de Barretos. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN

## Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu grande amigo, conselheiro e “pai profissional” José Lucas de Carvalho, (*in memoriam*)  
Que um dia possamos nos reencontrar, jogar conversa fora e claro, comer uma paçoca.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador, Luís Fernando Barbisan, pela paciência, conselhos e toda orientação.

Aos alunos do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE), em especial Ariane, Gabriel, Guilherme, Luís, Sara e Vânia, por todo o auxílio.

Agradeço à direção da UNIPEX, na pessoa da Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis, bem como às gerências administrativas e de laboratório (em especial, ao senhor José Georgete), bem como a todos os funcionários que me ajudaram com técnicas, afastamentos e conselhos.

Aos meus pais e irmãs, por todo apoio durante a fase de vacas magras na graduação. À Claudinha, minha eterna “mãe-profissional”, e à Profa. Adriana Marcantônio, bem como todos os demais docentes do Depto de Diagnóstico e Cirurgia. Não fui aluno, mas aprendi mais na odonto do que em qualquer curso que já fiz.

## Resumo

Os Desreguladores Endócrinos (DEs) são substâncias químicas naturais ou produzidas pela ação humana que possuem o potencial de interferir no sistema endócrino, afetando o crescimento/desenvolvimento e a reprodução dos organismos vivos, incluindo os seres humanos. Eles afetam principalmente a função de hormônios esteroides, podendo ter atividade anti-estrogênica/estrogênica ou anti-androgênica/androgênica, ou outros órgãos como a tireoide, alterando seu desenvolvimento e função. Os ftalatos são uma classe de substâncias utilizadas, dentre outros fins, como amaciantes plásticos, e que são agrupados em baixo e de alto peso molecular. Assim, os ftalatos e seus metabólitos são detectados na população de recém-nascidos, de jovens e adultos em diversas matrizes biológicas. Na literatura, a exposição aos ftalatos foi associada à disgenesia testicular, malformação genital, diminuição de produção de hormônios sexuais, alterações ovarianas, dentre outras. O efeito transgeracional da exposição aos ftalatos ainda não é bem estabelecido, porém estudos pré-clínicos tem indicado que ftalatos podem levar a distúrbios reprodutivos e endócrinos na descendência, mas poucos estudos testam animais expostos a misturas complexas de DEs. Assim, o objetivo deste estudo foi o de avaliar se a exposição materna a uma mistura de seis diferentes ftalatos [19% DEHP (Bis(2-etilexil) ftalato), 36% DEP (Dietilftalato), 15% DBP (Di-n-butilftalato), 10% DiBP (Diisobutilftalato), 8% BBzP (Butilbenzilftalato), e 10% DiNP (Diisonilftalato)] é capaz de alterar o desenvolvimento e função da glândula tireoide na prole de machos e fêmeas Sprague-Dawley (SD) pré-púberes e adultas (F1). Ratas SD prenhes receberam o tratamento com a mistura de ftalatos do dia gestacional 12 (DG12) ao dia pós-natal 21 (DPN 21), por gavagem diária, nas doses de 20µg, 200µg e 200mg/kg. Nos dias pós-natal (DPN) 21 e 120, as tireoides da prole (8 animais por ninhada, macho ou fêmea) foram removidas, processadas histologicamente para análises morfológicas e imunoistoquímicas. Foram observadas poucas alterações morfológicas na tireoide nos dois períodos analisados (DPN 21 e 120), tais como, alterações no volume relativo de compartimento estromal e de altura de epitélio tireoidiano, em especial nas fêmeas no DPN 21 e alterações hormonais em machos no DPN 21. Os níveis de proliferação celular pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foram semelhantes entre os grupos nos dois períodos analisados. Os resultados indicam que a exposição materna a uma mistura complexa de ftalatos e em doses relevantes não causou alterações importantes da morfologia da tireoide dos descendentes.

**Palavras chaves:** Misturas de Ftalatos; Exposição materna; Descendência (F1); Tireoide; Ratos Sprague-Dawley;

## Abstract

Endocrine Disruptors (ED) are natural and synthetic chemicals produced by human action that have the potential to interfere with the endocrine system, affecting the growth and reproduction of living organisms, including the human. ED mainly affect the function of steroid hormones, and may have anti-estrogenic/estrogenic or anti-androgenic/androgenic activity or other organs since as thyroid development and function. Despite scarce epidemiological evidence, there are reports that ED, such as bisphenol A (BPA) and phthalates, can alter the levels of thyroid hormones in pregnant women, leading to hormonal imbalance in the embryo and fetus. Phthalates are a class of substances used, among other purposes, as plastic softeners, which are classified into low and high molecular weights. Thus, phthalates and their metabolites are detected in the young/adult population in several biological matrices. In the literature, maternal exposure to phthalates has been associated with testicular dysgenesis, genital malformation, decreased production of sex hormones, ovarian alterations, among other changes in descendent. The transgenerational effect of maternal exposure to phthalates is not yet well established, but preclinical studies have indicated that phthalates can lead to reproductive and endocrine disorders in the offspring, but few animal studies evaluate adverse effects of ED complex mixtures of. Thus, the aim of this study was to assess whether maternal exposure to a mixture of six different phthalates [19% DEHP (Bis (2-ethylexyl) phthalate), 36% DEP (Diethylphthalate), 15% DBP (Di-n- butyl phthalate), 10% DiBP (Diisobutyl phthalate), 8% BBzP (Butylbenzyl phthalate), and 10% DiNP (Diisononyl phthalate)] is able to alter the development and function of the thyroid gland in the offspring of pre-pubertal and adult males and females Sprague-Dawley rats.(F1). The pregnant rats received the phthalate mixture from gestational day 12 (DG12) to postnatal day 21 (PND 21), by daily gavage, in the doses of 20 $\mu$ g, 200 $\mu$ g and 200mg/kg. On PND 21 and 120, the thyroid (8 animals per litter, male or female) were removed and processed histologically for morphological and immunohistochemical analyzes. Few morphological changes were observed in the thyroid in both periods analyzed, such as changes in the relative volume of the stromal compartment and height of the thyroid epithelium, especially in females and TSH hormone changes in males.

**Key words:** Phthalate mixture; Maternal exposure; Offspring (F1); Thyroid; Sprague-Dawley rats;

## Lista de Ilustrações

Figura 1 - Estrutura Química dos ftalatos mais comumente encontrados .....	15
Figura 2 - Desenvolvimento da tireoide em humanos e ratos .....	16
Figura 3 - Delineamento Experimental .....	27
Figura 4 - Lâminas histológicas de tireoide coradas em HE – DPN22 dias .....	35
Figura 5 - Lâminas histológicas de tireoide coradas em HE – DPN 120 dias.....	35
Figura 6 - Quantificação de TSH em machos.....	39

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Dados reprodutivos das mães e ninhadas F1 (machos e fêmeas) dos diferentes grupos experimentais <sup>(1)</sup> .....	31
Tabela 2 - Análise morfométrica da tireoide de machos e fêmeas no dia pós-natal (DPN) 21 .....	33
Tabela 3 - Análise morfométrica da tireoide de machos e fêmeas no dia pós-natal (DPN) 120 .....	34
Tabela 4 – Índice de marcação (IM%) de células foliculares pelo anticorpo PCNA <sup>(1)</sup> .....	38

**Abreviações:**

BPA, Bisfenol A;

Des.....Desreguladores endócrinos

POPs.....Poluentes orgânicos persistentes

DEHP.....Bis(2-etilhexil) ftalato

DEP..... Dietilftalato

DBP.....Di-n-butilftalato

DiBP..... Diisobutilftalato

BBzP..... Butilbenzilftalato

DiNP .....Diisonilftalato

DPN..... Dias pós-natal

Phth ..... Phthalates

**Sumário**

Dedicatória.....	5
Agradecimentos.....	6
Índice de Tabelas.....	10
Capítulo 1.....	13
Revisão de literatura.....	14
Referências.....	20
Capítulo 2.....	24
Introdução.....	25
Objetivo Geral.....	26
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	30
Discussão.....	40
Conclusão.....	43
Referências.....	44

## **Capítulo 1**

## Revisão de literatura

A produção e uso crescente de compostos químicos e a ineficiência de políticas de controle e/ou eliminação dos resíduos têm levado ao aparecimento dos chamados contaminantes emergentes ambientais. Estes podem interferir no sistema endócrino de seres humanos e de outros animais, afetando seu crescimento e reprodução (Yoon, 2014; Sifakis et al., 2017). Essas substâncias, conhecidas como desreguladores endócrinos (DEs), são definidas como substâncias químicas exógenas capazes de alterar as funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, provocar efeitos adversos para a saúde dos organismos vivos ou à sua descendência (OECD, 2015; Sifakis et al., 2017). Em sua maioria são poluentes químicos provenientes de praguicidas, plásticos, detergentes, tintas e outros compostos industriais ou produtos domésticos de uso diário (Yoon, 2014, OECD, 2015). Pertencem ao grupo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) e têm rápida e vasta dispersão ambiental pela cadeia alimentar através dos recursos hídricos, utensílios domésticos e alimentos contaminados (Yoon, 2014).

A função hormonal mais afetada pelos DEs é a regulação dos hormônios esteroides, os quais determinam as características e o comportamento sexual de diferentes espécies (Yoon, 2014; Sifakis et al., 2017). Os DEs mais conhecidos têm atividade anti-estrogênica/estrogênica ou anti-androgênica/androgênica (Yoon, 2014; Sifakis et al., 2017). Outros efeitos dos DEs recaem sobre o desenvolvimento e função da glândula tireoide, resultando em interferências na ação, biossíntese e/ou metabolismo dos seus hormônios (Sun et al., 2018). Há também evidências epidemiológicas e experimentais indicando que os DEs possam atuar como possíveis fatores de risco para desenvolvimento de câncer tireoidiano, como revisado por Alsen et al. (2021).

Os ftalatos (Figura 1) são uma família de diésteres de ácido ftálico tipicamente utilizados como plastificantes para amaciar e aumentar a flexibilidade dos produtos de plástico à base de cloreto de polivinilo (Bosnir et al., 2003). Uma vez que estes compostos não estão ligados covalentemente aos produtos em que são utilizados, podem ser liberados e contaminar alimentos processados ou armazenados em produtos ou utensílios plásticos de uso diário (Bosnir et al., 2003). Como DEs, os ftalatos têm sido especialmente estudados, em especial, por sua atividade antiandrogênica (Fisher 2004; Kay et al., 2014). Há inúmeros ftalatos catalogados, sendo os mais comuns o dibutilftalato (DBP), o dimetilftalatos (DMP), o dietilftalato (DEP) e o di-(2-etilexil) ftalato (DEHP) (Frederiksen, 2007).

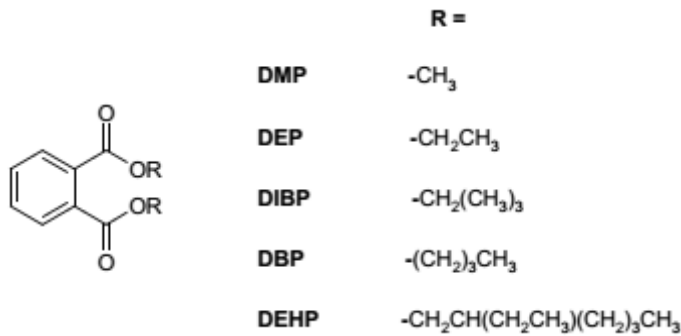


Figura 1 - Estrutura Química dos ftalatos mais comumente encontrados como contaminantes ambientais (Bosnir et al., 2003).

A tireoide surge de um espessamento ectodérmico mediano no assoalho da faringe primitiva que forma o primórdio da glândula, entre o 2º arco faríngeo (tubérculo ímpar) e o 3º arco faríngeo (eminência hipobranquial). Durante o seu desenvolvimento e migração para a região do pescoço (anterior a traqueia), a tireoide fica conectada a região da língua pelo ducto tireoglossos e quando ela atinge sua posição final, esse ducto se degenera, restando na língua um resquício proximal, que é o forame cego (Nilsson & Fangman, 2017). Em alguns indivíduos parte do ducto permanece, o qual passa a ser chamado de lobo piramidal. Até estar completamente ativo, o feto depende totalmente do transporte de hormônios tireoidianos maternos (Kester et al., 2004; Nilsson & Fangman, 2017).

Evidências demonstram que os hormônios tireoidianos agem desde o início do desenvolvimento embrionário (Calvo et al., 1990). Assim, observa-se a ocorrência de transporte destes através da via placentária, com um controle rígido de seus níveis até aproximadamente a décima sexta semana de desenvolvimento, onde o próprio feto já começa a produzi-los (Kester et al., 2004). Muitos dos achados sobre o desenvolvimento da tireoide e de seus hormônios foram baseados em modelos com roedores, sendo que em ratos o período crítico de ação de triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4) se estende do dia embrionário 18 (E18) até o dia pós-natal 21 a 25 (DPN 21-25) (Porterfield & Hendrich, 1993). Falhas no suprimento e produção destes hormônios no período crítico são frequentemente associados ao desenvolvimento neuronal anormal (Calvo et al., 1990).

Depois de formada, a tireoide contém dois lobos principais (direito e esquerdo, unidos pela região do istmo) e eventualmente o lobo piramidal (40-50% dos casos). A unidade morfofuncional da tireoide é denominada de folículo tireoidiano, delimitado por uma camada

única de células foliculares, com coloide em seu interior (Nilsson & Fangman, 2017). As células foliculares são responsáveis pela produção da T3 e T4 a partir da tireoglobulina iodada. Além disso, encontramos no interstício da tireoide, as células parafoliculares ou células C, produtoras de calcitonina (Nilsson & Fangman, 2017). Sua função é regulada pela tireotrofina ou hormônio estimulante da tireoide (TSH), que, ao se ligar com receptores de membrana da célula folicular, leva à formação de T3 e T4, que podem ficar armazenados no coloide tireoidiano por até três meses. No organismo, T4, que é um pró-hormônio, é convertido em T3, hormônio efetivamente ativo. (Moura & Moura, 2004). Além disso, células parafoliculares presentes na tireoide produzem a calcitonina, hormônio responsável pela regulação dos níveis de cálcio sanguíneo, diminuindo a sua absorção pelos intestinos e impedindo a atividade de osteoclastos (Prospero et al, 2009).

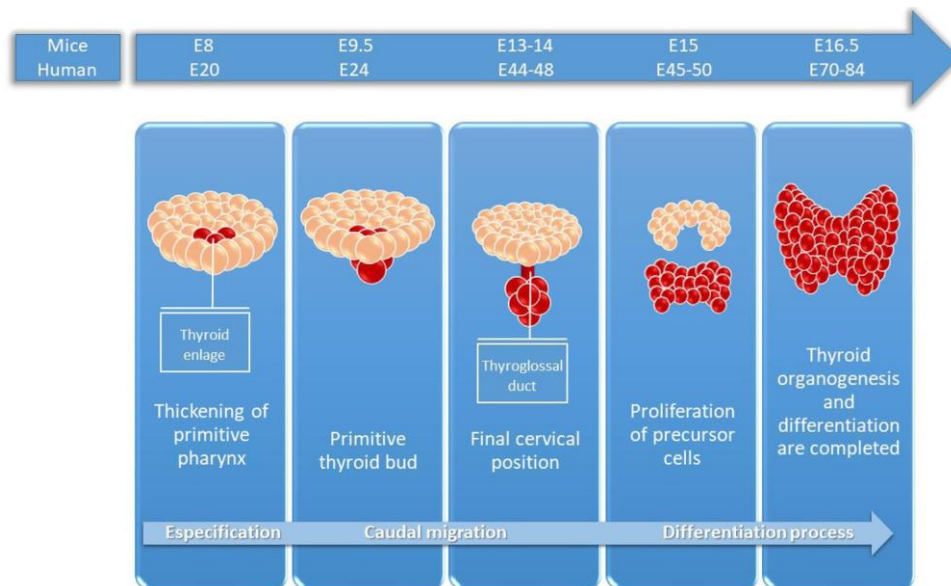


Figura 2 - Desenvolvimento da tireoide em humanos e ratos (Batistuzzo & Ribeiro, 2020).

Ainda há uma escassez de estudos sobre como os DES afetam o desenvolvimento da tireoide durante o período fetal, mas alguns destes químicos, como os Bifenilos Policlorados (PCBs, sigla do termo em inglês) e seus metabólitos ativos, que possuem estrutura muito semelhante ao do hormônio tireoidiano T4, podem se ligar aos receptores destes, bem como se acumular no tecido adiposo do feto, levando a redução da TSH materno, distúrbios no equilíbrio de T3 e T4 que são transferidos da mãe ao feto por via placentária e malformação neuronal. Tais evidências são conflitantes quanto aos possíveis efeitos diretos dos DEs na glândula tireoide, mas demonstram um risco maior em mulheres grávidas, ou seja, durante o desenvolvimento fetal (Hartoft-Nielsen et al., 2011).

Semelhante ao Bisfenol A (BPA), as investigações que avaliam o papel da exposição aos ftalatos concentraram-se principalmente nos resultados reprodutivos, metabólicos e neurológicos (Bosnir et al., 2003). A exposição pré-natal à ftalatos tem sido associada à síndrome da disgenesia testicular (TDS) em roedores e humanos. A TDS engloba um grupo de distúrbios reprodutivos com possíveis causas ambientais subjacentes, incluindo malformações genitais, diminuição da produção hormonal, qualidade do sêmen, fertilidade e predisposição ao crescimento hiperplásico (Williams et al., 2014). Os ftalatos também causam toxicidade ovariana por alterar a foliculogênese (formação e função), aumentar a esteroidogênese, causando infertilidade e outras anormalidades reprodutivas e não reprodutivas (Hannon & Flaws, 2015).

Os impactos da exposição aos ftalatos na saúde humana também foram extensivamente revistos e relatados pelo Programa Nacional de Toxicologia - Centro para a Avaliação de Riscos a Reprodução Humana dos Estados Unidos (Shelby, 2006). Há evidências suficientes em estudos com roedores que a exposição aos ftalatos provocam alterações de desenvolvimento e de reprodução em machos e fêmeas (Shelby 2006; Scsukova et al., 2016). Nos seres humanos, os distúrbios do trato genital, observados em lactentes do sexo masculino e feminino, foram significativamente associados à exposição pré-natal à ftalatos (Swan et al., 2015; Kay et al., 2014; Scsukova et al., 2016).

Sete metabolitos de ftalatos em amostras de urina foram medidos em 2540 indivíduos que participaram da *National Health and Nutrition Examination Survey* 1999-2000 (Silva et al., 2004). O mono-etil-ftalato (MEP) esteve presente em todas as amostras, o mono-butil-ftalato (MBP) em 99% das amostras e o ftalato de monoetilhexilo (MEHP) em 78% das amostras. A mediana de exposição aos ftalatos em adultos foi estimada em 8,2 µg/kg/dia e em crianças de 25,8 µg/kg/dia (Shelby, 2006). Verificou-se que as mulheres tinham níveis de exposição aos ftalatos duas a quatro vezes mais elevados do que os homens (Silva et al., 2004). Crianças mais jovens têm uma exposição significativamente maior do que crianças mais velhas (Koch & Calafat, 2009). Crianças em torno de um ano de idade foram consideradas um grupo de alto risco de exposição por causa de seus padrões comportamentais de alimentação e mastigação e por rastejarem em tapetes inalando poeira contendo ftalatos (Shelby, 2006).

O efeito transgeracional do DEHP e de outros ftalatos em seres humanos é completamente desconhecido, mas há evidências que ligam os níveis de DEHP e seus metabolitos a distúrbios reprodutivos naqueles diretamente expostos e seus descendentes (Hauser et al., 2007; Swan et al., 2015; Hannon & Flaws, 2015). Nesta perspectiva, são necessários estudos moleculares mais aprofundados com DEHP, outros ftalatos e/ou seus

metabólitos para avaliar os riscos potenciais destes compostos sobre a reprodução e desenvolvimento de órgãos hormônio-sensíveis e risco de câncer na vida adulta.

O BPA, os ftalatos e seus metabólitos mais conhecidos (DEHP / MEHP e DBP / BBP / MBP) foram descritos no *Toxicogenomics Database* (Davis et al., 2009) por terem 1232 e 265 interações únicas com genes/proteínas, respectivamente (Singh & Li, 2011; 2012). Cinco das dez principais redes de genes comuns afetadas pelos ftalatos e pelo BPA estão envolvidas com inflamação (Dietert et al., 2010); e seis delas são preditas pelo GeneGo por estarem envolvidas em neoplasias urogenitais, incluindo a neoplasia prostática, a de genitais masculino e feminino, as endometriais e de mama (Singh & Li, 2012). Estudos experimentais têm associado à exposição fetal e neonatal os ftalatos e seus metabólitos com alterações de expressão gênica na glândula mamária, ovário e a próstata, com potencial para aumentar susceptibilidade à carcinogênese e alterações reprodutivas (Moral et al., 2011; Scsukova et al., 2016; Scarano et al., 2018). Em estudo de co-cultura de células mamárias humanas não tumorigênicas (MCF-10) com fibroblastos isolados de tecido adjacente a tumores de mama com expressão de receptor de estrogênio (RE-positivos), foi demonstrado que a exposição da co-cultura aos ftalatos BBP, DBP (10 e 100 nM) aumentou as taxas de proliferação celular e expressão de RE nas células MCF-10, indicando que estes interferem na interação estroma/epitélio (Chen et al 2018). Scarano e colaboradores (2019) demonstraram o efeito de uma mistura ambientalmente relevante de ftalatos no desenvolvimento de próstata de ratos, encontrando hiperplasia, alteração nas medidas da distância anogenital e do peso do órgão, bem como alterações no perfil de expressão de miRNAs.

Em relação a tireoide, Zhang et al. (2020) demonstraram que o existe um sinergismo entre DEHP e BPA que levou a alterações no peso, produção de T3 e T4 e no número de tireócitos na tireoide de ratas fêmeas adolescentes. Tassinari et al. (2021) demonstraram alterações semelhantes, como aumento das áreas de folículos tireodianos e alterações dos níveis de expressão gênica de TSH. Barlas (2020) demonstrou o potencial que o DHP e o DCHP possuem de levar à degeneração de colóide e de epitélio folicular.

A elevação global no relato de nódulos de tireoide pode ser, em parte, definida pela melhora diagnóstica, incluindo o maior acesso a ultrassonografias e redução de preço destas. Porém, evidências sugerem que a maior exposição a agentes ambientais tem sua parcela como causa desta elevação (Andra, 2012). Estudos tem demonstrado que os ftalatos, com atenção especial ao DEHP, podem perturbar a atividade tireoidiana, seja por vias hormonais, como alterando a proporção de tiroxina livre (FT4) durante o início da gravidez, levando a possíveis problemas de desenvolvimento neuronal (Huang et al, 2007). Poucos estudos demonstram a

participação de DEs na carcinogênese de tireoide, mas há evidências de correlação entre a exposição a BPA e aumento na incidência de carcinoma papilar de tireoide (Zhou et al, 2017).

A maioria dos estudos toxicológicos envolvendo os ftalatos tem sido proposta para a avaliação de ftalatos isolados, no entanto, já está bem documentado que os seres humanos e animais são expostos a misturas de diferentes ftalatos (Ferguson et al., 2014; Meeker & Ferguson, 2014; Watkins et al., 2014). Um estudo realizado no estado de Illinois, nos Estados Unidos, em mulheres grávidas, determinou a concentração dos seis principais metabólitos de ftalatos na urina: DEHP (Bis(2-etilhexil) ftalato), DEP (Dietilftalato), DBP (Di-n-butilftalato), DiBP (Diisobutilftalato), BBzP (Butilbenzilftalato) e DiNP (Diisonilftalato), apontando para as proporções dos diferentes ftalatos aos quais os fetos estão indiretamente expostos durante a gestação (Zhou & Flaws, 2017). Estudos epidemiológicos desenvolvidos pelo grupo de Tassinari e colaboradores detectaram vários metabólitos de ftalatos, bem como de BPA, como parte do projeto LIFE PERSUADED. Nestes projetos foram tomadas como base amostras de urina de crianças italianas (Tassinari et al., 2020, 2021), demonstrando a importância de verificar os efeitos adversos destas substâncias na infância e juventude.

Assim, partindo-se uma mistura de ftalatos em concentrações biologicamente relevantes (Zhou & Flaws, 2017) e da exposição em uma janela crítica de desenvolvimento da tireóide, este trabalho foi elaborado com o intuito de para avaliar se a exposição materna gestacional e lactacional alteram a função e o desenvolvimento da tireóide na geração F1, como visto para o desenvolvimento da próstata e da glândula mamária (Scarano et al., 2019; de Freitas et al., 2021).

## Referências

- Alsen M, et al. Endocrine Disrupting Chemicals and Thyroid Cancer: An Overview. *Toxics*. 2021;14(9) .
- Andra SS, et al. Thyroid Disrupting Chemicals in Plastic Additives and Thyroid Health. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 2012;30(2):107-151.
- Barlas N, Göktekin E, Karabulut G. Influence of in utero di-n-hexyl phthalate and di-cyclohexyl phthalate exposure on the endocrine glands and T3, T4, and TSH hormone levels of male and female rats: Postnatal outcomes. *Toxicology and Industrial Health*. 2020;36(6):399–416.
- Batistuzzo A, Ribeiro MO. 2020. Clinical and subclinical maternal hypothyroidism and their effects on neurodevelopment, behavior and cognition. *Archives of endocrinology and metabolism*. 64:89–95.
- Bošnjir J, Puntarić D, Škes I, Klarić M, Šimić S, Zorić I. Migration of phthalates from plastic products to model solutions. *Collegium antropologicum*. 2003;27(1):23–30.
- Calvo R, Obregón MJ, De Ona CR, Del Rey FE, De Escobar GM. Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3, 5, 3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(3):889–99.
- Chen F-P, Chien M-H, Chen H-Y, Ng Y-T. Effects of phthalates on normal human breast cells co-cultured with different fibroblasts. *PloS one*. 2018;13(6):e0199596.
- Davis AP, Murphy CG, Saraceni-Richards CA, Rosenstein MC, Wiegers TC, Mattingly CJ. Comparative Toxicogenomics Database: a knowledgebase and discovery tool for chemical–gene–disease networks. *Nucleic acids research*. 2009;37(suppl\_1):D786–92.
- Dietert RR, DeWitt JC, Germolec DR, Zelikoff JT. Breaking patterns of environmentally influenced disease for health risk reduction: immune perspectives. *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(8):1091–9.
- Ferguson KK, Peterson KE, Lee JM, Mercado-García A, Blank-Goldenberg C, Téllez-Rojo MM, et al. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reproductive toxicology*. 2014;47:70–6.
- Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*. 2004;127(3):305–15.
- Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson A-M. Metabolism of phthalates in humans. *Molecular nutrition & food research*. 2007;51(7):899–911.

- de Freitas T, Zapaterini JR, Moreira CM, de Aquino AM, Alonso-Costa LG, Bidinotto LT, et al. Prenatal exposure to a mixture of different phthalates increases the risk of mammary carcinogenesis in F1 female offspring. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;156:112519.
- Hannon PR, Flaws JA. The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in endocrinology*. 2015;6:8.
- Hartoft-Nielsen M-L, Boas M, Bliddal S, Rasmussen ÅK, Main K, Feldt-Rasmussen U. Do thyroid disrupting chemicals influence foetal development during pregnancy? *Journal of thyroid research*. 2011;2011.
- Huang H-B, Pan W-H, Chang J-W, Chiang H-C, Guo YL, Jaakkola JJ, et al. Does exposure to phthalates influence thyroid function and growth hormone homeostasis? *The Taiwan Environmental Survey for Toxicants (TEST) 2013*. *Environmental research*. 2017;153:63–72.
- Kay VR, Bloom MS, Foster WG. Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in males. *Critical reviews in toxicology*. 2014;44(6):467–98.
- Kester MH, Martinez de Mena R, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, et al. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(7):3117–28.
- Koch HM, Calafat AM. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009;364(1526):2063–78.
- Meeker JD, Ferguson KK. Urinary phthalate metabolites are associated with decreased serum testosterone in men, women, and children from NHANES 2011–2012. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(11):4346–52.
- Moral R, Santucci-Pereira J, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Russo J. In utero exposure to butyl benzyl phthalate induces modifications in the morphology and the gene expression profile of the mammary gland: an experimental study in rats. *Environmental Health*. 2011;10(1):1–12.
- Moura EG de, Moura CC. Regulação da síntese e secreção de tireotrofina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2004;48:40–52.
- Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development*. 2017;144(12):2123–40.
- OECD C. Guidance document on the assessment of chemicals for endocrine disruption. Version. 2010;9:335.
- Porterfield SP, Hendrich CE. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development—current perspectives. *Endocrine reviews*. 1993;14(1):94–106.

- Prospero JD de, Baptista PPR, Amary MFC, Santos PPC dos. Paratireóides: estrutura, funções e patologia. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2009;17:53–7.
- Scarano WR, Bedrat A, Alonso-Costa LG, Aquino AM, Fantinatti BE, Justulin LA, et al. Exposure to an environmentally relevant phthalate mixture during prostate development induces microRNA upregulation and transcriptome modulation in rats. *Toxicological Sciences*. 2019;171(1):84–97.
- Scsukova S, Rollerova E, Mlynarcikova AB. Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. *Reproductive biology*. 2016;16(4):243–54
- Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017;51:56–70.
- Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, et al. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the US population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environmental health perspectives*. 2004;112(3):331–8.
- Singh S, Li SS-L. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(8):10143–53.
- Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Ntp Cerhr Mon*. 2006;(18):v, vii–7, II.
- Sun D, Zhou L, Wang S, Liu T, Zhu J, Jia Y, et al. Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in adolescent rat. *Endocrine journal*. 2017;EJ17-0272.
- Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RHN, et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Human reproduction*. 2015;30(4):963–72.
- Tassinari R, Narciso L, Tait S, Busani L, Martinelli A, Di Virgilio A, et al. Juvenile toxicity rodent model to study toxicological effects of Bisphenol A (BPA) at dose levels derived from Italian children biomonitoring study. *Toxicological Sciences*. 2020;173(2):387–401.
- Tassinari R, Tait S, Busani L, Martinelli A, Narciso L, Valeri M, et al. Metabolic, reproductive and thyroid effects of bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) orally administered to male and female juvenile rats at dose levels derived from children biomonitoring study. *Toxicology*. 2021;449:152653.

- Watkins DJ, Téllez-Rojo MM, Ferguson KK, Lee JM, Solano-Gonzalez M, Blank-Goldenberg C, et al. In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation. *Environmental research*. 2014;134:233–41.
- Williams C, Bondesson M, Kremontsov DN, Teuscher C. Gestational bisphenol A exposure and testis development. *Endocrine disruptors*. 2014;2(1):e29088.
- Yoon K, Kwack SJ, Kim HS, Lee B-M. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2014;17(3):127–74.
- Zhang X, Zhao Y, Cheng C, Li L, Xiao M, Zhang G, et al. Combined effects of di (2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol A on thyroid hormone homeostasis in adolescent female rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(32):40882–92.
- Zhou C, Flaws JA. Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured mouse antral follicles. *Toxicological Sciences*. 2017;156(1):217–29.
- Zhou Z, Zhang J, Jiang F, Xie Y, Zhang X, Jiang L. Higher urinary bisphenol A concentration and excessive iodine intake are associated with nodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *Bioscience reports*. 2017;37(4):BSR20170678.

## Capítulo 2

### Artigo Científico

\*Segundo as normas da revista Toxicology Mechanisms and Methods

## Introdução

Os Desreguladores Endócrinos (DEs) são substâncias químicas que podem alterar as funções do sistema endócrino, com potencial efeito adverso aos organismos vivos e a sua descendência (OECD, 2015; Sifakis et al., 2017). Vários DEs são encontrados em uma ampla variedade de produtos de uso diário, como materiais plásticos em geral, de construção, produtos de higiene, praguicidas, dentre outros (Zhou, 2017).

Dentre os DEs, destacam-se recentemente na literatura os ftalatos, grupo derivado da diesterificação do ácido ftálico ( $C_6H_4(COOH)_2$ ), que possuem largo emprego na indústria plástica, seja para produção de produtos eletrônicos, seja na produção de produtos médicos, utensílios domésticos e brinquedos infantis (Bosnir et al., 2003). Dentre os inúmeros ftalatos catalogados, destacam-se o dibutilftalato (DBP) e o dimetilftalatos (DMP) (Frederiksen, 2007), além do dietilftalato (DEP) e o di-(2-etilexil) ftalato (DEHP), o qual têm recebido especial atenção devido aos seus possíveis efeitos deletérios, como sua atividade anti-androgênica (Fisher 2004; Kay et al., 2014), com efeito transgeracional (Hauser et al., 2007; Swan et al., 2015; Hannon & Flaws, 2015).

Estudos populacionais, como o de Tassinari et al., 2020 têm demonstrado a presença de metabólitos de ftalatos em diversas matrizes biológicas, realçando a disseminação de exposição a esses compostos. Uma vez que há uma constante exposição aos ftalatos e seus metabólitos, causa especial preocupação o impacto destas substâncias no período de desenvolvimento embrionário/fetal e infantil, e a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer na vida adulta. Alterações no desenvolvimento da próstata e da glândula mamária Distúrbios do trato intestinal (Swan et al., 2015 ; Kay et al., 2014; Scsukova et al., 2016) e de má formação prostática na prole (Scarano et al., 2020) foram associados à exposição de ratas prenhas à ftalatos isolados ou em misturas, com potencial aumento de risco de formações cancerígenas.

A tireoide é uma glândula localizada na região cervical, sendo de fundamental importância no controle homeostático, pela produção de seus hormônios T3 e T4. Durante o desenvolvimento do feto, este é totalmente dependente dos hormônios produzidos pela mãe que são transportados ao feto por via placentária, até aproximadamente a décima semana de gestação, onde passa a produzi-los (Kester et al., 2004). Em ratos, a janela de desenvolvimento tireoidiano se dá entre o dia embrionário 18, estendendo-se até o dia pós-nascimento (DPN) 21 a 25 (Porterfield & Hendrich, 1993). Distúrbios hormonais nessa fase de desenvolvimento são frequentemente associados ao mal desenvolvimento neuronal (Calvo et al., 1990).

Proles de ratas prenhas expostas aos DEs tendem a apresentar má-formação de órgãos reprodutivos, redução de fertilidade, redução da foliculogênese (Barlas et al., 2020) e da qualidade de óocitos, dentre outras consequências (Zhou et al., 2017).

Em relação à tireoide, Zhang et al. (2020) demonstraram que existe um sinergismo entre DEHP e BPA que levou a alterações no peso, produção de T3 e T4 e no número de tireócitos na tireoide de ratas fêmeas adolescentes. Tassinari et al. (2021) demonstraram alterações semelhantes, como aumento das áreas de folículos tireoidianos e alterações dos níveis de expressão gênica de

TSH. Barlas (2020) demonstrou o potencial que o DHP e o DCHP possuem de levar à degeneração de colóide e do epitélio folicular.

Poucos estudos correlacionam o efeito da exposição à ftalatos durante a gestação, porém há indícios de que estes podem perturbar a proporção de tiroxina livre (FT4) durante o início da gravidez, levando à alterações no desenvolvimento neuronal (Huang et al., 2007). Além disso, os estudos geralmente focam em ftalatos isolados, sendo que sabe-se que a exposição humana geralmente se dá por uma mistura dos compostos (Ferguson et al., 2014; Meeker & Ferguson, 2014; Watkins et al., 2014).

Em um estudo populacional realizado em Illinois, nos Estados Unidos, foi caracterizado a composição de metabólitos dos ftalatos mais comuns e encontrados na urina de mulheres grávidas, sendo eles: DEHP (Bis(2-etilhexil) ftalato), DEP (Dietilftalato), DBP (Di-n-butilftalato), DiBP (Diisobutilftalato), BBzP (Butilbenzilftalato) e DiNP (Diisonilftalato). O estudo aponta para as proporções dos diferentes ftalatos aos quais os fetos estão indiretamente expostos durante a gestação (Zhou & Flaws, 2017). Assim, a partir desta mistura de ftalatos foram realizados dois trabalhos experimentais pelo nosso grupo avaliando o efeito da exposição materna a essa mistura complexa e as consequências para o desenvolvimento e risco de câncer de mama e próstata (Scarano et al., 2019, Freitas et al., 2021).

## **Objetivo Geral**

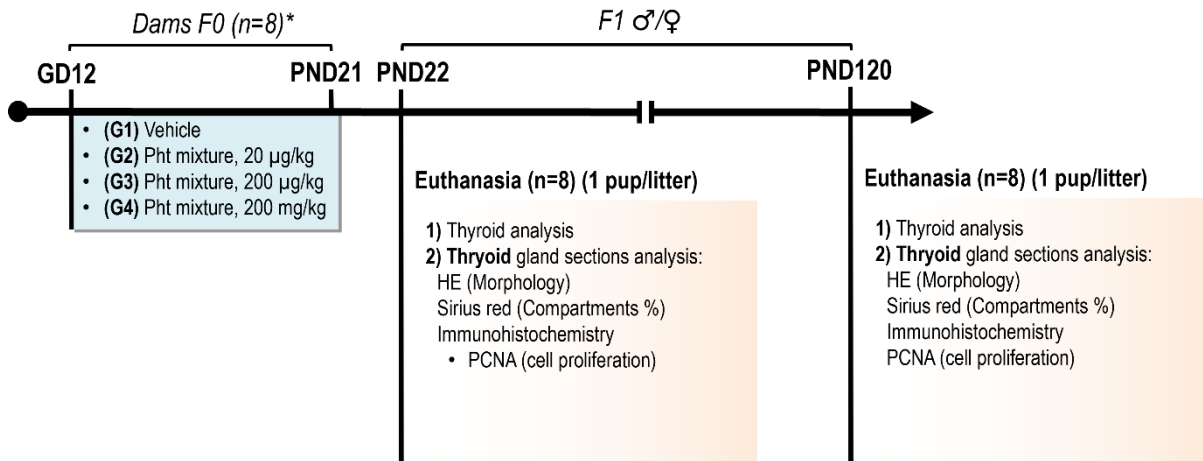
O objetivo desse projeto foi o de avaliar se a exposição materna a uma mistura de seis diferentes ftalatos (DEHP(9%), DEP(36%), DBP(15%), DiBP(10%), BBzP(8%) e DiNP(10%)) é capaz de alterar o desenvolvimento e função da glândula tireoide na prole de machos e fêmeas Sprague-Dawley pré-púberes e adultas (F1).

## **Objetivos Específicos**

Avaliar as alterações no volume relativo dos componentes tireoidianos de ratos pré-púberes e adultos expostos à mistura de ftalatos intra útero (epitélio, colóide e estroma), níveis plasmáticos de TSH e os índices de marcação imunistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, marcador de proliferação celular) na tireoide na prole nos DPN 22 e 120.

## Material e Métodos

### 3.1 Delineamento Experimental



\*G1-G4 groups: control (vehicle); 20 µg/kg/day, 200 µg/kg/day, 200 mg/kg/day) that receive different doses of Pht mixture.

SCARANO, Wellerson R. et al. Exposure to an environmentally relevant phthalate mixture during prostate development induces microRNA upregulation and transcriptome modulation in rats. *Toxicological Sciences*, v. 171, n. 1, p. 84-97, 2019.

Figura 3 - Delineamento Experimental

Machos adultos (n=15) (90 dias de idade, pesando aproximadamente 250 g) e fêmeas adultas (n=40) (120 dias de idade, pesando aproximadamente 250 g), da linhagem de ratos Sprague-Dawley foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério 3 da UNIPEX-FMB, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23-25°C) e receberam água e ração para roedores à vontade. Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se de duas a três fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (DG 0) foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro.

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=08/grupo): Grupo 1: Controle (veículo: óleo de milho); Grupo 2: que recebeu 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo 3: que recebeu 200 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo 4: que recebeu 200 mg/kg/dia da mistura de

ftalatos diluídos em óleo de milho. Os animais dos Grupos 2 a 4 receberam as respectivas doses da mistura por gavagem na seguinte proporção: 19% DEHP (Bis(2-ethylhexyl) ftalato), 36% DEP (Dietilftalato), 15% DBP (Di-n-butilftalato), 10% DiBP (Diisobutilftalato), 8% BBzP (Butilbenzilftalato), e 10% DiNP (Diisonoilftalato). A proporção da mistura foi baseada na composição de ftalatos detectados em amostras de urina de mulheres grávidas em Illinois, EUA (Zhou & Flaws, 2017). As ratas receberam o tratamento do dia gestacional 12 (DG12) ao dia pós-natal 21 (DPN 21) (Scarano et al., 2019). As ratas prenhes ou lactentes foram mantidas em gaiolas individuais, sendo pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume da mistura de ftalatos a ser administrado e a investigação de sinais clínicos de toxicidade. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito (proporção entre machos e fêmeas de 1:1 sempre que possível), e ninhadas com número de filhotes inferior a sete foram descartadas, ou seja, procedeu-se a eutanásia das mães e filhotes. O número inicial de ratas para o acasalamento foi de 40 ratas tendo em vista que aproximadamente 20% das ratas podem não acasalar ou terem ninhadas inferiores a oito filhotes.

No DPN1 foi determinada a distância anogenital (DAG) da prole, diferenciando os machos das fêmeas. Este parâmetro, que é definido como a distância medida entre o ânus e a genitália, é um marcador anatômico dimórfico que reflete a ação androgênica durante o desenvolvimento do sistema genital no período intrauterino (Welsh et al., 2008). Pelo menos oito filhotes (machos e fêmeas/ 1 por ninhada), provenientes de cada um dos quatro grupos experimentais foram anestesiados e eutanasiados sob anestesia com pentobarbital para coleta de sangue e da glândula tireoide em dois momentos: DPN22 (n= mínimo de oito /1 por ninhada) e DPN120 (n= mínimo de oito/ 1 por ninhada). Para que fosse garantida a independência dos tratamentos e das ninhadas, a unidade experimental foi a ninhada e não o indivíduo, e por isso, para cada análise, o uso de animais do mesmo grupo, porém de ninhadas diferentes, garante a heterogeneidade biológica do tratamento como é recomendado para experimentos toxicológicos envolvendo exposição materna e avaliação da prole (Jenkins et al., 2012).

### **Análises histológica e imunoistoquímica**

Nos DPNs 22 e 120, a glândula tireoide de cada animal (machos e fêmeas) foi retirada e fixada em formalina tamponada a 10% por 24 horas, sendo então encaminhadas para processamento histológico de hematoxilina-eosina (HE) e/ou reação de imunoistoquímica.

Para a coloração de HE, as lâminas contendo cortes de tireoide com 4µm de espessura passaram pelas seguintes etapas: bateria de hidratação (xilol I, II e III, etanol absoluto I, II e III, etanol 90% e etanol 70%; por 10 minutos cada passagem), Hematoxilina de Harris por 5

minutos, lavagem em água corrente por 10 minutos, Eosina por 2 minutos e a bateria de desidratação (etanol 70%, etanol 90%, etanol absoluto I, II e III, xilol I, II e III; por 10 minutos cada passagem). Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Merck (Alemanha). Terminada a coloração, as lâminas foram montadas, com o uso de resina sintética Permount (Fisher, EUA).

A expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi detectada pela técnica imuno-histoquímica, utilizando sistema de polímero/peroxidase de uma etapa (EasyPath - Erviegas, Brazil). Células epiteliais tireoidianas PCNA positivas foram analisadas nas glândulas coletadas nos DPN 22 e DPN 120. Os valores dos índices de marcação PCNA foram determinados dividindo-se o número de núcleos positivos pelo número de células analisadas de cada animal, e multiplicando-se por 100. O anticorpo policlonal IgG anti-PCNA de camundongo (Dako, Dinamarca) foi utilizado na diluição de 1:100.

#### **Análises plasmáticas de hormônios tireoidianos**

Nos DPNs 22 e 120, amostras de sangue foram coletadas em recipientes contendo EDTA para obtenção de plasma. As dosagens de TSH da prole de machos (oito animais/grupo) foram realizadas no laboratório da Dra Flaws nos EUA utilizando-se um Kit de ELISA específico. Por questões técnicas, não foi possível quantificar os hormônios nas fêmeas.

#### **Análises Estatísticas**

Os resultados dos diferentes parâmetros foram comparados entre os grupos experimentais utilizando-se o teste de ANOVA ou o teste de Kruskal-Wallis. O contraste entre os grupos foi avaliado utilizando-se os testes post hoc de Tukey (ANOVA) ou Dunn (Kruskal-Wallis). O nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$ . As análises estatísticas foram rodadas no programa Sigma Plot v 12.0 ( Systat Software, EUA).

## **Resultados**

### **Dados gerais**

Os dados reprodutivos das mães expostas ou não a mistura de ftalatos da prole de machos e fêmeas no DPN 21, 60 e 120 estão apresentados na Tabela 1. Os tratamentos com a mistura de ftalatos nas diferentes doses foram bem tolerados pelas mães durante a gestação e lactação, sem evidentes sinais de toxicidade sistêmica (perda de peso, alteração de consumo de ração ou presença de sinais clínicos). Os tratamentos com a mistura de ftalatos nas diferentes doses não alteraram a extensão da gestação, o tamanho médio da ninhada ao nascimento ou a relação entre o nascimento de machos e fêmeas.

Em relação ao peso corpóreo da prole de machos e fêmeas no DPN 01, 22, 60 e 120, estes foram similares entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados reprodutivos das mães e ninhadas F1 (machos e fêmeas) dos diferentes grupos experimentais<sup>(1)</sup>

Parâmetros	Grupos/Tratamentos <sup>2</sup>			
	G1 (Controle)	G2 (Pht 20ug/kg)	G3 (Pht 200ug/kg)	G4 (Pht 200mg/kg)
<b>Mães (F0)</b>	N=06	N=06	N=06	N=06
Período Gestacional (dias)	21,1 ± 0,3	21,8 ± 0,4	21,9 ± 0,3	21,1 ± 0,3
Ganho de Peso Corpóreo (g) (DG0-DG 20) <sup>3</sup>	106,4 ± 16,2	101,6 ± 13,12	101,6 ± 16,0	98,5 ± 10,7
Tamanho da Ninhada	10,0 ± 2,4	11,2 ± 1,8	10,25 ± 3,2	10,21 ± 2,8
Razão Sexual (F/M)	5/6	5/5	6/5	5/6
Peso da ninhada (DPN1) <sup>3</sup>	8,8 ± 0,8	8,4 ± 0,5	8,9 ± 0,4	8,2 ± 0,7
<b>Ninhadas (F1)</b>	N= 06/06 <sup>4</sup>	N= 06/06	N= 06/06	N= 06/06
DPN 22				
Machos	47,8 ± 2,8	48,0 ± 4,4	46,8 ± 2,9	45,0 ± 6,6
Fêmeas	50,1 ± 3,8	50,2 ± 4,40	51,0 ± 4,5	50,9 ± 3,9
DPN 60				
Machos	316,8 ± 21,8	321,3 ± 20,8	313,8 ± 11,5	314,8 ± 10,25
Fêmeas	204,9 ± 12,7	213,0 ± 14,8	210,4 ± 18,4	208,5 ± 16,3
DPN 120				
Machos	426,1 ± 24,7	432,7 ± 37,9	428,8 ± 24,6	481,3 ± 35,4
Fêmeas	272,4 ± 20,1	272,0 ± 14,08	279,8 ± 21,1	277,0 ± 25,3

<sup>1</sup>Valores expressos em média ± SD.; <sup>2</sup> Grupos experimentais [Grupo 1: Controle (veículo: óleo de milho); Grupo 2: que recebeu 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo 3: que recebeu 200 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo 4: que recebeu 200 mg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho]. <sup>3</sup> DG= Dia gestacional, DPN= Dia pós-natal. <sup>4</sup>Número de machos/fêmeas, 1 animal por ninhada.

### **Análise Morfométrica da Tireoide**

As análises morfométricas da tireoide foram realizadas em lâminas coradas pela H&E (i.e., medidas de tamanho folicular e altura dos tireócitos, figuras 4 e 5) e em lâminas coradas pelo picrossirius red (i.e., área relativa dos componentes estromais, epitélio e lúmen folicular, figuras 6 e 7) em machos e nas fêmeas F1 nos DPNs 21 e 120 (Tabelas 2 e 3).

Na análise da tireoide no DPN 21 foi observado redução significativa ( $p = 0,042$ ) da altura da célula folicular nas fêmeas do grupo Pht 200 $\mu$ g quando comparado com o grupo controle (veículo). Nas análises de área folicular e do volume relativo dos compartimentos epitelial, estromal e luminal não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais de machos e fêmeas F1 (Tabela 2). Na análise do DPN 120 foi observado aumento no volume relativo de compartimento estromal nas fêmeas do grupo 20  $\mu$ g em relação ao grupo controle (veículo). Para os demais parâmetros analisados não foram observadas alterações significativas entre os grupos experimentais de machos e fêmeas F1 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 2 - Análise morfométrica da tireoide de machos e fêmeas no dia pós-natal (DPN) 21 cujas mães foram expostas ou não (veículo) a uma mistura de ftalatos (Pht) durante a gestação e lactação<sup>(1)</sup>

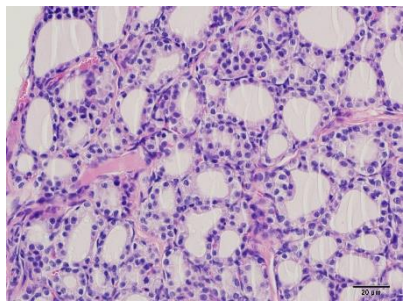
Grupo	Número de tireoides <sup>2</sup>	Área folicular (µm <sup>2</sup> )	Altura da célula folicular (µm)	Volume relativo dos compartimentos		
				Epitélio (%)	Estroma (%)	Lúmen (%)
<b>Machos F1</b>						
Controle	7	684,27 ± 92,30	3,96 ± 0,27	42,54 ± 7,03	24,12 ± 6,12	33,33 ± 4,34
Pht 20 µg	7	776,04 ± 80,26	4,30 ± 0,39	40,40 ± 4,92	25,74 ± 5,23	33,85 ± 2,45
Pht 200 µg	9	799,85 ± 143,51	4,23 ± 0,21	43,26 ± 7,56	26,31 ± 4,17	30,42 ± 6,82
Pht 200 mg	9	881,86 ± 295,94	4,59 ± 0,39	45,80 ± 13,78	25,53 ± 8,09	28,65 ± 7,39
<i>p-value</i>		0,229	0,006	0,657	0,892	0,191
<b>Fêmeas F1</b>						
Controle	4	796,52(680,86:878,01)	4,24(4,03:4,45)	48,79 ± 4,97	19,24 ± 3,27	32,17(30,24:33,68)
Pht 20 µg	3	843,77(735,76:861,65)	4,49(4,03:5,01)	47,90 ± 7,48	25,69 ± 2,42	28,60(23,84:30,60)
Pht 200 µg	4	741,93(691,01:802,415)	4,32(4,20:4,36)	42,19 ± 3,92	27,11 ± 4,57	30,87(29,53:31,74)
Pht 200 mg	7	927,17(767,46:1052,35)	4,69(4,16:5,44)	41,18 ± 8,43	24,88 ± 4,16	32,68(29,31:40,68)
<i>p-value</i>		0,428	0,503	0,222	0,042	0,250

<sup>1</sup> Valores expressos em média ± SD ou mediana com os quartis inferior e superior.; Pht= phthalates <sup>2</sup> Grupos experimentais [Grupo 1: Controle (veículo: óleo de milho)- mães receberam óleo de milho (5ml/kg); Grupo Pht 20 µg: mães receberam 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo Pht 200 µg 3: mães receberam 200 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo Pht 200 mg: mães receberam 200 mg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho)]. <sup>2</sup>Número de machos/fêmeas, 1 animal por ninhada.

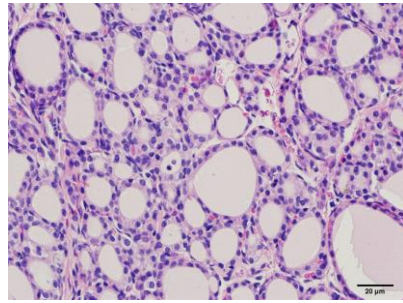
Tabela 3 - Análise morfométrica da tireoide de machos e fêmeas no dia pós-natal (DPN) 120 cujas mães foram expostas ou não (veículo) a uma mistura de ftalatos (Pht) durante a gestação e lactação<sup>(1)</sup>

Grupo	Número de Tiroides <sup>2</sup>	Área folicular ( $\mu\text{m}^2$ )	Altura da célula folicular ( $\mu\text{m}$ )	Volume relativo dos compartimentos		
				Epitélio (%)	Estroma (%)	Lúmen (%)
<b>Machos F1</b>						
Controle	5	936,01±156,65	6,49(6,24:6,64)	42,54 ± 7,03	24,12 ± 6,12	33,33±4,35
Pht 20 $\mu\text{g}$	7	947,89±196,04	6,79(5,89:7,28)	40,40 ± 4,92	25,74 ± 5,23	33,85±2,46
Pht 200 $\mu\text{g}$	7	993,301±260,08	6,451(6,23:7,07)	43,26 ± 7,56	26,31 ± 4,17	30,42±6,82
Pht 200 mg	7	977,739±348,65	5,448(4,87:6,34)	45,80 ± 13,79	25,54 ± 8,10	28,65±7,40
<i>p-value</i>		0,978	0,462	0,657	0,89	0,191
<b>Fêmeas F1</b>						
Controle	3	928,38 ± 173,07	5,65 [5,24:6,01]	48,79 ± 4,98	19,25 ± 3,72	32,17 ± 4,35
Pht 20 $\mu\text{g}$	4	1095,78 ± 96,81	5,99 [5,56:6,18]	47,91 ± 7,48	25,70 ± 2,43	28,60 ± 2,46
Pht 200 $\mu\text{g}$	8	854,54 ± 169,48	5,52 [4,96:5,94]	42,19 ± 3,93	27,11 ± 4,58	30,87 ± 6,82
Pht 200 mg	5	971,72 ± 157,59	5,35 (4,57:5,53)	41,18 ± 8,44	24,88 ± 4,17	32,68 ± 7,40
<i>p-value</i>		0,127	0,324	0,222	0,042	0,25

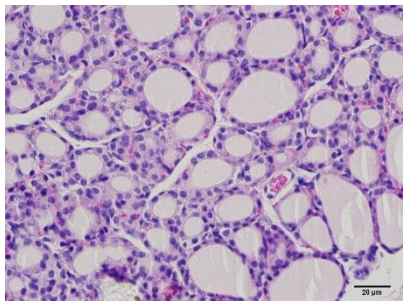
<sup>1</sup>Valores expressos em média ± SD ou mediana com os quartis inferior e superior; <sup>2</sup> Grupos experimentais [Grupo 1: Controle (veículo: óleo de milho)- mães receberam óleo de milho (5ml/kg); Pth= phthalates, Grupo Pht 20  $\mu\text{g}$ : mães receberam 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo Pht 200  $\mu\text{g}$  3: mães receberam 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo Pht 200 mg: mães receberam 200 mg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho)]. <sup>2</sup>Número de machos/fêmeas, 1 animal por ninhada.



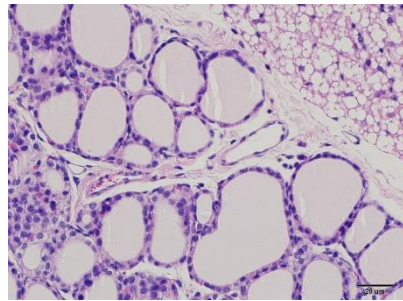
Controle



Pht 20µg

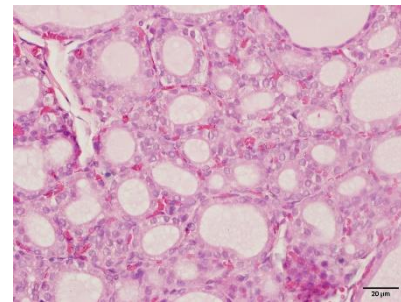


Pht 200µg

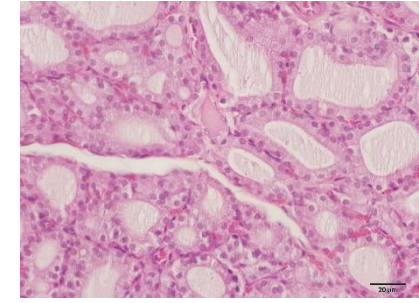


Pht 200mg

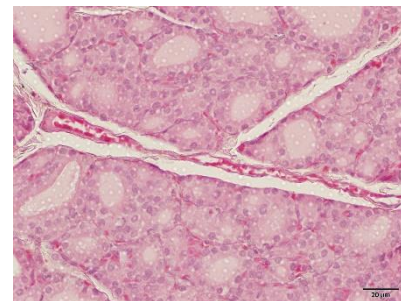
Figura 4 - Lâminas histológicas de tireoide coradas em HE – DPN22 dias (Machos, barra = 20 µm). Houve redução na altura de célula folicular no grupo 4 (200mg).



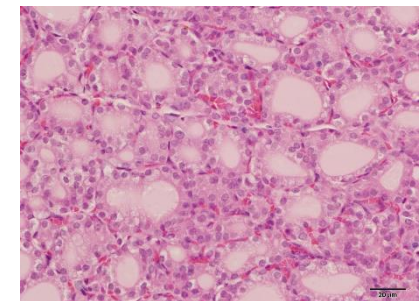
Controle



Pht 20µg

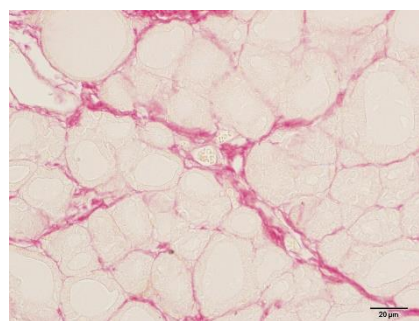


Pht 200µg

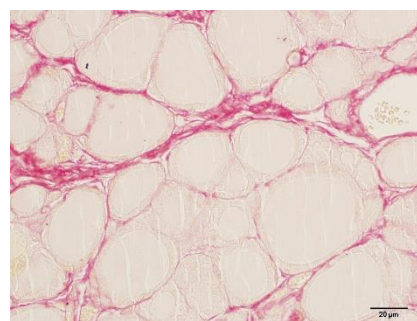


Pht 200mg

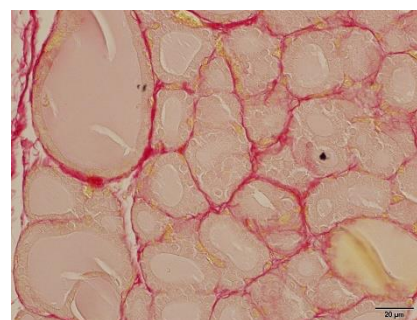
Figura 5 - Lâminas histológicas de tireoide coradas em HE – DPN 120 dias (Machos, barra = 20 µm). Não houve alteração entre os grupos.



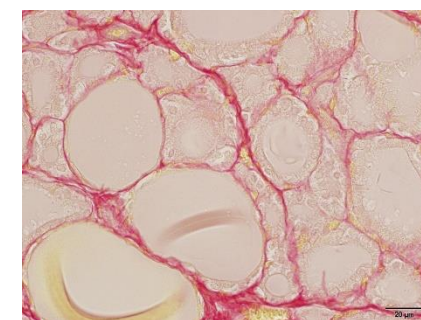
Controle



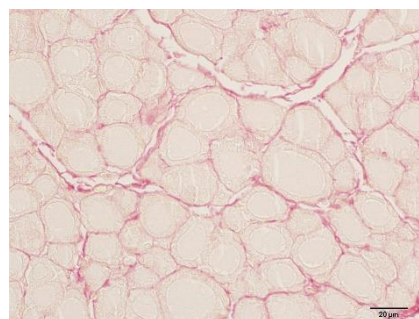
Pht 20µg



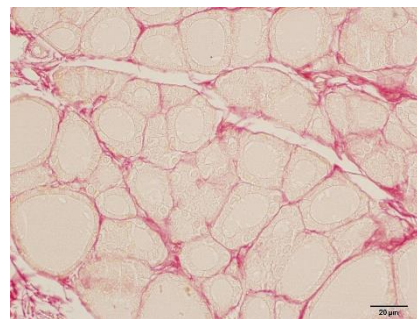
Controle



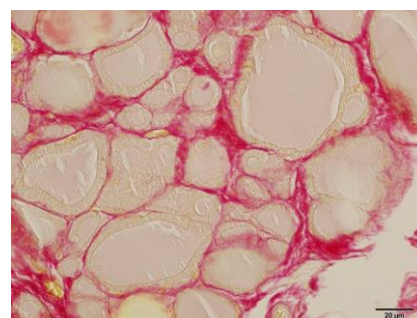
Pht 20µg



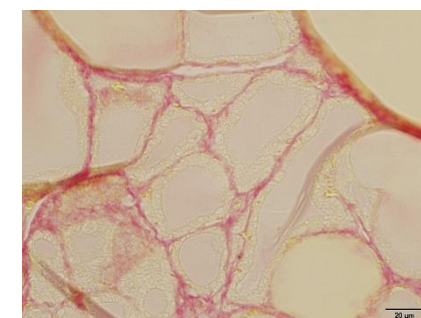
Pht 200µg



Pht 200mg



Pht 200µg



Pht 200mg

Figura 6 - Lâminas histológicas de tireoide coradas com Picrossirius – DPN 22 (Machos, barra = 20 µm). Não houve alterações entre os grupos.

Figura 7 - Lâminas histológicas de tireoide coradas com Picrossirius – DPN 120 (Fêmeas, barra = 20 µm). Houve aumento do volume relativo de estroma no grupo Pht 200 µg.

### **Análise de Imunohistoquímica**

As análises de imunohistoquímicas foram realizadas na tireoide na prole de machos e fêmeas nos DPN 22 e 120, com o uso da marcação para o PCNA, selecionando os núcleos fortemente corados caracterizados como em fase S do ciclo celular, para a determinação dos índices de marcação (IM%) de proliferação celular. Os dados indicam que houve redução significativa ( $p = 0,037$  e  $p=0,048$ ) dos níveis de proliferação celular nas células foliculares de machos e fêmeas do grupo Pht 200 $\mu$ g em relação aos grupos controle e Pht 20 $\mu$ g no DPN22. Não houve diferença significativa nos níveis de proliferação celular de células foliculares entre os grupos no DPN 120.

Tabela 4 – Índice de marcação (IM%) de células foliculares pelo anticorpo PCNA<sup>(1)</sup>

Grupo	Número de Tiroides <sup>2</sup>	PCNA IM%	Grupo	Número de Tiroides <sup>2</sup>	PCNA IM %
DPN22			DPN120		
Machos F1			Machos F1		
Controle	8	15,923 ± 9,064	Controle	5	8,424 [3,797:12,899]
Pht 20 µg	7	20,009 ± 9,196	Pht 20 µg	7	3,203[1,774:4,788]
Pht 200 µg	8	8,845 ± 5,004*	Pht 200 µg	7	4,955[3,746:6,535]
Pht 200 mg	8	11,969 ± 5,320	Pht 200 mg	7	5,717[3,792:13,802]
<i>p-value</i>		0,037	<i>p-value</i>		0,081
Fêmeas F1			Fêmeas F1		
Controle	3	25,559 ± 9,556	Controle	3	2,888 ± 1,100
Pht 20 µg	3	12,780 ± 8,670	Pht 20 µg	4	6,457 ± 4,054
Pht 200 µg	5	8,029 ± 3,889*	Pht 200 µg	8	6,153 ± 2,222
Pht 200 mg	5	12,639 ± 8,231	Pht 200 mg	5	5,968 ± 3,829
<i>p-value</i>		0,048	<i>p-value</i>		0,127

<sup>1</sup>Valores expressos em média ± SD ou mediana com os quartis inferior e superior; <sup>2</sup> Grupos experimentais [Grupo 1: Controle (veículo: óleo de milho)- mães receberam óleo de milho (5ml/kg); Grupo Pht 20 µg: mães receberam 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo Pht 200 µg 3: mães receberam 200 µg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho; Grupo Pht 200 mg: mães receberam 200 mg/kg/dia da mistura de ftalatos diluídos em óleo de milho)]. <sup>2</sup>Número de machos/fêmeas, 1 animal por ninhada. \* Diferença em relação aos grupos Controle e Pht 20 µg

## Análise de TSH

A análise do hormônio tireoestimulante (TSH) foi realizada apenas em machos, devido a problemas técnicos de amostras séricas. Empregou-se a técnica de ELISA, sendo estas análises realizadas pelo laboratório da Dra. Dra. Jodi A. Flaws, nos EUA. Os dados indicam que houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de TSH, nos grupos 2 (Pht 20  $\mu$ g) e no grupo 4 (Pht 200 mg) em relação ao grupo controle no DPN 22. Não houve diferença significativa dos níveis séricos de TSH entre os grupos no DPN 120.

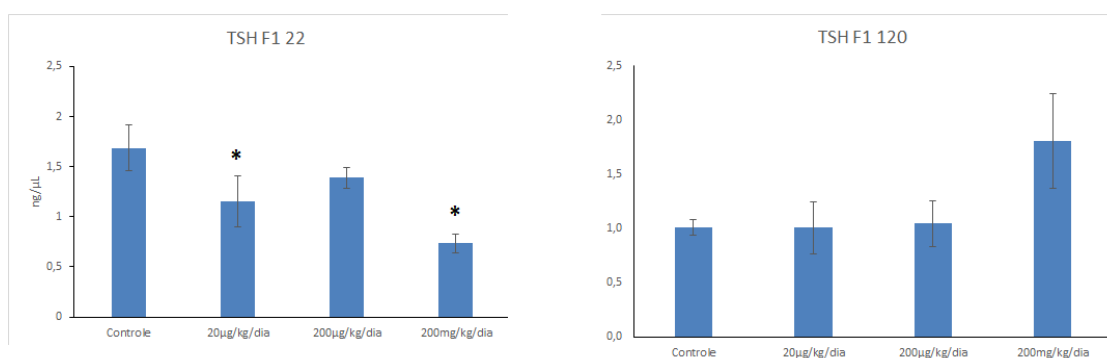


Figura 6 - Quantificação de TSH em machos

## Discussão

Este trabalho teve o intuito de analisar os efeitos adversos de uma mistura de ftalatos, em doses que partiram de níveis detectados na urina de mulheres grávidas de Illinois (Zhou & Flaws, 2017), ou seja, em doses ambientalmente relevantes e administradas a ratas Sprague Dawley, durante a gestação e lactação, buscando caracterizar as repercussões sobre a morfologia e função da tireoide na prole de machos e fêmeas F1 nas fases pré-pubere (DPN 22) e adulta (DPN 120).

Com a análise histopatológica, foi possível verificar que os ftalatos, em dose mais próxima à da real exposição humana, levaram ao aumento de altura epitelial no DPN 22 grupo no fêmea Pht 200µg. Tal alteração é ligada ao aumento da atividade tireoidiana (Stebbins et al., 1973) algo que foi relatado também por Tassinari et al., 2020 . No DPN 120, observou-se aumento no volume relativo de compartimento estromal nas fêmeas do grupo 20ug. Tal elevação também foi observada na literatura (Barlas, 2020), sendo relatada como possível marcador de lesão tecidual (Mai et al., 2016).

É importante notar que a análise de parâmetros histomorfométricos não seguiu um efeito dose-resposta clara, seguindo o que se verifica na literatura em diferentes resultados. Tassinari et al, 2021, verificaram alterações sexo-específicas na tiróide, com aumento significativo de áres de folículos, colóides e no número de células foliculares nos grupos macho DEHP 9 e 48 mg/kg/dia, sem alterações no grupo DEHP 9 mg/kg/dia. Barlas e colaboradores em 2020 relataram aumento no volume de tecido conjuntivo no grupo de 100 mg/kg/dia, algo que não foi visto nos grupos de 20 e 500 mg/kg/dia.

Nosso experimento verificou uma redução da proliferação celular, medida através da marcação pelo anticorpo PCNA, em machos e fêmeas nos grupos de 200 µg no DPN 22. Na literatura, estudos como o de Kim S e colaboradores (2019) demonstram a possibilidade de aumento de proliferação celular, bem como distúrbios na produção de proteínas relacionadas ao ciclo celular, em especial nos grupos tratados com doses mais elevadas. Kim M e colaboradores (2018) verificaram aumento na proliferação demonstrada pelo anticorpo Ki-67, também em doses elevadas, de DEHP. Apesar de termos verificado uma redução em apenas alguns grupos, há tendência de elevação não significativamente estatística nos grupos Pht 200 µg e 200mg, machos e fêmeas, no DPN 120, indicando a possibilidade de que novos experimentos possam elucidar melhor a influência da mistura utilizada na proliferação e no ciclo celular.

Observou-se também uma alteração não dose dependente dos níveis de TSH, tanto no DPN 22 como no DPN 120 para machos, não dose dependente. Os hormônios tireoidianos são fundamentais para a formação dos órgãos do corpo humano e para o desenvolvimento do cérebro, sendo que a deficiência severa desses hormônios, nas fases iniciais do desenvolvimento, leva ao cretinismo caracterizado pela baixa estatura e retardo mental (Contempre et al., 1991; Bernal, 1995). A tireoide é a primeira glândula endócrina a se formar no corpo humano, sendo que o feto começa a sintetizar e secretar os hormônios tireoidianos na 12<sup>a</sup> semana do desenvolvimento, mas não alcança os níveis necessários para as necessidades do desenvolvimento do sistema nervoso do embrião/feto (SN) (Kratzsch & Pulzer, 2008). Assim, para completar as necessidades dos hormônios tireoideanos dos órgãos, em especial do SN, fontes maternas desses hormônios são necessárias viabilizado pelo através do transporte placentário até o parto do concepto (Patel et al., 2011). Existem relatos de que os ftalatos podem interferir com o transporte de hormônios tireoideanos maternos através da placenta (Yu et al., 2018; Du et al., 2020).

Relatos indicam que os ftalatos tem potencial para alterar a função tireoidiana e a homeostase dos seus hormônios na mulher grávida e no feto (Mallozzi et al., 2016). Em um estudo de corte “Ma’anshan Birth Cohort study”, os níveis urinários maternos de DEHP e dos metabólitos MEHP e MEHHP, no início da gravidez (5<sup>a</sup>-14<sup>a</sup> semana), apresentaram correlação negativa com as concentrações de T4 total e livre e uma correlação positiva com o TSH do soro materno (Yao et al., 2016).

Também em 2020, Baralic e colaboradores estudaram o sinergismo de DEHP, DBP e BPA. Com tempo de tratamento e dosagem semelhante ao trabalho de Zhang e colaboradores (2020) em ratos Wistar com exposição em quatro estratégias: DEHP (50 mg/kg/dia) ; DBP (50 mg/kg/dia); BPA (25 mg/kg/dia) e MIX (DEHP 50 mg + DBP 50 mg + BPA 25mg/kg/dia), por 28 dias. Houve redução de T4 em DBP e BPA e aumento no grupo MIX. Uma redução de peso corpóreo foi observada em todos os grupos, menos no DEHP. Alterações no peso relativo de fígado em DEHP e MIX, com redução em DBP e BPA em relação ao MIX e aumento do peso do rim no grupo MIX foram observadas. Os autores concluíram que o estudo aprofunda a necessidade de estudos da ação da mistura de ftalatos para caracterizar melhor o efeito de desregulação endócrina dessas substâncias.

Analisando-se artigos anteriores, pode-se desprender que a maioria dos experimentos foi realizada com uso de substâncias isoladas, em doses consideravelmente altas, ou com uma mistura de doses um pouco elaborado de DEs. Em nosso trabalho, realizamos experimentos com níveis de substâncias em doses consideravelmente mais baixas, a fim de aproximar ao máximo os níveis reais de exposição humana, mas as alterações morfológicas da tireoide da descendência foram sutis, em relação aos achados da literatura, em geral de ftalatos isolados e em doses altas.

Dentre os grupos analisados, foram encontradas duas alterações nos parâmetros histomorfológicos: no DPN 22, observou-se um aumento da altura do epitélio folicular no grupo fêmea Pht 200µg. Tal alteração, também foi relatada por (Tassinari et al., 2020) o que pode sugerir um sutil aumento da atividade tireoidiana (Stebbins et al., 1973). No DPN 120, observou-se aumento no volume relativo de compartimento estromal nas fêmeas do grupo 20ug. Tal elevação também foi observada na literatura (Barlas, 2020), sendo relatada como possível marcador de lesão tecidual (Mai et al., 2016).

É importante notar que a análise de parâmetros histomorfométricos e imunohistoquímicos, em sintonia com o que se encontra na literatura, especialmente em doses mais próximas às da exposição humana real, não seguiu um efeito dose-resposta clara (hormesis), assim, demonstrando a necessidade de aprofundamento de estudos para melhor elucidação da influência das misturas de ftalatos na saúde humana, em especial quanto ao desenvolvimento e função da tireoide.

## Conclusão

Os resultados obtidos permitem predizer que as doses de exposição materna utilizadas neste estudo, bem mais próximas das encontradas na exposição humana, também são capazes de causar algumas alterações na glândula tireoidiana, porém em menor intensidade que as doses mais altas encontradas na literatura.

## Referências

Baralić K, Živančević K, Javorac D, Djordjevic AB, Anđelković M, Jorgovanović D, Miljaković EA, Čurčić M, Bulat Z, Antonijević B. 2020. Multi-strain probiotic ameliorated toxic effects of phthalates and bisphenol A mixture in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*. 143:111540.

Barlas N, Göktekin E, Karabulut G. 2020. Influence of in utero di-n-hexyl phthalate and di-cyclohexyl phthalate exposure on the endocrine glands and T3, T4, and TSH hormone levels of male and female rats: Postnatal outcomes. *Toxicology and Industrial Health*. 36(6):399–416.

Bernal J, Nunez J. 1995. Thyroid hormones and brain development. *European journal of endocrinology*. 133(4):390–398.

Bošnjir J, Puntarić D, Škes I, Klarić M, Šimić S, Zorić I. 2003. Migration of phthalates from plastic products to model solutions. *Collegium antropologicum*. 27(1):23–30.

Calvo R, Obregón MJ, De Ona CR, Del Rey FE, De Escobar GM. 1990. Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3, 5, 3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *The Journal of clinical investigation*. 86(3):889–899.

Contempre B, JE D, Bebe NGO, CH T, AT D, Vanderpas J. 1991. Effect of selenium supplementation in hypothyroid subjects of an iodine and selenium deficient area: the possible danger of indiscriminate supplementation of iodine-deficient subjects with selenium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 73(1):213–215.

Du Z-P, Feng S, Li Y-L, Li R, Lv J, Ren W-Q, Feng Q-W, Liu P, Wang Q-N. 2020. Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits expression and internalization of transthyretin in human placental trophoblastic cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 394:114960.

Ferguson KK, Peterson KE, Lee JM, Mercado-García A, Blank-Goldenberg C, Téllez-Rojo MM, Meeker JD. 2014. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reproductive toxicology*. 47:70–76.

Fisher JS. 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*. 127(3):305–315.

Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson A-M. 2007. Metabolism of phthalates in humans. *Molecular nutrition & food research*. 51(7):899–911.

Hannon PR, Flaws JA. 2015. The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in endocrinology*. 6:8.

Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S, Calafat AM. 2007. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Human Reproduction*. 22(3):688–695.

Huang H-B, Pan W-H, Chang J-W, Chiang H-C, Guo YL, Jaakkola JJ, Huang P-C. 2017. Does exposure to phthalates influence thyroid function and growth hormone homeostasis? The Taiwan Environmental Survey for Toxicants (TEST) 2013. *Environmental research*. 153:63–72.

Jenkins S, Betancourt AM, Wang J, Lamartiniere CA. 2012. Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 129(3–5):191–200.

Kay VR, Bloom MS, Foster WG. 2014. Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in males. *Critical reviews in toxicology*. 44(6):467–498.

Kester MH, Martinez de Mena R, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, Hume R, Morreale de Escobar G. 2004. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(7):3117–3128.

Kim S, Park G-Y, Yoo YJ, Jeong JS, Nam KT, Jee S-H, Lim K-M, Lee Y-S. 2019. Di-2-ethylhexylphthalate promotes thyroid cell proliferation and DNA damage through activating thyrotropin-receptor-mediated pathways in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 124:265–272.

Kim M, Jeong JS, Kim H, Hwang S, Park I-H, Lee B-C, Yoon SI, Jee SH, Nam KT, Lim K-M. 2018. Low dose exposure to di-2-ethylhexylphthalate in juvenile rats alters the expression of genes related with thyroid hormone regulation. *Biomolecules & therapeutics*. 26(5):512.

Kratzsch J, Pulzer F. 2008. Thyroid gland development and defects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 22(1):57–75.

Mai KT, Hogan K. 2016. Stromal tissue as an adjunct tool in the diagnosis of follicular thyroid lesions by fine-needle aspiration biopsy. *CytoJournal*. 13.

Mallozzi M, Bordi G, Garo C, Caserta D. 2016. The effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on fetal and neonatal development: A review on the major concerns. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 108(3):224–242.

Meeker JD, Ferguson KK. 2014. Urinary phthalate metabolites are associated with decreased serum testosterone in men, women, and children from NHANES 2011–2012. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 99(11):4346–4352. OECD C. 2010. Guidance document on the assessment of chemicals for endocrine disruption. Version. 9:335.

Patel J, Landers K, Li H, Mortimer RH, Richard K. 2011. Thyroid hormones and fetal neurological development. *Journal of Endocrinology*. 209(1):1.

Porterfield SP, Hendrich CE. 1993. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development—current perspectives. *Endocrine reviews*. 14(1):94–106.

Scarano WR, Bedrat A, Alonso-Costa LG, Aquino AM, Fantinatti BE, Justulin LA, Barbisan LF, Freire PP, Flaws JA, Lemos B. 2019. Exposure to an environmentally

relevant phthalate mixture during prostate development induces microRNA upregulation and transcriptome modulation in rats. *Toxicological Sciences*. 171(1):84–97.

Scsukova S, Rollerova E, Mlynarcikova AB. 2016. Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. *Reproductive biology*. 16(4):243–254.

Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. 2017. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 51:56–70.

Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RHN, Redmon JB. 2015. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Human reproduction*. 30(4):963–972.

Stebbins RC, Tong W. 1973. Epithelial cell height as a measure of thyroid activity in free-living western fence lizards, *Sceloporus occidentalis*. *Copeia*.:668–672.

Tassinari R, Narciso L, Tait S, Busani L, Martinelli A, Di Virgilio A, Carli F, Deodati A, La Rocca C, Maranghi F. 2020. Juvenile toxicity rodent model to study toxicological effects of Bisphenol A (BPA) at dose levels derived from Italian children biomonitoring study. *Toxicological Sciences*. 173(2):387–401.

Tassinari R, Tait S, Busani L, Martinelli A, Narciso L, Valeri M, Gastaldelli A, Deodati A, La Rocca C, Maranghi F. 2021. Metabolic, reproductive and thyroid effects of bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) orally administered to male and female juvenile rats at dose levels derived from children biomonitoring study. *Toxicology*. 449:152653.

Watkins DJ, Téllez-Rojo MM, Ferguson KK, Lee JM, Solano-Gonzalez M, Blank-Goldenberg C, Peterson KE, Meeker JD. 2014. In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation. *Environmental research*. 134:233–241.

Welsh M, Saunders PT, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, Sharpe RM. 2008. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *The Journal of clinical investigation*. 118(4):1479–1490.

Yao H, Han Y, Gao H, Huang K, Ge X, Xu Yuan-yuan, Xu Ye-qing, Jin Z, Sheng J, Yan S. 2016. Maternal phthalate exposure during the first trimester and serum thyroid hormones in pregnant women and their newborns. *Chemosphere*. 157:42–48.

Yu Z, Han Y, Shen R, Huang K, Xu Y, Wang Q, Zhou S, Xu D, Tao F. 2018. Gestational di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure causes fetal intrauterine growth restriction through disturbing placental thyroid hormone receptor signaling. *Toxicology letters*. 294:1–10.

Zhang X, Zhao Y, Cheng C, Li L, Xiao M, Zhang G, Lu X. 2020. Combined effects of di (2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol A on thyroid hormone homeostasis in adolescent female rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 27(32):40882–40892.

Zhou C, Flaws JA. 2017. Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured mouse antral follicles. *Toxicological Sciences*. 156(1):217–229.

Zhou Z, Zhang J, Jiang F, Xie Y, Zhang X, Jiang L. 2017. Higher urinary bisphenol A concentration and excessive iodine intake are associated with nodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *Bioscience reports*. 37(4):BSR20170678.

**ANEXO – Comprovante da CEUA**

## CERTIFICADO Nº 1303/2019 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Exposição materna a mistura de flutatos: efeitos sobre desenvolvimento e função da tireoide na prole de machos e fêmeas Sprague-Dawley."**, conduzido pelo Pesquisador: **Leandro Alves dos Santos** – Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, registrada com o nº **1303/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião extraordinária de 07 de agosto de 2019.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	28 de fevereiro de 2023
<b>Espécie/Linhagem/Raça</b>	Sprague-Dawley
<b>Nº de animais</b>	65
<b>Idade/Peso</b>	Adultos – 200 gr
<b>Sexo</b>	Machos e Fêmeas
<b>Origem</b>	CEMIB UNICAMP



Sara Rosa Stanley Sampaio  
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Profa. Associada Bertha Furlan Polegato  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP