

## EFEITOS DO PERCLORATO DE SÓDIO (NaClO<sub>4</sub>) NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS MACHOS WISTAR EXPOSTOS *IN UTERO* E DURANTE A LACTAÇÃO

Felipe Hermano Teixeira<sup>1</sup>, Kely Cristina Neves dos Santos<sup>2</sup>, Júlia Regina de Almeida Reis<sup>3</sup>, Lavínia Ferreira de Lima<sup>4</sup>, Luciane Candeloro Portugal<sup>5</sup>, Andréa Luiza Cunha-Laura<sup>6</sup>, Raquel Fantin Domeniconi<sup>7</sup>, Arielle Cristina Arena<sup>8</sup>, Marciana Sanabria<sup>9</sup>

1. Aluno do Curso de Medicina Veterinária da FAMEZ/UFMS. Bolsista PIBIC.
2. Aluna da Pós-Graduação em Biologia Animal do INBIO/UFMS.
3. Aluna do Curso de Medicina Veterinária da FAMEZ/UFMS.
4. Aluna do Curso de Ciências Biológicas do INBIO/UFMS.
5. Professora Associada do INBIO/UFMS.
6. Professora Associada do INBIO/UFMS.
7. Professora Assistente Doutor do INBIO /UNESP.
8. Professora Assistente Doutor do INBIO /UNESP.
9. Professora Adjunta A do INBIO /UNESP.

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição *in utero* e lactacional ao NaClO<sub>4</sub> sobre o trato genital da prole masculina de ratos Wistar. Ratas prenhes foram tratadas com NaClO<sub>4</sub> em doses de 10 e 100mg/Kg/dia e o grupo controle com água destilada, via oral (gavage), do dia gestacional 12 até o final da lactação. As doses foram escolhidas com base na LOAEL – 0,2mg/Kg e com base em estudos prévios da literatura e na estimativa do consumo de perclorato através da ingestão de água potável. Os resultados provenientes do trabalho mostram a diminuição significativa do peso corpóreo em ratos expostos à 10mg/Kg/dia e a diminuição significativa no peso absoluto da próstata, nas espermátides maduras no testículo e na Produção Diária de Espermatozoides Relativa na maior dose. De acordo com os resultados obtidos, a exposição *in utero* e lactacional ao NaClO<sub>4</sub> é tóxica ao sistema genital masculino, capaz de comprometer parâmetros espermáticos e órgãos andrógenos dependentes.

**Autorização legal:** 829/2016

**Palavras-chave:** desregulador endócrino, fertilidade, espermatozoide

**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Bolsa PIBIC.

### Introdução

A exposição a diversas substâncias químicas pode contribuir para o surgimento de distúrbios em várias estruturas e funções envolvidas na reprodução de seres humanos e de outras espécies de animais (Neubert, 2002). Em estudos sobre a função reprodutiva masculina, o perclorato em diversos grupos de vertebrados, mostrou-se capaz promover hiperplasia dos testículos comprometendo a espermatogênese (Swapna et al., 2006).

O perclorato (ClO<sub>4</sub>) é um desregulador endócrino (DE) comumente utilizado durante a fabricação de combustível de foguetes, fogos de artifício, sistemas de airbags, fertilizantes e herbicidas (Leung et al., 2014). Este contaminante ambiental é estável, hidrofílico e frequentemente detectado no solo, água, vegetais e produtos lácteos (Brent, 2014). É um produto químico amplamente distribuído no ambiente e vêm causando grandes preocupações de saúde pública devido a exposição generalizada através da ingestão de água e alimentos contaminados (McLanahan et al., 2009).

A principal via de exposição humana ao perclorato é através do consumo de água e alimentos contaminados (Furin et al., 2013; Furin et al., 2015) e pode ser transferido para organismos em desenvolvimento pela via placentária e durante a lactação (Télez Télez et al., 2005; Valentín-Blasini et al., 2011; Evans et al., in press). Tem sido evidenciado que a exposição ao perclorato promove disfunções na tireoide, interferindo na absorção de iodo proveniente da alimentação, através da inibição da glicoproteína transmembrânica denominada simportador sódio/iodeto, que transporta iodeto para o interior do tireócito em um processo de cotransporte (McLanahan et al., 2009; Pinto et al., 2010). Os hormônios da tireoide, tiroxina (T<sub>4</sub>) e triiodotironina (T<sub>3</sub>), desempenham um papel vital na regulação do desenvolvimento, crescimento, metabolismo e reprodução em vertebrados (McLanahan et al., 2009).

O objetivo do presente estudo é analisar o peso dos órgãos do sistema genital masculino e a contagem de espermátides maduras no testículo da prole masculina exposta à baixas doses de NaClO<sub>4</sub> durante a prenhez e lactação.

### Metodologia

Ratos adultos (80 dias de idade, pesando aproximadamente 450g) e fêmeas adultas (60 dias de idade,

pesando aproximadamente 200g) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UFMS de Campo Grande, foram mantidos no Laboratório de Bioensaios do Instituto de Biologia (INBIO) da UFMS de Campo Grande, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura média de 23°C. Os animais receberam água destilada e ração para roedores à vontade. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (CEUA nº829/2016). As fêmeas prenhes, previamente pesadas e distribuídas aleatoriamente, foram alocadas em três grupos experimentais: controle e tratados (10 e 100mg/Kg/dia de NaClO<sub>4</sub>– (CAS 7601-89-0 - Sigma®), compostos por 10 ratas cada um. Essas doses foram escolhidas com base na LOAEL – 0,2mg/kg e com base em estudos prévios na literatura e na estimativa do consumo de perclorato através da ingestão de água potável (York et al., 2003).

A partir dos 80 dias de idade, os filhotes machos (dois por ninhada) foram eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub> seguida por decapitação. Testículo (cálculo da produção diária de espermatozoides [PDE]) e epidídimo (análise histológica) de cada rato foram retirados e pesados em balança analítica de precisão, sendo posteriormente congelados a –20°C para posterior determinação do número de células germinativas. O canal deferente direito, a próstata ventral e a glândula seminal (cheia e vazia, sem a glândula coaguladora) foram pesados e descartados.

Para comparação dos dados obtidos, foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05.

### Resultados e Discussão

Através da pesagem corporal final dos ratos Wistar ao compararmos o grupo 10mg/Kg/dia com o controle, podemos observar o comprometimento do crescimento dos animais devido ao desregulador endócrino. Outra diferença significativa observada no experimento foi a diminuição significativa do peso absoluto da próstata do grupo 100mg/Kg/dia em comparação ao grupo controle (Tabela 1). De acordo com Brent (2014) isso pode ser devido ao fato do perclorato de sódio diminuir os níveis de testosterona no organismo e o órgão em questão ser andrógeno dependente.

Tabela 1: Peso corpóreo e dos órgãos do sistema genital masculino de ratos Wistar

PARÂMETROS	CONTROLE (N = 7)	10mg/Kg/dia/NaClO <sub>4</sub> (N = 8)	100mg/Kg/dia/NaClO <sub>4</sub> (N = 7)
Peso corporal final (g)	363,3 ± 9,49	*322 ± 28,71	368,6 ± 23,57
Peso absoluto do testículo (g)	1,59 ± 0,14	1,51 ± 0,09	1,61 ± 0,08
Peso absoluto do epidídimo (mg)	517,1 ± 55,89	530 ± 72,7	524,3 ± 58,84
Peso absoluto da próstata (mg)	430 ± 68,56	365,7 ± 45,41	*294 ± 49,8
Peso absoluto do canal deferente (mg)	100 ± 15,28	95,71 ± 19,88	88,33 ± 11,69
Peso absoluto da vesícula seminal cheia (mg)	1136 ± 146,2	1186 ± 134,5	1117 ± 119,4

Valores expressos em média±EPM. Teste análise de variância (ANOVA) com “a posteriori” de Tukey. \*p≤0,05.

Na análise da contagem de espermátides maduras presentes no testículo e a PDEr houve uma diminuição significativa do grupo de 100mg/Kg/NaClO<sub>4</sub> em relação ao grupo controle (Tabela 2). De acordo com Zhang et al. (2016), que trabalhou com o desregulador endócrino sílica na concentração de 2,0mg/Kg em camundongos, as alterações espermáticas testiculares podem ocorrer devido a inibição da expressão de proteínas reguladoras do processo meiótico no tecido testicular e destruição de estruturas teciduais. Segundo Park & Bae (2012) a queda na PDEr pode ser secundária a órgãos reprodutivos, como evidenciado no presente estudo, em que houve a diminuição do peso relativo da próstata também na dose de 100mg/Kg/NaClO<sub>4</sub>, que é um órgão andrógeno dependente.

Tabela 2: Contagem espermáticas no testículo de ratos Wistar

PARÂMETROS	CONTROLE (N = 7)	10mg/Kg/dia/NaClO <sub>4</sub> (N = 7)	100mg/Kg/dia/NaClO <sub>4</sub> (N = 6)
Nº de espermátides maduras (x10 <sup>6</sup> /testículo)	187,4 ± 15,78	166,7 ± 18,3	167,2 ± 28,14
Nº de espermátides maduras (x10 <sup>6</sup> /g/testículo)	156,3 ± 15,38	157,6 ± 19,81	*129,5 ± 17,23
PDE	30,72 ± 2,587	27,32 ± 3	27,41 ± 4,614
PDEr	25,63 ± 2,522	25,83 ± 3,248	*21,24 ± 2,825

Valores expressos em média±EPM. Teste análise de variância (ANOVA) com “a posteriori” de Tukey. \*p≤0,05.

### Conclusões

Podemos concluir com os resultados obtidos que a exposição *in utero* e lactacional ao NaClO<sub>4</sub>, nessas condições experimentais, é tóxica ao sistema genital da prole masculina, capaz de comprometer parâmetros espermáticos e órgãos andrógenos dependentes. No entanto, outras análises de qualidade espermáticas precisam ser realizadas para elucidar melhor o efeito tóxico na prole quando adulta.

### Referências bibliográficas

- BRENT G.A. Perchlorate Exposure in Pregnancy and Cognitive Outcomes in Children: It's Not Your Mother's Thyroid. *Journal Clinical Endocrinology Metabolic*, v.99, p.4066 – 4068, 2014.
- EVANS K.A.; RICH D.Q.; WEINBERGER B.; VETRANO A.M.; VALENTIN-BLASINI L.; STRICKLAND P.O.; BLOUNT B.C. 2015. *Reprod Toxicol*; in press.
- FURIN C.G.; VON HIPPEL F.A.; HAGEDORN B.; O'HARA T.M.; 2013. Perchlorate trophic transfer increases tissue concentrations above ambient water exposure alone in a predatory fish. *J Toxicol Environ Health A*; 76: 1072–1084.
- FURIN C.G.; VON HIPPEL F.A.; POSTLETHWAIT J.H.; BUCK C.L.; WILLIAM A. CRESKO W.A.; O'HARA T.M. 2015. Developmental timing of sodium perchlorate exposure alters angiogenesis, thyroid follicle proliferation and sexual maturation in stickleback. *Gen Comparative Endocrinol*; 219: 24–35.
- MCLANAHAN E.D; ANDERSEN M.E.; CAMPBELL JR. J.L.; FISHER J.W. 2009. Competitive Inhibition of Thyroidal Uptake of Dietary Iodide by Perchlorate Does Not Describe Perturbations in Rat Serum Total T4 and TSH. *Environ Health Perspect*; 117(5): 731-738.
- NEUBERT, D. *Reproductive toxicology: The science today. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, v.22, p.159–174, 2002.
- PARK, H.-O., & BAE, J. Disturbed Relaxin Signaling Pathway and Testicular Dysfunction in Mouse Offspring upon Maternal Exposure to Simazine. *PLoS ONE*, v.7, p.1-13, 2012.
- SWAPNA, I., RAJASEKHAR M., SUPRIYA A., et al. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v.144, p.1-10, 2006.
- TÉLLEZ TÉLLEZ R.; MICHAUD CHACÓN P.; REYES ABARCA C.; et al. 2005. Longterm environmental exposure to perchlorate through drinking water and thyroid function during pregnancy and the neonatal period. *Thyroid*; 15:963–975.
- VALENTÍN-BLASINI L.; BLOUNT B.C.; OTERO-SANTOS S.; CAO Y.; BERNBAUM J.C.; WALTER J. ROGAN W.J. 2011. Perchlorate exposure and dose estimates in infants. *Environ Sci Technol*; 45(9): 4127–4132.
- YORK R.G., FUNK, K.A., GIRARD M., et al. Oral (Drinking Water) Developmental Toxicity Study of Ammonium Perchlorate in Sprague-Dawley Rats. *International Journal of Toxicology*, v.22, p.453-464, 2003.
- ZHANG Y., ZHANG S., KHANDEKAR N., et al. Reduced serum levels of oestradiol and brain derived neurotrophic factor in both diabetic women and HFD-feeding female mice. *Endocrine*, v.56, p.65-72, 2016.