

Érica Kássia Sousa Vidal

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A FTALATOS DURANTE A
GESTAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DO EIXO HIPOTÁLAMO-
HIPÓFISE-TIREOIDE DE SUA PROLE**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

São Paulo

2022

Érica Kássia Sousa Vidal

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A FALATOS DURANTE A
GESTAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DO EIXO HIPOTÁLAMO-
HIPÓFISE-TIREOIDE DE SUA PROLE**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Caroline Serrano do Nascimento

São Paulo

2022

Vidal, Érica Kássia Sousa

Impacto da exposição materna a ftalatos durante a gestação sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide de sua prole / Érica

Kássia Sousa Vidal. -- São Paulo, 2022.

xv; 73 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Impact of maternal exposure during pregnancy to phthalates on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of her offspring.*

1. Dietilexilftalato. 2. Gravidez. 3. Disruptores endócrinos. 4. Glândula tireoide.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Érica Kássia Sousa Vidal

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A FTALATOS DURANTE A
GESTAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-
TIREOIDE DE SUA PROLE**

Presidente da banca: Profa. Dra. Caroline Serrano do Nascimento

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Andréa Laurato Sertié

Profa. Dra. Gisele Giannocco

Dra. Maria Izabel Chiamolera

Membros suplentes:

Profa. Dra. Karina Griesi Oliveira

Prof. Dr. Leandro Miranda Alves

Aprovada em: 29/07/2022.

Dedicatória

Dedico este trabalho a primeira pessoa que acreditou que ele daria certo. Minha mãe, Marinês Gomes de Sousa.

Agradecimentos

À Deus, meu amigo fiel que permitiu realizar esse sonho. Me conduziu pelos caminhos certos e nunca me deixou desistir.

Aos meus pais, Marinês Gomes e Carlos Vidal por sempre acreditarem em mim e investirem em minha educação. Em especial, agradeço à minha mãe Marinês, que foi meu alicerce durante todos esses anos. Que muitas vezes abriu mão de seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Mesmo tão longe participou de cada minuto dessa jornada. Mãe, esse é o resultado das tuas orações.

À minha orientadora e mãe científica Dra. Caroline Serrano, por acreditar naquela menina que veio do interior do Pará e confiou a mim a responsabilidade de tocar esse projeto. Desde o início sempre com paciência, de forma leve e bem humorada me ensinou tanto durante a realização desse projeto. Seu grande incentivo me fez ultrapassar todos os obstáculos e realizar grandes conquistas. Não chegaria até aqui sem seu apoio. Você é minha inspiração como mulher, cientista, mãe e filha.

Ao Guilherme Henrique, que foi meu parceiro de bancada. Eu sempre um furacão de ansiedade e ele sempre calmo e paciente, como aprendi com você.

À equipe do Biotério do Einstein (CETEC), por estarem sempre disponíveis em me ajudar durante o período de tratamento dos meus animais.

À Cléia Costa, Marta Diniz e toda equipe IIEP pelo apoio técnico e convívio diário no laboratório.

Aos amigos que fiz no Einstein, por terem tornado o dia a dia no laboratório um lugar tão prazeroso. E que por muitas vezes, me deram o incentivo, o apoio ou o conselho que eu precisava.

A todos do LEMT – UNIFESP onde tive uma breve, mas agradável e rica convivência.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram este trabalho ser possível.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	x
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Visão geral do sistema endócrino.....	1
1.2 Glândula tireoide	3
1.2.1 Anatomia, histologia e função da glândula tireoide	3
1.2.2 Desenvolvimento embrionário da glândula tireoide	5
1.2.3 Biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos.....	7
1.2.4 Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.....	9
1.3 Desreguladores endócrinos.....	10
1.3.1 Desreguladores endócrinos e as origens desenvolvimentistas da saúde e da doença.....	13
1.3.2 Ftalatos.....	15
1.4 Objetivos.....	19
2 MÉTODOS	20
2.1 Animais, desenho experimental e tratamentos.....	20
2.2 Avaliação da expressão gênica	23
2.2.1 Extração de RNA total	23
2.2.2 Reação de transcrição reversa.....	23
2.2.3 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real	24
2.3 Avaliação da expressão proteica.....	24
2.3.1 Extração de proteínas totais	24
2.3.2 <i>Western blotting</i>	25
2.4 Dosagens séricas de hormônios	26
2.5 Análise estatística.....	26
3 RESULTADOS	27
3.1 Efeitos da exposição intrauterina ao ftalato di (2-etil hexil) ftalato nas fêmeas da geração F1	27
3.1.1 Resultados da prole fêmea ao final da gestação.....	27

3.1.1.1 Avaliação da expressão gênica na tireoide das fêmeas	27
3.1.1.2 Resumo dos resultados obtidos nas fêmeas da geração F1 ao final da gestação	29
3.1.2 Resultados obtidos durante a vida adulta.....	29
3.1.2.1 Avaliação da expressão gênica e proteica do hipotálamo das fêmeas	29
3.1.2.2 Avaliação da expressão gênica e proteica da hipófise das fêmeas.....	30
3.1.2.3 Avaliação da expressão de genes e proteínas envolvidos na biossíntese de hormônios tireoidianos na tireoide das fêmeas	31
3.1.2.4 Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide das fêmeas	32
3.1.2.5 Avaliação de alterações epigenéticas na tireoide das fêmeas	33
3.1.2.5.1 Modificações pós-traducionais em histonas das fêmeas.....	33
3.1.2.5.2 Avaliação da expressão gênica de acetiltransferases de histonas das fêmeas	34
3.1.2.5.3 Avaliação da expressão gênica de deacetilases de histonas das fêmeas.....	35
3.1.2.5.4 Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas das fêmeas	35
3.1.2.5.5 Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas das fêmeas.....	36
3.1.2.5.6 Avaliação da expressão gênica de DNA metiltransferases das fêmeas	37
3.1.2.6 Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos das fêmeas	37
3.1.2.7 Avaliação da expressão gênica do fígado das fêmeas.....	38
3.1.2.8 Resumo dos resultados obtidos nas fêmeas da geração F1 no 90º dia pós-natal	40
3.2 Efeitos da exposição intrauterina ao di (2-etil hexil) ftalato nos machos da geração F1	41
3.2.1 Resultados da prole macho ao final da gestação	41
3.2.1.1 Expressão de genes envolvidos na síntese e secreção de hormônios tireoidianos	41
3.2.1.2 Resumo dos resultados obtidos nos machos da geração F1 no GD20.....	42
3.2.2 Resultados da prole macho durante a vida adulta.....	43
3.2.2.1 Avaliação da expressão gênica e proteica do hipotálamo dos machos.....	43
3.2.2.2 Avaliação da expressão gênica e proteica da hipófise dos machos	43
3.2.2.3 Avaliação da expressão de genes e proteínas envolvidos na biossíntese de hormônios tireoidianos na tireoide dos machos.....	45

3.2.2.4 Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide dos machos	46
3.2.2.5 Avaliação de alterações epigenéticas na tireoide dos machos.....	47
3.2.2.5.1 Modificações pós-traducionais em histonas dos machos	47
3.2.2.5.2 Avaliação da expressão gênica de acetiltransferases de histonas dos machos	47
3.2.2.5.3 Avaliação da expressão gênica de deacetilases de histonas dos machos	48
3.2.2.5.4 Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas dos machos.....	49
3.2.2.5.5 Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas dos machos....	49
3.2.2.5.6 Avaliação da expressão gênica de desmetilases de DNA metiltransferases dos machos	50
3.2.2.6 Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos dos machos.....	51
3.2.2.7 Avaliação da expressão gênica do fígado dos machos	51
3.2.2.8 Resumo dos resultados obtidos nos machos da geração F1 no 90º dia pós-natal	53
4 DISCUSSÃO	54
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS	66
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática das principais glândulas endócrinas e hormônios produzidos pelo sistema endócrino em humanos.....	2
Figura 2. Anatomia da glândula tireoide	4
Figura 3. Histologia da tireoide	5
Figura 4. Desenvolvimento e diferenciação da glândula tireoide	6
Figura 5. Representação esquemática da biossíntese e secreção dos hormônios tireoidianos	8
Figura 6. Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.....	10
Figura 7. Características e efeitos desencadeados pelos desreguladores endócrinos	12
Figura 8. Exemplos de curvas dose-resposta induzidas pela exposição aos desreguladores endócrinos	13
Figura 9. Desenho experimental.....	22
Figura 10. Avaliação da expressão gênica dos fatores transcricionais tireoidianos em fêmeas da geração F1, ao final da gestação, dos grupos Controle e expostos ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	28
Figura 11. Avaliação da expressão gênica da tireoide em fêmeas da geração F1, ao final da gestação, dos grupos controle e expostos ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	28
Figura 12. Esquema dos achados encontrados nas fêmeas da geração F1, no GD20, de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação.....	29
Figura 13. Avaliação da expressão gênica e proteica do TRH no hipotálamo das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	30
Figura 14. Avaliação da expressão gênica e proteica do tireotrofina alfa na hipófise das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	30
Figura 15. Avaliação da expressão gênica e proteica do tireotrofina beta na hipófise das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação.....	31
Figura 16. Avaliação da expressão gênica na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação.....	31

Figura 17. Avaliação da expressão proteica na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação.....	32
Figura 18. Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	33
Figura 19. Avaliação de modificações pós-traducionais nas histonas H3 e H4 na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	34
Figura 20. Avaliação da expressão gênica de enzimas histonas acetiltransferases na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	34
Figura 21. Avaliação da expressão gênica de enzimas histonas deacetilases na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	35
Figura 22. Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	36
Figura 23. Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	36
Figura 24. Avaliação da expressão gênica das DNA metiltransferases na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	37
Figura 25. Concentração sérica dos níveis de hormônios tireoidianos em fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	38
Figura 26. Avaliação da expressão gênica das desidases no fígado de fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	38
Figura 27. Avaliação da expressão gênica das glucoronosiltransferases, envolvidas na metabolização periférica de hormônios tireoidianos, no fígado das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	39
Figura 28. Avaliação da expressão gênica da TTR no fígado das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	39
Figura 29. Esquema demonstrando os achados obtidos nas fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação.....	40

Figura 30. Avaliação da expressão gênica de fatores transcricionais da tireoide de machos da geração F1, ao final da gestação, provenientes de ratas expostas ou não ao ftalato di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	41
Figura 31. Avaliação da expressão gênica de fatores de diferenciação da tireoide de machos da geração F1, ao final da gestação, provenientes de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	42
Figura 32. Esquema dos achados encontrados nos machos da geração F1, no 20º dia pós-natal, de ratas expostas ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	42
Figura 33. Avaliação da expressão gênica e proteica do TRH no hipotálamo dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação	43
Figura 34. Avaliação da expressão gênica e proteica da subunidade alfa do tireotrofina na hipófise dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação.....	44
Figura 35. Avaliação da expressão gênica e proteica da subunidade beta do tireotrofina na hipófise de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	44
Figura 36. Avaliação da expressão gênica da tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	45
Figura 37. Avaliação da expressão proteica da tireoide dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino ..	46
Figura 38. Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	46
Figura 39. Avaliação de modificações pós-traducionais das histonas H3 e H4 na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	47
Figura 40. Avaliação da expressão gênica acetiltransferases de histonas na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	48
Figura 41. Avaliação da expressão gênica de deacetilases na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	48

Figura 42. Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	49
Figura 43. Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	50
Figura 44. Avaliação da expressão gênica de Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	50
Figura 45. Concentração sérica de T4 e T3 total em machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino	51
Figura 46. Avaliação da expressão gênica da desidase tipo 1 e desidase tipo 3 no fígado dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	51
Figura 47. Avaliação da expressão gênica de enzimas glucoronosiltransferases no fígado dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	52
Figura 48. Avaliação da expressão gênica da TTR no fígado dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.....	52
Figura 49. Esquema demonstrando os achados obtidos nos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação.....	53

Resumo

Introdução: A produção de hormônios tireoidianos é finamente regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Os desreguladores endócrinos alteram o funcionamento do sistema endócrino e induzem efeitos adversos dependendo do tempo de exposição e da fase do desenvolvimento em que o indivíduo é exposto. O di (2-etil hexil) ftalato é o principal plastificante utilizado pela indústria na produção de plásticos maláveis. Seu papel desregulador sobre a função tireoidiana já foi descrito em alguns estudos. Contudo, pouco se sabe sobre o seu papel desregulador durante períodos críticos do desenvolvimento. **Objetivos:** Investigar o impacto da exposição materna ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação sobre a função do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide dos animais da geração F1, após o nascimento e durante a vida adulta. **Métodos:** Ratas Wistar prenhes foram tratadas oralmente com óleo de milho (Controle) ou óleo de milho suplementado com di (2-etil hexil) ftalato (0,48 ou 4,8mg/kg/dia) durante todo o período gestacional. Os machos e fêmeas das proles foram utilizados em dois períodos distintos: no 20º dia gestacional ou 90º dia pós-natal. Hipotálamo, hipófise, tireoide, fígado e sangue foram coletados para a análise de expressão gênica e proteica, através de ensaios de PCR em tempo real e *western blot*, respectivamente. A dosagem sérica dos hormônios tireoidianos foi realizada a partir de ELISA. **Resultados:** O tratamento materno com di (2-etil hexil) ftalato aumentou significativamente a expressão de genes envolvidos na síntese/secreção dos hormônios tireoidianos na tireoide dos machos e fêmeas da prole GD20. Nas fêmeas adultas das proles, observou-se aumento da expressão gênica/proteica do TSH alfa na menor dose de tratamento de exposição ao di (2-etil hexil) ftalato. Na tireoide desses animais, houve redução da expressão gênica/proteica de NIS, TSHR, TG, TPO, NKX2.1, PAX8 e FOXE1, em ambas as doses de di (2-etil hexil) ftalato. Esses dados são coerentes com a redução nos níveis séricos de T4. Ainda na tireoide, observamos diminuição gênica de enzimas envolvidas na acetilação, deacetilação e desmetilação de histonas. Houve também um aumento da expressão gênica de DNMT3a na maior dose de tratamento, enquanto a expressão do mRNA da enzima antioxidante SOD1 estava diminuída na tireoide desses animais. Também nas fêmeas, observou-se aumento da expressão gênica hepática de D1 e de TTR, apenas na menor dose de tratamento; e redução da expressão gênica das enzimas UGT1a1 e UGT1a6, apenas na maior dose de tratamento com di (2-etil hexil) ftalato. Já

nos machos adultos das proles, houve aumento no conteúdo de mRNA do TRH no hipotálamo, na maior dose de tratamento; e de TSH beta na hipófise, em ambas as doses de tratamento. Na tireoide desses animais, houve diminuição da expressão gênica/proteica de NIS, TSHR e FOXE1, e aumento de PAX8 e NKX2.1, em ambas as doses de tratamento. Adicionalmente, a acetilação das histonas H3 e H4 apresentou-se aumentada, na maior dose de tratamento. Não houve alteração na concentração sérica de T4 e T3 nos machos. Não houve alterações nas enzimas modificadoras de histonas, enquanto que a expressão do mRNA da enzima antioxidante CAT estava aumentada na tireoide desses animais. Não houve alteração significativa em nenhuma das enzimas hepáticas avaliadas nos machos adultos das proles. **Conclusão:** Nossos dados demonstram, pela primeira vez, que a exposição intrauterina ao di (2-etil hexil) ftalato, em doses mais baixas que aquelas consideradas seguras, desregula o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide em machos e fêmeas da prole, em períodos distintos do desenvolvimento. Nossos dados sugerem fortemente que a exposição intrauterina ao di (2-etil hexil) ftalato aumenta a susceptibilidade da prole para o desenvolvimento de disfunções tireoidianas durante a vida adulta, sendo mais nociva em fêmeas do que em machos.

Descritores: Dietilexilftalato; Gravidez; Disruptores endócrinos; Glândula tireoide

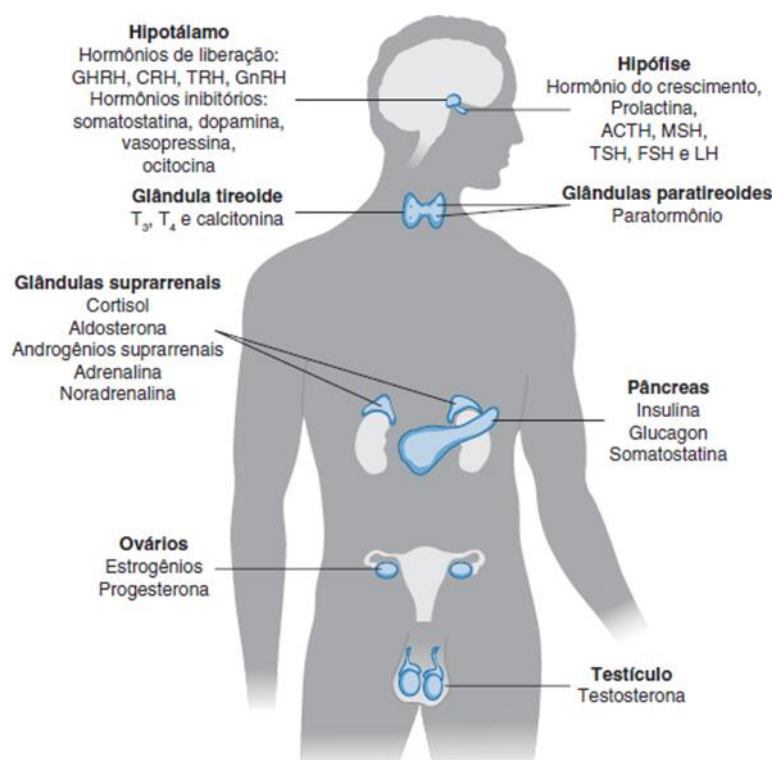
1 INTRODUÇÃO

1.1 Visão geral do sistema endócrino

O sistema endócrino exerce suas funções através de um complexo sistema de sinalização celular capaz de coordenar e regular diferentes atividades celulares, que culminam com a manutenção do crescimento, do desenvolvimento, da homeostase, da reprodução e perpetuação das espécies.⁽¹⁾ Esse sistema realiza suas funções através da síntese e secreção de hormônios, principalmente por glândulas endócrinas, que estão distribuídas por todo o corpo e cujas funções são controladas por hormônios/metabólitos presentes no sistema circulatório, por substâncias produzidas localmente, ou por estimulação neuroendócrina direta.⁽²⁾ Existem similaridades entre os sistemas endócrino e nervoso, uma vez que ambos são responsáveis pela comunicação celular e pelo controle de importantes funções do organismo. Contudo, cada sistema possui suas particularidades. O sistema nervoso permite uma rápida transmissão de informações entre as células, principalmente através de sinais elétricos. Já a comunicação célula-célula desencadeada pelo sistema endócrino depende de vários passos como biossíntese, secreção, transporte, reconhecimento por receptores e metabolização periférica de hormônios, que desencadeiam ações mais lentas e duradouras sobre o organismo. Ainda assim, os dois sistemas possuem uma importante interação, de maneira tal que os estímulos recebidos e emitidos pelo sistema nervoso influenciam a liberação de certos hormônios, assim como, os hormônios secretados na circulação atuam sobre neurônios, controlando estímulos nervosos.⁽¹⁾

Os hormônios são mensageiros químicos secretados na circulação, através da qual, atingem e atuam em células alvo próximas ou distantes, desencadeando efeitos biológicos. A célula alvo necessariamente expressa proteínas específicas, denominadas receptores hormonais, que reconhecem e se ligam aos hormônios e localizam-se na membrana, citosol e/ou no núcleo das células. A interação entre hormônio/receptor dá início a uma cascata de reações bioquímicas, que resulta em uma resposta celular.⁽³⁾ Vale destacar que um único hormônio pode controlar diferentes funções biológicas, assim como, uma única função biológica pode ser controlada por vários hormônios simultaneamente.⁽³⁾

A maioria das glândulas endócrinas é controlada por eixos hierárquicos, denominados eixo hipotálamo-hipófise-glândula. O hipotálamo e a hipófise são órgãos anatomicamente próximos. O hipotálamo está localizado na base do cérebro e é conectado pelo infundíbulo, em forma de pedúnculo, à hipófise, que se localiza no interior da sela túrcica. A haste hipofisária contém vasos sanguíneos e fibras nervosas, permitindo a passagem de hormônios estimulantes e inibitórios, além de outras moléculas, do hipotálamo para a hipófise.⁽⁴⁾ Dessa forma, o hipotálamo sintetiza os chamados hormônios estimulatórios e/ou inibitórios que, ao serem secretados na eminência mediana e atingirem o sistema porta hipotálamo-hipofisário, alcançam a hipófise e regulam a síntese e secreção de hormônios adeno-hipofisários (Figura 1).



No hipotálamo: GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina (*gonadotropin-releasing hormone*); CRH: hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin-releasing hormone*); GHRH: hormônio liberador do hormônio do crescimento (*growth hormone-releasing hormone*); GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas (*gonadotropin-releasing hormone*); TRH: hormônio liberador da tireotrofina (*thyrotropin-releasing hormone*). Na hipófise: ACTH: hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotrophic hormone*); FSH: hormônio folículo-estimulante (*follicle-stimulating hormone*); LH: hormônio luteinizante (*luteinizing hormone*); MSH: hormônio estimulante de melanócitos (*melanocyte-stimulating hormone*); TSH: hormônio tireoestimulante ou tireotrofina (*thyroid-stimulating hormone*). Na tireoide: T₃: triiodotironina; T₄: tiroxina.

Fonte: Molina PE. Fisiologia endócrina. 5a ed. Porto Alegre: McGraw Hill Education; 2021. Figura 1-1. Sistema endócrino; p. 3.⁽¹⁾

Figura 1. Representação esquemática das principais glândulas endócrinas e hormônios produzidos pelo sistema endócrino em humanos

Esses hormônios, por sua vez, são secretados na circulação sanguínea e alcançam suas glândulas-alvo, como tireoide, gônadas e adrenais. Nessas glândulas, os hormônios hipofisários estimulam a síntese e secreção de outros hormônios que, por sua vez, atuam em diferentes tecidos, desencadeando seus efeitos biológicos.⁽¹⁾

Sabe-se, ainda, que a produção e secreção hormonal é finamente regulada por mecanismos de retroalimentação. As alças de retroalimentação são simples ou hierárquicas e garantem o ajuste contínuo dos níveis hormonais na circulação, graças ao monitoramento constante dos níveis circulantes de metabólitos/íons (alças simples) regulados por hormônios, ou a partir do controle da produção/secreção de outros hormônios reguladores, como nos eixos hipotálamo-hipófise-glândula citados anteriormente.⁽⁵⁾

O mecanismo de retroalimentação pode ser negativo ou positivo. A retroalimentação negativa ocorre quando o hormônio secretado por determinada glândula inibe a expressão/secreção de hormônios ou dos sinais que estimularam a sua secreção. Dessa forma, quando a concentração sérica do hormônio aumenta, esse tônus inibitório também aumenta, provocando redução do estímulo que promove a sua síntese e secreção. O contrário acontece quando a concentração sérica do hormônio diminui, o que reduz seu efeito inibitório sobre o sistema, com consequente aumento do estímulo para a sua síntese e secreção. Já na retroalimentação positiva, a resposta biológica gerada pelo hormônio potencializa o estímulo da sua síntese/secreção. Nesse sentido, o hormônio atua aumentando a sua própria secreção ao estimular a liberação de hormônios/sinais estimulatórios, que agem sobre a glândula endócrina que o produz.⁽⁶⁾

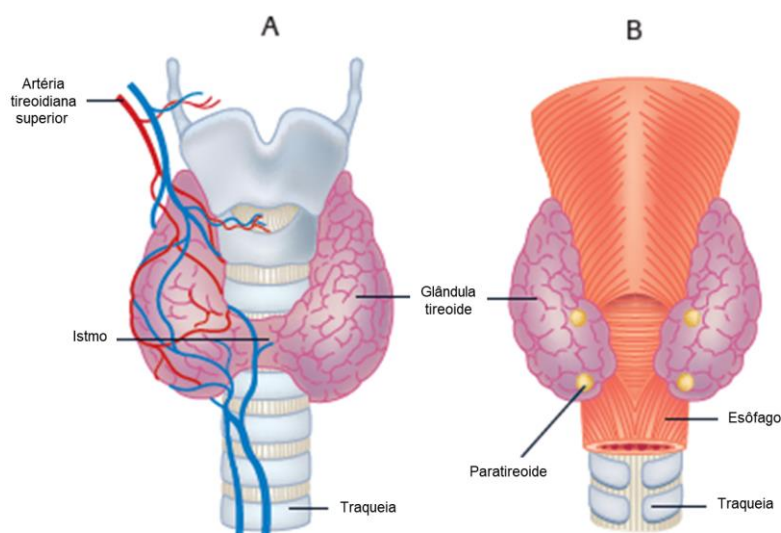
1.2 Glândula tireoide

1.2.1 Anatomia, histologia e função da glândula tireoide

A tireoide é uma glândula endócrina responsável pela produção dos hormônios tireoidianos (HTs). Os HTs, por sua vez, são essenciais para o controle do desenvolvimento, crescimento e metabolismo. Seu importante papel é claramente demonstrado pela deficiência mental observada em indivíduos com disfunção congênita da tireoide ou em recém-nascidos cujas mães desenvolveram hipotireoidismo durante a

gestação. Os principais hormônios produzidos pela tireoide são a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), que exercem seus efeitos biológicos principalmente através de sua ligação em receptores nucleares.⁽⁷⁾

A tireoide localiza-se na parte anterior do pescoço, posicionada abaixo da cartilagem cricoide, na traqueia. É formada por dois lobos lateralizados, direito e esquerdo, unidos por um istmo formado de parênquima tireoidiano (Figura 2).⁽⁸⁾

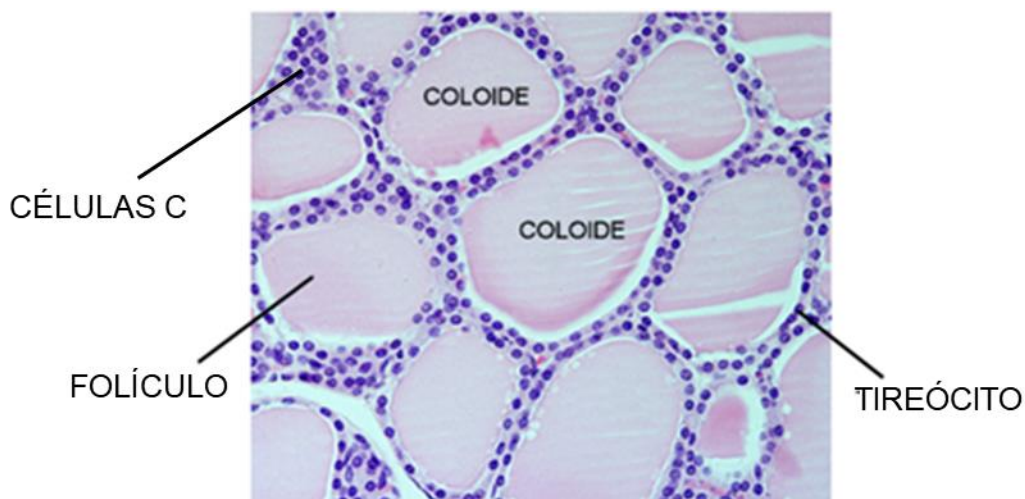


(A) Visão anterior da tireoide. (B) Visão posterior da tireoide.

Fonte: Martins MA, Carrilho FJ, Alves VA, Castilho EA, Cerri GG. Clínica médica. Vol. 5. 2ed. Barueri: Manole; 2015. Figura 1. Ilustração esquemática da anatomia da glândula tireoide; p. 165.⁽⁹⁾

Figura 2. Anatomia da glândula tireoide

Conforme demonstrado na figura 3, histologicamente, a tireoide é composta, principalmente, por vários folículos tireoidianos e, entre eles, encontram-se as células C ou células parafoliculares, responsáveis pela produção de calcitonina. Os folículos tireoidianos são considerados as unidades funcionais da glândula, pois neles ocorrem os processos de biossíntese, armazenamento e secreção dos HTs. Os folículos são formados por uma monocamada de células epiteliais, denominadas tireócitos. O interior dos folículos é preenchido por material proteico, denominado coloide, composto principalmente pela proteína TG produzida pelas células foliculares. Os tireócitos são polarizados: a membrana basolateral está em íntimo contato com a vasta rede de capilares sanguíneos, que irriga a glândula, e a membrana apical está voltada para o lúmen do folículo, em contato com o coloide.⁽¹⁰⁾



Fonte: Adaptada de Abrahamsohn P, Freitas V. 14-14 Glândulas endócrinas. 2004 [citado 2022 Jun 7]. Disponível em: <https://mol.icb.usp.br/index.php/14-14-glandulas-endocrinas/>.⁽¹¹⁾

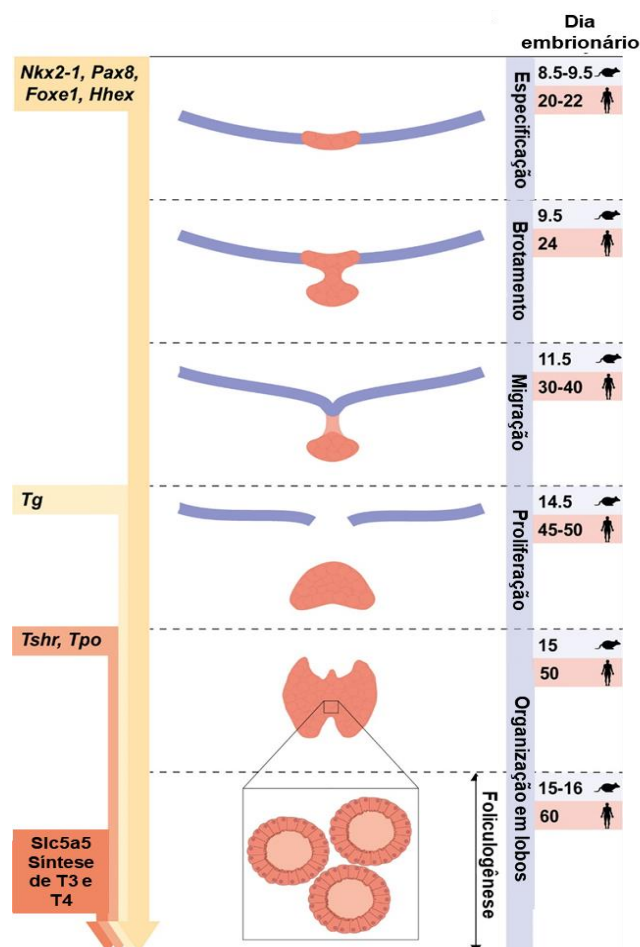
Figura 3. Histologia da tireoide

1.2.2 Desenvolvimento embrionário da glândula tireoide

O desenvolvimento embrionário da tireoide inicia-se a partir do 24º dia gestacional (GD) em humanos e do GD 8.5 em ratos/camundongos.⁽¹²⁾ Existe uma correlação temporal e estrutural entre a foliculogênese e síntese de HTs, sugerindo que as maturações estrutural e funcional desta glândula estão intimamente correlacionadas.⁽¹³⁾

O desenvolvimento da tireoide depende da expressão de fatores transcricionais tireoidianos (NKX2.1, FOXE1 e PAX8) em células do assoalho da faringe primitiva, que é ativada após o aparecimento do divertículo tireoidiano.⁽¹²⁾ É importante lembrar que a manutenção do estado diferenciado da glândula tireoide também depende da expressão coordenada desses fatores transcricionais, que regulam a expressão dos genes envolvidos na biossíntese dos HTs: NIS, TPO, TSHR, TG, dentre outros.^(14,15)

A tireoide fetal encontra-se plenamente diferenciada e desenvolvida a partir da 16ª semana de gestação em humanos e em GD16.5 em camundongos/ratos, sendo capaz de concentrar iodeto, além de sintetizar e secretar seus próprios HTs⁽¹⁵⁾ (Figura 4).



A expressão dos fatores transcripcionais *NKX2.1*, *FOXE1*, *PAX8* e *HHEX* determina a especificidade de um grupo de células da endoderme ventral a partir dos dias 20 a 22 após a fertilização em humanos e dia 8.5 a 9.5 em ratos. Após o desenvolvimento, o divertículo migra para a região da traqueia. Durante a migração, as células proliferam e expandem lateralmente, processo conhecido como lobalização, que se completa quando a glândula atinge sua posição definitiva, nos dias 45 a 50 em humanos e 14.5 em ratos, após a fertilização. A organização das células foliculares em folículos ocorre à medida que a expressão de genes relacionados com a biossíntese de hormônios tireoidianos progressivamente aumenta. A expressão do gene *SLC5A5*, que codifica a proteína NIS, é um passo limitante na diferenciação, pois garante a captação de iodo e a biossíntese de hormônios tireoidianos, e a glândula atinge sua maturação funcional.

Fonte: Traduzido de López-Márquez A, Carrasco-López C, Fernández-Méndez C, Santisteban P. Unraveling the complex interplay between transcription factors and signaling molecules in thyroid differentiation and function, from embryos to adults. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:654569. Figure 1. Stages of early thyroid development; p. 3.⁽¹⁵⁾

Figura 4. Desenvolvimento e diferenciação da glândula tireoide

Por esse motivo, vale ressaltar que até a 16ª semana de gestação, o feto depende exclusivamente dos HTs produzidos pela mãe e, qualquer variação dos níveis maternos de HTs neste período gera drásticas consequências no desenvolvimento fetal.⁽¹⁵⁾ A passagem de HTs maternos para o feto, durante a gestação, se faz através

da placenta, graças à expressão de transportadores específicos de HTs nas vilosidades coriônicas.⁽¹⁶⁾

1.2.3 Biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos

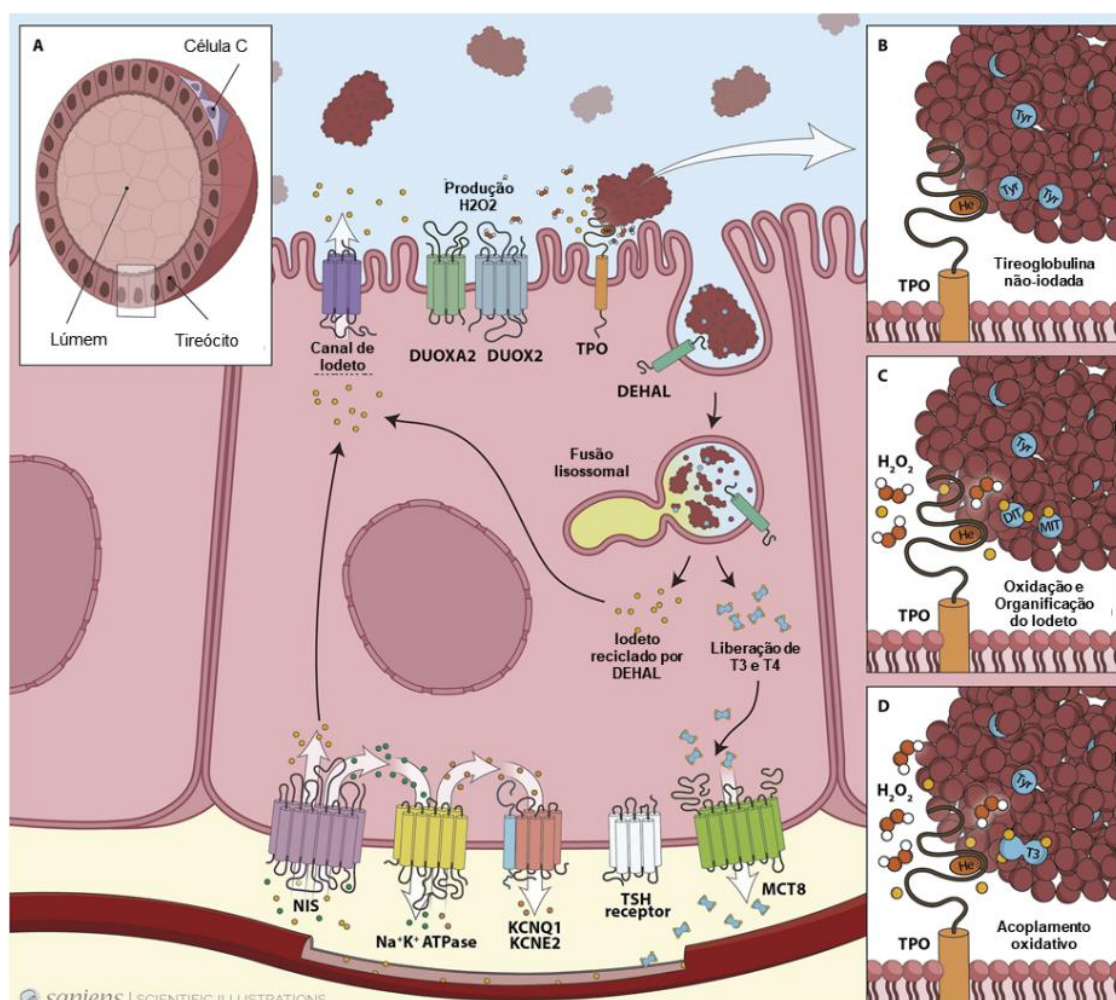
Os HTs possuem iodo em sua estrutura molecular e, por conta disso, esse micronutriente é essencial para a biossíntese de hormônios pela tireoide. Após ser obtido pela dieta, o iodo é reduzido a iodeto no trato gastrointestinal. O iodeto é então absorvido pelas vilosidades intestinais e transportado pela corrente sanguínea até a tireoide.⁽¹⁰⁾ A captação do iodeto na tireoide é mediada pela proteína NIS, através de um transporte ativo secundário, contra um gradiente eletroquímico.^(7,10) Após sua entrada nos tireócitos, o iodeto é transportado do citoplasma para o lúmen do folículo, através de transportadores apicais como a Pendrina e Anoctamina-1.⁽¹⁷⁾

No lúmen folicular, o iodeto é oxidado a iodo e incorporado em resíduos de tirosina das moléculas de TG. Ambos os processos são catalisados pela enzima TPO. A ação da TPO depende do cofator peróxido de hidrogênio (H_2O_2), essencial para a sua atividade catalítica e gerado a partir de oxidases tireoidianas (DUOX1 e DUOX2), flavoproteínas dependentes de cálcio e membros da família NADPH oxidase.⁽¹⁸⁾

A incorporação do iodo nos aminoácidos tirosina gera dois tipos de moléculas: a 3-monoiodotirosina (MIT) e a 3,5-diiodotirosina (DIT), que são acopladas por ação da TPO. O acoplamento de duas moléculas de DIT dá origem ao hormônio T₄, e uma DIT e uma MIT forma o T₃. Outros hormônios, sem ação biológica mediada por receptores nucleares, são formados durante o processo de acoplamento das iodotirosinas, como a 3,3',5'-triiodotironina (rT₃) e a 3,3'-diiodotironina (T₂).⁽¹⁰⁾

A secreção dos HTs inicia-se pelo processo de endocitose do coloide presente no lúmen folicular, por meio de macro e micropinocitose. Lisossomos contendo enzimas proteolíticas associam-se às vesículas endocitadas, formando os fagolisossomos, nos quais a tireoglobulina, contendo os HTs, é hidrolisada. Além dos HTs, são liberadas moléculas de MIT e DIT, que são posteriormente desidodadas pela enzima iodotirosina dehalogenase (DEHAL1). Este processo de desidodação das iodotirosinas é importante para reciclar o iodeto, que será utilizado na síntese de novos hormônios.⁽¹⁹⁾ A secreção dos HTs é mediada, principalmente, por uma proteína expressa na

membrana basolateral dos tireócitos, o transportador de monocarboxilatos tipo 8 (MCT8).⁽²⁰⁾ Além do MCT8, a tireoide expressa outros transportadores na membrana basolateral que auxiliam a secreção de HTs, como o transportador de L-aminoácidos do tipo 2 (LAT2)⁽²¹⁾ (Figura 5).



A) Estrutura tridimensional dos folículos tireoidianos, formados por uma camada de células epiteliais circundando um lúmen preenchido com colóide. Ao redor dos folículos, encontram-se as células C, também conhecidas como células parafoliculares, que produzem calcitonina. B) C) e D) Representação esquemática dos processos de oxidação do iodo, organificação do iodo e acoplamento das iodotirosinas, processos catalisados pela TPO. NIS: co-transportador sódio-iodeto; TSHR: receptor de tireotrofina; MCT8: transportador de monocarboxilato tipo 8; KCNQ1/KCNE2: canais de K⁺ dependentes de voltagem; DUOX2: dual-oxidase tipo 2; DUOX2: fator de maturação da dual oxidase tipo 2; TPO: tireoperoxidase; He: grupo heme da TPO; DEHAL: iodotirosina dehalogenase; TG: tireoglobulina; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; DIT: diiodotirosina; MIT: monoiodotirosina.

Fonte: Traduzido de Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;458:6-15. Fig. 1. Schematic representation of thyroid hormone biosynthesis and release. p. 7.⁽¹⁰⁾

Figura 5. Representação esquemática da biossíntese e secreção dos hormônios tireoidianos

O T4 é o principal hormônio secretado pela tireoide. De fato, a maior parte do T3 circulante deriva da desiodação do anel externo da molécula de T4, que

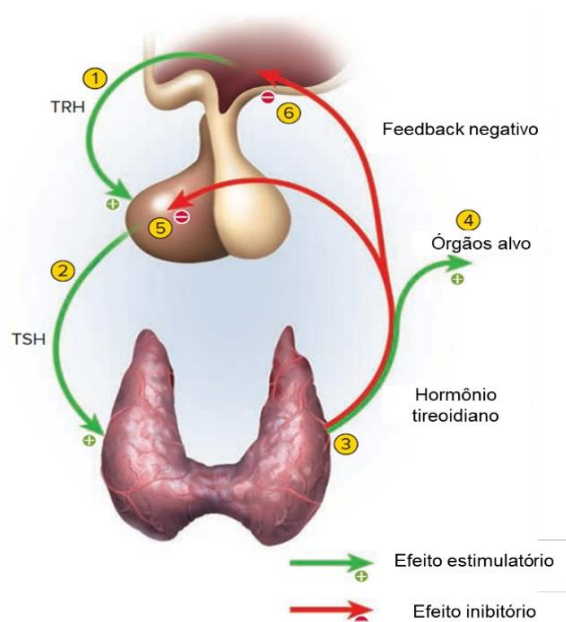
ocorre, principalmente, em tecidos periféricos pela ação das desidases.⁽²²⁾ Em humanos, aproximadamente 80% do T3 sérico deriva da desiodação do T4. Por outro lado, em ratos, o nível de T3 circulante derivado da desiodação varia de 40 a 50%, sendo o restante produzido pela tireoide.^(7,23)

1.2.4 Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide

A síntese e a secreção dos HTs são reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT). Nesse sentido, o hipotálamo, através da secreção do TRH, estimula a síntese e TSH pelos tireotrofos da adeno-hipófise. Quando liberado, o TSH é transportado pela circulação e liga-se ao TSHR, expresso na membrana basolateral dos tireócitos, estimulando todos os passos envolvidos na biossíntese e secreção dos HTs.⁽⁷⁾

Os HTs, por sua vez, atuam no eixo inibindo a síntese e secreção de TRH e TSH, no hipotálamo e hipófise, respectivamente, configurando um mecanismo de retroalimentação negativa.⁽⁷⁾

Dessa maneira, quando há diminuição dos níveis circulantes de HTs, em uma situação fisiológica, há uma diminuição da inibição exercida por esses hormônios sobre o eixo HHT, o que aumenta a síntese e secreção de TRH e TSH, até que os níveis de HTs retornem à normalidade. Por outro lado, frente ao aumento dos níveis de HTs na circulação, há um aumento da inibição exercida por eles tanto no hipotálamo, quanto na hipófise, o que, em última instância, reduz os níveis circulantes de TSH e seu estímulo sobre a tireoide⁽⁸⁾ (Figura 6).



1) O hipotálamo sintetiza e secreta o TRH. 2) O TRH estimula a hipófise anterior a secretar TSH. 3) O TSH estimula a glândula tireoide a secretar os HTs. 4) Os HTs exercem ações em praticamente todas as células do organismo. 5) Os HTs inibem a síntese e liberação de TSH pela adeno-hipófise. 6) Em menor grau, os HTs inibem a liberação de TRH pelo hipotálamo.

Fonte: Traduzido de Saladin K. Anatomy & physiology. The unity of form and function. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2021. Figure 17.7 Negative feedback inhibition of the pituitary gland by the thyroid gland; p. 622.⁽²⁴⁾

Figura 6. Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide

1.3 Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias químicas, isoladas ou em mistura, de origem natural ou sintética, que interferem com o complexo sistema de comunicação celular controlado pelo sistema endócrino, resultando em efeitos adversos à saúde. Ao longo da vida, o ser humano é exposto a uma grande quantidade de compostos com potencial de desregular o sistema endócrino.⁽²⁵⁾

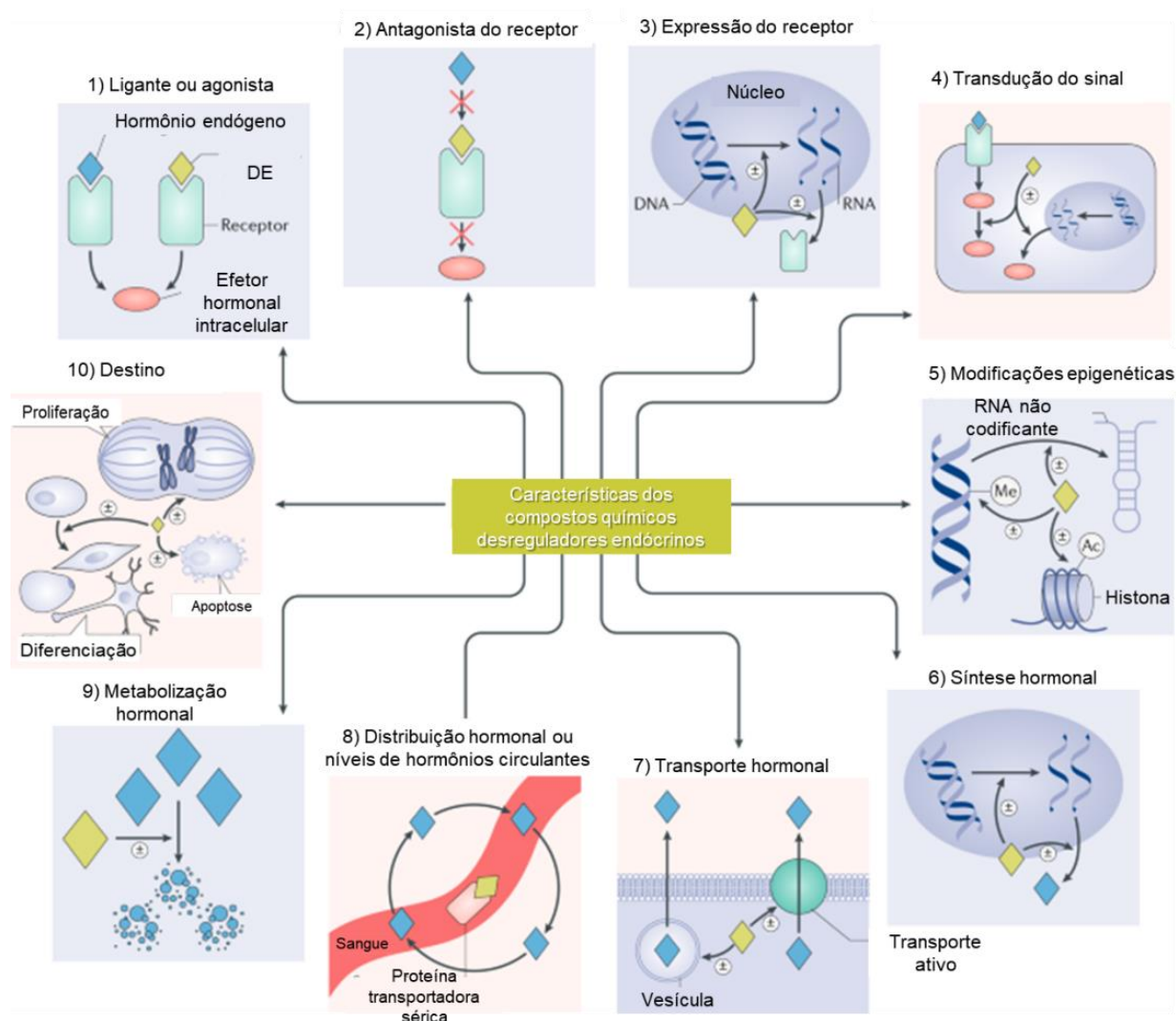
É importante ressaltar que, o sistema endócrino é altamente sensível a interferências e susceptível a desregulações causadas por substâncias exógenas, uma vez que os níveis circulantes e a concentração de hormônios necessária para desencadear os efeitos biológicos estão na faixa de pM – μM.⁽²⁶⁾

A maior parte dos DEs conhecidos foram originalmente criados com o intuito de desempenhar uma função específica, seja como pesticida, plastificante ou solvente. Contudo, dada sua similaridade estrutural com diversos hormônios produzidos

endogenamente pelo organismo, os DEs promovem alterações significativas no funcionamento do sistema endócrino e induzem efeitos adversos sobre o crescimento, desenvolvimento, reprodução e metabolismo, com repercussões sistêmicas em variados graus, dependendo do tempo de exposição e da fase do desenvolvimento em que o indivíduo é exposto.⁽²⁷⁾

Dentre os produtos químicos sintéticos identificados como DEs, encontram-se solventes/lubrificantes industriais, como os bifenilos policlorados (PCBs), bifenilos polibromados (PBBs) e as dioxinas; plastificantes como o bisfenol A (BPA) e os ftalatos (por exemplo, o di (2-etilhexil) ftalato [DEHP]); pesticidas (por exemplo, o DDT), fungicidas (por exemplo, a vinclozolina), herbicidas (por exemplo, o glifosato) e drogas para uso farmacêutico (como o dietilestilbestrol; DES).⁽²⁸⁾ Nesse sentido, mais de 90.000 compostos químicos produzidos pela indústria já foram classificados como potenciais DEs para o organismo.⁽²⁵⁾ A União Europeia estima um gasto anual de mais de 100 milhões de euros com o tratamento de doenças relacionadas aos DEs e na manutenção de indivíduos que não podem trabalhar devido a problemas de saúde desencadeados por essas substâncias.⁽²⁹⁾

Os DEs interferem em diferentes etapas da síntese, secreção, transporte, metabolismo periférico e ação dos hormônios endogenamente produzidos pelo organismo.⁽²⁷⁾ Um dos principais mecanismos desencadeados pelos DEs no comprometimento do sistema endócrino envolve sua ligação em receptores hormonais, de membrana ou nucleares, antagonizando ou mimetizando os efeitos biológicos dos hormônios. Além disso, descreve-se que os DEs atuam a partir de outros mecanismos, como: alteração da atividade/expressão de co-ativadores e co-repressores transcricionais; comprometimento de vias enzimáticas envolvidas na biossíntese/metabolismo dos hormônios; alteração da expressão e da atividade de proteínas transportadoras de hormônios, etc.^(30,31) (Figura 7).



As setas identificam os dez potenciais efeitos desencadeados por desreguladores endócrinos. O símbolo $\pm$ indica que esses contaminantes amplificam ou atenuam os processos/efeitos descritos em cada item. 1) DEs interagem com receptores hormonais mimetizando os efeitos desencadeados pelo hormônio endogenamente produzido pelo organismo. 2) DEs interagem com receptores hormonais e antagonizam/bloqueiam seus efeitos biológicos. 3) DEs regulam a expressão de receptores de diferentes hormônios. 4) DEs alteram a transdução de sinal em células responsivas a hormônios, incluindo: mudanças na expressão de mRNAs e proteínas, modificações pós-traducionais, alterações no fluxo de íons. 5) DEs induzem modificações epigenéticas em células produtoras ou responsivas a hormônios. 6) DEs alteram a síntese hormonal. 7) DEs alteram o transporte de hormônios através das membranas celulares. 8) DEs alteram a distribuição de hormônios ou os níveis de hormônios circulantes, por interferirem na função de proteínas transportadoras. 9) DEs alteram o metabolismo periférico e/ou depuração hormonal. 10) DEs alteram o destino de células produtoras ou responsivas a hormônios, alterando taxas de proliferação, diferenciação e/ou apoptose celular. As ações de DEs representadas incluem amplificação e atenuação de efeitos.

Fonte: Traduzido de La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(1):45-57. Fig. 1 The key characteristics of endocrine-disrupting chemicals. p. 48.⁽³¹⁾

Figura 7. Características e efeitos desencadeados pelos desreguladores endócrinos

A determinação da dose segura de exposição aos DEs é complexa, uma vez que, na maioria dos casos, os efeitos nocivos desencadeados pelos DEs não

seguem curvas monotônicas de dose-resposta, como curvas em U ou U invertido⁽³²⁾ (Figura 8).



Fonte: Aires MM. Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018. Figura 78.8 Os efeitos desencadeados pelos desreguladores endócrinos podem seguir curvas monotônicas ou não monotônicas de dose-resposta. p. 1311.⁽⁵⁾

Figura 8. Exemplos de curvas dose-resposta induzidas pela exposição aos desreguladores endócrinos

Nesse sentido, qualquer nível de exposição aos DEs potencialmente desencadeia anormalidades endócrinas e/ou reprodutivas, especialmente se os indivíduos forem expostos durante as janelas críticas do desenvolvimento. Vale frisar que, para alguns DEs, doses baixas de exposição exercem efeitos deletérios mais potentes do que doses altas. Finalmente, como vários sistemas endócrinos são afetados pela exposição aos DEs, uma dose considerada “segura” para um dos eixos endócrinos, não necessariamente será “segura” para outro eixo hormonal.⁽³²⁾

1.3.1 Desreguladores endócrinos e as origens desenvolvimentistas da saúde e da doença

Sugere-se que, além dos fatores genéticos, o aumento da exposição humana aos DEs tenha relação direta com o aumento acentuado, nas últimas décadas, de diversas doenças não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas e *diabetes mellitus*. Por esse motivo, há um interesse crescente em entender como as exposições crônicas aos DEs, ao longo da vida e em baixas doses, contribuem para o aumento dessas doenças em humanos.⁽³³⁾

Esses efeitos dos DEs têm relação direta com a teoria da origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD), que preconiza que experiências adversas (nutricionais, farmacológicas, ambientais etc.) vividas durante as fases iniciais do desenvolvimento predispõe os indivíduos à maior susceptibilidade de desenvolver doenças ao longo da vida.⁽³⁴⁾

Os períodos intrauterino, neonatal e os primeiros anos de vida são classificados como janelas de exposição extremamente vulneráveis para a exposição aos DEs, uma vez que, especialmente nessas fases, ocorrem intensas e importantes ações hormonais que garantem o adequado desenvolvimento e crescimento dos indivíduos. De fato, eventos finamente coordenados temporalmente em nível celular, bioquímico e molecular são desencadeados por ações hormonais, de forma tal que a exposição a interferentes endócrinos desencadeia efeitos deletérios no desenvolvimento, organização e maturação de diferentes órgãos/tecidos dos organismos expostos.⁽²⁸⁾ Sendo assim, dentre os vários fatores ambientais que comprometem o desenvolvimento adequado dos indivíduos, os DEs têm recebido grande atenção, dada a sua onipresença no meio ambiente e o aumento acentuado de doenças endócrinas em humanos com níveis detectáveis dessas substâncias no organismo.^(35,36)

Nesse sentido, demonstrou-se que processos moleculares altamente conservados e eficientes evoluíram, permitindo que fatores ambientais regulem a conformação da cromatina e, consequentemente, a expressão gênica de diferentes tecidos, independentemente de alterações na sequência do DNA. São os conhecidos mecanismos de programação da expressão gênica que tem relação direta com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças ao longo da vida.⁽³⁷⁾ Ainda mais preocupantes são as alterações epigenéticas desencadeadas pela exposição aos DEs em células germinativas (óvulos e espermatozoides). As alterações epigenéticas nesses tipos celulares podem resultar na transmissão de fenótipos adversos para próximas gerações, caracterizando as heranças multigeracional e transgeracional, com crescente interesse nas pesquisas sobre a teoria de DOHaD e a exposição humana aos DEs.⁽³⁴⁻³⁷⁾

É importante ressaltar que, os mecanismos epigenéticos são essenciais para estabelecer a totipotência do zigoto e especificar as linhagens geradas a partir das células germinativas. Por esse motivo, é tão preocupante que os DEs interfiram nesses mecanismos de manutenção e perpetuação das marcas epigenéticas durante o desenvolvimento, uma vez que, ao alterarem o epigenoma celular os DEs potencialmente interferem com o correto desenvolvimento dos órgãos e tecidos, em

diferentes gerações.^(37,38) Como os padrões epigenéticos são herdados por meio da mitose, quanto mais precoce for o estágio de desenvolvimento, mais crítico será o impacto da exposição aos DEs no fenótipo resultante.^(36,39)

Os mecanismos epigenéticos mais conhecidos e envolvidos na regulação da expressão gênica são a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas.⁽⁴⁰⁾

A metilação do DNA envolve a adição de grupos metil às citosinas e é catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs). É um mecanismo de suma importância para vários processos celulares, incluindo a gametogênese e embriogênese, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e preservação da estabilidade cromossômica. Vale destacar que, a hipermetilação do DNA em uma região promotora reprime a transcrição gênica, uma vez que torna a cromatina menos acessível aos fatores de transcrição, além de aumentar a afinidade dessa molécula para histonas desacetilases e co-repressores transcricionais.⁽⁴⁰⁾

A modificação pós-traducional de histonas, por sua vez, envolve a acetilação, metilação, fosforilação, sumoilação e/ou ubiquitinação de aminoácidos específicos nas extremidades N-terminais das histonas, principalmente H3 e H4, mediada por diferentes enzimas, como histonas acetiltransferases, desacetilases, DNMTs, desmetilases etc. As modificações pós-traducionais das histonas aumentam ou diminuem a interação física dessas proteínas com o DNA, o que leva à maior ou menor compactação da cromatina e, conseqüentemente, à diminuição ou ao aumento da atividade transcricional, respectivamente.^(40,41)

1.3.2 Ftalatos

Os ftalatos são plastificantes amplamente utilizados na fabricação de centenas de produtos como brinquedos, materiais de construção, produtos de higiene pessoal, cosméticos, filmes para conservação de alimentos, detergentes e equipamentos médicos.^(42,43) Esses plastificantes são usualmente adicionados a polímeros, como o cloreto de polivinila (PVC), para conferir flexibilidade e durabilidade aos plásticos. Sendo assim, pode-se encontrar os ftalatos em produtos de segurança, como capacetes e *airbags*, em automóveis, celulares, computadores, televisores e outros equipamentos eletrônicos. Também são amplamente encontrados em diferentes produtos das

residências, como em revestimentos, pisos, telhados e isolamentos. Além disso, esses plastificantes são largamente utilizados na produção de embalagens para alimentos.⁽⁴²⁾

Aproximadamente 6.000.000 de toneladas de ftalatos são produzidos anualmente no mundo, e são classificados como moléculas de alto ou baixo peso molecular.⁽⁴⁴⁾ Os ftalatos de alto peso molecular possuem de 9 a 13 átomos de carbono em sua estrutura química, o que lhes confere maior durabilidade, sendo utilizados em produtos de PVC, como fios e cabos, pisos e revestimentos, filmes autoadesivos e aplicações automotivas. Os ftalatos de alto peso molecular mais comuns incluem o diisononil ftalato (DINP), diisodecil ftalato (DIDP) e dipropil-heptil-ftalato (DPHP). Os ftalatos de baixo peso molecular são compostos com 3 a 8 átomos de carbono em sua molécula e são amplamente utilizados em produtos médicos, PVC de uso geral, adesivos, tintas e cosméticos; os mais comuns incluem o DEHP e dibutil ftalato (DBP).⁽⁴⁵⁻⁴⁹⁾

Dentre os ftalatos apontados acima, o DEHP é o mais utilizado no mundo e pode representar até 40% do peso final de alguns produtos plásticos, o que demonstra a importância de sua utilização na fabricação desses produtos.^(42,46,47)

O DEHP é um líquido incolor, praticamente inodoro e está presente em diversos produtos do dia a dia, como: revestimentos de parede, toalhas de mesa, estofamento de móveis, cortinas de chuveiro, mangueiras de jardim, forros de piscina, capas de chuva, brinquedos, estofados de automóveis, películas de embalagem, revestimento para fios e cabos, maquiagens, cosméticos e equipamentos médicos – bolsas de armazenamento de sangue e/ou soluções intravenosas), cateteres e tubos para diálise.^(42,50)

Independentemente de seu peso molecular, os ftalatos encontram-se ligados de forma não covalente aos plásticos, sendo facilmente liberados no meio ambiente, potencializando, assim, a exposição humana a esses contaminantes.⁽⁵¹⁾ No corpo humano, o DEHP é absorvido e imediatamente metabolizado em mono (2-etil-hexil) ftalato (MEHP) um composto considerado ainda mais tóxico do que o próprio DEHP.⁽⁵²⁾

A meia vida dos ftalatos no organismo é de algumas horas, pois são rapidamente metabolizados e excretados nas fezes e na urina. Ainda assim, a sua onipresença no meio ambiente e em diversos produtos do dia a dia, resulta em uma exposição humana constante e altamente variável.⁽⁵³⁾

Devido à grande quantidade e variedade de produtos contendo DEHP, estima-se que exposição humana a esse composto é de 0,5-25µg/kg/dia.^(46,54,55) A exposição tende a ser ainda maior em recém-nascidos internados em UTI neonatal, que alcançam níveis de exposição da ordem de 3mg/kg/dia, dada a alta utilização de equipamentos médicos, como tubos e sondas, ricos em DEHP em sua composição.⁽⁵⁶⁾

Dada a intensa exposição humana ao DEHP, agências regulatórias determinaram doses de exposição consideradas seguras, a fim de se evitar possíveis danos causados pela exposição a esse ftalato. Assim sendo, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) Americana, a dose 20µg de DEHP/kg/dia aumenta o risco de desenvolvimento de hepatomegalia. Já a Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (EFSA) indicou que a dose de 50µg de DEHP/kg/dia pode causar toxicidade testicular.⁽⁴⁹⁾

A exposição humana ao DEHP ocorre, principalmente, por inalação, ingestão ou contato dérmico.⁽⁵⁷⁾ Metabólitos de ftalatos foram encontrados em amostras biológicas humanas como sangue, urina, líquido amniótico e leite materno, o que confirma a ampla contaminação humana com esses DEs.^(45,51) Especialmente por esse motivo, a preocupação pelas consequências da exposição humana ao DEHP aumentou nos últimos anos, dada sua alta toxicidade e a capacidade de perturbar a função endócrina em humanos e animais.^(46,55)

Em concordância, estudos indicam que a exposição humana aos ftalatos desencadeia sérios problemas de saúde, que vão desde anormalidades em órgãos reprodutivos, até a interferência na ação, metabolização, produção e transporte de hormônios no organismo.^(58,59) Sendo assim, estudos descrevem que alguns ftalatos, como o di-n-butil ftalato (DNBP),⁽⁶⁰⁾ di-isobutil ftalato (DIBP),⁽⁶¹⁾ DEHP,⁽⁶²⁾ benzilbutil ftalato (BBzP)⁽⁶³⁾ e o diisonil ftalato (DINP)⁽⁶⁴⁾ desencadeiam efeitos nocivos no desenvolvimento e na reprodução em humanos e outros animais.⁽⁶⁵⁾

Sabe-se, por exemplo, que a exposição intrauterina aos ftalatos desencadeia diversos problemas no funcionamento do sistema endócrino, causando a perturbação do desenvolvimento de estruturas dependentes de andrógenos, principalmente por inibir a biossíntese de testosterona fetal.⁽⁶⁶⁾ Além disso, foi demonstrado que os ftalatos interferem com a produção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 3 (IGF-3), envolvidos na descida dos testículos para a bolsa escrotal durante o desenvolvimento.⁽⁶⁷⁾ Dessa maneira, a maior parte dos estudos correlaciona a exposição aos ftalatos a ações anti-

androgênicas, que comprometem estrutural e funcionalmente estruturas do sistema reprodutor masculino, durante uma janela de exposição crítica para o desenvolvimento de estruturas reprodutivas. Estes efeitos fazem parte da chamada “síndrome do ftalato”, que se caracteriza pelo encurtamento da distância anogenital, hipospádia e malformações do epidídimo, ducto deferente, vesículas seminais e próstata.⁽⁶⁸⁾

Além dos efeitos nocivos sobre o sistema reprodutor, a exposição aos ftalatos foi previamente associada ao desenvolvimento de resistência insulínica, diabetes tipo II, sobrepeso e obesidade, alterações esqueléticas, alergias e desencadeamento de diferentes tipos de câncer.⁽⁶⁹⁾

Nos últimos anos, tem-se descrito os efeitos deletérios do DEHP e os seus metabólitos sobre a função do eixo HHT. Neste sentido, demonstrou-se que exposição ao DEHP causou redução da concentração sérica de HTs e do TRH em roedores, além de reduzir a expressão tireoidiana da proteína NIS, cuja atividade é limitante para a biossíntese hormonal. Esse mesmo estudo demonstrou a diminuição da TTR, principal proteína plasmática transportadora de HTs em roedores, e o aumento da expressão da deiodase do tipo 1 (D1) e de glucuronosiltransferases (UGTs), enzimas hepáticas que metabolizam os HTs. Indicando que o DEHP pode alterar a expressão de enzimas hepáticas, levando a anormalidades metabólicas e da função do eixo HHT através da via Ras/Akt/TRHr.⁽⁵⁸⁾ Em humanos, observou-se uma associação inversa entre as concentrações urinárias de MEHP e os níveis séricos de T3 livre e T4 total.⁽⁶⁵⁾ Outro estudo demonstrou que os níveis séricos de T4 total e livre estavam negativamente associados ao MEHP na urina de gestantes.⁽⁷⁰⁾

Ainda assim, até o momento, poucos estudos investigaram os efeitos da exposição intrauterina aos ftalatos e suas consequências para a saúde da progênie durante a vida adulta. Conforme destacado anteriormente, a maior parte dos estudos feitos com esse propósito, investigaram os efeitos dos ftalatos sobre o sistema reprodutor de diferentes classes de animais, dadas as suas conhecidas ações anti-androgênicas.⁽⁷¹⁾

A principal hipótese do nosso estudo é que a exposição ao DEHP, durante uma janela crítica do desenvolvimento, compromete o desenvolvimento e função da tireoide nos indivíduos da progênie. Essa hipótese baseia-se nos dados anteriormente expostos, na importância incontestável da função tireoidiana materna para o desenvolvimento fetal e do período intrauterino para a programação de doenças durante a vida adulta. Dessa forma, tornou-se relevante compreender os mecanismos através dos quais o DEHP interfere, durante o período intrauterino, com o desenvolvimento,

programação e função da tireoide, cujos hormônios exercem efeitos em praticamente todas as células do organismo, garantindo a manutenção da homeostase.

1.4 Objetivos

1. Avaliar os efeitos desencadeados pela exposição materna ao di (2-etil hexil) ftalato, durante a gestação, sobre a expressão gênica e proteica da função do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide dos animais da geração F1, no final da gestação e durante a vida adulta;

2. Avaliar a participação de mecanismos epigenéticos (metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas) na programação da expressão gênica da tireoide nos animais adultos da geração F1, que foram expostos ao ftalato di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino.

2 MÉTODOS

2.1 Animais, desenho experimental e tratamentos

Foram realizados estudos *in vivo*, utilizando-se ratas da linhagem Wistar adultas e virgens, provenientes e mantidas no biotério do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia do Hospital Israelita Albert Einstein. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$ e ciclo invertido claro/escuro de 12 horas. Água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*.

Após o período de adaptação (~10 dias), deu-se início ao procedimento de cópula, no qual um rato da linhagem Wistar adulto foi colocado em cada caixa contendo duas ratas. Diariamente foi avaliada a presença de tampão vaginal para identificação do primeiro dia da prenhez (GD0.5).

As prenhes foram pesadas, colocadas em gaiolas individuais e divididas entre os seguintes grupos experimentais:

Grupo Controle (número amostral = 5 ratas prenhes) – receberam oralmente o mesmo volume de óleo de milho ($50\mu\text{L}/250\text{g}$ de peso corporal; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizado para a diluição do DEHP administrado nos animais dos outros grupos experimentais.

Grupo DEHP 0.48 (número amostral = 5 ratas prenhes) – receberam oralmente $0,48\text{mg/kg/dia}$ de DEHP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha, pureza $\geq 99,5\%$) dissolvido em óleo de milho.

Grupo DEHP 4.8 (número amostral = 5 ratas prenhes) – receberam oralmente $4,8\text{mg/kg/dia}$ de DEHP dissolvido em óleo de milho.

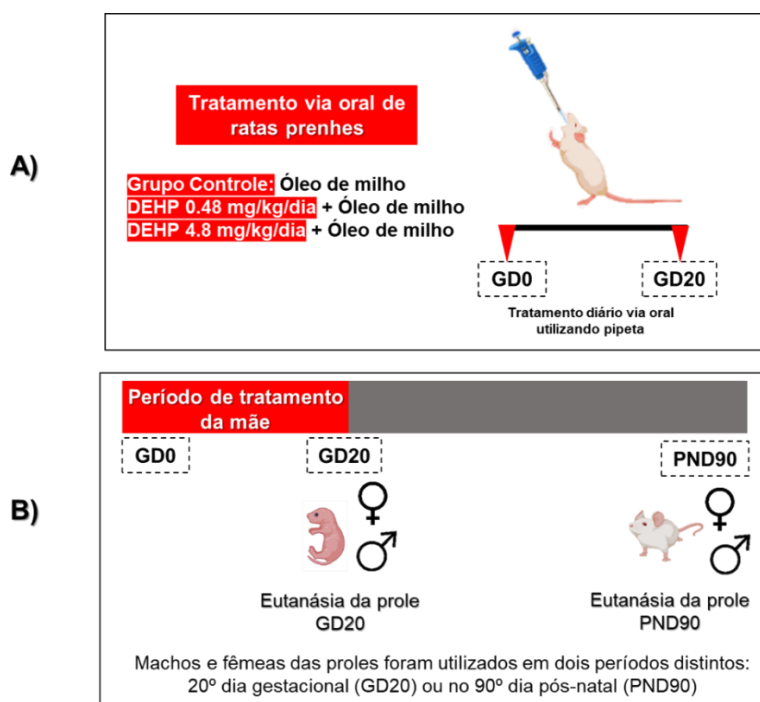
As doses de DEHP foram administradas diariamente nas ratas prenhes, no período da manhã, durante todo o período gestacional (GD0.5-GD21) por via oral, com o auxílio de uma micropipeta monocal e ponteira. Esse método de administração é considerado menos estressante para os animais do que a gavagem.⁽⁶⁹⁾ Conforme apontado anteriormente, o DEHP foi dissolvido em óleo de milho e o volume administrado ($50\mu\text{L}/250\text{g}$ de peso corporal) foi ajustado diariamente, com base na variação do peso corporal das ratas prenhes ao longo da gestação, para manutenção da mesma dose de DEHP durante todo o período de tratamento.

As doses de DEHP administradas neste estudo foram definidas a partir da dose nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL – *no-observed-adverse-effect level*) de DEHP, definida como 4,8mg/kg/dia.⁽⁷²⁾ Dessa forma, 4,8mg/kg/dia é considerada uma dose segura de exposição ao DEHP, e a dose 0,48mg/kg/dia corresponde a uma dose 10 vezes mais baixa que a NOAEL, simulando uma dose de exposição ao DEHP mais factível com a exposição humana a esse desregulador endócrino.

Os machos e fêmeas das proles foram utilizados em dois períodos distintos: no 20º dia gestacional (GD20) ou no 90º dia pós-natal (PND90).

Os critérios de exclusão dos animais foram: se o animal apresentasse qualquer sinal de sofrimento ou alteração comportamental/patológica relevante durante o período de tratamento/crescimento, por questões éticas, o mesmo seria anestesiado e eutanasiado antes do período inicialmente previsto. Contudo, é importante destacar que não houve nenhuma situação similar à descrita anteriormente em nosso protocolo experimental.

Nos experimentos que ocorreram em GD20, as prenhes foram anestesiadas e, após a excisão dos cornos uterinos, os filhotes foram removidos. O sexo dos animais foi determinado por análise da distância anogenital e, posteriormente, pesados e decapitados (número amostral=10 animais por grupo experimental). Com o auxílio de uma lupa estereoscópica a tireoide desses animais foi coletada. Para os experimentos em PND90, as prenhes foram mantidas com o tratamento com óleo de milho ou DEHP até o nascimento dos filhotes, quando o tratamento foi interrompido. Após o desmame, os machos e fêmeas das proles foram separados por sexo (número amostral=15 animais por grupo experimental) e mantidos com ração padrão e água filtrada até completarem 90 dias de idade. Os animais foram então pesados, anestesiados e eutanasiados por decapitação. O sangue, hipotálamo, hipófise, tireoide, fígado e rim foram coletados (Figura 9).



A) Ratas Wistar prenhes foram divididas aleatoriamente em 3 grupos experimentais e receberam óleo de milho (controle) ou óleo de milho suplementado com DEHP (DEHP 0,48 e DEHP 4,8), por via oral, durante toda a gestação. B) Os animais das proles foram avaliados em dois momentos distintos: GD20 ou PND90.

Figura 9. Desenho experimental

As amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas (1260×g, 10min, 4°C) e armazenadas em *freezer* -20°C. As amostras de tecido foram armazenadas em *freezer* -80°C e, posteriormente, processadas conforme descrito a seguir.

As análises realizadas a partir dos tecidos coletados nos animais das progênes foram realizadas de forma discriminada e independente de acordo com o sexo do animal – machos controles comparados com machos expostos ao DEHP; fêmeas controle comparadas com fêmeas expostas ao DEHP.

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (CEUA 3326/2018), seguindo os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

O período de realização dos procedimentos de cópula e geração das proles ocorreu entre fevereiro de 2019 a fevereiro de 2020.

2.2 Avaliação da expressão gênica

2.2.1 Extração de RNA total

Hipotálamo, hipófise, tireoide, fígado e rim coletados nos experimentos GD20 e PND90 foram homogeneizados em Reagente TRIzol® (Invitrogen Life Technologies Carlsbad, CA, USA), utilizando o equipamento de homogeneização de tecidos Polytron® (KINEMATICA).

Conforme descrito anteriormente por Serrano-Nascimento et al.⁽⁷³⁾ Após a homogeneização, realizou-se a extração de RNA total das amostras. Adicionou-se 0,2mL de clorofórmio em cada amostra e posteriormente, a amostra foi vigorosamente vortexada até a obtenção de uma solução rósea de aspecto leitoso, e posteriormente, centrifugada a 12.000g, a 4°C por 15 minutos. Observou-se as 3 fases formadas na solução. A primeira fase aquosa, contendo o RNA, foi coletada e precipitada com isopropanol; seguiu-se a incubação em temperatura ambiente, por 15 minutos, e nova centrifugação a 12.000g, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e o precipitado, que corresponde ao RNA total, foi lavado com etanol 95% e centrifugado a 6.000g, a 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, o precipitado ressuspenso em 30µL de água Milli-Q® estéril. A concentração de RNA de cada amostra foi obtida a partir da leitura no equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific™).

2.2.2 Reação de transcrição reversa

A síntese de DNA complementar foi realizada a partir de 500ng do RNA total extraído e quantificado de cada amostra, com volume final de reação de 20µL. Foram adicionados: oligo dT (100µg/mL), 10mM de cada dNTP, 5X First-Strand *buffer* e 1µL de enzima (200U/µL) M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação foi realizada em um termociclador por 10 minutos a 65°C, seguido por 60 minutos a 42°C e 95°C por 10 minutos, conforme descrito anteriormente.⁽⁷³⁾

2.2.3 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

Para a realização do ensaio de *real-time* PCR, utilizou-se 1µL do produto de RT em 10µL de reação final, contendo 200nM de cada par de *primers* designados para os genes de interesse: a expressão gênica dos fatores transcricionais tireoidianos (*Nkx2.1*, *Pax8*, *Foxe1*), marcadores de diferenciação tireoidiana (*Slc5a5*, *Tshr*, *Tpo*, *Tg*, *Mct8*), histonas acetiltransferases (*Hat1*, *Kat2b*, *Kat5b*, *Kat14*), histonas deacetilases (*Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac3*, *Hdac6*, *Sirt1*), histona metilases (*Prmt1*, *Prmt2*, *Prmt5*, *Ezh1*, *Ezh2*), histonas desmetilases (*Kdm1a*, *Kdm5b*, *Kdm5c*), enzimas antioxidantes (*Sod1*, *Sod2* e *Cat*), desidases tipo 1 (*Dio1*) e tipo 3 (*Dio3*), genes hipofisários/hipotalâmicos (*Tshb*, *Tsha*, *Trh*), enzimas hepáticas (*Ttr*, *Ugt1a1*, *Ugt1a6*) foi avaliada através de ensaios de RT-qPCR, conforme descrito anteriormente.⁽⁷³⁾ A expressão dos genes *Gapdh* ou *Rpl19* foi utilizada como controle endógeno em cada reação.

A reação de PCR foi realizada em aparelho QuantStudio 6 *real-time* PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições de ciclagem e temperatura: 50°C por 2min, 95°C por 10min, e 40 repetições do ciclo de 95°C por 20s e 60°C por 1min. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata. As curvas de *melting* foram analisadas para confirmar a amplificação de um único produto na PCR. As análises quantitativas foram realizadas utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.⁽⁷⁴⁾

2.3 Avaliação da expressão proteica

2.3.1 Extração de proteínas totais

Hipotálamo, hipófise e tireoide dos animais dos experimentos GD20 e PND90 foram homogeneizados com o auxílio do equipamento Polytron® (KINEMATICA) em tampão de lise RIPA (Tris 50mM, pH 7.5; NaCl 150mM, Nonidet P-40 1%; deoxicolato de sódio 0,5%; EDTA 1mM e SDS 0,1%) suplementado com inibidor de protease (*Protease Inhibitor Tablets*, Thermo Scientific Pierce™).

As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10min a 4°C. As concentrações de proteína total foram determinadas no leitor de microplacas Varioskan LUX™ (Thermo Fisher Scientific™) utilizando o reagente Bradford (Bio-Rad).

2.3.2 Western blotting

De maneira geral, 30µg de cada amostra foram utilizados nos ensaios de *western blotting*. Para tanto, adicionou-se tampão Laemmli 2x (65.8mM Tris-HCl, pH 6.8, 2,1% SDS, 26,3% glicerol, 0,01% bromofenol azul, β-mercaptoetanol) em cada amostra. As amostras foram aquecidas a 37°C por 40min ou 95°C por 5min e, então, fez-se a eletroforese em géis SDS-PAGE (6, 10 ou 15%). Posteriormente, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad), que foram bloqueadas com solução de leite (5%) e incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários específicos para a detecção de fatores transcricionais tireoidianos (PAX8, NKX2.1), fatores de diferenciação tireoidiana (NIS, TG, TSHR, TPO), proteínas hipofisárias (TSHA, TSHB), proteínas hipotalâmicas (TRH), histonas com marcações pós-traducionais específicas em lisinas (H3Ac, H4Ac, H3K9me3, H3K27me3). A expressão de GAPDH ou o Ponceau S foram utilizados como normalizador.

Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho por 1 hora, em temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas e expostas ao reagente quimioluminescente ECL (Bio-Rad) por 1min. A reação foi captada pelo equipamento de coleta de imagens ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

Os anticorpos utilizados e suas informações estão informadas na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados nos ensaios de *western blotting*

Anticorpos primários	Fonte primária	Diluição	Fabricante	Anticorpo secundário	Diluição
TRH	Coelho	1:1000	Abcam	Anti-coelho	1:4000
TSHα	Coelho	1:3000	NIH	Anti-coelho	1:4000
TSHβ	Coelho	1:3000	NIH	Anti-coelho	1:4000
TSHR	Coelho	1:1000	Abcam	Anti-coelho	1:4000
NIS	Coelho	1:3000	Doado por Nancy Carrasco	Anti-coelho	1:4000
TG	Camundongo	1:2000	Abcam	Anti-camundongo	1:4000
TPO	Camundongo	1:500	Santa Cruz	Anti-camundongo	1:4000
MCT8	Coelho	1:1000	Abcam	Anti-coelho	1:4000
TTF-1	Coelho	1:5000	Santa Cruz	Anti-coelho	1:4000
PAX8	Camundongo	1:500	Santa Cruz	Anti-camundongo	1:4000
H3AC	Coelho	1:2500	Cell Signaling	Anti-coelho	1:4000
H4AC	Coelho	1:3000	Cell Signaling	Anti-coelho	1:4000

continua...

...continuação

H3K9me3	Coelho	1:2000	Cell Signaling	Anti-coelho	1:4000
H3K27me3	Camundongo	1:3000	Cell Signaling	Anti-camundongo	1:4000
GAPDH	Camundongo	1:1000	Santa Cruz	Anti-camundongo	1:4000

TRH: hormônio liberador de tireotrofina; TSH α : subunidade alfa do hormônio estimulante da tireoide; TSH β : subunidade beta do hormônio estimulante da tireoide; TSHR: receptor do hormônios estimulante da tireoide; NIS: simportador sódio-iodo; TG: tireoglobulina; TPO: tireoperoxidase; MCT8: transportador de monocarboxilato 8; TTF-1: fator de transcrição da tireoide 1; PAX8: *paired box* 8; H3AC: histona H3 Acetilada; H4AC: histona H4 acetilada; H3K9me3: tri-metilação no nono resíduo de lisina da histona H3; H3K27me3: tri-metilação da lisina 27 da histona H3; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Fez-se a análise densitométrica das bandas utilizando-se o *software* Image J. 1.4 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MA, EUA).

2.4 Dosagens séricas de hormônios

A concentração sérica de T3, T4 e TSH do soro dos animais, expostos ou não ao tratamento com ftalato DEHP, de ambos os sexos, foi determinado a partir de ensaios ELISA, seguindo as instruções do fabricante Roche Diagnostics.

2.5 Análise estatística

Todos os valores numéricos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) dos valores obtidos em cada uma das análises/experimentos.

As comparações entre dois grupos foram realizadas através do *Student's unpaired t test* e entre 3 grupos por meio da análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguido do pós-teste Student–Newman–Keuls, utilizando-se o *software* Prism Graph Pad – Version: 5.0. A significância estatística foi definida pelos valores-p < 0,05.

3 RESULTADOS

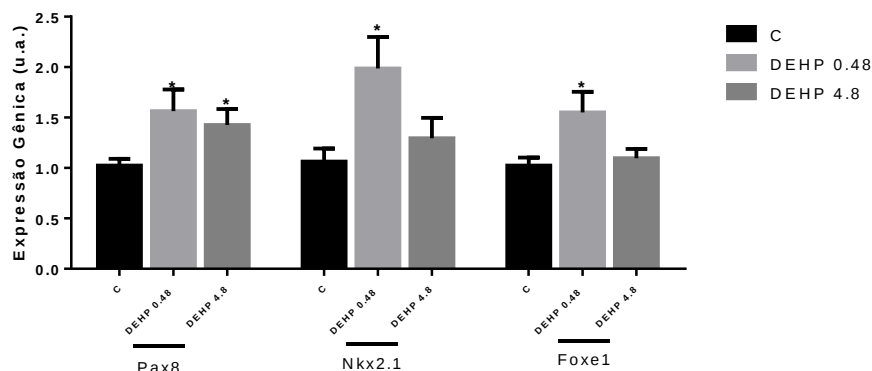
Conforme demonstrado na seção anterior, este estudo avaliou o impacto da exposição materna a diferentes doses do ftalato DEHP, durante o período intrauterino, sobre a função do eixo HHT dos machos e fêmeas da geração F1, durante dois períodos distintos: ao final da gestação (GD20) e durante a vida adulta (PND90). As prenhes foram divididas em 3 grupos que serão representados nos gráficos a seguir como: Grupo Controle (C), grupo tratado com 0,48mg de DEHP/kg/dia (DEHP 0,48) e grupo tratado com 4,8mg de DEHP/kg/dia (DEHP 4,8).

3.1 Efeitos da exposição intrauterina ao ftalato di (2-etil hexil) ftalato nas fêmeas da geração F1

3.1.1 Resultados da prole fêmea ao final da gestação

3.1.1.1 Avaliação da expressão gênica na tireoide das fêmeas

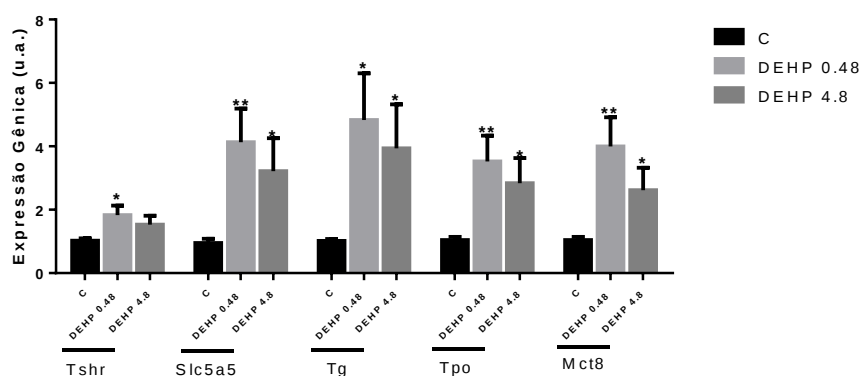
A exposição durante o período intrauterino ao DEHP aumentou a expressão gênica dos fatores transcricionais na tireoide da prole fêmea GD20. Conforme demonstrado na figura 10, a expressão dos genes *Nkx2.1* e *Foxe1* apresentaram-se significativamente aumentadas apenas na menor dose de tratamento, enquanto a expressão do gene *Pax8* apresentou-se aumentada em ambas as doses de tratamento.



A expressão gênica (*Pax8*, *Nkx2.1* e *Foxe1*) foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=8-11$.

Figura 10. Avaliação da expressão gênica dos fatores transcricionais tireoidianos em fêmeas da geração F1, ao final da gestação, dos grupos Controle e expostos ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

A exposição intrauterina ao ftalato DEHP aumentou significativamente a expressão gênica dos fatores de diferenciação tireoidiana (*Slc5a5*, *Tshr*, *Tpo*, *Tg*) e secreção de HTs (*Mct8*) na tireoide das fêmeas da geração F1, em GD20, em relação aos animais do Grupo Controle. Contudo, vale destacar que, a expressão do mRNA de *Tshr* apresentou aumento apenas na menor dose de tratamento. Enquanto a expressão dos genes *Slc5a5*, *Tg*, *Tpo* e *Mct8* apresentou-se aumentada, nos grupos expostos ao DEHP, em ambas as doses de tratamento (Figura 11).



A expressão gênica (*Tshr*, *Slc5a5*, *Tg*, *Tpo* e *Mct8*) foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=8-11$.

Figura 11. Avaliação da expressão gênica da tireoide em fêmeas da geração F1, ao final da gestação, dos grupos controle e expostos ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.1.1.2 Resumo dos resultados obtidos nas fêmeas da geração F1 ao final da gestação

A figura 12 apresenta um resumo esquemático dos resultados obtidos nas fêmeas da geração F1, em GD20, que foram expostas ao DEHP durante o período intrauterino.

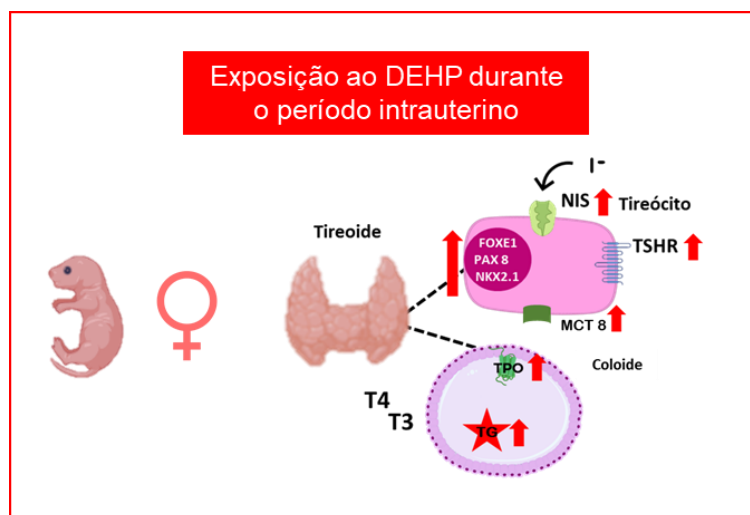
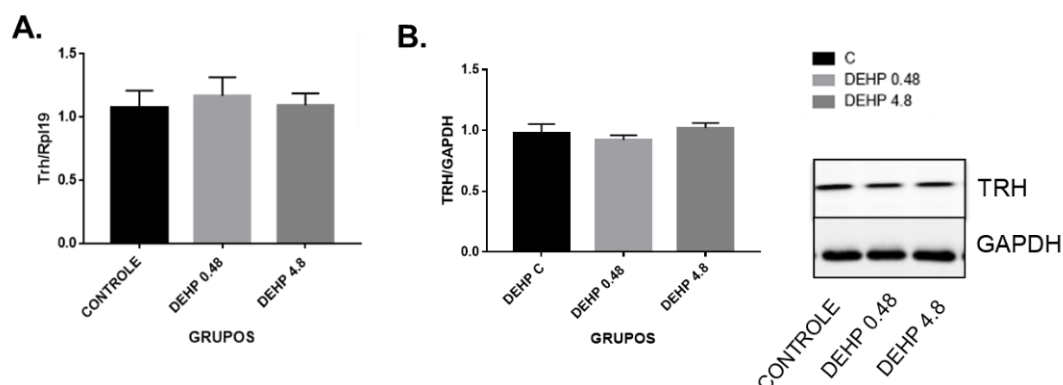


Figura 12. Esquema dos achados encontrados nas fêmeas da geração F1, no GD20, de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2 Resultados obtidos durante a vida adulta

3.1.2.1 Avaliação da expressão gênica e proteica do hipotálamo das fêmeas

A exposição intrauterina ao DEHP, em ambas as doses de tratamento, não alterou de maneira significativa a expressão gênica (Figura 13A) e proteica (Figura 13B) do TRH no hipotálamo das fêmeas adultas da geração F1.

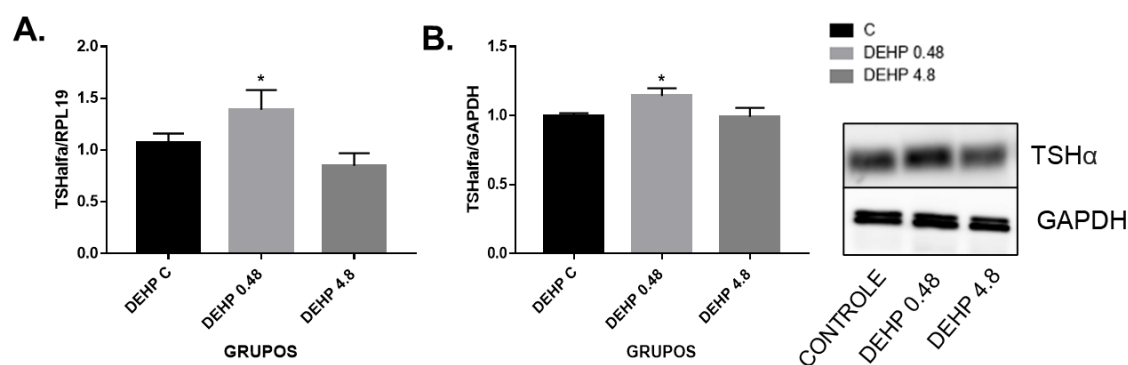


A. A expressão gênica (*Trh*) foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. **B.** Avaliação da expressão proteica do TRH avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=12–15 animais.

Figura 13. Avaliação da expressão gênica e proteica do TRH no hipotálamo das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.2 Avaliação da expressão gênica e proteica da hipófise das fêmeas

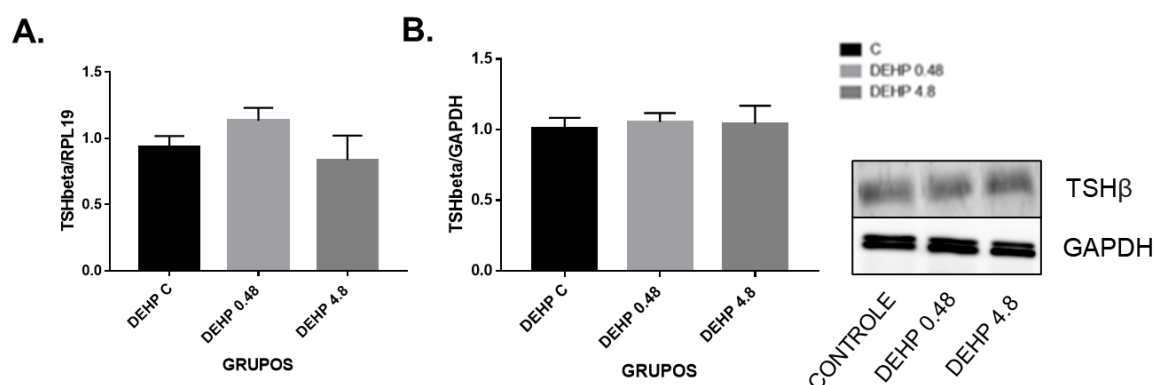
A exposição intrauterina ao DEHP, na menor dose de tratamento, aumentou de maneira significativa a expressão gênica (Figura 14A) e proteica (Figura 14B) da subunidade alfa do TSH na hipófise das fêmeas adultas da prole.



A. A expressão gênica da subunidade alfa do TSH (*Tshα*) foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. **B.** A expressão proteica da subunidade alfa do TSH (*TSHα*) foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=12–16.

Figura 14. Avaliação da expressão gênica e proteica do tireotrofina alfa na hipófise das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

A exposição intrauterina ao ftalato DEHP, não alterou a expressão gênica (Figura 15A) e proteica (Figura 15B) da subunidade β do TSH (*Tshβ*) na hipófise das fêmeas adultas da prole.

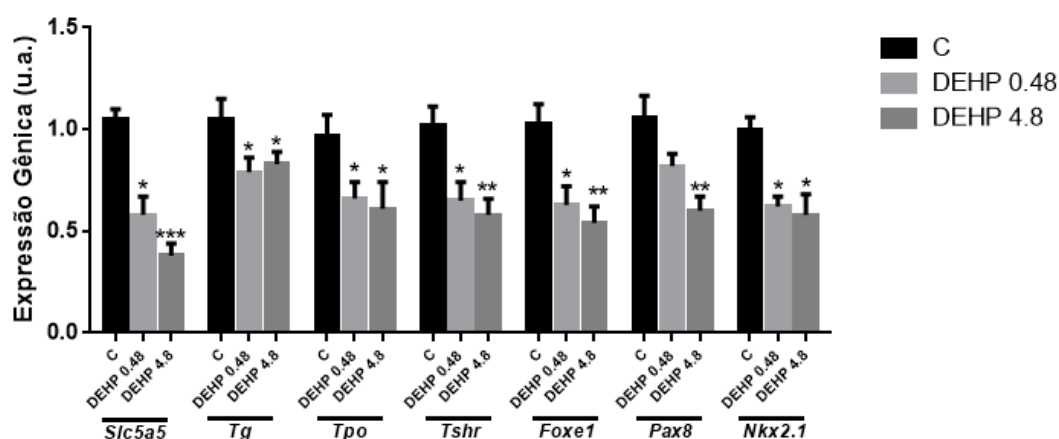


A. A expressão gênica da subunidade beta do TSH (Tshβ) foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. **B.** A expressão proteica da subunidade beta do TSH (TSHβ) foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=10–17.

Figura 15. Avaliação da expressão gênica e proteica do tireotrofina beta na hipófise das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.3 Avaliação da expressão de genes e proteínas envolvidos na biossíntese de hormônios tireoidianos na tireoide das fêmeas

A exposição intrauterina ao DEHP alterou a expressão de genes que codificam os fatores transcricionais tireoidianos e algumas proteínas envolvidas na síntese e secreção de HTs na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 (Figura 16).

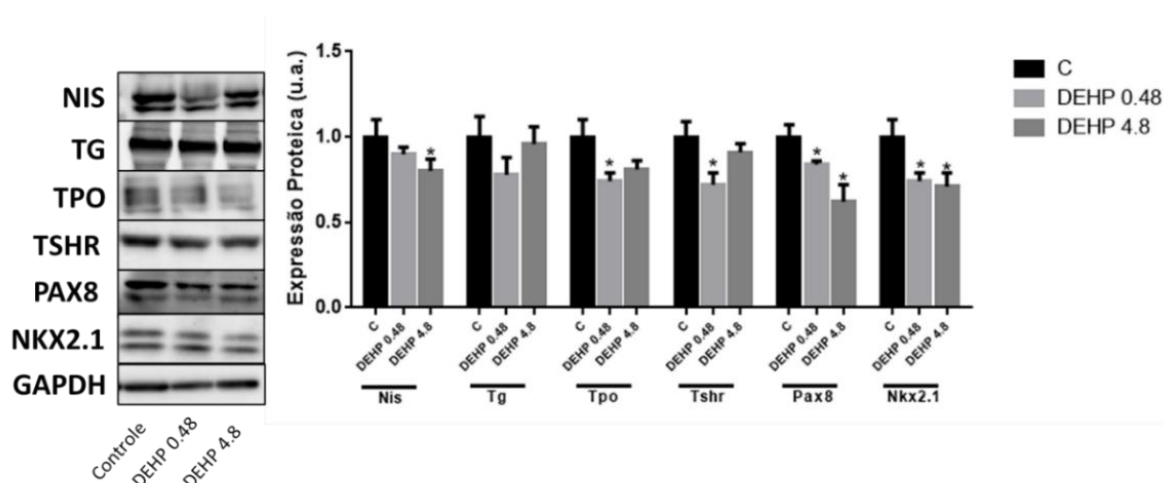


A expressão gênica de *Slc5a5*, *Tg*, *Tpo*, *Tshr*, *Pax8*, *Nkx2.1* e *Foxe1* foi avaliada por *real-time* PCR, e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=6-9.

Figura 16. Avaliação da expressão gênica na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

Houve uma diminuição significativa da expressão gênica dos fatores transcricionais *Foxe1* e *Nkx2.1* em ambas as doses de tratamento, enquanto a expressão do gene de *Pax8* apresentou-se diminuída apenas na maior dose de exposição ao DEHP. Além disso, exposição intrauterina ao ftalato DEHP reduziu significativamente a expressão dos mRNAs de *Slc5a5*, *Tg*, *Tpo*, *Tshr*, e *Mct8*, em ambas as doses de tratamento, em relação aos animais do Grupo Controle.

A expressão proteica de NIS apresentou redução significativa apenas na maior dose de exposição ao DEHP. Já as proteínas TPO e TSHR apresentaram expressão diminuída apenas na menor dose de exposição. A expressão proteica dos fatores transcricionais PAX8 e NKX2.1 apresentou-se reduzida em ambas as doses de tratamento avaliadas. Finalmente, não houve alteração na expressão proteica de TG (Figura 17).



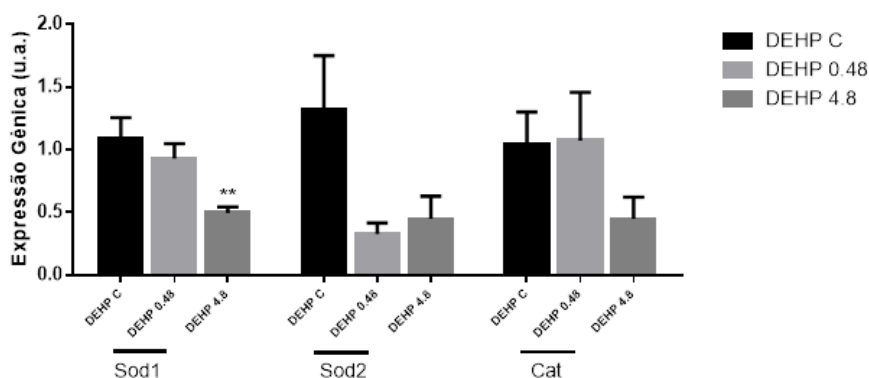
A expressão proteica de NIS, TG, TPO, TSHR, PAX8, NKX2.1 foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$ versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls), $n=6-9$.

Figura 17. Avaliação da expressão proteica na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.4 Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide das fêmeas

A exposição ao ftalato DEHP, durante o período intrauterino, provocou redução significativa da expressão do gene *Sod1* na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas à dose 4,8mg de DEHP/kg/dia. A expressão dos genes

Sod2 e *Cat* não apresentou alteração significativa em nenhuma das doses avaliadas (Figura 18).



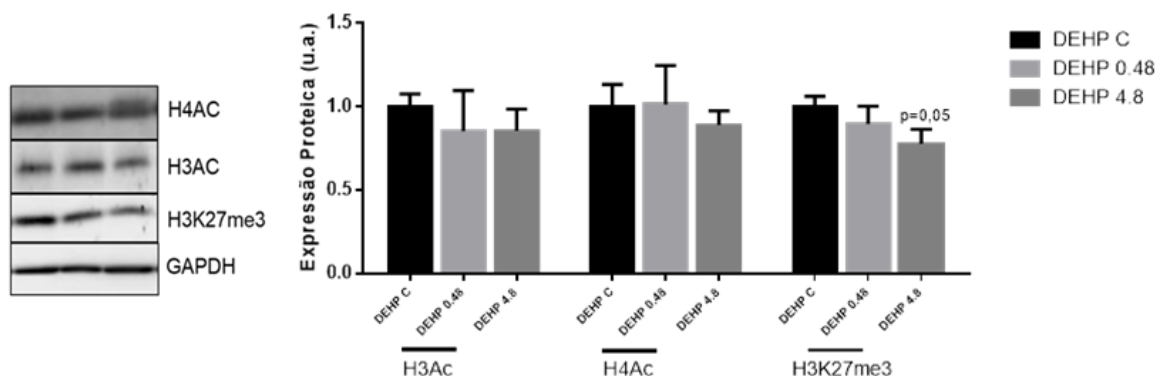
A expressão gênica de *Sod1*, *Sod2* e *Cat* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. ** $p < 0,01$ versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 18. Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.5 Avaliação de alterações epigenéticas na tireoide das fêmeas

3.1.2.5.1 Modificações pós-traducionais em histonas das fêmeas

Não houve alteração significativa no conteúdo de histonas H3 e H4 acetiladas na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ao DEHP durante o período intrauterino. Entretanto, nesses animais, a expressão proteica da histona H3 trimetilada na lisina 27 apresentou tendência de diminuição ($p=0,05$), na maior dose de tratamento (Figura 19).

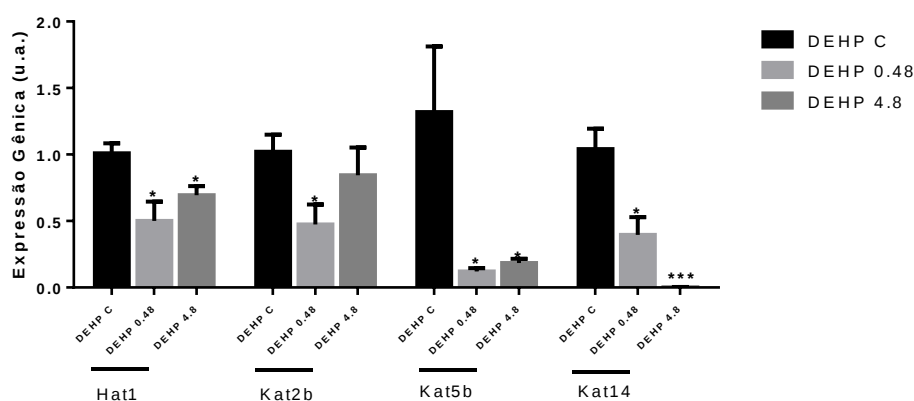


A expressão proteica de H3AC, H4AC, H3K27me3 foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=6-9.

Figura 19. Avaliação de modificações pós-traducionais nas histonas H3 e H4 na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.5.2 Avaliação da expressão gênica de acetiltransferases de histonas das fêmeas

A exposição intrauterina ao DEHP durante o período intrauterino diminuiu a expressão gênica de enzimas histona acetiltransferases. Nas fêmeas da geração F1 que foram expostas ao tratamento com DEHP, os genes *Hat1*, *Kat5b* e *Kat14* apresentaram redução significativa de sua expressão, em ambas as doses de tratamento, enquanto a expressão do gene *Kat2b* apresentou-se expressão reduzida apenas na dose 0,48mg/kg/dia (Figura 20).

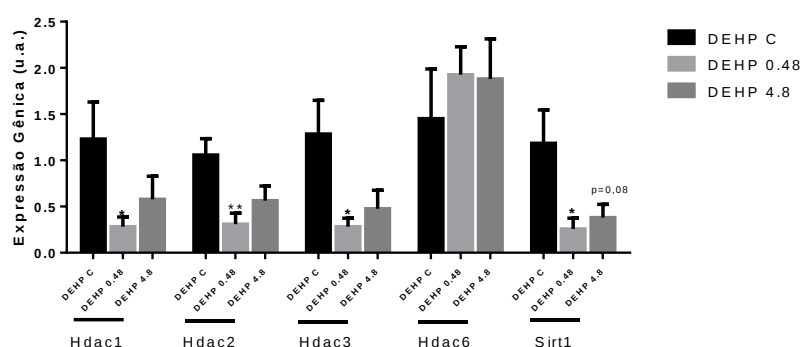


A expressão gênica de *Hat1*, *Kat2b*, *Kat5b* e *Kat14* foi avaliada por *real-time* PCR. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=4-5.

Figura 20. Avaliação da expressão gênica de enzimas histonas acetiltransferases na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.5.3 Avaliação da expressão gênica de deacetilases de histonas das fêmeas

A expressão dos genes *Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac3* e *Sirt1* apresentou-se significativamente reduzida na menor dose de exposição ao DEHP, sem alterações significativas na maior dose de tratamento. Já o gene *Hdac6* não apresentou alteração significativa em nenhuma dose estudada (Figura 21).

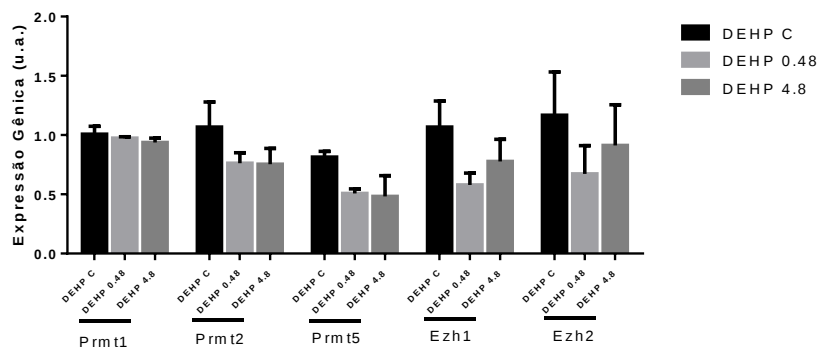


A expressão gênica de *Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac3*, *Hdac6* e *Sirt1* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. *p<0,05, **p<0,01 versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=4-5.

Figura 21. Avaliação da expressão gênica de enzimas histonas deacetilases na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.5.4 Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas das fêmeas

Não foram encontradas alterações significativas na expressão gênica das metilases de histonas na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ao DEHP durante o período intrauterino, em nenhuma das doses avaliadas (Figura 22).

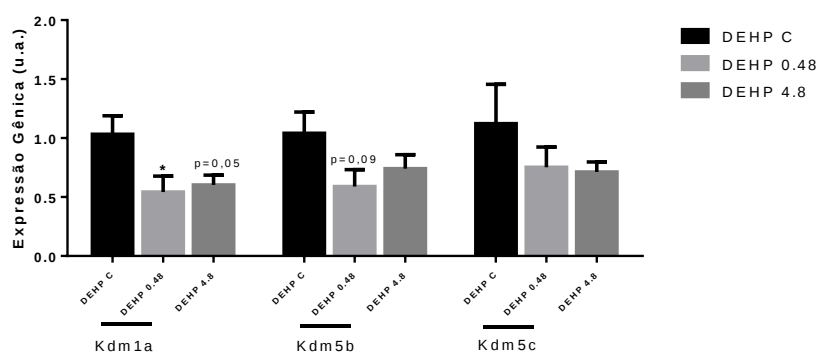


A expressão gênica de *Prmt1*, *Prmt2*, *Prmt5*, *Ezh1* e *Ezh2* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=4-5.

Figura 22. Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.5.5 Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas das fêmeas

A expressão do gene *Kdm1a* diminuiu significativamente na tireoide da prole fêmea adulta exposta ao DEHP durante o período intrauterino na dose 0,48mg/kg/dia. As expressões dos mRNAs de *Kdm5b* e *Kdm5c*, não apresentaram alteração significativa em nenhuma das doses avaliadas (Figura 23).

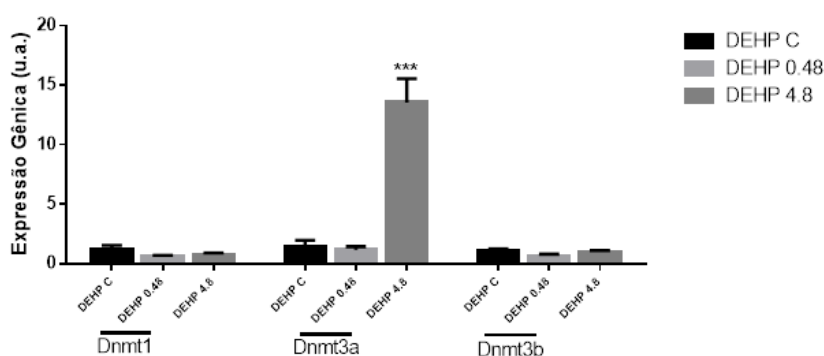


A expressão gênica de *Kdm1a*, *Kdm5b*, *Kdm5c* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. *p<0,05 versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=4-5.

Figura 23. Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.5.6 Avaliação da expressão gênica de DNA metiltransferases das fêmeas

A expressão gênica de *Dnmt1* não foi alterada significativamente, enquanto que a expressão do mRNA de *Dnmt3a* apresentou aumento significativo na maior dose de tratamento. Adicionalmente, a expressão gênica de *Dnmt3b* não apresentou alteração significativa na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 em nenhuma das doses de tratamento (Figura 24).

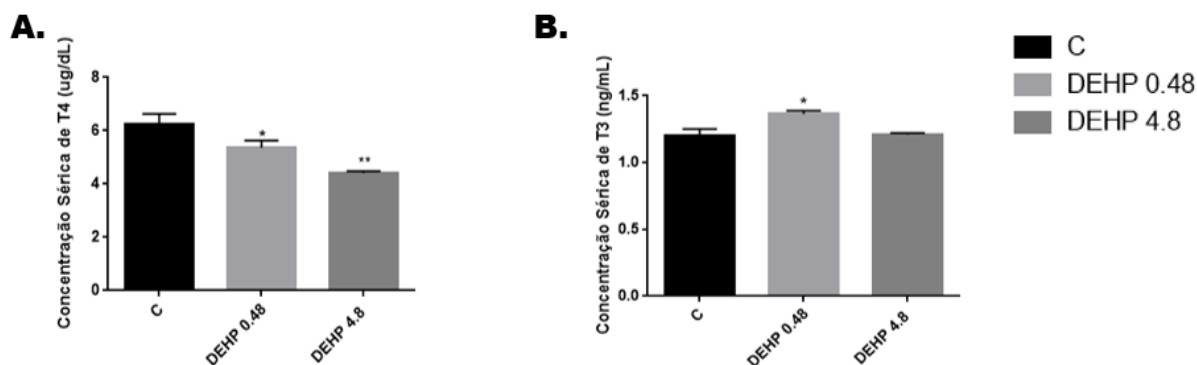


A expressão gênica de *Dnmt1*, *Dnmt3a* e *Dnmt3b* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. *** $p < 0,001$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 24. Avaliação da expressão gênica das DNA metiltransferases na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.6 Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos das fêmeas

A exposição intrauterina ao DEHP reduziu significativamente os níveis circulantes de T4 no soro das fêmeas adultas da geração F1, em ambas as doses de tratamento avaliadas (Figura 25A). Nos níveis circulantes de T3, observou-se aumento significativo apenas na menor dose de exposição ao DEHP (Figura 25B).

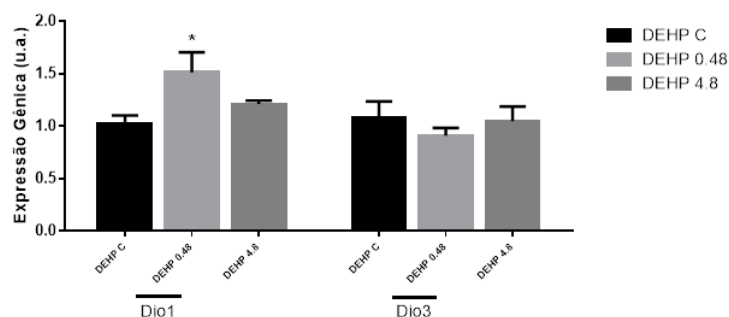


Os valores estão expressos como média±SEM, em µg/dL para o T4 e ng/mL para o T3. *p<0,05, **p<0,01 versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=5-6.

Figura 25. Concentração sérica dos níveis de hormônios tireoidianos em fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.1.2.7 Avaliação da expressão gênica do fígado das fêmeas

A exposição intrauterina ao DEHP alterou a expressão gênica no fígado das fêmeas adultas da geração F1. Nesse sentido, a expressão gênica da *Dio1* apresentou-se significativamente aumentada, apenas na menor dose de tratamento quando comparada ao Grupo Controle. Contudo, não foram observadas diferenças significativas na análise da expressão gênica do mRNA da *Dio3* (Figura 26).

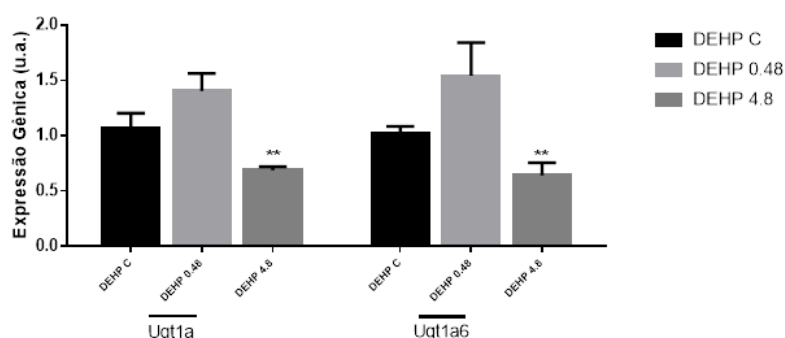


A expressão gênica de *Dio1* e *Dio3* foi avaliada por *real-time* PCR e foi normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias *p<0,05 versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=7-10.

Figura 26. Avaliação da expressão gênica das desidases no fígado de fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

A partir da análise da expressão gênica de enzimas hepáticas envolvidas na metabolização de HTs, observou-se que, tanto a expressão do mRNA de *Ugt1a*, quanto do mRNA de *Ugt1a6* apresentaram redução significativa nas fêmeas

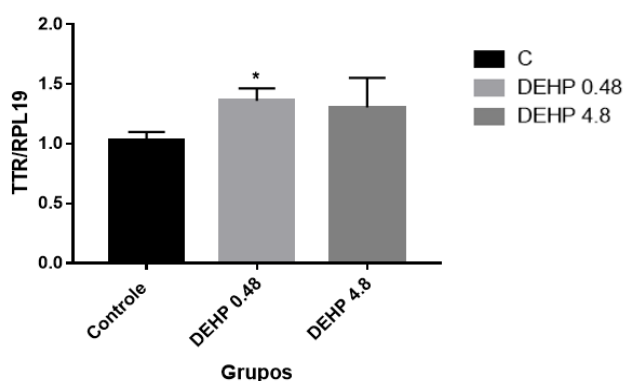
adultas da geração F1 de ratas expostas ao DEHP durante o período intrauterino, especialmente na maior dose de tratamento (Figura 27).



A expressão gênica de *Ugt1a* e *Ugt1a6* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias ** $p < 0,01$ versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n = 6-10$.

Figura 27. Avaliação da expressão gênica das glucoronosiltransferases, envolvidas na metabolização periférica de hormônios tireoidianos, no fígado das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

Finalmente, o tratamento com DEHP, durante o período intrauterino, aumentou a expressão gênica de transtirretina (*Ttr*) no fígado das fêmeas adultas da prole, especialmente na menor dose de tratamento (Figura 28).



A expressão gênica de *Ttr* foi avaliada por *real-time* PCR. A expressão do gene foi normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias * $p < 0,05$ versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n = 6-10$.

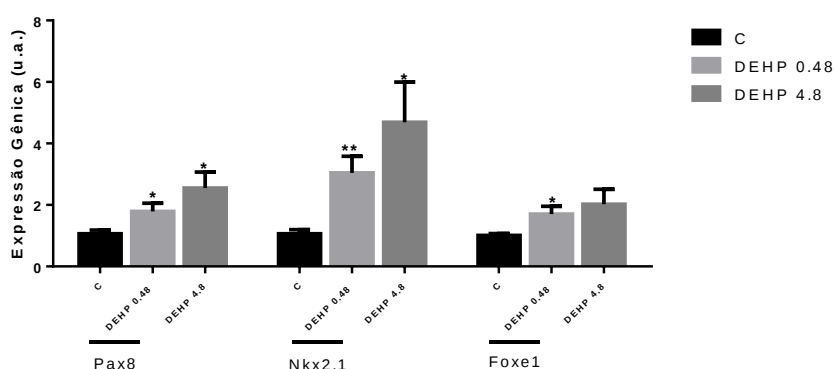
Figura 28. Avaliação da expressão gênica da TTR no fígado das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.2 Efeitos da exposição intrauterina ao di (2-etil hexil) ftalato nos machos da geração F1

3.2.1 Resultados da prole macho ao final da gestação

3.2.1.1 Expressão de genes envolvidos na síntese e secreção de hormônios tireoidianos

Conforme demonstrado na figura 30, a exposição materna ao DEHP, durante a gestação, alterou a expressão gênica dos fatores transcricionais tireoidianos dos machos da geração F1, em GD20. Dessa maneira, a expressão dos mRNAs de *Pax8* e *Nkx2.1* apresentou-se significativamente aumentada, em ambas as doses de tratamento, enquanto a expressão do gene de *Foxe1* apresentou-se aumentada apenas na dose 0,48mg/kg/dia de DEHP.

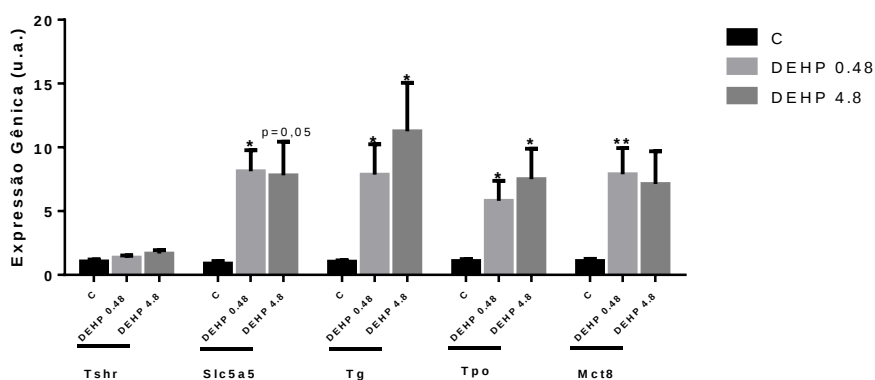


A expressão gênica de *Pax8*, *Nkx2.1* e *Foxe1* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=8-11$.

Figura 30. Avaliação da expressão gênica de fatores transcricionais da tireoide de machos da geração F1, ao final da gestação, provenientes de ratas expostas ou não ao ftalato di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

A exposição intrauterina ao DEHP aumentou de maneira significativa a expressão da maioria dos fatores de diferenciação tireoidiana (*Slc5a5*, *Tpo*, *Tg*) e secreção de HTs (*Mct8*). Conforme demonstrado na figura 31, os genes *Slc5a5* e *Mct8* apresentaram aumento significativo da sua expressão, apenas na menor dose de tratamento, enquanto o conteúdo de mRNA de *Tg* e *Tpo* apresentou-se aumentado, em

ambas as doses de tratamento. Já a expressão do mRNA de *Tshr* não apresentou alteração significativa em nenhuma das doses avaliadas.



A expressão gênica de *Tshr*, *Slc5a5*, *Tg*, *Tpo* e *Mct8* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=8-11$.

Figura 31. Avaliação da expressão gênica de fatores de diferenciação da tireoide de machos da geração F1, ao final da gestação, provenientes de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.1.2 Resumo dos resultados obtidos nos machos da geração F1 no GD20

A figura 32 apresenta um resumo esquemático dos resultados encontrados nos machos da geração F1, em GD20, expostos ao DEHP durante o período intrauterino.

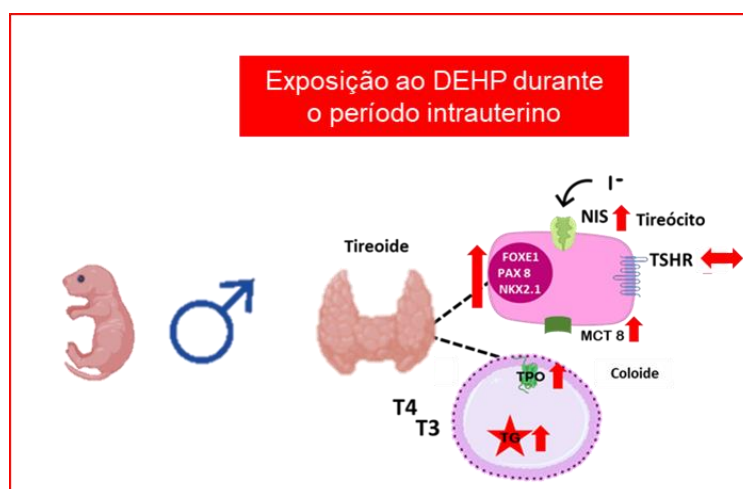
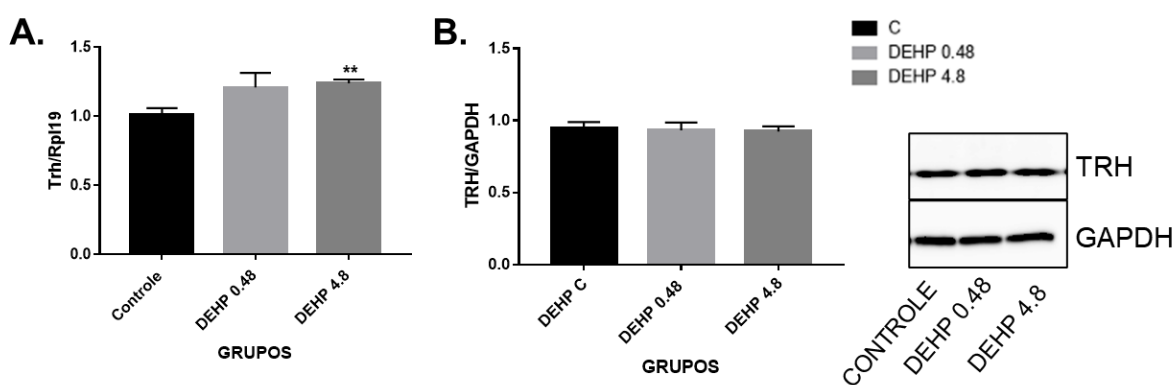


Figura 32. Esquema dos achados encontrados nos machos da geração F1, no 20º dia pós-natal, de ratas expostas ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.2.2 Resultados da prole macho durante a vida adulta

3.2.2.1 Avaliação da expressão gênica e proteica do hipotálamo dos machos

A exposição intrauterina ao ftalato DEHP, especialmente na maior dose de tratamento, aumentou significativamente a expressão gênica de *Trh* no hipotálamo dos machos adultos da prole (Figura 33A). Contudo, a avaliação de expressão proteica de TRH não indicou alterações significativas em nenhuma das doses avaliadas, quando comparadas ao Grupo Controle (Figura 33B).

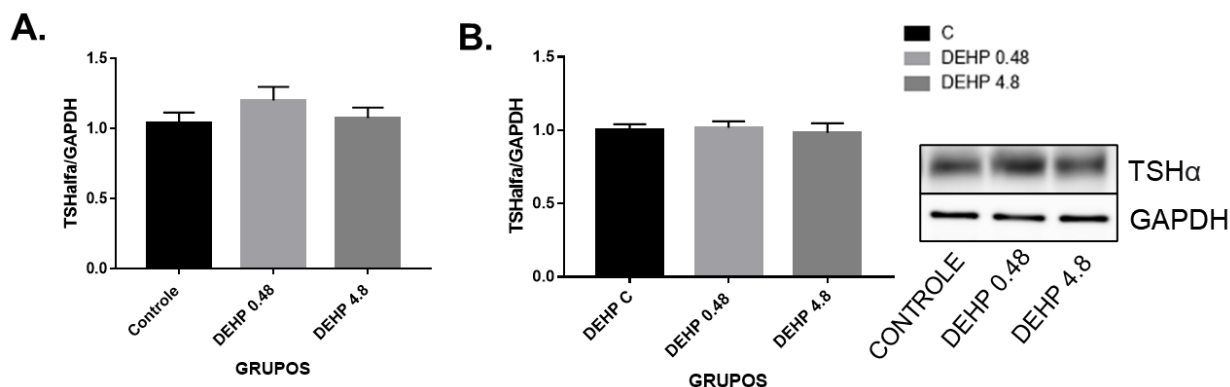


A. A expressão gênica de *Trh* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. **B.** A expressão proteica de TRH foi avaliada por *western blot* e normalizada pelo GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias ** $p < 0,01$ versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n = 8-15$.

Figura 33. Avaliação da expressão gênica e proteica do TRH no hipotálamo dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

3.2.2.2 Avaliação da expressão gênica e proteica da hipófise dos machos

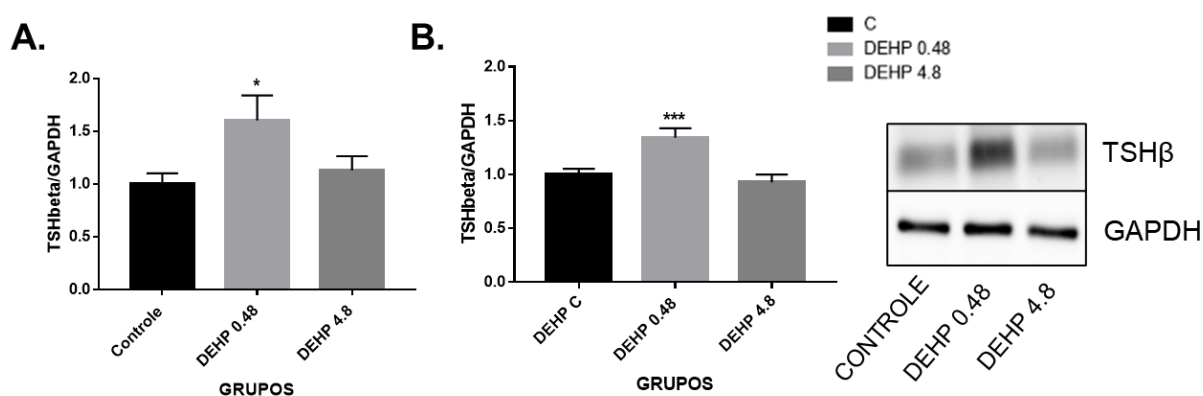
A exposição intrauterina ao DEHP não alterou a expressão gênica e proteica da subunidade alfa do TSH na hipófise dos machos adultos da geração F1 (Figura 34).



A. A expressão gênica de *Tsha* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Gapdh*. **B.** A expressão proteica de TSHα foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias $p>0,05$ (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=17-18$.

Figura 34. Avaliação da expressão gênica e proteica da subunidade alfa do tireotrofina na hipófise dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

Quando comparada ao controle, a expressão gênica da subunidade beta do TSH apresentou-se aumentada nos animais que foram expostos à menor dose de tratamento com DEHP durante a gestação (Figura 35A). Coerentemente, observou-se um aumento significativo no conteúdo proteico da subunidade beta do TSH nos animais que foram expostos à dose de 0,48mg/kg/dia durante o período intrauterino. Por outro lado, não houve alteração significativa da expressão gênica ou proteica da subunidade beta do TSH nos animais expostos à maior dose de tratamento com DEHP (Figura 35B).

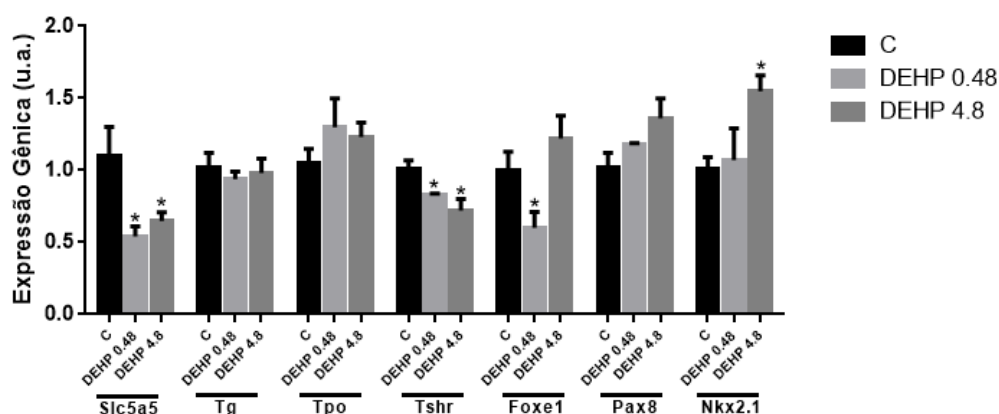


A. A expressão gênica da subunidade beta do TSH (*Tshβ*) foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Gapdh*. **B.** A expressão proteica (TSHβ) foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias * $p<0,05$; *** $p<0,001$ versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=13-15$.

Figura 35. Avaliação da expressão gênica e proteica da subunidade beta do tireotrofina na hipófise de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.3 Avaliação da expressão de genes e proteínas envolvidos na biossíntese de hormônios tireoidianos na tireoide dos machos

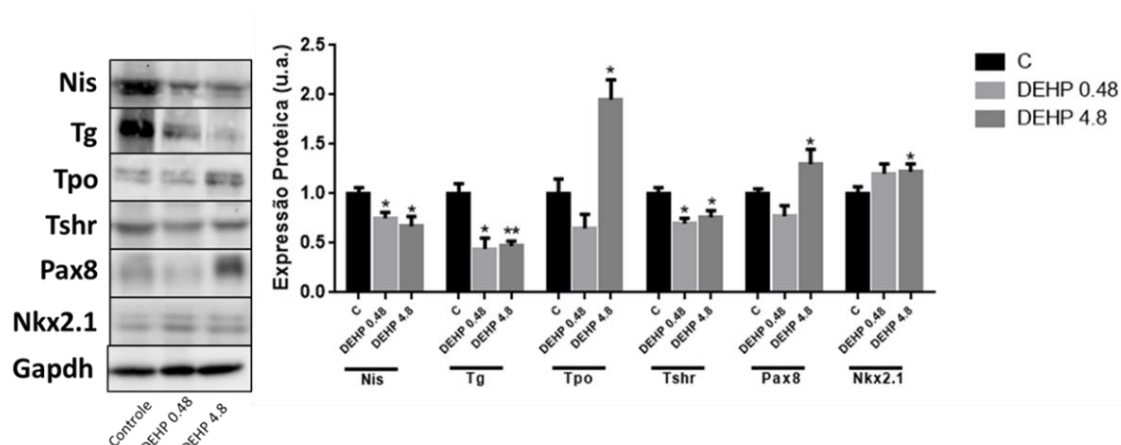
Conforme demonstrado na figura 36, a exposição intrauterina ao DEHP alterou a expressão gênica da tireoide dos machos adultos da geração F1. A expressão do mRNA de *Foxe1* diminuiu significativamente na dose de 0,48mg de DEHP/kg/dia. Por outro lado, a expressão gênica de *Nkx2.1* apresentou-se aumentada na dose de 4,8mg de DEHP/kg/dia. Contudo, não foram observadas alterações significativas na expressão do gene de *Pax8* em nenhuma das doses avaliadas. Enquanto isso, ambas as doses de exposição intrauterina ao DEHP reduziram significativamente a expressão gênica de *Slc5a5* e *Tshr*. A expressão gênica de *Tg* e *Tpo* não foi alterada de maneira significativa em nenhuma das doses avaliadas.



A expressão gênica de *Slc5a5*, *Tg*, *Tpo*, *Tshr*, *Foxe1*, *Pax8*, *Nkx2.1* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$ versus C (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=8-11$.

Figura 36. Avaliação da expressão gênica da tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

Quanto à expressão proteica, o tratamento intrauterino com DEHP, em ambas as doses, reduziu a expressão proteica de NIS, TG e TSHR nos machos adultos da geração F1. Por outro lado, esses mesmos animais apresentaram aumento significativo da expressão das proteínas TPO, NKX2.1 e PAX8, apenas na maior dose de tratamento com DEHP (Figura 37).

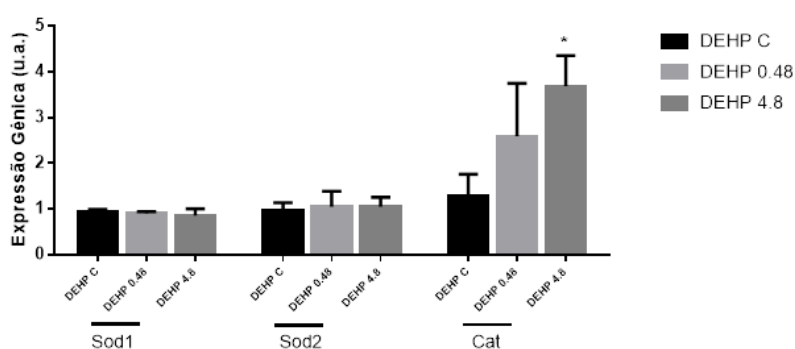


A expressão proteica de NIS, TG, TPO, TSHR, PAX8, NKX2.1 foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=11-12$.

Figura 37. Avaliação da expressão proteica da tireoide dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.4 Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide dos machos

A exposição intrauterina à maior dose de DEHP alterou significativamente a expressão do gene *Cat* na tireoide da prole de machos adultos (PND90) da geração F1. Contudo, não houve alteração significativa da expressão dos mRNAs de *Sod1* e *Sod2* (Figura 38).



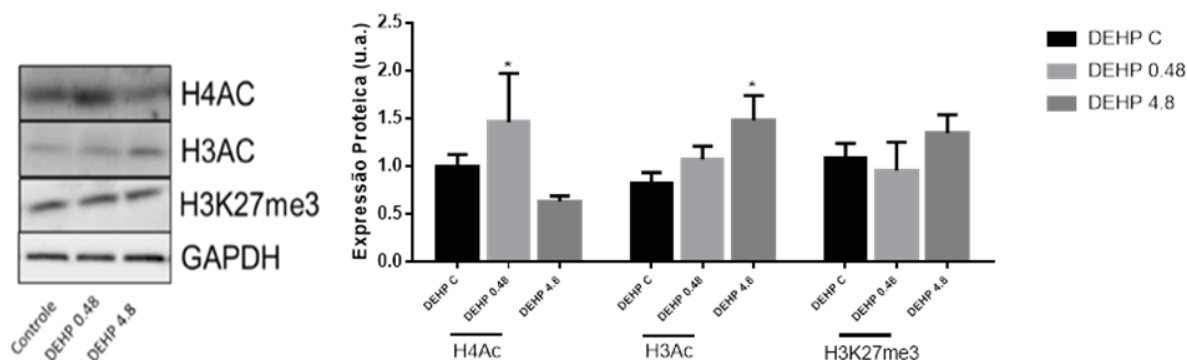
A expressão gênica de *Sod1*, *Sod2* e *Cat* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p<0,05$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=6-10$.

Figura 38. Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.5 Avaliação de alterações epigenéticas na tireoide dos machos

3.2.2.5.1 Modificações pós-traducionais em histonas dos machos

A exposição intrauterina ao DEHP aumentou significativamente a acetilação da histona H4 nos animais expostos à menor dose de tratamento. Além disso, a acetilação da histona H3 apresentou-se aumentada nos animais expostos à maior dose de DEHP. Por outro lado, o conteúdo proteico de histona H3 trimetilada na lisina 27 não foi alterado pela exposição ao DEHP, em nenhuma das doses de avaliadas (Figura 39).

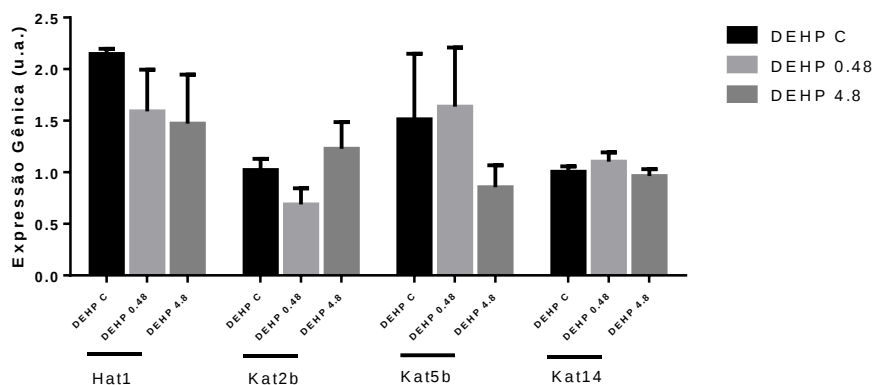


A expressão proteica de H4Ac, H3Ac e H3K27me3 foi avaliada por *western blot* e normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=11-12$.

Figura 39. Avaliação de modificações pós-traducionais das histonas H3 e H4 na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.5.2 Avaliação da expressão gênica de acetiltransferases de histonas dos machos

A exposição intrauterina ao DEHP não alterou a expressão dos mRNAs que codificam acetiltransferases na tireoide dos machos adultos da geração F1 (Figura 40).

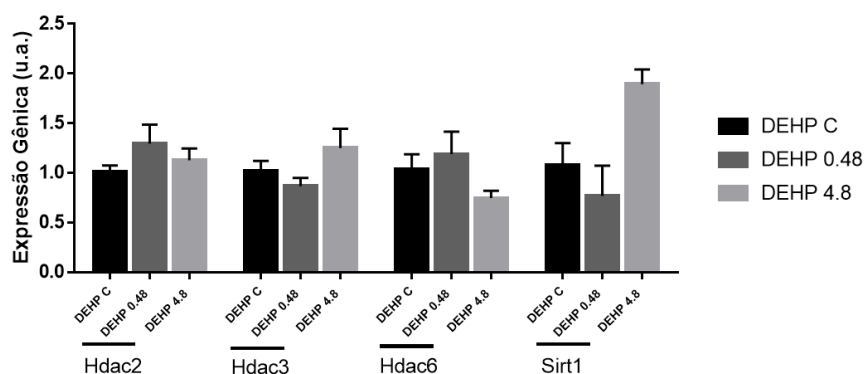


A expressão gênica de *Hat1*, *Kat2b*, *Kat5b*, *Kat14* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. $p>0,05$ (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 40. Avaliação da expressão gênica acetiltransferases de histonas na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.5.3 Avaliação da expressão gênica de deacetilases de histonas dos machos

Não foram observadas alterações significativas na expressão gênica de deacetilases de histonas na tireoide dos machos adultos (PND90) da geração F1 de ratas expostas ou não ao DEHP durante o período intrauterino (Figura 41).

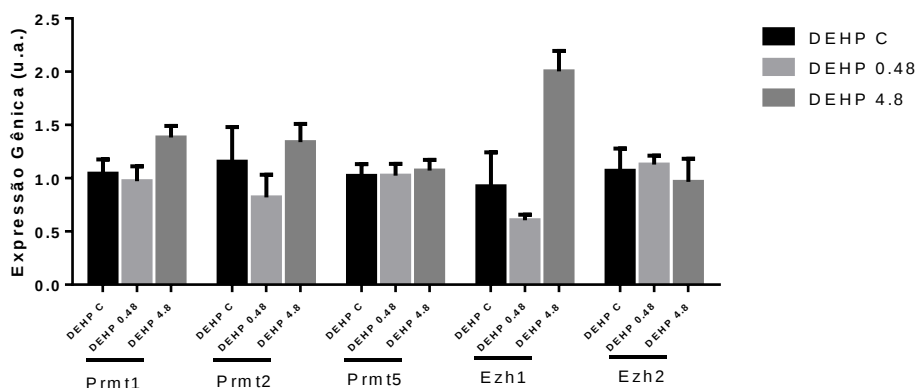


A expressão gênica de *Hdac2*, *Hdac3*, *Hdac6* e *Sirt1* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. $p>0,05$ (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 41. Avaliação da expressão gênica de deacetilases na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.5.4 Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas dos machos

A exposição intrauterina ao ftalato DEHP não alterou a expressão dos transcritos que codificam *Prmt1*, *Prmt2*, *Prmt5*, *Ezh1* e *Ezh2* na tireoide dos machos adultos da geração F1 (Figura 42).

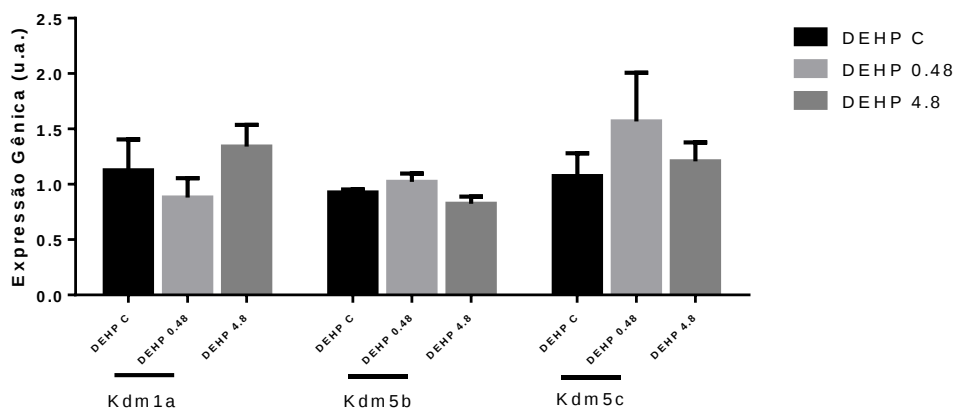


A expressão gênica de *Prmt1*, *Prmt2*, *Prmt5*, *Ezh1*, *Ezh2* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. $p>0,05$ (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 42. Avaliação da expressão gênica de metilases de histonas na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.5.5 Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas dos machos

A exposição intrauterina ao DEHP não alterou a expressão gênica das desmetilases de histonas na tireoide dos machos adultos geração F1 (Figura 43).

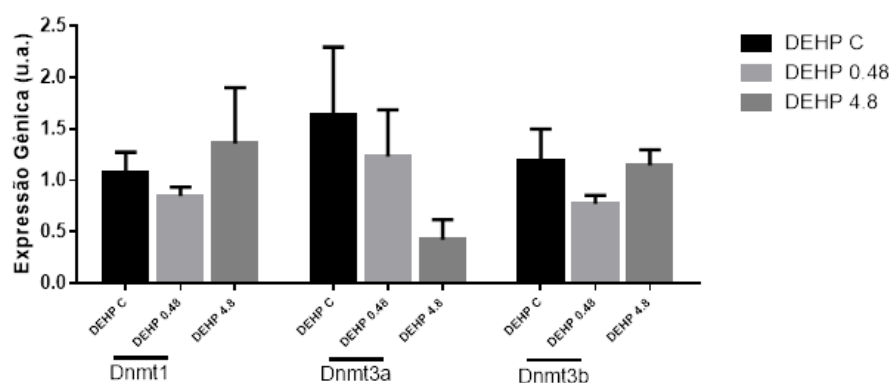


A expressão gênica de *Kdm1a*, *Kdm5b*, *Kdm5c* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. $p>0,05$ (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 43. Avaliação da expressão gênica de desmetilases de histonas na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.5.6 Avaliação da expressão gênica de desmetilases de DNA metiltransferases dos machos

A exposição intrauterina ao DEHP não alterou a expressão de *Dnmt1* em comparação ao Grupo Controle. Além disso, o tratamento materno com DEHP, durante a gestação, não alterou a expressão gênica de *Dnmt3a* e *Dnmt3b* na tireoide dos ratos adultos da geração F1 (Figura 44).

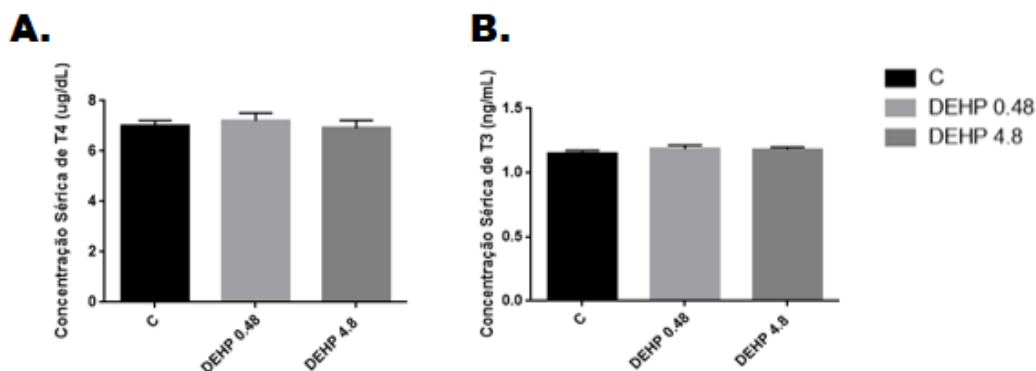


A expressão gênica de *Dnmt1*, *Dnmt3a* e *Dnmt3b* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. $p>0,05$ (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 44. Avaliação da expressão gênica de Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b na tireoide de machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.6 Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos dos machos

Não houve alteração significativa na concentração sérica total de T4 (Figura 45A) e T3 (Figura 45B) nos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ao DEHP durante o período intrauterino.

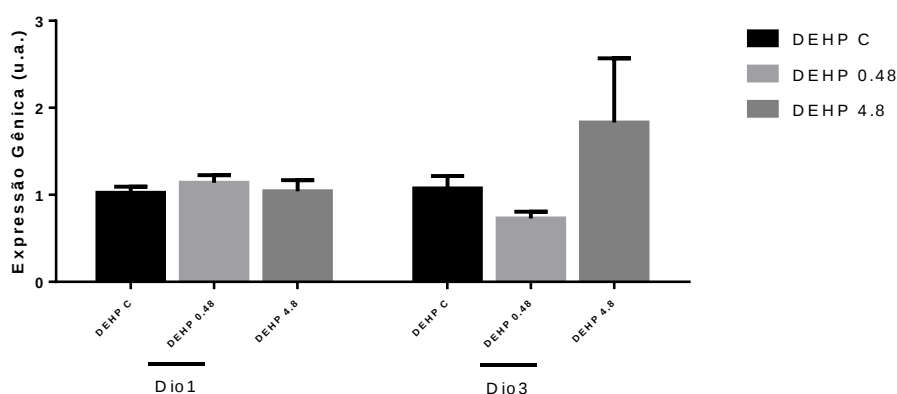


Os valores estão expressos como média±SEM, em µg/dL para o T4 e como ng/mL para o T3. $p > 0,05$ versus C (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). $n=4-5$.

Figura 45. Concentração sérica de T4 e T3 total em machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

3.2.2.7 Avaliação da expressão gênica do fígado dos machos

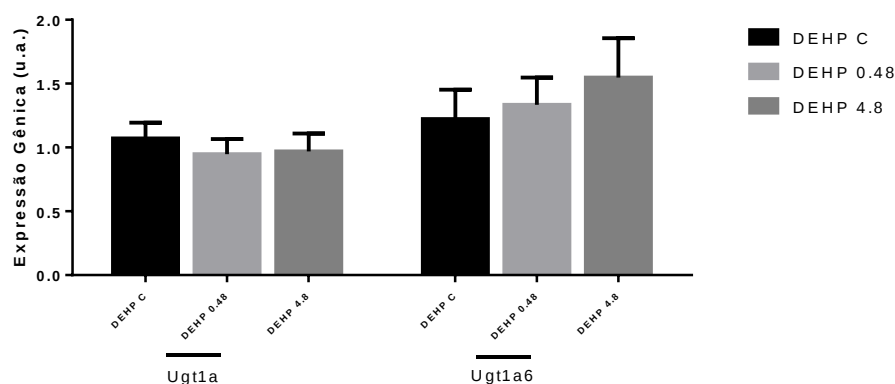
A exposição materna ao DEHP, durante a gestação, não resultou em alterações na expressão gênica da *Dio1* e *Dio3* no fígado dos machos adultos da geração F1 (Figura 46).



A expressão dos genes *Dio1* e *Dio3* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Gapdh* e *Rpl19*, respectivamente. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias (one-way ANOVA, pós-teste Student-Newman Keuls). $n=7-10$.

Figura 46. Avaliação da expressão gênica da desidase tipo 1 e desidase tipo 3 no fígado dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

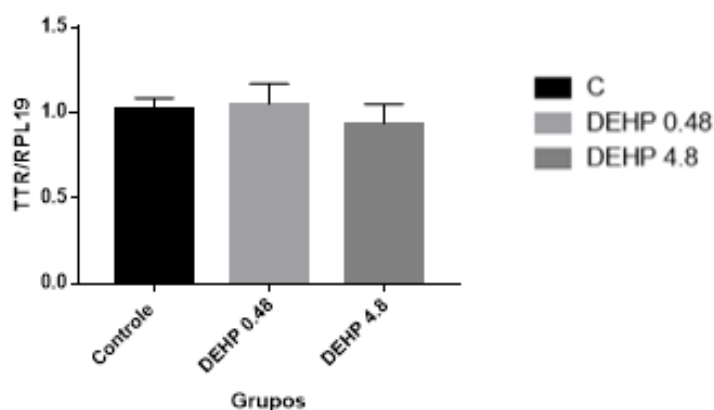
A expressão gênica das enzimas hepáticas *Ugt1a* e *Ugt1a6* também não apresentou mudanças significativas nos grupos avaliados (Figura 47).



A expressão gênica de *Ugt1a* e *Ugt1a6* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=9-10.

Figura 47. Avaliação da expressão gênica de enzimas glucoronosiltransferases no fígado dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

Finalmente, a expressão gênica de *Ttr* também não sofreu alterações significativas nos machos adultos da geração F1, em nenhum dos grupos avaliados (Figura 48).



A expressão gênica de *Ttr* foi avaliada por *real-time* PCR e normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl19*. Os valores estão expressos como média±SEM, em unidades arbitrárias. $p < 0,05$ (*one-way* ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). n=8-10.

Figura 48. Avaliação da expressão gênica da TTR no fígado dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ou não ao di (2-etil hexil) ftalato durante o período intrauterino

Figura 49. Esquema demonstrando os achados obtidos nos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ao di (2-etil hexil) ftalato durante a gestação

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, identificou-se que a exposição intrauterina ao ftalato DEHP altera a função do eixo HHT em machos e fêmeas da geração F1, em dois períodos distintos, GD20 e 90º dia pós-natal. Além disso, demonstrou-se que, principalmente nas fêmeas, essa exposição desencadeou alterações nos níveis séricos dos HTs durante a vida adulta, provocou alterações na expressão de enzimas envolvidas em processos epigenéticos de regulação da expressão gênica e na expressão de enzimas envolvidas na proteção antioxidante na tireoide. Por fim, vale destacar que, principalmente nas fêmeas adultas da geração F1, a exposição materna ao DEHP também alterou a expressão de enzimas hepáticas envolvidas na metabolização e transporte de HTs.

Os HTs desempenham um papel crucial em muitos processos fisiológicos.⁽⁷⁵⁾ Os efeitos da exposição aos ftalatos sobre a função da tireoide e do eixo HHT, em animais, já foram previamente relatados na literatura. Contudo, a maioria deles foca na avaliação da desregulação tireoidiana decorrente da exposição direta (via gavagem), de forma aguda ou crônica, a altos níveis de DEHP – uma exposição de, em média, 300mg de DEHP/kg/dia. Essas doses de exposição, apesar de desencadearem efeitos deletérios sobre a função tireoidiana, representam níveis de contaminação muito acima daqueles observados em humanos. Sendo assim, a relevância desses estudos para esclarecer os efeitos dos ftalatos em humanos torna-se questionável.^(58,76–80)

Nesse sentido, o presente estudo teve como diferencial, mimetizar a exposição intrauterina a níveis de exposição considerados seguros, uma vez que a dose NOAEL do DEHP é de 4,8mg de DEHP/kg/dia. Ainda assim, vale ressaltar que essa é a dose na qual não há efeitos adversos observáveis no sistema reprodutor de ratos.⁽⁷²⁾ Por essa ser considerada uma dose segura de exposição, e pela inexistência de dados na literatura sobre a segurança de exposição ao DEHP sobre a função tireoidiana, foram utilizadas as doses de 4,8mg de DEHP/kg/dia, como a dose máxima de exposição deste estudo, enquanto a dose de 0,48mg de DEHP/kg/dia, 10 vezes mais baixa do que a dose NOAEL, foi a segunda dose de exposição escolhida. Outro diferencial importante e inédito deste estudo é a avaliação dos efeitos da exposição ao DEHP em machos e fêmeas da geração F1, em dois períodos distintos do desenvolvimento.

Demonstramos que a exposição intrauterina ao DEHP gera efeitos adversos na função do eixo HHT nos animais da geração F1 a longo prazo. Contudo, em alguns tecidos do eixo, observou-se um dimorfismo sexual na resposta dos animais expostos ao DEHP durante o período intrauterino.

No presente estudo, observou-se um aumento significativo da expressão gênica do TRH no hipotálamo, apenas nos machos expostos à maior dose de tratamento com DEHP (4,8mg/kg/dia). Em contraste com nossos achados, Sun et al.⁽⁷⁹⁾ observou a diminuição da expressão proteica e dos níveis séricos de TRH, assim como, os níveis séricos de T3, em animais tratados por gavagem com DEHP (50 a 500mg/kg/dia). Fica claro que as doses utilizadas são muito maiores do que as utilizadas no presente estudo, por esse motivo, não se esperava, necessariamente, uma reprodução dos dados apresentados na literatura.

Importante ressaltar que a alteração da expressão gênica do *Trh*, mesmo sem alterações nos níveis séricos de T3 nos machos, e a ausência de alteração na expressão gênica de *Trh* das fêmeas, ainda que tenham sido observadas alterações nos níveis séricos de HTs, reflete claramente a desregulação dos eixos endócrinos provocada pela exposição aos DEs. Ainda assim, o mecanismo pelo qual a exposição intrauterina ao DEHP regula a expressão gênica de TRH nesses animais não está clara, e mais estudos são necessários para investigar esse resultado.

Os resultados obtidos quanto à expressão da subunidade alfa do TSH nas fêmeas adultas da geração F1 expostas aos ftlatos são inéditos e intrigantes. Além do TSH, a subunidade alfa está presente em outros hormônios glicoproteicos, como o FSH de gonadotrofinas, responsável pela estimulação e secreção de estrogênio, e o hormônio luteinizante (LH), responsável pelo desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos. Esses hormônios, assim como o TSH, são constituídos pelas subunidades alfa e beta, sendo essa última específica de cada hormônio.⁽⁸¹⁾ Dessa maneira, a alteração da expressão da subunidade alfa, apenas nas fêmeas, sugere que a produção/secreção de FSH e LH estão potencialmente prejudicadas nos animais que foram expostos ao DEHP durante o período intrauterino. Esta hipótese é reforçada pelo fato de o DEHP ser um conhecido desregulador da função reprodutiva feminina.⁽⁸²⁻⁸⁵⁾ Um estudo anterior demonstrou, por exemplo, que a exposição intrauterina ao DEHP a doses superiores a 100mg/kg/dia aumentou significativamente os níveis séricos de FSH nas fêmeas da geração F1 de camundongos.⁽⁸⁵⁾ Sendo assim, os dados do presente

estudo fortalecem o comprometimento de vários eixos endócrinos pela exposição a um único DE, como o DEHP, em fases críticas do desenvolvimento.

É comum a avaliação da expressão do gene da subunidade β do TSH como um parâmetro de avaliação da disfunção do eixo HHT induzida pela exposição a DEs.^(77,79,80,86) No presente estudo, demonstrou-se que, a partir da exposição intrauterina ao DEHP, houve um aumento da expressão gênica e proteica da subunidade β do TSH na hipófise dos machos adultos da geração F1, especialmente na menor dose de tratamento. Esse resultado é discordante daqueles descritos por Wu et al. e Dong et al. que observaram uma diminuição significativa na expressão gênica da subunidade beta do TSH em animais diretamente expostos a 150mg/kg/dia de DEHP.^(77,80) Contudo, são coerentes com estudos realizados em peixes *zebrafish*, que apontaram um aumento significativo da expressão dessa subunidade em animais expostos ao MEHP (40 e 200 μ g/L), principal metabólito do DEHP.⁽⁸⁶⁾

Novamente, a alteração da expressão da subunidade beta sem alterações nos níveis séricos de HTs nos machos, e a ausência de alteração da expressão da subunidade beta nas fêmeas, que apresentaram alterações significativas nos níveis séricos de HTs, sugerem fortemente uma alteração no *setpoint* do eixo HHT dos animais da geração F1, que foram expostos ao DEHP durante o período intrauterino.

Os efeitos do DEHP sobre a tireoide dos animais das proles, foram avaliados em dois períodos distintos, ao final da gestação (GD20), para avaliar o impacto da exposição intrauterina sobre o desenvolvimento embrionário da tireoide, e durante a vida adulta (PDN90), com o intuito de avaliar mecanismos de programação e perpetuação de disfunções tireoidianas.

Dessa maneira, em GD20, observou-se um aumento significativo na expressão de mRNAs que codificam proteínas envolvidas na síntese e secreção de HTs na tireoide, tanto nos machos quanto nas fêmeas, e em ambas as doses de tratamento. Os resultados apontam para mecanismos diretos de regulação da expressão gênica do tecido tireoidiano pelo DEHP, nesta fase específica do desenvolvimento. Sabendo-se da importância dos HTs fetais para o desenvolvimento do sistema nervoso durante o período embrionário, o impacto dessas alterações para o desenvolvimento cognitivo e para a morfologia do SNC frente à exposição aos ftalatos deve ser investigada em estudos futuros. Ainda assim, em humanos, estudos demonstraram uma associação entre a exposição pré-natal ao DEHP e comportamentos semelhantes a transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) e autista em crianças.^(56,87) Além disso, foi

demonstrado que crianças de até 6 meses que foram expostas ao DEHP apresentaram comprometimento do desenvolvimento mental e físico.⁽⁸⁸⁾ Em animais, a exposição a ftalatos foi associada a hiperatividade e a impulsividade.⁽⁸⁹⁾

Até o momento, nenhum estudo anterior avaliou os efeitos da exposição intrauterina ao ftalato DEHP sobre a função tireodiana nos animais da geração F1 ao final da gestação. Contudo, a presença de DEHP e seus metabólitos no líquido amniótico reforça a transferência placentária desses contaminantes para o feto.⁽⁵⁶⁾ O estudo de Dong et al.⁽⁷⁷⁾ foi o único encontrado na literatura que avaliou a exposição perinatal ao DEHP, porém, utilizou altas doses de tratamento (30, 300 e 750mg de DEHP/kg/dia) e não especificou o sexo dos animais utilizados nas análises. Além disso, os animais da prole foram avaliados em PND7, PND14 e PND21, ou seja, períodos diferentes daqueles analisados no presente estudo. Ainda assim, dados similares foram encontrados em ambos os estudos, como o aumento significativo da expressão dos mRNA de *Nkx2.1*, *Pax8*, *Tpo* e *Slc5a5* nos animais expostos ao DEHP.⁽⁷⁷⁾ Um segundo estudo, no qual os animais foram tratados, por gavagem, com 150, 300 e 600mg de DEHP/kg/dia, por 90 dias, também demonstrou aumento da expressão gênica dos fatores transcricionais tireoidianos (*Nkx2.1* e *Pax8*) e de genes envolvidos na biossíntese de HTs (*Slc5a5*, *Tpo*, e *Tg*) na tireoide dos animais expostos em relação aos animais do Grupo Controle.⁽⁷⁸⁾ Esses dados, em conjunto, reforçam que a exposição direta ao DEHP tem um efeito estimulatório sobre a expressão gênica da tireoide. Vale destacar que dados não apresentados nesta dissertação, realizados em cultura de células, apontam para o efeito direto estimulatório do DEHP sobre os tireócitos.

No período PND90, especialmente nas fêmeas da geração F1, observou-se uma redução significativa na expressão de diferentes genes/proteínas envolvidos na síntese e secreção de HTs, em ambas as doses de tratamento. Esses dados contrastam com outros da literatura. Conforme relatado anteriormente, Dong et al. demonstrou que a exposição direta de fêmeas ao DEHP (150 e 600mg/kg/dia), por 6 meses, aumentou a expressão gênica/proteica de *Slc5a5*, *Tpo*, *Tshr* e *Tg*.⁽⁷⁸⁾ Novamente, é importante reforçar que o período e doses de tratamento são completamente diferentes daqueles utilizados no presente estudo.

A expressão coordenada de fatores transcricionais tireoidianos é fundamental para manter a função da tireoide.⁽¹⁴⁾ Uma vez que os resultados apresentados neste estudo apontaram para uma diminuição significativa da expressão gênica e proteica de PAX8, NKX2.1 e FOXE1, especialmente nas fêmeas adultas da

geração F1, a redução de todos os outros genes tireoidianos envolvidos na biossíntese hormonal pode ser consequência da diminuição da expressão dos fatores transcricionais tireoidianos.

Uma das etapas mais importantes e limitantes da produção de HTs é a captação de I^- mediada pela NIS.^(10,90) No presente estudo, observamos que a expressão gênica e proteica de NIS apresentou-se diminuída na tireoide dos machos e fêmeas adultos da geração F1 de ratas expostas ao DEHP durante o período intrauterino. Esses resultados são opostos àqueles obtidos em estudos com exposição direta e crônica ao DEHP (150, 300, 600mg/kg/dia), nos quais observou-se aumento da expressão de NIS.⁽⁷⁸⁾ Conforme discutido anteriormente, o aumento da expressão gênica e proteica de NIS já foi relatada em outros estudos de exposição ao DEHP.^(77,80) Contudo, reforçamos que nenhum desses estudos avaliou o impacto da exposição intrauterina ao DEHP nos animais adultos das proles das ratas expostas. Por esse motivo, não era esperada a reprodução dos dados descritos da literatura.

Ainda assim, é interessante destacar que os efeitos de desregulação da expressão gênica na tireoide das fêmeas foram muito mais proeminentes do que nos machos da geração F1. Esse dado é interessante e coerente com a maior taxa de incidência de doenças tireoidianas em mulheres do que em homens.⁽⁹¹⁾ Além disso, sabe-se que os estrogênios afetam a função e expressão gênica da tireoide, assim como, modulam os níveis de TSH.⁽⁹²⁾ Finalmente, Radke et al. indicaram em seu estudo que as mulheres são mais sensíveis à exposição ao DEHP (principalmente crianças e mulheres grávidas).⁽⁹³⁾ Por esse motivo, um ponto importante deste estudo foi a avaliação dos efeitos da exposição ao DEHP nas fêmeas da geração F1. Adicionalmente, nossa hipótese atual é que os hormônios sexuais femininos contribuam para o dismorfismo sexual observado em nosso estudo, especialmente na tireoide. Futuras investigações serão necessárias para confirmar essa associação e elucidar o mecanismo biológico por trás das diferenças observadas na regulação da expressão gênica/proteica da tireoide de acordo com a idade e sexo dos animais.

Em nosso estudo, também foi avaliada a expressão de genes/proteínas envolvidos na síntese e secreção dos HTs na tireoide dos machos adultos da geração F1 de ratas expostas ao DEHP no período gestacional. A partir desses experimentos, observou-se alteração significativa na expressão gênica/proteica da tireoide em doses muito mais baixas (0,48 ou 4,8mg/kg/dia) do que aquelas documentadas na literatura.^(79,80,94,95) Além da diminuição da expressão de NIS, os

resultados obtidos a partir da tireoide dos machos adultos da geração F1 apontaram para a diminuição da expressão proteica de TSHR e FOXE1, especialmente na menor dose de tratamento. Esses resultados são concordantes àqueles descritos pelo estudo de Kim et al.,⁽⁹⁴⁾ no qual ratos machos foram expostos diretamente ao DEHP (50 e 500mg/kg/dia), via gavagem, por 14 dias. Adicionalmente, a redução da expressão gênica/proteica tireoidiana pelo DEHP já foi relatada em estudos anteriores, nos quais ratos foram tratados cronicamente com doses extremamente altas de DEHP (500 e 750mg/kg/dia), nos quais demonstrou-se redução significativa dos níveis séricos de NIS e TPO.⁽⁵⁸⁾ Contudo, é importante reforçar que as alterações observadas nos machos foram menos evidentes do que aquelas observadas nas fêmeas.

Estudos anteriores demonstraram que o DEHP e seu metabólito (MEHP) provocam estresse oxidativo em ovários,⁽⁹⁶⁾ fígado^(58,97) e rins.⁽⁹⁸⁾ Na tireoide, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenha papéis funcionais essenciais, pois a geração de H₂O₂ pela enzima DUOX2 é fundamental para síntese de HTs catalisada pela TPO. Ainda assim, já foi demonstrado que o excesso na produção de H₂O₂ e/ou a proteção insuficiente dos tireócitos pelas enzimas antioxidantes comprometem a integridade celular, levando a disfunções tireoidianas.⁽⁹⁹⁾ Neste sentido, sabe-se que as EROs são normalmente mantidas em baixas concentrações intracelulares devido à ação de peroxidases, como a Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), entre outros sistemas antioxidantes.⁽¹⁰⁰⁾

Os resultados do presente estudo demonstraram a diminuição da expressão gênica da enzima SOD1 nas fêmeas, e aumento do conteúdo de mRNA de CAT nos machos. Até o momento, apenas um estudo, avaliou o estresse oxidativo na tireoide de animais expostos ao DEHP. Ye et al. demonstraram que ratos adultos expostos, via gavagem, a 250, 500 e 750mg de DEHP/kg/dia, por 30 dias, apresentaram estresse oxidativo na tireoide, com aumento da produção de EROs e diminuição da atividade da enzima SOD e Glutathione.⁽⁵⁸⁾ Contudo, nenhum estudo avaliou o impacto da exposição ao DEHP a longo prazo e durante janelas críticas do desenvolvimento, o que reforça o ineditismo e relevância dos nossos dados.

No presente estudo, demonstrou-se, pela primeira vez, que a exposição intrauterina ao DEHP tem efeitos diretos sobre a secreção de HTs, principalmente nas fêmeas adultas da prole. Dessa maneira, além das alterações moleculares na tireoide, os dados indicaram alterações nos níveis séricos totais de T3 e T4, exclusivamente nas fêmeas adultas da geração F1, reforçando a importância de

avaliar os efeitos dos DEs em fêmeas. De fato, a concentração sérica total de T4 apresentou-se significativamente diminuída, em ambas as doses de tratamento avaliadas, enquanto os níveis de T3 apresentaram-se aumentados no soro destes animais, exclusivamente na menor dose de tratamento. Este achado, vai ao encontro dos dados de Wu et al. e Sherif et al., que observaram um aumento nos níveis séricos de TT3 e diminuição do TT4 em animais diretamente expostos a doses superiores a 300mg de DEHP/kg/dia.^(80,101) Além disso, um estudo recente demonstrou que a exposição de ratos, por gavagem, a doses a partir de 0,75mg de DEHP/kg/dia reduz os níveis séricos de T4.⁽⁹⁴⁾

Coerente com os resultados apresentados no presente estudo, dados epidemiológicos demonstraram que os níveis de metabólitos de DEHP na urina estão negativamente associados aos níveis séricos dos hormônios T3 e T4. O estudo de Meeker et al. foi pioneiro em relatar que a concentração urinária de MEHP, estava negativamente associada aos níveis de T4 livre e T3 total em homens.⁽¹⁰²⁾ Estudos posteriores encontraram evidências consistentes de que existe uma relação inversa entre as concentrações urinárias de MEHP e HTs. Boas et al. realizaram um estudo transversal com crianças de até 9 anos e descobriram que os metabólitos de ftalatos estavam negativamente associados aos níveis séricos de T3 livre e T3 total.⁽¹⁰³⁾ O estudo de Huang et al. demonstrou associações inversas entre a concentração urinária de MEHP e níveis séricos de T4 livre em meninas de até 9 anos de Taiwan.⁽¹⁰⁴⁾ Finalmente, um estudo recente demonstrou uma correlação negativa entre MEHP e urinário e TT4 em adolescentes chineses (16 a 19 anos).⁽¹⁰⁵⁾

Os níveis circulantes de HTs dependem tanto da taxa de secreção da glândula tireoide, como da atividade de enzimas periféricas, conhecidas como desidases. As desidases desempenham um papel crucial no organismo, a biotransformação de HTs em tecidos periféricos, podendo ativá-los ou inativá-los, por meio da remoção seletiva do iodeto presente nesses hormônios.⁽¹⁰⁶⁾ Neste sentido, a D1 e D2 são as principais enzimas ativadoras de HTs, por catalisarem a conversão de T4 em T3; enquanto a D3 é considerada uma enzima inativadora, por catalisar a conversão de T4 em T3 reverso e do T3 em T2.⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾

A análise da expressão das desidases é usualmente utilizada como um marcador sensível do comprometimento das ações dos HTs em tecidos periféricos de ratos^(76,77) e em peixes.^(86,109) Desse modo, exclusivamente nas fêmeas adultas, observou-se o aumento da expressão gênica da *Dio1* no fígado, sem que alterações na

Dio3 fossem observadas. De fato, sugere-se que o aumento da expressão hepática da *D1* nessas ratas contribuiu para o aumento dos níveis circulantes de T3, que seria derivado da conversão periférica do T4, especialmente na menor dose de tratamento.

A regulação da expressão de desidases pelo DEHP já foi relatada na literatura. Interessantemente, Dong et al. demonstraram que a exposição direta de ratas ao DEHP (600mg/kg/dia), por 3 meses, provocou diminuição da expressão de *Dio1* no fígado. Contudo, quando essa exposição foi estendida por 6 meses, a expressão gênica de *Dio1* aumentou significativamente.⁽⁷⁷⁾ Um outro estudo, utilizando o modelo de *zebrafish*, relatou que a exposição ao MEHP (1, 6, 8, 40 e 200µg/L) a partir de 2 horas até 168 horas após a fertilização, diminuiu os níveis séricos de T3 e T4, além de aumentar a expressão gênica da *Dio1* e *Dio2* nesses animais.⁽¹⁰⁹⁾ Estudos futuros serão necessários para elucidar os mecanismos moleculares que norteiam o dimorfismo sexual apresentado na regulação da expressão de desidases em machos e fêmeas adultos das proles de ratas expostas ao DEHP durante a gestação.

Uma vez secretados pela tireoide, os HTs circulam pela corrente sanguínea ligados a proteínas transportadoras. Em ratos, a principal proteína transportadora dos HTs é a TTR. Os HTs ligados à proteína TTR não entram nas células-alvo, mas, também, não são metabolizados, sendo considerados biologicamente inertes. Assim, a TTR garante um grande reservatório de HTs na circulação.⁽⁹⁰⁾

No presente estudo, observou-se aumento significativo da expressão do mRNA de TTR apenas nas fêmeas adultas da prole. Estudos anteriores revelaram resultados opostos aos do nosso trabalho, indicando a supressão da expressão gênica e proteica do TTR no fígado de ratos expostos ao DEHP, o que contribuiu para a diminuição dos níveis circulantes de HTs no soro desses animais.⁽⁷⁶⁾ Contudo, vale destacar que, diferentemente de nossos estudos, Liu et al. avaliaram os efeitos da exposição direta e crônica (30 dias) de machos ao DEHP, em doses muito acima daquelas utilizadas em nossos estudos (250 a 750mg/kg/dia).⁽⁷⁶⁾ Interessantemente, outro estudo demonstrou que o DEHP se liga competitivamente ao TTR no fígado e diminui sua expressão em codornas japonesas.⁽¹¹⁰⁾

Os níveis de HTs na circulação são modulados não apenas pela síntese, secreção e desidatação, mas, também, pelo seu metabolismo, que acontece exclusivamente no fígado.^(111,112) Assim, uma das hipóteses do presente estudo era que a exposição intrauterina ao DEHP induziria alterações na expressão de enzimas hepáticas e, com isso, comprometeria a homeostase dos HTs no organismo.

Em ratos, a glucoronidação é uma via metabólica de degradação dos HTs muito importante, catalisada pelas enzimas UDP-glucoroniltransferases (UGTs).⁽⁹⁰⁾ No estudo atual, a expressão da *Ugt1a1* e *Ugt1a6* foi negativamente regulada no fígado das fêmeas adultas da prole, apenas na maior dose de tratamento (4,8mg/kg/dia). Nos machos não foram observadas alterações significativas. Coerentemente com os resultados obtidos neste estudo, um estudo utilizando modelo *in vitro*, demonstrou que o MEHP inibe fortemente a atividade das enzimas UGT1A7 e UGT1A9, descritas como as principais enzimas que processam e inativam o hormônio T4, concluindo que os monoésteres de ftalato perturbam o metabolismo periférico do T4.⁽¹¹³⁾ Adicionalmente, no trabalho de Ye et al., a expressão gênica/proteica de *Ugt1a1* apresentou-se significativamente aumentada em ratos tratados diretamente com 200 e 500mg de DEHP/kg/dia, enquanto a expressão de *Ugt1a6* não sofreu alteração em nenhuma das doses avaliadas.⁽⁵⁸⁾ Outro estudo, realizado em peixes *zebrafish*, constatou a redução da expressão de *Ugt1a6* nos animais expostos a 400µg/L de DEHP pelo período de 2 a 168 horas após a fertilização.⁽¹⁰⁹⁾ Ainda assim, conforme extensivamente discutido, nosso modelo é inédito, tanto pelas doses utilizadas, quanto pelos períodos de exposição avaliados, que nunca foram descritos na literatura.

Finalmente, inúmeros estudos sugerem que doenças desenvolvidas durante a vida adulta podem ser programadas pela exposição aos DEs durante janelas críticas do desenvolvimento, como os períodos intrauterino, perinatal e neonatal. Dessa forma, propõe-se que essas doenças estariam ligadas a alterações específicas na expressão de genes críticos, que seriam epigeneticamente modificados após a exposição aos DEs.^(114–116)

As modificações epigenéticas mais conhecidas e descritas na literatura incluem a metilação do DNA, que resulta principalmente em repressão transcricional e as modificações pós-traducionais da porção N-terminal das histonas.^(39,40) Essas modificações geralmente ocorrem na lisina ou arginina das histonas e são mediadas por enzimas modificadoras de histonas.⁽¹¹⁷⁾ Modificações nas porções N-terminais de histonas têm papéis importantes no controle da compactação da cromatina, dinâmica do nucleossomo e reparo do DNA, e regulam a transcrição gênica.⁽¹¹⁴⁾

Entretanto, poucos estudos avaliaram o impacto da exposição ao DEHP sobre modificações epigenéticas em diferentes tecidos. Até o momento, não existem estudos que tenham avaliado o impacto da exposição ao DEHP sobre

modificações epigenéticas no tecido tireoidiano. Ainda assim, estudos anteriores indicaram que o DEHP diminui a expressão do mRNA de DNMTs e os níveis de metilação do DNA no ovário de ratas.⁽¹¹⁸⁾ Além disso, demonstrou-se que a exposição puberal ao DEHP regula negativamente a metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) durante a espermatogênese de camundongos.⁽⁹⁵⁾

No estudo atual, de forma inédita, demonstrou-se que, nos machos adultos da prole de ratas expostas ao DEHP durante a gestação, houve um aumento significativo do conteúdo proteico das histonas H3 e H4 acetiladas. O aumento da acetilação é coerente com o aumento da expressão de alguns genes da tireoide desses animais. Porém, por serem avaliações globais, serão necessários estudos mais detalhados para compreender se essas modificações pós-traducionais das histonas acontecem especificamente na região promotora dos genes que foram estimulados pela exposição intrauterina ao DEHP.

Na tireoide das fêmeas, foi observada a diminuição da expressão gênica de acetiltransferases, deacetilases e desmetilases de histonas. Contudo, não foram encontradas alterações significativas nas modificações pós-traducionais das histonas. Esse resultado reforça a importância do estudo sítio-específico dessas modificações pós-traducionais, com o intuito de se delinear uma relação causa-efeito entre as modificações epigenéticas encontradas e o padrão de regulação de cada um dos genes estudados. Por este motivo, estudos futuros trarão informações significativas sobre a regulação epigenética em promotores específicos dos genes tireoidianos desencadeada pela exposição intrauterina ao DEHP.

Até o momento, pode-se apenas especular que a exposição intrauterina ao DEHP altera a expressão/atividade de enzimas envolvidas nas modificações epigenéticas da tireoide, mas não necessariamente, são essas modificações que levam aos resultados encontrados na expressão dos genes/proteínas envolvidos na biossíntese de HTs. Entretanto, não se pode excluir a participação de alterações epigenéticas causadas pela exposição intrauterina ao DEHP, como mediadoras das disfunções tireoidianas encontradas em nosso estudo.

Interessante destacar que houve um aumento significativo da expressão gênica da enzima DNMT3a apenas na tireoide das fêmeas adultas da geração F1 de ratas expostas ao DEHP durante o período intrauterino. Esta enzima está envolvida na metilação *de novo* do DNA e na geração de novos padrões de metilação em células quiescentes. De modo geral, a metilação do DNA está associada a repressão

transcricional.⁽¹¹⁹⁾ Nesse sentido, o aumento da expressão de DNMT3a sugere um aumento na metilação do DNA, e consequentemente, na repressão da transcrição gênica da tireoide nesses animais. Entretanto, estudos futuros serão necessários para confirmar essa hipótese.

Desta maneira, serão necessários ensaios mais específicos para entender qual o papel dessas mudanças na expressão de enzimas envolvidas em mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica no padrão de expressão e na programação da tireoide dos machos e fêmeas da geração F1 de ratas expostas ao DEHP durante o período intrauterino. Até o momento, a literatura não relata nenhuma evidência de que o DEHP afeta o epigenoma da tireoide, o que reforça a importância de nossos achados.

5 CONCLUSÕES

1. Demonstramos, pela primeira vez, que a exposição intrauterina ao di (2-etilhexil) ftalato, em doses mais baixas do que aquelas consideradas seguras, desregula o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide em machos e fêmeas da geração F1, logo após o nascimento e durante a vida adulta;

2. Nossos dados sugerem fortemente que a exposição intrauterina ao di (2-etilhexil) ftalato aumenta a susceptibilidade da prole para o desenvolvimento de disfunções tireoidianas durante a vida adulta, sendo mais nociva em fêmeas do que em machos.

6 REFERÊNCIAS

1. Molina PE. Fisiologia endócrina. 5a ed. Porto Alegre: McGraw Hill Education; 2021. Figura 1-1. Sistema endócrino; p. 3.
2. Cooper GM. The cell: a molecular approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>
3. Whitlock C, Temple N. Meet your hormones. Buffalo: Firefly Books; 2019.
4. Feldt-Rasmussen U, Effraimidis G, Klose M. The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;525:111173.
5. Aires MM. Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018. Figura 78.8 Os efeitos desencadeados pelos desreguladores endócrinos podem seguir curvas monotônicas ou não monotônicas de dose-resposta. p. 1311.
6. Chou K, Henderson J. Endocrine system. In: Wexler P. Encyclopedia of toxicology. Vol. 1. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 332–40.
7. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009;150(3):1091–6.
8. Benvenga S, Tuccari G, Ieni A, Vita R. Thyroid gland: anatomy and physiology. In: Huhtaniemi I, Martini L, editors. Encyclopedia of endocrine diseases. 2nd ed. Vol. 4. Amsterdam: Elsevier; 2018. p. 382-90.
9. Martins MA, Carrilho FJ, Alves VA, Castilho EA, Cerri GG. Clínica médica. Vol. 5. 2ed. Barueri: Manole; 2015. Figura 1. Ilustração esquemática da anatomia da glândula tireoide; p. 165.
10. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;458:6–15. Fig. 1. Schematic representation of thyroid hormone biosynthesis and release. p. 7.
11. Abrahamsohn P, Freitas V. 14-14 Glândulas endócrinas. 2004 [citado 2022 Jun 7]. Disponível em: <https://mol.icb.usp.br/index.php/14-14-glandulas-endocrinas/>
12. Ma R, Latif R, Davies TF. Human embryonic stem cells form functional thyroid follicles. *Thyroid*. 2015;25(4):455–61.
13. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development*. 2017;144(12):2123–40.
14. Fernández LP, López-Márquez A, Santisteban P. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(1):29–42.
15. López-Márquez A, Carrasco-López C, Fernández-Méndez C, Santisteban P. Unraveling the complex interplay between transcription factors and signaling molecules in thyroid differentiation and function, from embryos to adults. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:654569. Figure 1. Stages of early thyroid development; p. 3.

16. Zoeller RT, Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(10):809–18.
17. Iosco C, Cosentino C, Sirna L, Romano R, Cursano S, Mongia A, et al. Anoctamin 1 is apically expressed on thyroid follicular cells and contributes to ATP- and calcium-activated iodide efflux. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(3):966–80.
18. Szanto I, Pusztaszeri M, Mavromati M. H₂O₂ metabolism in normal thyroid cells and in thyroid tumorigenesis: focus on NADPH oxidases. *Antioxidants.* 2019;8(5):126.
19. Gnidehou S, Lacroix L, Sezan A, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Morand S, et al. Cloning and characterization of a novel isoform of iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) DEHAL1C from human thyroid: comparisons with DEHAL1 and DEHAL1B. *Thyroid.* 2006;16(8):715–24.
20. Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest.* 2010;120(9):3377–88.
21. de Souza EC, Dias GR, Cardoso RC, Lima LP, Fortunato RS, Visser TJ, et al. MCT8 is downregulated by short time iodine overload in the thyroid gland of rats. *Horm Metab Res.* 2015;47(12):910-5.
22. Meyer EL, Wagner MS, Maia AL. [Iodothyronine deiodinases expression in thyroid neoplasias]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(5):690-700. Portuguese.
23. Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Compr Physiol.* 2016;6(3):1387–428.
24. Saladin K. *Anatomy & physiology. The unity of form and function.* 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2021. Figure 17.7 Negative feedback inhibition of the pituitary gland by the thyroid gland; p. 622.
25. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 2015;36(6):E1–150.
26. Kubickova B, Ramwell C, Hilscherova K, Jacobs MN. Highlighting the gaps in hazard and risk assessment of unregulated endocrine active substances in surface waters: retinoids as a European case study. *Environ Sci Eur.* 2021;33(1):1–38.
27. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(3-5):204–15.
28. Diamanti-Kandarakis E, Palioura E, Kandarakis SA, Koutsilieris M. The impact of endocrine disruptors on endocrine targets. *Horm Metab Res.* 2010;42(8):543–52.
29. Szewczyńska M, Pośniak M, Dobrzyńska E. Determination of phthalates in particulate matter and gaseous phase emitted into the air of the working environment. *Int J Environ Sci Technol.* 2020;17(1):175–86.
30. Schug TT, Abagyan R, Blumberg B, Collins TJ, Crews D, DeFur PL, et al. Designing endocrine disruption out of the next generation of chemicals. *Green Chem.* 2013;15(1):181–98.
31. La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard

identification. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(1):45–57. Fig. 1 The key characteristics of endocrine-disrupting chemicals. p. 48.

32. Vandenberg LN. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam Horm*. 2014;94:129–65.

33. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health*. 2012;11:42.

34. Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol*. 2015;43:66–75.

35. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol*. 2011;31(3):337–43.

36. Zlatnik MG. Endocrine-disrupting chemicals and reproductive health. *J Midwifery Womens Health*. 2016;61(4):442–55.

37. Gore AC, Patisaul HB. Neuroendocrine disruption: historical roots, current progress, questions for the future. *Front Neuroendocrinol*. 2010;31(4):395–9.

38. Tang ZR, Xu XL, Deng SL, Lian ZX, Yu K. Oestrogenic endocrine disruptors in the placenta and the fetus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1519.

39. Mazzio EA, Soliman KF. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*. 2012;7(2):119–30.

40. Fan J, Krautkramer KA, Feldman JL, Denu JM. Metabolic regulation of histone post-translational modifications. *ACS Chem Biol*. 2015;10(1):95–108.

41. Kim MK, Kim KB, Yoon S, Kim HS, Lee BM. Risk assessment of unintentional phthalates contaminants in cosmetics. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020;115:104687.

42. Ipapo KN, Factor-Litvak P, Whyatt RM, Calafat AM, Diaz D, Perera F, et al. Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and visual recognition memory among infants at 27 weeks. *Environ Res*. 2017;155:7–14.

43. Xie Z, Ebinghaus R, Temme C, Lohmann R, Caba A, Ruck W. Occurrence and air-sea exchange of phthalates in the Arctic. *Environ Sci Technol*. 2007;41(13):4555–60.

44. Deierlein AL, Wolff MS, Pajak A, Pinney SM, Windham GC, Galvez MP, et al.; Breast Cancer and Environment Research Program. Longitudinal associations of phthalate exposures during childhood and body size measurements in young girls. *Epidemiology*. 2016;27(4):492–9.

45. Erythropel HC, Maric M, Nicell JA, Leask RL, Yargeau V. Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(24):9967–81.

46. Dutta S, Haggerty DK, Rappolee DA, Ruden DM. Phthalate exposure and long-term epigenomic consequences: a review. *Front Genet*. 2020;11:405.

47. Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1526):2097–113.

48. Serrano SE, Braun J, Trasande L, Dills R, Sathyanarayana S. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ Health*. 2014;13(1):43.
49. Inoue K, Kawaguchi M, Yamanaka R, Higuchi T, Ito R, Saito K, et al. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin Chim Acta*. 2005;358(1-2):159–66.
50. Braun JM, Sathyanarayana S, Hauser R. Phthalate exposure and children's health. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25(2):247–54.
51. Rowdhwal SS, Chen J. Toxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate: an overview. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1750368.
52. Braun JM, Smith KW, Williams PL, Calafat AM, Berry K, Ehrlich S, et al. Variability of urinary phthalate metabolite and bisphenol A concentrations before and during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2012;120(5):739–45.
53. Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta*. 2005;361(1-2):20–9.
54. Wittassek M, Heger W, Koch HM, Becker K, Angerer J, Kolossa-Gehring M. Daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children — a comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210(1):35–42.
55. Silva MJ, Samandar E, Preau JL Jr, Needham LL, Calafat AM. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*. 2006;219(1-3):22–32.
56. Engel SM, Villanger GD, Nethery RC, Thomsen C, Sakhi AK, Drover SS, et al. Prenatal phthalates, maternal thyroid function, and risk of attention-deficit hyperactivity disorder in the Norwegian mother and child cohort. *Environ Health Perspect*. 2018;126(5):057004.
57. Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT, editors. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: summary for decision-makers. Geneva: World Health Organization; 2013.
58. Ye H, Ha M, Yang M, Yue P, Xie Z, Liu C. Di2-ethylhexyl phthalate disrupts thyroid hormone homeostasis through activating the Ras/Akt/TRHr pathway and inducing hepatic enzymes. *Sci Rep*. 2017;7(1):40153.
59. Lee KY, Shibutani M, Takagi H, Kato N, Takigami S, Uneyama C, et al. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*. 2004;203(1-3):221–38.
60. Saillenfait AM, Sabaté JP, Gallissot F. Developmental toxic effects of diisobutyl phthalate, the methyl-branched analogue of di-n-butyl phthalate, administered by gavage to rats. *Toxicol Lett*. 2006;165(1):39–46.
61. Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Gericke C, Grote K, Golombiewski A, et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology*. 2006;228(1):85–97.
62. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Fail PA, Seely JC, Brine DR, et al. Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol*. 2004;18(2):241–64.

63. Gutiérrez-García AK, Choudhury M, De Leon-Rodriguez A. Diisononyl phthalate differentially affects sirtuin expression in the HepG2 cell line. *Chem Res Toxicol*. 2019;32(9):1863–70.
64. Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009;12(4):225–49.
65. Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ*. 2004;328(7437):447–51.
66. Kumar P. Role of plastics on human health. *Indian J Pediatr*. 2018;85(5):384–9.
67. Benjamin S, Masai E, Kamimura N, Takahashi K, Anderson RC, Faisal PA. Phthalates impact human health: epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *J Hazard Mater*. 2017;340:360–83.
68. Meeker JD. Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012;166(10):952–8.
69. Niermann S, Rattan S, Brehm E, Flaws JA. Prenatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) affects reproductive outcomes in female mice. *Reprod Toxicol*. 2015;53:23–32.
70. Huang PC, Tsai CH, Liang WY, Li SS, Huang HB, Kuo PL. Early phthalates exposure in pregnant women is associated with alteration of thyroid hormones. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159398.
71. Akgül S, Sur U, Düzçeker Y, Balcı A, Kızıllan MP, Kanbur N, et al. Bisphenol A and phthalate levels in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2019;35(12):1084–7.
72. Blystone CR, Kissling GE, Bishop JB, Chapin RE, Wolfe GW, Foster PM. Determination of the di-(2-ethylhexyl) phthalate NOAEL for reproductive development in the rat: importance of the retention of extra animals to adulthood. *Toxicol Sci*. 2010;116(2):640–6.
73. Serrano-Nascimento C, Nicola JP, Teixeira SS, Poyares LL, Lellis-Santos C, Bordin S, et al. Excess iodide downregulates Na(+)/I(-) symporter gene transcription through activation of PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;426:73–90.
74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
75. Fekete C, Lechan RM. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev*. 2014;35(2):159–94.
76. Liu C, Zhao L, Wei L, Li L. DEHP reduces thyroid hormones via interacting with hormone synthesis-related proteins, deiodinases, transthyretin, receptors, and hepatic enzymes in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015;22(16):12711–9.
77. Dong J, Cong Z, You M, Fu Y, Wang Y, Wang Y, et al. Effects of perinatal di (2-ethylhexyl) phthalate exposure on thyroid function in rat offspring. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019;67:53–60.
78. Dong X, Dong J, Zhao Y, Guo J, Wang Z, Liu M, et al. Effects of long-term in vivo exposure to di-2-ethylhexylphthalate on thyroid hormones and the TSH/TSHR signaling pathways in Wistar rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(1):44.

79. 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. *Endocr J*. 2022;69(2):217-24.
80. Wu H, Zhang W, Zhang Y, Kang Z, Miao X, Na X. Novel insights into di-(2-ethylhexyl) phthalate activation: implications for the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Mol Med Rep*. 2021;23(4):1–12.
81. Pierce JG. Eli Lilly lecture. The subunits of pituitary thyrotropin—their relationship to other glycoprotein hormones. *Endocrinology*. 1971;89(6):1331–44.
82. Hannon PR, Flaws JA. The effects of phthalates on the ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:8.
83. Adibi JJ, Zhao Y, Zhan LV, Kapidzic M, Larocque N, Koistinen H, et al. An investigation of the single and combined phthalate metabolite effects on human chorionic gonadotropin expression in placental cells. *Environ Health Perspect*. 2017;125(10):107010.
84. Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994;128(2):216–23.
85. Moyer B, Hixon ML. Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP). *Reprod Toxicol*. 2012;34(1):43–50.
86. Zhai W, Huang Z, Chen L, Feng C, Li B, Li T. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). *PLoS One*. 2014;9(3):e92465.
87. Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, et al. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology*. 2011;32(2):261–7.
88. Kim Y, Ha EH, Kim EJ, Park H, Ha M, Kim JH, et al. Prenatal exposure to phthalates and infant development at 6 months: prospective Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study. *Environ Health Perspect*. 2011;119(10):1495–500.
89. Ishido M, Masuo Y, Sayato-Suzuki J, Oka S, Niki E, Morita M. Dicyclohexylphthalate causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J Neurochem*. 2004;91(1):69–76.
90. van der Spek AH, Fliers E, Boelen A. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;458:29–38.
91. Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncol*. 2010;6(11):1771–9.
92. Faria CC, Peixoto MS, Carvalho DP, Fortunato RS. The emerging role of estrogens in thyroid redox homeostasis and carcinogenesis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2514312.
93. Radke EG, Glenn BS, Braun JM, Cooper GS. Phthalate exposure and female reproductive and developmental outcomes: a systematic review of the human epidemiological evidence. *Environ Int*. 2019;130:104580.
94. Kim MJ, Kim HH, Song YS, Kim OH, Choi K, Kim S, et al. DEHP down-regulates tshr gene expression in rat thyroid tissues and FRTL-5 rat thyrocytes: a potential mechanism of thyroid disruption. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2021;36(2):447–54.

95. Liu C, Qian P, Yang L, Zhang L, Chen C, He M, et al. Pubertal exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate inhibits G9a-mediated histone methylation during spermatogenesis in mice. *Arch Toxicol*. 2016;90(4):955-69.
96. Wang W, Craig ZR, Basavarajappa MS, Hafner KS, Flaws JA. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and inhibits growth of mouse ovarian antral follicles. *Biol Reprod*. 2012;87(6):152.
97. Zhang Y, Wang S, Zhao T, Yang L, Guo S, Shi Y, et al. Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) promoted lipid accumulation via JAK2/STAT5 and aggravated oxidative stress in BRL-3A cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;184:109611.
98. Tsai HJ, Wu CF, Hsiung CA, Lee CH, Wang SL, Chen ML, et al. Longitudinal changes in oxidative stress and early renal injury in children exposed to DEHP and melamine in the 2011 Taiwan food scandal. *Environ Int*. 2022;158:107018.
99. Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, Olivieri G, Silvestrini A, Meucci E, et al. Thyroid hormones, oxidative stress, and inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6757154.
100. Kochman J, Jakubczyk K, Bargiel P, Janda-Milczarek K. The influence of oxidative stress on thyroid diseases. *Antioxidants*. 2021;10(9):1442.
101. Sherif NA, El-Banna A, Abdel-Moneim RA, Sobh ZK, Balah MI. The possible thyroid disruptive effect of di-(2-ethyl hexyl) phthalate and the potential protective role of selenium and curcumin nanoparticles: a toxicological and histological study. *Toxicol Res (Camb)*. 2021;11(1):108–21.
102. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. *Environ Health Perspect*. 2007;115(7):1029–34.
103. Boas M, Frederiksen H, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE, Hegedüs L, Hilsted L, et al. Childhood exposure to phthalates: associations with thyroid function, insulin-like growth factor I, and growth. *Environ Health Perspect*. 2010;118(10):1458–64.
104. Huang HB, Chuang CJ, Su PH, Sun CW, Wang CJ, Wu MT, et al. Prenatal and childhood exposure to phthalate diesters and thyroid function in a 9-year follow-up birth cohort study: Taiwan maternal and infant cohort study. *Epidemiology*. 2017;28 Suppl 1:S10–8.
105. Zhao Y, Song X, Ding S, Qi W, Zhang Y, Xu Q, et al. The associations of urinary DEHP metabolite levels, serum thyroid hormones, and thyroid-related genes among the adolescent students from China: a cross-sectional study. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(13):19081–97.
106. Bianco AC, da Conceição RR. The deiodinase trio and thyroid hormone signaling. *Methods Mol Biol*. 2018;1801:67–83.
107. Luongo C, Dentice M, Salvatore D. Deiodinases and their intricate role in thyroid hormone homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(8):479–88.
108. Orozco A, Valverde-R C. Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid*. 2005;15(8):799–813.
109. Jia PP, Ma YB, Lu CJ, Mirza Z, Zhang W, Jia YF, et al. The effects of disturbance on hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis in zebrafish larvae after exposure to DEHP. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155762.

110. Ishihara A, Nishiyama N, Sugiyama S, Yamauchi K. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *Gen Comp Endocrinol*. 2003;134(1):36–43.
111. Peeters RP, Visser TJ. Metabolism of thyroid hormone. In: Feingold KR, editor. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com. 2000- [updated 2017 Jan 1; cited 2022 Jun 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285545/>
112. Kwakkel J, Fliers E, Boelen A. Illness-induced changes in thyroid hormone metabolism: focus on the tissue level. *Neth J Med*. 2011;69(5):224–8.
113. Du Z, Cao YF, Li SN, Hu CM, Fu ZW, Huang CT, et al. Inhibition of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) by phthalate monoesters. *Chemosphere*. 2018;197:7–13.
114. Vaiserman A. Early-life exposure to endocrine disrupting chemicals and later-life health outcomes: an epigenetic bridge? *Aging Dis*. 2014;5(6):419–29.
115. Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol*. 2011;31(3):363–73.
116. Jacobs MN, Marczylo EL, Guerrero-Bosagna C, Rüegg J. Marked for life: epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals. *Annu Rev Environ Resour*. 2017;42(1):105–60.
117. Sabari BR, Zhang D, Allis CD, Zhao Y. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(2):90–101.
118. Rattan S, Beers HK, Kannan A, Ramakrishnan A, Brehm E, Bagchi I, et al. Prenatal and ancestral exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate alters gene expression and DNA methylation in mouse ovaries. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;379:114629.
119. Zhang X, Ho SM. Epigenetics meets endocrinology. *J Mol Endocrinol*. 2011;46(1):R11–32.

Abstract

Introduction: Thyroid hormones production is regulated by the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. Di-(2-ethylhexyl) phthalate is an endocrine disruptor and it constitutes the main plasticizer used by the industry in the production of malleable plastics. Di-(2-ethylhexyl) phthalate disrupts thyroid function by several mechanisms, however, its effect on hypothalamic-pituitary-thyroid axis during critical windows of development has never been described. **Purpose:** To investigate the impact of maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy on the function of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of F1 offspring animals, after birth and during adulthood. **Methods:** Pregnant Wistar rats were orally treated with corn oil (Control) or di-(2-ethylhexyl) phthalate-supplemented corn oil (0.48 or 4.8mg/kg/day) throughout the gestational period. The male and female offspring rats were used in two periods: in the 20th gestational day or in the 90th postnatal day. Hypothalamus, pituitary, thyroid, liver, and blood were collected, and the gene and protein analysis were performed through real-time PCR and western blot, respectively. TH serum dosage was performed by ELISA. **Results:** Maternal with di-(2-ethylhexyl) phthalate significantly increased the expression of genes involved in thyroid synthesis/secretion of males and offspring in 20th gestational day. In adult females of the offspring, TSH alpha gene/protein expression was observed at the lowest treatment dose of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure. In the thyroid of these animals, there was a reduction in the gene/protein expression of NIS, TSHR, TG, TPO, NKX2.1, PAX8 and FOXE1, in both doses of di-(2-ethylhexyl) phthalate. These data are consistent with the reduction in serum T4 levels. Still in the thyroid, we observed a gene increase of enzymes involved in the acetylation, deacetylation, and demethylation of histones. There was also an increase in DNMT3 gene expression at the highest dose of treatment. While the mRNA expression of the antioxidant enzyme SOD1 was reduced in the thyroid of these animals. In addition, in females, increased hepatic expression of D1 and TTR treatment was observed, only at the lowest treatment dose. A reduction was observed in gene expression of UGT1a1 and UGT1a6 enzymes, only at the highest dose of di-(2-ethylhexyl) phthalate treatment. In the adult males of the offspring, there was no increase in TRH mRNA content in the hypothalamus at the highest treatment dose; and TSH beta in the pituitary, at both treatment doses. In the thyroid of these animals, there was an increase in the gene/protein expression of NIS, TSHR and FOXE1, and an increase in

PAX8 and NKX2.1, at both treatment doses. Additionally, the action of histon3 and H4 presented Hacetyl at the highest treatment dose. There was no change in the serum concentration of T4 and T3 in males. There are no changes in histone-modifying enzymes. While the mRNA expression of the antioxidant enzyme CAT was increased in the thyroid of these animals. There was no significance in the plastic packaging of the profiles in adult males. **Conclusion:** Intrauterine exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate, at low doses, disrupts the HHT axis of the newborn and adult male and female offspring rats. This study strongly suggests that di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure increases the offspring's susceptibility to develop thyroid dysfunctions during adulthood, especially in the female offspring rats.

Keywords: Diethylhexyl phthalate; Pregnancy; Endocrine disruptors; Thyroid gland