

HEMILY BATISTA DA SILVA

**EFEITO AGUDO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO BIS(2-
ETILHEXIL)FTALATO NA HOMEOSTASE DO CÁLCIO,
METABOLISMO ENERGÉTICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
TESTÍCULOS DE *DANIO RERIO***

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica
Orientadora: Profa. Dra. Fátima
Regina Mena Barreto Silva

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Batista-Silva, Hemily

Efeito agudo in vivo e in vitro do bis(2-
etilhexil)ftalato na homeostase do cálcio,
metabolismo energético e estresse oxidativo em
testículos de Danio rerio / Hemily Batista-Silva ;
orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva, 2018.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

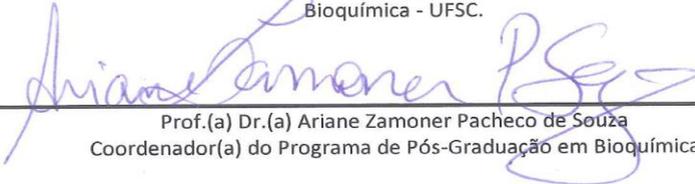
1. Bioquímica. 2. Bioquímica testicular. 3.
Peixes. 4. Cálcio. 5. Ftalatos. I. Silva, Fátima
Regina Mena Barreto. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica. III. Título.

"Efeito agudo *in vivo* e *in vitro* do bis(2-etilhexil)ftalato na homeostase do cálcio, metabolismo energético e estresse oxidativo em testículos de *Danio rerio*"

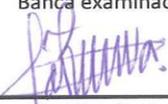
Por

Hemily Batista da Silva

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (027/2018/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

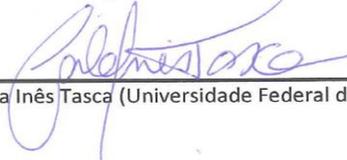

Prof.(a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr.(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr.(a) Rozangela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Claus Tröger Pich (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 09 de novembro de 2018.

*Dedico este trabalho
àqueles que sempre
permaneceram ao meu lado
me incentivando e que
sempre acreditaram e
torceram por mim: meus pais
Tereza Batista e Carlos
Augusto da Silva e ao meu
marido Lucas Formentin.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dispor de boas energias e por estar sempre comigo em todos os momentos;

Agradeço aos meus pais: Tereza Batista da Rocha e Carlos Augusto da Silva por me incentivarem desde sempre aos estudos e por serem as pessoas que mais torcem por mim;

Agradeço ao meu marido e melhor amigo: Lucas Formentin Julia pelo companheirismo, amizade e atenção, compartilhou comigo este momento desde o início, foi paciente em me ouvir, em compreender minhas ausências e em me aturar nos momentos de estresse e desabafo. Sempre me apoiando desde o início desta trajetória;

Manifesto minha gratidão à minha orientadora Dr^a Fátima Regina Mena Barreto Silva por me conceder a oportunidade de realizar o mestrado em seu grupo de pesquisa científica e por todas as oportunidades que me concedeu! Agradeço à sua atenção, colaboração, a todos seus ensinamentos e por acreditar em mim sempre;

Agradeço a todas as minhas companheiras do laboratório pela ajuda, parceria e amizade: Paola Sulis, Renata Gonçalves, Vanessa Staldoni. Em especial à Keyla Rodrigues, Betina Dambrós e Allisson Gomes Castro, nos quais foram muito prestativos me auxiliando sempre que precisei, foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho do início ao fim. Além de companheiros de laboratório, ganhei amigos!

Manifesto minha gratidão ao professor Dr Glen Van Der Kraak e à professora Dr^a Kiev Resende Sousa de Moura pela colaboração, atenção, ensinamentos e toda ajuda;

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade na avaliação deste trabalho;

Agradeço a minha amiga e ex co-orientadora de TCC, Dr^a Michelle Garcez, na qual me auxiliou com a estatística, sempre disposta a tirar minhas dúvidas a respeito;

Também manifesto minha gratidão a Dr^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza e Dr^a Rozangela Curi Pedrosa por todo o apoio, colaboração e ajuda!

Agradeço a CAPES e ao CNPq por todo auxílio financeiro;
Agradeço ao suporte técnico do LAMEB/UFSC e do laboratório do Dr Boris Stambuk;

Agradeço ao suporte físico e financeiro da Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

RESUMO

Os animais estão expostos a produtos químicos considerados desreguladores endócrinos (EDC) através da contaminação dérmica, ingestão ou inalação. O bis(2-etilhexil)ftalato, conhecido como BEHP ou DEHP é considerado um dos principais EDC e se destaca por afetar negativamente a bioquímica testicular de diferentes espécies animais, impactando na fisiologia reprodutiva e na fertilidade masculina. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito agudo *in vivo* e *in vitro* do BEHP na homeostase do cálcio (Ca^{2+}), metabolismo energético e no estresse oxidativo em testículos de *Danio rerio* (*D. rerio*). Para estudar o impacto de diferentes molaridades de Ca^{2+} em testículos de *D. rerio*, os peixes foram mantidos em ambiente aquático por 12 h com uma baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+} . Posteriormente, foi estudado o influxo de Ca^{2+} *in vitro* aos 30 e 60 min com Ca^{2+} radioativo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), bem como a atividade enzimática da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no fígado. Para o estudo do efeito do BEHP no *D. rerio*, os testículos foram tratados *in vitro* por 30 min e os peixes tratados *in vivo* por 12 h com BEHP a 1 μM . Após os tratamentos, foram analisados o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, o envolvimento de canais iônicos, receptores e enzimas, conteúdo de lactato, atividade da lactato desidrogenase (LDH) e gama glutamil transpeptidase (GGT), bem como, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica em testículo de *D. rerio*. Adicionalmente, foi analisada a atividade da TGO e TGP no fígado. A modificação iônica com baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+} no ambiente aquático estimulou o influxo de Ca^{2+} no testículo, bem como acarretou em um aumento da atividade da TGP e GGT. Além disso, o efeito agudo *in vitro* de BEHP em uma baixa concentração aumentou o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) do modo reverso e inibição da Ca^{2+} ATPase SERCA; também acarretou na redução do conteúdo de lactato e redução da atividade da LDH no testículo. Além disso, o efeito agudo *in vitro* e *in vivo* do BEHP foi capaz de aumentar a produção de EROs e peroxidação lipídica no testículo. O efeito *in*

vivo do BEHP também causou aumento da atividade da GGT no testículo e TGP no fígado de *D. rerio*. O efeito agudo do BEHP alterou negativamente a bioquímica testicular de peixes, acarretou em alteração da homeostase do Ca^{2+} , redução do suporte energético e promoveu estresse oxidativo no testículo de *D. rerio*.

Palavras-chave: Ftalato; cálcio; zebrafish; *Danio rerio*; gônadas.

ABSTRACT

The animals are exposed to chemicals that are considered endocrine disrupters (EDC) through dermal contamination, ingestion or inhalation. The bis (2-ethylhexyl) phthalate, known as BEHP or DEHP is considered one of the main EDC and it is known to affect negatively the testicular biochemistry of different animal species impacting on reproductive physiology and male fertility. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the in vivo and in vitro acute effect of BEHP on calcium (Ca^{2+}) homeostasis, energetic metabolism and oxidative stress in *Danio rerio* (*D. rerio*) testis. In order to study the impact of different Ca^{2+} molarities on *D. rerio* testis, the fish were kept in the aquatic environment for 12 h with a low (0.02 mM) and high (2 mM) Ca^{2+} concentrations. After, it was studied the Ca^{2+} influx at 30 and 60 min with radioactive Ca^{2+} ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), as well as the enzymatic activity of glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) in the liver. For the study of the effect of BEHP on *D. rerio*, the testis were treated in vitro for 30 min and the fish treated in vivo for 12 h with 1 μM of BEHP. After this, were studied the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx, the involvement of ionic channels, receptors and enzymes, lactate content, lactate dehydrogenase (LDH) and gamma and gamma glutamyl transpeptidase (GGT) activity, as well as production of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation in the testis. In addition, the activity of GOT and GPT was analyzed in the liver. Ionic modification with low (0.02 mM) and high (2 mM) Ca^{2+} concentrations in the aquatic environment stimulated the Ca^{2+} influx in the testis, as well as resulted in an increase in GPT and GGT activity. In addition, the acute in vitro effect of BEHP at a low concentration increased Ca^{2+} influx through L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels, activation of reverse-mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) exchanger and Ca^{2+} ATPase SERCA inhibition; also led to the reduction of lactate content and reduction of LDH activity in the testis. In addition, the acute in vitro and in vivo effect of BEHP was able to increase ROS production and lipid peroxidation in the testis. The in vivo effect of BEHP also increased of GGT activity in the testis and GPT activity in the liver of *D. rerio*. The acute effect of BEHP was able to negatively alter the testicular

biochemistry of fish, leading to alteration of Ca^{2+} homeostasis, reduction of energy support and promoting oxidative stress in the testis of *D. rerio*.

Keywords: Phthalate; calcium; zebrafish; *Danio rerio*; gonads.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem macroscópica dos testículos de <i>D. rerio</i>	20
Figura 2: Comparação de testículos de mamíferos (A, camundongo) e peixes (B, <i>D. rerio</i>).....	21
Figura 3: (A) Ilustração da organização básica dos testículos de <i>D. rerio</i> e (B) Ilustração das três diferentes fases da espermatogênese em testículos de <i>D. rerio</i>	22
Figura 4: Ilustração esquemática do metabolismo celular das células de Sertoli.....	26
Figura 5: Curva basal do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes <i>D. rerio</i> adultos nos tempos de 30 e 60 min após 12 h de exposição <i>in vivo</i> à um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+}	53
Figura 6: Atividade das enzimas TGO (A); TGP (B) e GGT (C) em fígado de peixes <i>D. rerio</i> após 12 h de exposição <i>in vivo</i> a um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+}	54
Figura 7: Efeito <i>in vitro</i> do BEHP em uma curva concentração-resposta durante 30 min no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes <i>D. rerio</i>	56
Figura 8: Envolvimento dos L-CCDV utilizando o bloqueador Nifedipina (A), TRPV1, usando o agonista Capsaicina (B), Na^+/K^+ ATPase, utilizando o inibidor Ouabaina (C) e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, utilizando o inibidor KB-R763 (D) no efeito <i>in vitro</i> do BEHP durante 30 min no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes <i>D. rerio</i>	58
Figura 9: Envolvimento do Ca^{2+} intracelular, incluindo o receptor de rianodina utilizando o antagonista Dantrolene (A), o quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM (B) e a SERCA utilizando o inibidor Tapsigargina (C) no efeito do BEHP <i>in vitro</i> por 30 min no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes <i>D. rerio</i>	60
Figura 10: Conteúdo de lactato (A), captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose (B) e atividade da LDH intracelular (C) em testículos de	

peixes <i>D. rerio</i> tratados <i>in vitro</i> por 1 h com tampão Cortland (controle) ou BEHP.....	62
Figura 11: Atividade da GGT em testículos de peixes <i>D. rerio</i> tratados <i>in vitro</i> por 1 h (A) e <i>in vivo</i> por 12 h (B) com BEHP.....	63
Figura 12: Produção de EROs em testículos de peixes <i>D. rerio</i> tratados <i>in vitro</i> por 1 h (A) e <i>in vivo</i> por 12 h (B) com BEHP.....	64
Figura 13: Peroxidação lipídica em testículos de peixes <i>D. rerio</i> tratados <i>in vitro</i> por 1 h (A) e <i>in vivo</i> por 12 h (B) com BEHP.....	64
Figura 14: Atividade das enzimas TGO (A), TGP (B) e GGT (C) em fígado de peixes <i>D. rerio</i> tratados <i>in vivo</i> por 12 h com BEHP.....	65
Figura 15: Mecanismo de ação proposto do BEHP na homeostase do Ca ²⁺	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância, do inglês <i>Analysis Of Variance</i> ;
BAPTA	Ácido 1,2-Bis(2-aminofenoxy)etano-N, N, N', N'-tetraacético tetraquis (éster acetoximetílico), do inglês <i>1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester)</i>
BBP	Benzil Butil Ftalato, do inglês <i>Benzyl Butyl Phthalate</i> ;
BEHP	Bis(2-etilhexil)Ftalato, do inglês <i>Bis(2 ethylhexyl)phthalate</i> ;
BIP	Proteína de Ligação, do inglês <i>Binding immunoglobulin Protein</i> ;
Ca ²⁺	Cálcio;
CAAV	Canais Ativados por Alta voltagem;
CABV	Canais Ativados por Baixa Voltagem;
cADPR	Adenosina Difosfato Ribose cíclico, do inglês <i>cyclic Adenosine Diphosphate Ribose</i> ;
CL ₅₀	Concentração Letal 50;
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;
DBP	Dibutil Ftalato, do inglês <i>DiButyl Phthalate</i> ;
DIDP	Diisododecil Ftalato, do inglês <i>Diisodecyl Phthalate</i> ;
DEHP	Di(2-etilhexil)Ftalato, do inglês <i>Di(2-ethylhexyl)Phthalate</i> ;
DEP	Dietil Ftalato, do inglês <i>Diethyl Phthalate</i> ;
DINP	Diisononil Ftalato, do inglês <i>Diisononil Phthalate</i> ;
DOP	Diocetil Ftalato, do inglês <i>Dioctyl Phthalate</i> ;
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i> ;
E2	17β-Estradiol;
ECaC	Canais Epiteliais De Ca ²⁺ , do inglês <i>Epithelial Channels of Ca²⁺</i> ;
EDC	Disruptores Endócrinos, do inglês <i>Endocrine Disruptors Chemicals</i> ;
EPM	Erro Padrão da Média;

FSH Hormônio Folículo Estimulante, do inglês *Follicle-Stimulating Hormone*;

GGT Gama-Glutamil Transpeptidase;

GLUT Transportador de Glicose, do inglês *Glucose Transporter*;

GPx Glutaciona Peroxidase;

GSH Glutaciona, do inglês *Glutathione*;

GST Glutaciona Transferase;

GTH Gonadotrofinas, do inglês *Gonadotrophins*

Grp94 Proteína Regulada por Glicose de 94kDa, do inglês *Glucose Regulated Protein 94 kDa*;

H⁺ Próton;

H₂-DCFDA 2',7'-Dicloro-Dihidro-Fluoresceína Diacetato;

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio;

HCO³ Bicarbonato;

HRCs Células Ricas em H⁺-ATPase, do inglês *H⁺-ATPase Rich-Cells*;

IGF Fator de Crescimento semelhante à Insulina, do inglês *Insulin Growth Factor*;

Ins1,4,5P3 Inositol-1,4,5-Trisfosfato;

InsP3 Inositol Trisfosfato;

KSCs Células Secretoras de K⁺, do inglês *K⁺ Secretory Cells*

LDH Lactato Desidrogenase, do inglês *Lactate Dehydrogenase*;

LH Hormônio Luteinizante, do inglês *Luteinizing Hormone*;

L-CCDV Canais de Ca²⁺ dependente de voltagem do tipo L;

MCT Transportador de Monocarboxilato, do inglês *Monocarboxylate Transporter*;

MDA Malonaldeído;

mRNA Ácido Ribonucleico mensageiro, do inglês *messenger Ribonucleic Acid*;

Na⁺ Sódio;

NAADP Ácido Nicotínico Adenina Dinucleotídeo Fosfato, do inglês *Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate*;

NaOH Hidróxido de sódio;

NaRCs Células Ricas em Na⁺-K⁺-ATPase, do inglês *Na⁺-K⁺-ATPase Rich-Cells*;

NCCCs Células que expressam Cotransportadores Na⁺-Cl⁻, do inglês *Na⁺-Cl⁻ Cotransporter-expressing Cells*;

NCX Trocador Na⁺/Ca²⁺, do inglês *Na⁺/Ca²⁺ Exchanger*;

NH⁴⁺ Amônia;

O₂ Oxigênio molecular;

O₂⁻ Radical Ânion Superóxido;

OH Hidroxila;

⁻OH Radical Hidroxila;

PBR Receptor de Benzodiazepina do tipo Periférico, do inglês *Peripheral-type Benzodiazepine Receptor*;

PET Polietileno Tereftalato;

PPAR Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma, do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*;

PVC Cloreto de Polivinil Plastificado, do inglês *Polyvinyl Chloride plastified*;

Ryr Receptor de Rianodina, do inglês *Ryanodine Receptor*;

SERCA Ca²⁺ ATPase do retículo sarco/endoplasmático, do inglês *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase*;

SIRT1 Sirtuína 1;

SLC26Cs Células que expressam uma família de portadores de soluto 26, do inglês *Solute Carrier family 26 SLC26Cs-expressing Cells*;

SOD Superóxido Dismutase;

StAR Proteína Reguladora Aguda Esteroidogênica, do inglês *Steroidogenic Acute Regulatory protein*;

TBARS Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Species*;

TGF Fator de Crescimento Transformador, do inglês *Transforming Growth Factor*;

TGO Transaminase Glutâmico-Oxalacética;
TGP Transaminase Glutâmico-Pirúvica;
TRP Receptor de Potencial Transitório, do inglês
Transient Receptor Potential;
TRPV1 Receptor de Potencial Transitório da subfamília
Vaniloide 1, do inglês *Transient Receptor Potential subfamily
Vanilloid*;
U Unidades;
VDR Receptores de Vitamina D, do inglês *Vitamin D
Receptors*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>DANIÓ RERIO</i>	19
1.2 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE PEIXES.....	19
1.2.1 Estrutura testicular	19
1.2.2 Espermatogênese	22
1.2.3 Bioquímica testicular: Suporte físico, nutricional e energético às células germinativas	24
1.3 REGULAÇÃO IÔNICA	27
1.3.1 Influxo de cálcio da região extracelular	28
1.3.1.1 Canais de cálcio dependentes de voltagem	28
1.3.1.2 Receptores de potencial transitório	29
1.3.1.3 Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ do modo reverso.....	30
1.3.2 Liberação de cálcio dos estoques intracelulares de cálcio	30
1.3.2.1 Receptores de rianodina	31
1.3.2.2 Receptores de InsP_3	31
1.3.3 Remoção e armazenamento de cálcio	32
1.3.3.1 Bombas Ca^{2+} ATPase do retículo sarco/endoplasmático e membrana plasmática.....	32
1.3.3.2 Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	33
1.3.4 Cálcio: importante íon sinalizador no desempenho de processos testiculares	33
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO	34
1.5 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	35
1.5.1 Ftalatos	36
1.5.1.1 Bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP).....	38
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3 METODOLOGIA	46
3.1 ANIMAIS.....	46
3.2 ACLIMATAÇÃO EM AMBIENTE AQUÁTICO COM BAIXA E ALTA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO	46
3.3 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$	46
3.3.1 Estrutura química dos bloqueadores, antagonista, agonista e inibidores	47
3.4 MENSURAÇÃO DE LACTATO.....	49
3.5 CAPTAÇÃO DE ^{14}C -DESOXI-D-GLICOSE	49

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	50
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GGT	50
3.8 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO TOTAL DE EROs ..	51
3.9 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	51
3.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TGO E TGP	51
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	52
4 RESULTADOS.....	53
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	74
REFERENCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 DANIO RERIO

Danio rerio (*D. rerio*) popularmente conhecido como zebrafish, é um peixe tropical de água doce, membro do grupo de teleósteos *Cyprinidae*, nativo da Índia e do sul da Ásia continental, como Birmânia (MCGONNELL; FOWKES, 2006; LIN; HWANG, 2016). Estudos com o *D. rerio* como um modelo animal de mecanismo regulatório da homeostase iônica são cada vez mais explorados nos últimos anos (HWANG; CHOU, 2013; GUH; LIN; HWANG, 2015; KWONG; KUMAI; PERRY, 2016). No entanto, ao contrário dos animais terrestres, os peixes enfrentam a desafiadora tarefa de equilibrar os gradientes iônicos entre o meio aquático e os fluidos corporais, uma vez que, este animal é considerado hiper-iônico em relação ao ambiente externo em que habitam, estão em constante absorção de íons para evitar a perda destes para o ambiente aquático (HWANG; CHOU, 2013; GUH; LIN; HWANG, 2015; KWONG; KUMAI; PERRY, 2016).

1.2 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE PEIXES

1.2.1 Estrutura testicular

Semelhante a outros vertebrados, o testículo de peixes teleósteos (que possuem esqueleto ósseo) é responsável pela espermatogênese e pela produção de andrógenos (MATTA, 2002). Na grande maioria dos peixes teleósteos, o testículo é um órgão par alongado e emparelhado, ligado à parede dorsal do corpo por um mesórquio (Figura 1), ambos se juntam convergindo em um sistema central de ducto deferente que é aberto para o exterior em todo o poro urogenital (URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2015). Entretanto, de forma distinta dos mamíferos, as células de Sertoli se proliferaram em peixes adultos também (SCHULZ et al., 2005), além de que, a espermatogênese em peixes se desenvolve em cistos localizados dentro dos túbulos seminíferos, no qual estes cistos são formados pela extensão citoplasmática da célula de Sertoli que se associam a espermatogônias primárias, ocorrendo o desenvolvimento

simultâneo das células germinativas (MATTA et al., 2002; SCHULZ et al., 2005).



Figura 1: Imagem macroscópica dos testículos de *D. rerio*. Fonte: Própria do autor.

Morfologicamente o testículo é composto de dois compartimentos principais, o intertubular ou intersticial e o compartimento tubular (KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002). O compartimento intertubular é composto por células esteroidogênicas de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos e mastócitos, células neurais e do tecido conjuntivo, o qual é contínuo com a túnica albugínea, formando a parede do órgão testicular (SCHULZ et al., 2010). O compartimento tubular abriga o epitélio germinativo, o qual é delineado por uma membrana basal e células mióide peritubulares (caracteristicamente semelhantes às células musculares lisas, achatadas e contráteis). Este compartimento contém apenas dois tipos de células: as células somáticas de Sertoli e as células germinativas, que são encontradas em diferentes estágios de desenvolvimento (MRUK; CHENG, 2004; SCHULZ et al., 2010; URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2015).

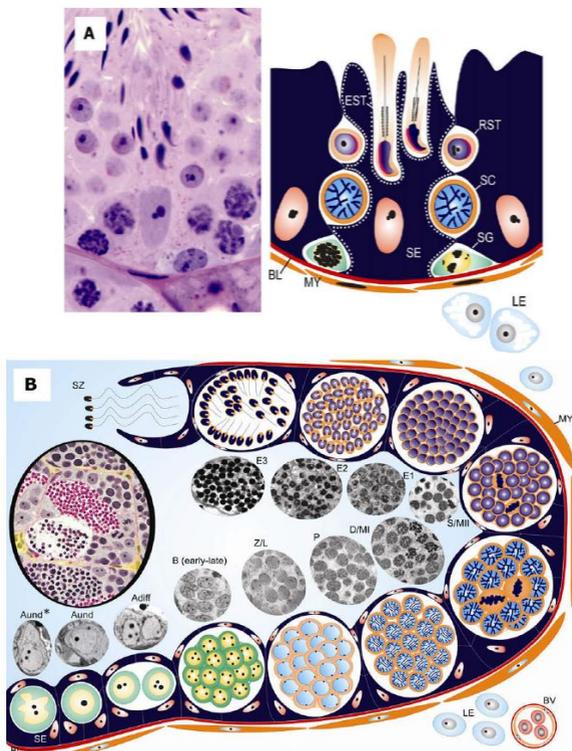


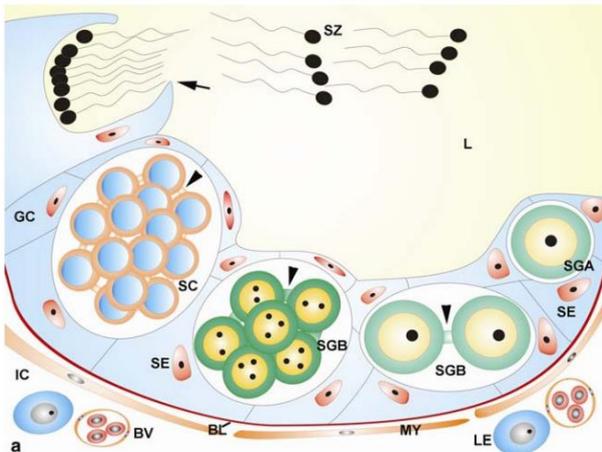
Figura 2: Comparação de testículos de mamíferos (A, camundongo) e peixes (B, *D. rerio*). Segmentos de túbulos espermatogênicos são mostrados para ilustrar as diferenças na relação células de Sertoli/células germinativas entre espermatogênese cística (B) e não-cística (A). O epitélio germinativo contém Sertoli (SE) e células germinativas, delimitadas por uma lâmina basal (BL) e células mioide peritubulares (MY). As células intersticiais de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (BV) são mostrados. (A) espermatogonia (SG); espermatócito (SC); espermatíde redonda (RST); e espermatíde alongada (EST). (B) Espermatogonia indiferenciada* (Aund*); espermatogonia indiferenciada tipo A (Aund); espermatogônia diferenciada tipo A (Adiff); espermatogônias tipo B [B (início-tardio)]; espermatócitos primários leptotênicos/zigotênicos (L/Z); espermatócitos primários paquínicos (P); espermatócitos diplotênicos/metáfase I (D/MI); espermatócitos

secundários/metáfase II (S / MII); espermátides precoces (E1), intermediárias (E2) e finais (E3); espermatozóides (SZ).

Fonte: Schulz et al., 2010.

1.2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo altamente organizado, em que as espermatogônias se proliferam e se diferenciam para formar espermatozóides maduros (Figura 3). A duração deste processo é mais curta em peixes em relação aos mamíferos. A espermatogênese em peixes pode ser dividida em três fases principais de acordo com a morfologia e funcionalidade: I) Fase mitótica/proliferativa ou espermatogonial, com as diferentes gerações de espermatogônias (indiferenciadas e diferenciadas); II) Fase meiótica ou espermatocitária, no qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado, gerando espermatócitos primários e secundários; e III) Fase espermiogênica ou de diferenciação, em que as espermátides haplóides sofrem drásticas alterações morfológicas e funcionais, como condensação nuclear e formação de flagelos, dando origem aos espermatozóides (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010).



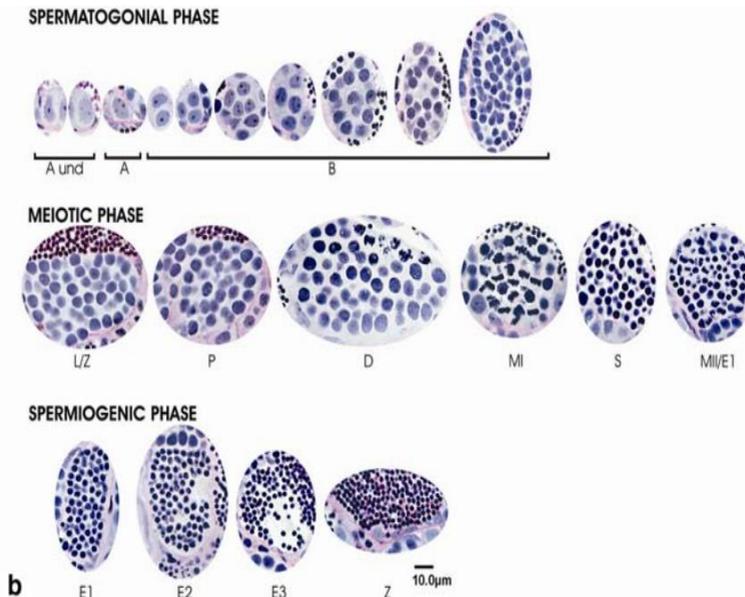


Figura 3: (A) Ilustração da organização básica dos testículos de *D. rerio*, dividido em dois compartimentos: o compartimento tubular ou germinal e o compartimento intertubular ou intersticial). Nos peixes, o epitélio germinativo é organizado em cistos. Estes são formados quando uma única espermatogônia primária ou tipo A (SGA) é completamente envolvido por células de Sertoli (SE). As células resultantes das divisões mitóticas de uma única espermatogônia permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas (pontas de seta) devido à citocinese incompleta. Cistos de espermatogônias secundárias ou tipo B (SGB) e espermatócitos (SC) também estão representados. A espermação (seta) envolve várias alterações nas junções das células de Sertoli, conduzindo à abertura dos cistos e, conseqüentemente, à liberação espermática (SZ) no lúmen do túbulo seminífero (L). (B) Ilustração das três diferentes fases da espermatogênese em testículos de *D. rerio*: Espermatogonial ou proliferativa; meiótico ou espermatocitária e espermiogênica ou diferenciação. Fonte: Nóbrega; Batlouni; França, 2009.

1.2.3 Bioquímica testicular: Suporte físico, nutricional e energético às células germinativas

As células de Sertoli exigem altos níveis de energia para funcionar corretamente, porém, a glicose não é a principal fonte energética utilizada por elas para a síntese de ATP. As células de Sertoli podem manter a viabilidade em cultura na completa ausência de glicose, produzindo ATP e lactato através do metabolismo de lipídios, no qual a β -oxidação parece ser a principal via metabólica utilizada, na qual as células de Sertoli usam preferencialmente lipídios como fonte de energia (XIONG et al., 2009). Curiosamente, as células de Sertoli podem induzir apoptose de células germinativas, no qual são responsáveis por fagocitar as células espermatogênicas apoptóticas, realizar a endocitose e degradação de corpos residuais, convertendo-os em lipídios que são posteriormente metabolizados para produzir ATP (LEE et al., 1997; XIONG et al., 2009). Além disso, o metabolismo de aminoácidos e glicogênio também contribui para a fonte energética das células de Sertoli (SLAUGHTER; MEANS, 1983; RIERA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). A alanina é considerada o principal aminoácido glicogênico, no qual pode ser convertido em piruvato e também pode ser usado como substrato energético pelas células de Sertoli para diversas vias bioquímicas, incluindo o ciclo de Krebs e gliconeogênese (RATO et al., 2012a; 2012b).

O correto desenvolvimento e a função das células germinativas estão intimamente relacionados ao funcionamento das células de Sertoli, que são consideradas as células mais importantes para guiar o desenvolvimento das células germinativas, uma vez que, proporcionam um ambiente adequado para o amadurecimento das células germinativas nos testículos, fornecendo suporte físico, nutricional e energético necessário para uma adequada execução da espermatogênese, além disso, também realizam a fagocitose de células germinativas apoptóticas (ROBINSON; RANGA, 1981; BLANCO-RODRIGUEZ; MARTINEZ-GARCIA, 1999; SCHULZ et al., 2010). O número de células germinativas suportadas por uma célula de Sertoli em peixes teleósteos é em cerca de 100/1, aproximadamente 10 vezes maior em relação à mamíferos (RUSSEL; PETERSON, 1984), sugerindo que o arranjo cístico da

espermatogênese é mais eficiente comparado com o modo como as células de Sertoli estão distribuídas nos túbulos seminíferos de mamíferos (MATTA et al., 2002)

As células de Sertoli fornecem fatores necessários para o metabolismo das células germinativas (Figura 4), como lactato, vitaminas, ferro, cobre, transferrina testicular e ceruloplasmina (responsáveis pelo transporte do ferro e cobre), proteína ligadora de andrógeno; proteína de ligação ao folato e proteína de ligação à biotina, que garante o suprimento vitamínico exigido pelas células germinativas (SKINNER, 1991; REI et al., 2015), bem como, secretam fatores de crescimento, como fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e II (IGF-II), fator de crescimento transformador α (TGF α) e β (TGF β) e hormônios como estrógeno e inibina (RISBRIDGER; ROBERTSON; DE KRETZER, 1990; SKINNER, 2005). A secreção e o transporte destes nutrientes é crítico para o desenvolvimento das células germinativas, no qual são primordialmente dependentes do metabolismo de carboidratos. As células germinativas mais maduras, como os espermatócitos e espermátides são dependentes de lactato, fornecido pelas células de Sertoli (BAJPAI; GUPTA; SETTY, 1998; BOUSSOUAR; BENAHMED, 2004). As células de Sertoli são responsáveis por metabolizar a glicose proveniente do líquido intersticial à lactato através da glicólise, no qual a lactato desidrogenase (LDH) converte o piruvato em lactato na presença de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH) (GRANCHI et al., 2010). O lactato é então transportado para as células germinativas através de transportadores de monocarboxilato (MCT) 4 e 2 (SKINNER, 1991; RATO et al., 2012). Além de fornecer lactato para o desenvolvimento de células germinativas, a LDH é considerada também uma marcadora de atividade testicular, indicadora funcional da espermatogênese (EL-FATTAH et al., 2016).

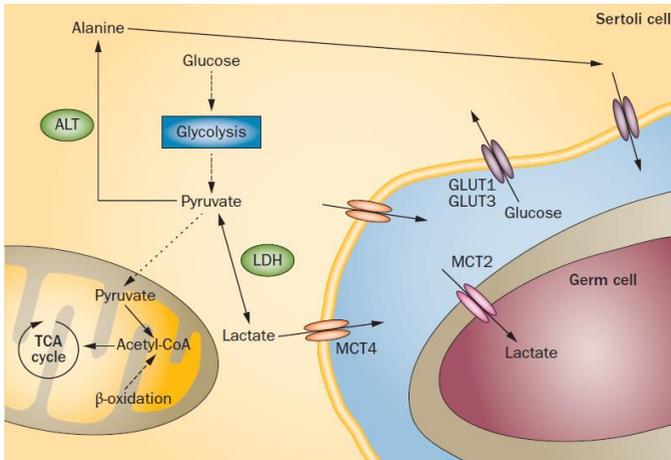


Figura 4: Ilustração esquemática do metabolismo celular das células de Sertoli, nas quais recebem glicose do líquido intersticial através de transportadores de glicose de alta afinidade (GLUT1 e GLUT3) presentes em sua membrana plasmática. A glicose entra na via glicolítica, que resulta na produção de piruvato, que pode ser convertido em lactato pela LDH, alanina ou transportado para a matriz mitocondrial, onde é oxidado e descarboxilado pela piruvato desidrogenase, formando acetil-CoA, que pode entrar no ciclo de Krebs. A maioria do lactato produzido é então exportado para o líquido intratubular através dos transportadores de monocarboxilato 4 (MCT4) e posteriormente para as células germinativas através do MCT2. Fonte: Rato et al., 2012.

As gonadotrofinas pituitárias (GTH) também exercem um papel essencial na fisiologia reprodutiva de peixes, inicialmente chamadas de GTH I e GTH II, estruturalmente semelhantes ao hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) de mamíferos (VAN DER KRAAK, 1992). O FSH regula as atividades das células de Sertoli, como o suporte estrutural, nutricional e regulatório do desenvolvimento das células germinativas (HUHTANIEMI; THEMEN, 2005).

Outra enzima também muito importante para a bioquímica testicular é a GGT, considerada uma enzima marcadora da função das células de Sertoli no testículo, no qual a atividade

desta enzima é inversamente proporcional ao número de espermatozoides maduros (SHERINS; HODGEN, 1976; SCHTEINGART et al., 1988). Por ser a única enzima do ciclo localizada no exterior da superfície da membrana plasmática, a GGT desempenha funções-chave na homeostase da GSH (gama- glutamil- L- cisteinil- L- glicina) - um tripeptídeo antioxidante muito importante na homeostase redox – através da clivagem da GSH extracelular e elevação do fornecimento de cisteína, o qual é o precursor limitante da velocidade da síntese intracelular da GSH. Desta forma, a GSH é o principal substrato da GGT, a qual transfere os resíduos gama-glutamil para a síntese de outros peptídeos e aminoácidos de cisteinilglicina e gama-glutamil. Portanto, a GGT participa da manutenção da homeostase redox da GSH, de células e processos dependentes de oxirredução, como proliferação, diferenciação ou reatividade a condições adversas (MEISTER, 1982; HANIGAN, 1998; MARES et al., 2005; ZHANG; FORMAN; CHOI, 2005).

1.3 REGULAÇÃO IÔNICA

A regulação iônica em peixes teleósteos adultos é realizada primordialmente pelas brânquias, no qual os ionócitos são as células responsáveis pelo transporte de íons epiteliais (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; HWANG; LEE; LIN, 2011; HWANG; CHOU, 2013; KWONG; KUMAI; PERRY, 2016). As brânquias são os órgãos respiratórios dos peixes, a qual é considerado um órgão multifuncional devido à complexidade estrutural deste órgão, o qual possuem diferentes tipos de células, como os ionócitos, células pavimentosas, células mucosas e células estaminais (DYMOWSKA et al., 2012). Os ionócitos são células ricas em mitocôndrias especializadas, sendo que, o *D. rerio* possui no mínimo 5 tipos: células ricas em H⁺-ATPase (HRCs) e Na⁺-K⁺-ATPase (NaRCs), células que expressam cotransportadores Na⁺-Cl⁻ (NCCCs), células secretoras de K⁺ (KSCs) e células que expressam uma família de transportadores de soluto 26 (SLC26Cs) (GUH; LIN; HWANG, 2015). Estas células são consideradas as principais células que expressam transportadores de íons específicos responsáveis pelo transporte de íons, principalmente absorção de sódio (Na⁺),

cloro (Cl^-) e Ca^{2+} , secreção de próton (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-), excreção de amônia (NH_4^+) nas brânquias de *D. rerio* (EVANS, 2011; DYMOWSKA; HWANG; GOSS, 2012; HWANG; CHOU, 2013).

1.3.1 Influxo de cálcio da região extracelular

Existem muitos canais de membrana plasmática que controlam a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular para o interior das células em resposta a estímulos que incluem despolarização de membrana, estímulos nocivos, agonistas extracelulares, mensageiros intracelulares e depleção de reservas intracelulares (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003). Estes canais são proteínas que formam poros funcionais na membrana plasmática, nos quais a abertura e o influxo de Ca^{2+} são favorecidos pelo gradiente eletroquímico de Ca^{2+} e, uma vez que, a concentração extracelular de Ca^{2+} (1 mM) é muito superior a concentração intracelular, 10^{-7} M (HOSEY; LAZDUNSKI, 1988; KRAUSS, 2014). O influxo de Ca^{2+} não só modela a diferença de potencial elétrico da membrana (despolarizando-a e contribuindo para os potenciais de ação), como também eleva significativamente a concentração citosólica do íon (AIRES, 2008).

1.3.1.1 Canais de cálcio dependentes de voltagem

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem da membrana plasmática são agentes de oscilações elétricas da diferença de potencial elétrico da membrana celular. Tanto a diferença de concentração do Ca^{2+} , como a diferença do potencial elétrico compõem a diferença de potencial eletroquímico que move o íon para dentro da célula, com isso, o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular através destes canais altera a baixa concentração citosólica do íon (AIRES, 2008). Estes canais foram classificados em duas grandes classes funcionais: Canais ativados por alta voltagem (CAAV) e ativados por baixa voltagem (CABV). Os CAAV requerem fortes despolarizações para abrir e após inativam lentamente. Considerando as características biofísicas e farmacológicas das correntes, estes foram classificados nos tipos L, N, P/Q e R. Por outro lado, os CABV precisam de despolarizações mais fracas para abrir e inativam mais rapidamente e com potenciais mais negativos que os CAAV. As

correntes dos CABV foram inicialmente denominadas tipo T porque se abrem por corrente elétrica transitória (FOX; NOWYCKY; TSIEN, 1987; DARSZON et al., 2011). e O canal de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L (L-CCDV) é um canal de longa ação da corrente elétrica produzida pela entrada de Ca^{2+} para dentro da célula, o qual é um complexo heteroligomérico constituído por uma subunidade $\alpha 1$ e subunidades acessórias β , γ e $\alpha 2$ - δ . O componente funcional principal, a subunidade $\alpha 2$ é composta por 4 domínios homólogos, cada um contendo 6 segmentos transmembrana (AIRES, 200). Todos os bloqueadores de canais de Ca^{2+} se ligam à subunidade $\alpha 1$, nos quais a nifedipina (da classe das diidropiridinas) é utilizada como um fármaco bloqueador dos canais tipo L (OIGMAN; FRITSCH, 1998).

1.3.1.2 Receptores de potencial transitório

A ampla família dos receptores de potencial transitório (TRP) está envolvida em uma grande variedade de processos de transdução, além da termoccepção. Enquanto alguns membros são ativados por temperaturas baixas e outros, como o receptor de potencial transitório da subfamília vaniloide 1 (TRPV1), o qual é um canal catiônico não seletivo, altamente permeável ao Ca^{2+} , são ativados por temperaturas mais altas, superiores a 42 °C e também por substâncias vaniloides, tais como a capsaicina, presentes em vários tipos de pimentas (essa é a razão pela qual uma sensação de calor é atribuída ao sabor de muitas pimentas) (AIRES, 2008; SANZ-SALVADOR et al., 2012). A estrutura dos receptores TRP é similar a estrutura dos canais dependentes de voltagem, proteínas caracterizadas por seis segmentos transmembrana (S1-S6), com uma região de poros e um sensor de voltagem (MINKE; COOK, 2002). Com base na similaridade de sequência, eles podem ser divididos em sete grupos: TRPC (canônico); TRPV (vaniloide); TRPM (melastatina); TRPA (anquirina); TRPML (mucopolipina); TRPP (policistina) e TRPN, o qual é apenas encontrado em peixes *D. rerio*, vermes e moscas, mas não em mamíferos (DARSZON et al., 2011).

1.3.1.3 Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ do modo reverso

O modo de trabalho do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) depende principalmente do potencial de membrana e do gradiente eletroquímico de Na^+ e Ca^{2+} (SATISH et al., 2011). Um aumento na concentração intracelular de Na^+ , de qualquer fonte, afeta o funcionamento do NCX acarretando na diminuição da força motriz para a saída de Ca^{2+} e/ou aumentando a força motriz para a entrada de Ca^{2+} . Isto, por sua vez, favorece o influxo de um íon Ca^{2+} em troca do efluxo de três íons Na^+ para o meio extracelular. Este processo é chamado de modo reverso ou modo de entrada de Ca^{2+} do NCX e esse processo de acumulação de Ca^{2+} no interior das células leva à sobrecarga de Ca^{2+} (AMRAN; HOMMA; HASHIMOTO, 2003). O KB-R7943 é um inibidor seletivo NCX no modo reverso, inibe preferencialmente o modo reverso do que o modo de avanço, no qual exibe uma fraca inibição (IWAMOTO; WATANO; SHIGEKAWA, 1996; WATANO et al., 1996; AMRAN; HOMMA; HASHIMOTO, 2003).

1.3.2 Liberação de cálcio dos estoques intracelulares de cálcio

No meio intracelular, o Ca^{2+} é armazenado nas mitocôndrias e em compartimentos especiais de armazenamento dos retículos sarco/endoplasmáticos, os qual está complexado com proteínas tamponantes de armazenamento, como calreticulina, calsequestrina, calnexinas, proteína regulada por glicose (Grp94) e proteína de ligação (BIP) (LEE; MICHALAK, 2010). A concentração citosólica de Ca^{2+} em células eucarióticas é mantida em níveis muito baixos, entre 50 a 100 nM. Com a abertura dos canais de organelas de estoque, resulta em um aumento súbito da concentração intracelular deste íon, o qual atua como um segundo mensageiro intracelular (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; ZHENG; POO, 2007). Os receptores inositol trisfosfato (InsP3) e receptores de rianodina são os principais canais intracelulares de Ca^{2+} dos estoques de Ca^{2+} , retículos sarco/endoplasmático. A liberação de Ca^{2+} dos estoques internos é estimulada e modulada pelo próprio Ca^{2+} ou por um grupo de mensageiros, como o inositol-1,4,5-trisfosfato (Ins1,4,5P3), ADP ribose cíclico (cADPR), ácido nicotínico

adenina dinucleotídeo fosfato (NAADP) e esfingosina-1-fosfato que estimulam ou modulam os canais de liberação de reservas intracelulares (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003).

1.3.2.1 Receptores de rianodina

Os receptores de rianodina (Ryr) são uma família de canais intracelulares de liberação de Ca^{2+} que medeiam a liberação deste íon do retículo sarco/endoplasmático para o citoplasma (KUSHNIR; BETZENHAUSER; MARKS, 2010). Os Ryr são complexos homotetraméricos de aproximadamente 2200-kDa de quatro subunidades de 550-kDa. Os RyRs possuem grandes domínios citoplasmáticos de N-terminal (cerca de 80% da proteína) que modulam a abertura do poro do canal localizado no C-terminal. O N-terminal forma um grande arcação citosólico, que interage com as proteínas reguladoras, criando um complexo de sinalização macromolecular (ZALK; LEHNART; MARKS, 2007). Além do cADPR estimular a abertura dos Ryr, o estado aberto deste receptor também é controlado em parte pelo Ca^{2+} , que se liga ao receptor e induz a abertura. Um aumento inicial na concentração de Ca^{2+} induzido pelo influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular devido à abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, estimulando a abertura de ainda mais receptores de rianodina, levando a um aumento acentuado na concentração de Ca^{2+} (KRAUSS, 2014).

1.3.2.2 Receptores de InsP3

A abertura do receptor InsP3 está sujeita a regulação múltipla envolvendo InsP3, Ca^{2+} e ATP. A ligação do InsP3 ao receptor aumenta a afinidade pelo Ca^{2+} e somente após o Ca^{2+} estar ligado pode ocorrer o tráfego de Ca^{2+} para o citoplasma. Por este mecanismo, o Ca^{2+} tem uma ação bifásica no receptor, com um efeito estimulatório por baixas concentrações de Ca^{2+} e um efeito inibitório em altas concentrações de Ca^{2+} , no qual se acredita que este último seja um mecanismo crucial para terminar a atividade do canal e prevenindo aumentos danosos de Ca^{2+} (TAYLOR; TOVEY, 2010; KRAUS, 2014).

1.3.3 Remoção e armazenamento de cálcio

1.3.3.1 Bombas Ca^{2+} ATPase do retículo sarco/endoplasmático e membrana plasmática

As bombas Ca^{2+} ATPase são ATPases do tipo P que realizam um transporte ativo de Ca^{2+} contra seu gradiente de concentração, utilizando a hidrólise de ATP como fonte de energia, tendo como objetivo evitar o acúmulo de Ca^{2+} livre no citoplasma e manter a concentração de Ca^{2+} intracelular mais baixa que o meio extracelular (CLAPHAM, 2007; KRAUSS, 2014).

A Ca^{2+} ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) realiza o transporte de Ca^{2+} obedecendo uma estequiometria na qual dois íons Ca^{2+} são transportados para o interior do retículo por uma molécula de ATP hidrolisada. Este transporte de Ca^{2+} do citosol para o interior do retículo também está associado com um co-transporte de H^+ do interior do retículo para o citosol (CLAPHAM, 2007). A SERCA consiste em uma cadeia polipeptídica simples de 994 resíduos de aminoácidos, enovelada em quatro grandes domínios: um domínio transmembrana (M, composta por 10 hélices transmembrana) e três domínios citosólicos (A, P e N). Os domínios A e P estão envolvidos na fosforilação e estão conectados ao domínio M. O domínio N é de ligação de nucleotídeo, sendo conectado ao domínio P. O sítio catalítico, como o das outras ATPases, compreende dois estados conformacionais: E1 e E2. O ciclo se inicia com a ligação de dois íons Ca^{2+} nos sítios de alta afinidade, no estado E1 e a posterior ligação do ATP e magnésio no sítio do domínio N, no qual gera aproximação do domínio N ao domínio P, o que permite a transferência do fosfato do ATP para o resíduo aspartil formando o intermediário acilfosfato de alta energia. A enzima então assume a conformação E2-P, na qual os sítios de cálcio estão voltados para o lúmen do retículo, havendo uma baixa afinidade pelo Ca^{2+} e permitindo que estes íons sejam liberados para dentro do retículo (AIRES, 2008).

A Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (PMCA) realiza o transporte de Ca^{2+} do citosol para o meio extracelular. A seqüência primária de aminoácidos da PMCA é semelhante à de outros tipos de ATPases do tipo P. A maior parte da proteína se

encontra na porção citosólica, com apenas 10% para o lado extracelular. A porção citosólica é dividida em três grandes domínios, no qual o terceiro domínio constitui uma particularidade da PMCA, corresponde a uma longa cauda do lado do COOH terminal, com 200 a 701 resíduos de aminoácidos, enquanto a SERCA tem apenas 20 a 50 resíduos. O ciclo catalítico da PMCA também transita entre as formas E1 e E2, sendo que, no estado E1, a enzima possui uma alta afinidade para Ca^{2+} no lado citosólico da membrana, enquanto no estado E2 a bomba se encontra em uma baixa afinidade pelo Ca^{2+} fazendo com que o Ca^{2+} seja liberado para o meio externo, entretanto, enquanto a SERCA bombeia 2 íons Ca^{2+} para dentro do retículo, a PMCA bombeia apenas 1 íon Ca^{2+} à custa da hidrólise de uma molécula de ATP (AIRES, 2008; GIACOMELLO et al., 2013).

1.3.3.2 Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Outro mecanismo importante que também contribui para manter baixa a concentração citosólica de Ca^{2+} é o NCX da membrana. A concentração extracelular de Na^+ é de 140 mM e de Ca^{2+} é de 1 mM; já a concentração intracelular de Na^+ é de aproximadamente 4-16 mM e de Ca^{2+} 50-100 nM (BERS; BARRY; DESPA, 2003; KRAUSS, 2014). A atividade do NCX é influenciada por forças eletroquímicas, ou seja, pelos gradientes de concentração de Na^+ e Ca^{2+} e potencial de membrana, no qual resulta em um co-transporte bidirecional eletrogênico de três íons Na^+ para o citosol na troca de um íon Ca^{2+} para o meio extracelular, contribuindo para a despolarização da membrana. Este movimento é chamado de modo de avanço ou modo de saída de Ca^{2+} ou operação do modo de efluxo de Ca^{2+} do NCX (REEVES; HALES, 1984; AMRAN; HOMMA; HASHIMOTO, 2003).

1.3.4 Cálcio: importante íon sinalizador no desempenho de processos testiculares

O Ca^{2+} é considerado o mais importante íon sinalizador intracelular, altamente versátil que regula o desempenho de processos celulares (CLAPHAM, 2007; RIZZUTO et al., 2012;

MAMMUCARI et al., 2016), incluindo aspectos do desenvolvimento neural, como proliferação, migração e diferenciação (ZHENG; POO, 2007; TOTH; SHEM; PRAKRIYA, 2016); contração muscular, desenvolvimento e regeneração do músculo esquelético (TU et al., 2016), contração uterina (DAS, 2000). Além disso, a influência dos canais iônicos, principalmente os de Ca^{2+} , são muito estudados nos últimos anos em diversos processos fisiológicos e bioquímicos do sistema reprodutor masculino através do uso de antagonistas e inibidores de canais iônicos que inibem certos processos a jusante (ALAVI; COSSON, 2006; DARZON et al., 2011). Utilizando estas ferramentas farmacológicas, foi descoberto que a participação dos canais de Ca^{2+} e as vias de sinalização intracelular desempenham um papel fundamental na fertilidade por detectar a influência destes íons e canais iônicos em funções de secreção celular, como exocitose (NAKAMURA; TESHIMA; SAWADA, 2002; DARZON et al., 2006), incluindo secreção em células de Sertoli (MENEGAZ et al., 2010); crescimento, proliferação e morte celular das espermatogônias e espermatócitos (GOLPOUR; SENICKA; NIKSIRAT, 2017); maturação, motilidade e reação do acrossoma de espermatozóides de invertebrados e vertebrados (BILLARD; COSSON, 1992; KRASZNAI et al., 2000; ALAVI et al., 2004; DARZON et al., 2006; DARZON et al., 2011; GOLPOUR; SENIČKA; NIKSIRAT, 2017).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Há cerca de 80 anos atrás, Michaelis propôs que todas as reações de oxidação envolvendo moléculas orgânicas são mediadas por radicais livres (MICHAELIS, 1939). Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares (VALKO, 2007), nos quais estes elétrons não pareados possuem um grau de reatividade. Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas biológicos (MILLER; BUETTNER; AUST, 1990). O oxigênio molecular (O_2) sofre redução de um elétron, originando o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), seguido por redução de um elétron com aceitação concomitante de dois prótons para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este composto não é um radical livre, mas

é quimicamente mais ativo que o O_2 , considerado uma ERO. A molécula de H_2O_2 que aceita mais um elétron é dividida em radical hidroxila (HO^\cdot) e ânion hidroxila (OH^-) (LUSHCHAK, 2014). EROs são gerados em processos endógenos, principalmente pelas mitocôndrias, porém, sua produção pode ser acentuada principalmente por radiações, hiperóxia, drogas e produtos químicos, como xenobióticos. O estresse oxidativo ocorre quando há uma produção excessiva de EROs e/ou diminuição da produção ou inativação de enzimas antioxidantes que excede a capacidade de reparação, no qual pode contribuir para mecanismos fisiopatológicos, acarretando em danos oxidativos a macromoléculas, como dano a lipídeos, como peroxidação lipídica; proteínas, como carbonilação de proteínas; e danos ao DNA (VALKO, 2007).

Um dos fatores mais importantes na etiologia da infertilidade masculina é o estresse oxidativo. A espermatogênese é considerada altamente vulnerável ao estresse oxidativo, uma vez que, se trata de um processo com altas taxas de divisão e proliferação celular, capaz de gerar milhões de espermatozoides, implicando em uma grande demanda no consumo de oxigênio mitocondrial pelo epitélio germinativo. No entanto, a baixa vascularização dos testículos significa que a tensão de oxigênio neste tecido é baixa, no qual há uma intensa competição por esse elemento vital. Os sistemas de defesa antioxidante testicular são de grande importância para proteger contra possíveis danos oxidativos, no qual o dano peroxidativo é considerado uma das principais causas do comprometimento da função testicular (FREE; SCHLUNTZ; JAFFE, 1976; PELTOLA et al., 1994; AITKEN; ROMAN, 2008; SEDHA; KUMAR; SHUKLA, 2015).

1.5 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

O meio ambiente está exposto a inúmeros compostos químicos que são considerados desreguladores endócrinos, conhecidos como *Endocrine Disruptors Chemicals* (EDC) (BROUARD et al., 2016). EDC é o nome designado às moléculas que interferem em funções endócrinas de animais, mimetizam a ação do hormônio 17β -estradiol (E_2), produzindo respostas

estrogênicas ou anti-androgênicas, podendo ocasionar efeitos deletérios ao sistema reprodutor. Estes produtos químicos são encontrados demasiadamente em indústrias químicas, no qual se destacam os ftalatos, uma importante classe de EDC rapidamente metabolizáveis (HILL; JANZ, 2003; ENGEL; WOLF, 2013; USTUNDAG et al., 2017). Com a preocupação em relação aos efeitos deletérios, aumenta-se a necessidade de estudar os mecanismos envolvidos. É demonstrada uma gama de efeitos rápidos de xenoestrógenos, como a ativação de proteínas, incluindo canais de Ca^{2+} , proteínas G, proteínas cinase PKA e PKC, MAPK (WATSON; HU; PAULUCCI-HOLTHAUZEN, 2014).

1.5.1 Ftalatos

Os ésteres de ácidos ftálicos ou ftalatos são produtos químicos rotineiramente utilizados na fabricação de plásticos para aumentar a flexibilidade e a durabilidade dos polímeros plásticos, utilizados principalmente em cloreto de polivinil plastificado (PVC). Todavia, também são utilizados em produtos de cuidados pessoais e farmacêuticos, produtos de cuidados infantis, revestimentos de vinil, materiais de construção, brinquedos, dispositivos médicos, pesticidas, detergentes e acabamentos de madeira (OEARLS; AXFORD; BRAYBROOK, 2003; SCHETTLER, 2006; KOCH; CALAFAT, 2009; CHATTERJEE; KARLOVSKY, 2010; CHEN et al., 2014). Desde a década de 70, há relato evidenciando que o BEHP é transferido de sacos (bolsas) de PVC para o sangue armazenado em bolsas de transfusão sanguínea (JAEGER; RUBIN, 1970). A produção global de ftalatos é superior há três milhões de toneladas métricas anualmente, utilizados principalmente na fabricação do PVC (SCHETTLER, 2006). Como os ftalatos não são incorporados covalentemente na matriz do plástico, estes são facilmente liberados para o meio ambiente, tornando a exposição humana inevitável através da ingestão, inalação e contaminação dérmica (ZHANG et al., 2016). Já se tem comprovado a presença em alimentos (SCHECTER et al., 2013), pó doméstico (BORNEHAG et al., 2004; ABB et al., 2009), água do rio e sedimento (YUWATINI; HATA; TAGUCHI, 2006); em fluidos corporais como o plasma (WAN et al., 2013), leite materno (MAIN et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2012) e urina (LIN et al., 2011).

Os ftalatos são conhecidos como xenoestrógenos, uma vez que, possuem atividade estrogênica *in vitro* e *in vivo* (ZACHAREWSKI et al., 1998; ANDERSEN et al., 1999; PARVEEN et al., 2008; HO et al., 2013; CHEN et al., 2014). A associação de E2 com dibutil ftalato (DBP), bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) e diisononil ftalato (DINP) tem demonstrado um aumento sinérgico da atividade estrogênica em fígado de peixes Medaka (*O. melastigma*) (CHEN et al., 2014).

Estudos preliminares revelam que o sistema reprodutor é mais suscetível aos ftalatos do que a outros órgãos (MARTINO-ANDRADE; CHAHOUD, 2010). A toxicidade testicular promovida pelos ftalatos é influenciada pelo comprimento da cadeia lateral da molécula de éster. Os ftalatos com cadeias mais longas, com grupamentos butil na cadeia lateral (DBP) ou ramificadas com grupamentos etilhexil (BEHP) induzem lesões testiculares degenerativas (HEINDEL; POWELL, 1992; LORZ, 2002). Os efeitos no sistema reprodutor masculino são caracterizados por diminuição do peso dos testículos devido à atrofia dos túbulos seminíferos e degeneração das células germinativas, principalmente espermátócitos e espermátides, células germinativas apoptóticas (GRAY; GANGOLLI, 1986). Além disso, evidenciou-se que os ftalatos promovem o aumento do influxo de Ca^{2+} e aumento do Ca^{2+} intracelular em células germinativas de camundongo (ZHANG et al., 2016), em ovário e células renais (SHIBA et al., 2009), em mastócitos de ratos (NAKAMURA et al., 2002) e em células pancreáticas de ratos (SUN et al., 2015).

Já é elucidado que os ftalatos se ligam e ativam os receptores do proliferador de peroxissomo (PPARs), podendo ocasionar toxicidade hepática e estresse oxidativo (LAPINKAS et al., 2005; ASGHARI; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2015). Os ftalatos BEHP, DBP, benzil butil ftalato (BBP), diisododecil ftalato (DIDP), diisononil ftalato (DINP) e diisononil ftalato (DNOP) quando associados promovem toxicidade aditiva com uma concentração letal 50 (CL_{50}) a 0,5 mg/L e apresentam sintomas de toxicidade, incluindo mortalidade embrionária, curvatura da cauda, edema cardíaco, necrose e ausência de resposta ao toque em embriões de *Danio rerio* (CHEN et al., 2014).

1.5.1.1 Bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP)

O membro mais abundante da classe dos ftalatos é o bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP), também conhecido como di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), o qual consiste em um par de ésteres de oito carbonos ligados a um anel de ácido benzeno-dicarboxílico. O BEHP é comumente utilizado como plastificante em produtos poliméricos para aumentar a flexibilidade e elasticidade, principalmente como plastificante de plásticos de polietileno tereftalato (PET) (WAN et al., 2013; ROWDHWAL; CHEN, 2018). O BEHP é considerado o ftalato mais importante, no qual é produzido mais de dois milhões de toneladas do mesmo anualmente em nível mundial (LORZ et al., 2002). Por ser um composto químico ubíquo, o BEHP levantou preocupações relativas à exposição contínua e generalizada do ser humano. O BEHP ao entrar no corpo, é metabolizado a diferentes metabólitos. Primeiramente é clivado a MEHP e posteriormente, aos metabólitos primários de monoéster: di-n-octil ftalato (DOP), DBP, BBP e dietil ftalato (DEP). A oxidação secundária do BEHP ocorre extensivamente por diferentes reações de oxidação, dando origem aos metabólitos: mono(2-etil-5-hidroxi-hexil)ftalato (5-OH-MEHP), mono(2-etil-5-oxo-hexil)ftalato (5-oxo-MEHP), mono(2-etil-5-carboxipentil)ftalato (5cx-MEPP) e mono[2-(carboximetil)hexil]ftalato (2cx-MMHP) (KOCH; DREXLER; ANGERER, 2003; KOCH; PREUSS; ANGERER, 2006).

O principal metabólito do BEHP, o MEHP causa disfunção reprodutiva em *D. rerio* machos, no qual acarreta na diminuição da densidade e produção de espermatozóides (ZHU et al., 2016). Estudos demonstram que o BEHP é capaz de interromper a produção de testosterona testicular fetal e reduzir a expressão da StAR e Cyp11a em ratos adultos (HANNAS et al., 2011; KARIYAZONO et al., 2015), além de alterar a produção e distribuição de testosterona em humanos (DESDOITS-LETHIMONIER et al., 2012), interromper a espermatogênese de ratos, promover atrofia testicular devido ao aumento de morte celular e diminuição da proliferação celular e apoptose de células de Sertoli, além de aumentar a produção de EROs (KASAHARA et al., 2002; LI et al., 2014). Além disso, o tratamento com BEHP em altas concentrações em *D. rerio* machos é capaz de inibir a progressão da espermatogênese causando uma redução na proporção de espermatozóides e um aumento na proporção de

espermatócitos com conseqüente diminuição na capacidade de fertilizar oócitos (UREN-WEBSTER et al., 2010).

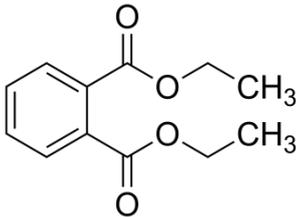
Acredita-se que alterações na espermatogênese provocadas pelo BEHP também podem ser devido à disfunção nas células de Sertoli, tornando-as incapazes de fornecer adequadamente o suporte físico e metabólico às células germinativas (KAVLOCK et al., 2002). A ativação da apoptose no testículo induzida por BEHP pode ser atribuída à indução de dano mitocondrial, aumento da produção de EROs e dano ao DNA, o qual leva à atenuação de SIRT1 (um regulador da função mitocondrial). O BEHP, portanto, também é capaz de suprimir os níveis de ATP testicular devido a uma menor expressão do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial (LI et al, 2014). Além dos efeitos deletérios promovidos pelo BEHP *in vitro* e *in vivo*, estudos com ratas grávidas expostas ao BEHP têm demonstrado acarretar em efeitos deletérios na prole masculina, como redução da expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), Cyp11a e Cyp17a1 que codificam enzimas do complexo enzimático citocromo P450; redução da expressão do receptor de mineralocorticoide e redução da produção de testosterona testicular fetal (HOWDESHHELL et al., 2007; MARTINEZ-ARGUELLES et al., 2009), bem como, redução significativa dos níveis séricos de aldosterona e testosterona na prole masculina (MARTINEZ-ARGUELLES et al., 2011).

O efeito do BEHP *in vitro* em hepatócitos humanos e o efeito *in vivo* em fígado de ratos resultam na ativação do PPAR γ e em estresse oxidativo (ZHANG et al., 2017). Já foi revelado que o BEHP pode induzir carcinogênese hepática por ativação do PPAR α , proliferação de peroxissomos e indução de proteínas peroxissômicas, aumento da proliferação celular, supressão da apoptose, produção de EROs e dano oxidativo ao DNA (RUSYN; PETERS; CUNNINGHAM, 2006). Os mecanismos de toxicidade reprodutiva, como o efeito antiandrogênico dos ftalatos também estão correlacionados com a ativação do PPAR α no testículo e em células de Leydig, no qual induz uma redução do RNAm do receptor de benzodiazepina do tipo periférico (PBR) - uma proteína de ligação ao colesterol envolvida na regulação do transporte de colesterol através das membranas mitocondriais – prejudicando o transporte de colesterol para as mitocôndrias,

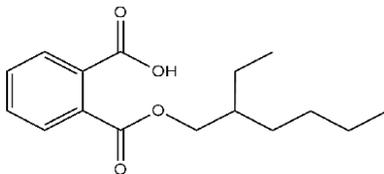
inibição da síntese de esteróides e redução dos níveis circulantes de testosterona (GAZOULI et al., 2002).

Estudos também têm demonstrado o papel dos ftalatos em promover o desequilíbrio entre a produção e a remoção de ERO, ocasionando em dano oxidativo a macromoléculas (RUSYN; PETERS; CUNNINGHAM, 2006; CHEN et al., 2011; ALY et al., 2015). Já é evidenciado que o BEHP gera EROs em testículos de ratos (KASAHARA et al., 2002; LI et al., 2014), em células de adenocarcinoma de próstata humana (ERKEKOGLU et al., 2011), em células de Leydig (ERKEKOGLU et al. ., 2010) e em músculo gastrocnêmio de ratos (SRINIVASAN et al., 2011). Além de reduzir a capacidade antioxidante das células de Leydig, como diminuição da atividade da glutaciona peroxidase (GPx), redução da GSH e glutaciona transferase (GST), bem como ocasionar dano oxidativo ao DNA (ERKEKOGLU et al., 2010). Além disso, promove o aumento da peroxidação lipídica no fígado (ERKEKOGLU et al., 2014) e no músculo gastrocnêmio de ratos (SRINIVASAN et al., 2011).

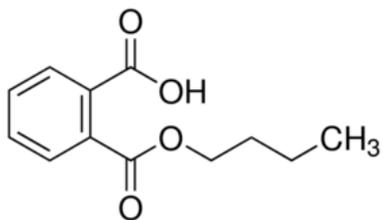
1.5.1.2 Estrutura química do BEHP e seus principais metabólitos



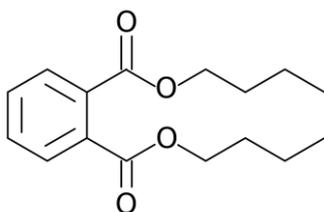
BEHP



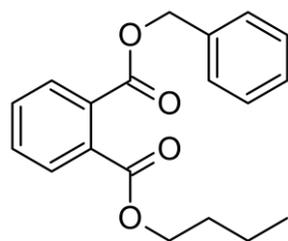
MEHP



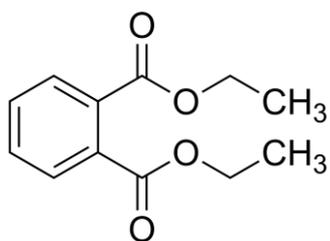
DOP



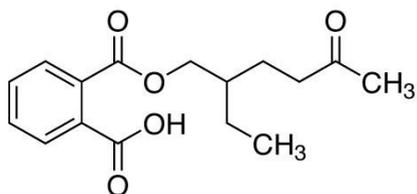
DBP



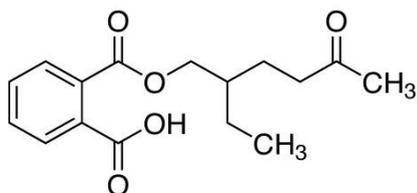
BBP



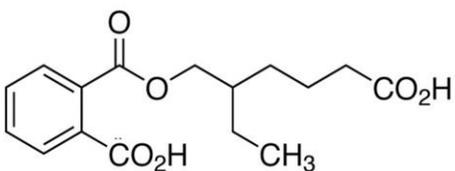
DEP



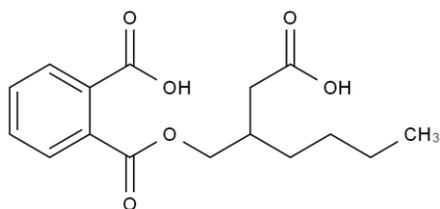
5-OH-MEHP



5-oxo-MEHP



5cx-MEPP



2cx-MMHP

1.5.2 Uso do modelo animal *D. rerio* no estudo da regulação da homeostase iônica e impacto de desreguladores endócrinos no sistema reprodutor masculino

Estudos bioquímicos sobre os efeitos deletérios do BEHP ao sistema reprodutor masculino e mecanismo de ação no modelo animal *D. rerio* são escassos. Os peixes são fundamentais no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, além de ser uma fonte alimentar de extrema importância. Há um vasto número de contaminantes ambientais desreguladores endócrinos, onde diferentes espécies animais estão constantemente expostas. Todavia, o *D. rerio* representa um importante modelo de estudo do mecanismo regulatório da homeostase iônica e de investigações sobre o impacto de compostos desreguladores endócrinos na fisiologia e bioquímica do sistema reprodutor masculino (SCHOLZ; KLÜVER, 2009; SEGNER, 2009; HWANG; CHOU, 2013; BAUMANN et al., 2014; HWANG, 2015; KWONG; KUMAI; PERRY, 2016). É um organismo modelo que oferece vantagens técnicas, práticas e econômicas para o estudo dos principais processos, efeitos e mecanismos biológicos. Há uma ampla gama de ferramentas e informações disponíveis, incluindo o seqüenciamento do seu genoma. O *D. rerio* prova ser um organismo modelo representativo e geneticamente similar a grupos de organismos maiores (SEGNER, 2009).

Além disso, os peixes possuem outras vantagens, por possuírem um ciclo de vida mais curto, é possível estudar seu ciclo de vida em laboratório, desde a fase embrionária até a vida adulta/reprodutiva. Além de que, diferentemente dos mamíferos, a espermatogênese ocorre em arranjo cístico e em um curto período, onde cerca de 100 células germinativas se desenvolvem dentro dos cistos formados e suportados por uma célula de Sertoli, sendo aproximadamente 10 vezes maior em relação aos mamíferos (RUSSEL; PETERSON, 1984), sugerindo que o arranjo cístico da espermatogênese é mais eficiente comparado com o modo como as células de Sertoli estão distribuídas nos túbulos seminíferos de mamíferos. Com todas estas vantagens, é possível estudar todos os processos da espermatogênese e possíveis danos resultantes da exposição a compostos químicos desreguladores endócrinos que podem acarretar em efeitos

deletérios e impactar na infertilidade. Este projeto se justifica pelo objetivo que propõem em elucidar o efeito agudo do BEHP em testículos e fígado de *D. rerio*, além do efeito da exposição *in vivo* dos peixes às extremas molaridades de cálcio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) na homeostase do Ca^{2+} e no metabolismo energético em testículos de peixes *D. rerio* (Zebrafish).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar a curva basal do influxo de cálcio Ca^{2+} *in vitro* em uma curva de tempo de em testículos de peixes *D. rerio* tratados *in vivo* com uma baixa e alta concentração de Ca^{2+} ;
- 2) Avaliar a atividade das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e gama-glutamil-transferase (GGT) no fígado de peixes *D. rerio* tratados *in vivo* com uma baixa e alta concentração de Ca^{2+} ;
- 3) Analisar o efeito *in vitro* do BEHP no influxo de Ca^{2+} e caracterizar os canais iônicos, enzimas e receptores envolvidos no mecanismo de ação do BEHP em testículos de peixes *D. rerio*;
- 4) Mensurar o conteúdo de lactato, atividade da lactato desidrogenase (LDH) e captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose em testículos de *D. rerio* tratados *in vitro* com BEHP;
- 5) Avaliar a atividade da GGT, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica em testículos de *D. rerio* tratados *in vitro* e *in vivo* com BEHP;
- 6) Analisar a atividade das enzimas TGO, TGP e GGT em fígado de *D. rerio* tratados *in vivo* com BEHP.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados peixes *D. rerio* adultos obtidos comercialmente de Muriaé, Minas Gerais. Estes permaneceram em quarentena no aquário para se habituarem ao novo ambiente aquático. Os peixes foram mantidos em aquários em ciclo claro/escuro de 12 h, alimentados duas vezes ao dia com ração especial para peixes ornamentais através de alimentadores automáticos e a temperatura da água dos aquários foram mantidas entre 27 ± 2 °C. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo nº PP00968.

3.2 ACLIMATAÇÃO EM AMBIENTE AQUÁTICO COM BAIXA E ALTA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO

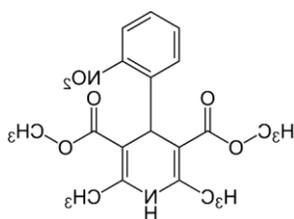
De acordo com o método de Chen, Lu e Hwang (2003), os peixes *D. rerio* foram aclimatados por 12 h em um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e alta concentração (2 mM) de Ca^{2+} , mimetizando situações em que o peixe pode vivenciar em diferentes ambientes aquáticos na natureza. Utilizou-se água deionizada purificada em um sistema Milli-Q para a preparação dos respectivos meios. Utilizou-se 0,02 mM e 2 mM de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e os demais sais $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 foram utilizados em concentrações iguais para ambos os meios ($[\text{Na}^+]$, 0,5 mM, $[\text{Mg}^{2+}]$, 0,16 mM e $[\text{K}^+]$ 0,3 mM). Foram utilizados como grupo controle, os peixes provenientes da água do aquário sem adição de sais, no qual a concentração de Ca^{2+} era de 0,7 mM (análise por titulometria).

3.3 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

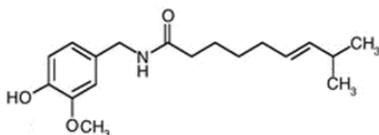
Primeiramente, os testículos dos peixes foram dissecados e acondicionados em microtubos contendo tampão Cortland (124 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,7 mM CaCl_2 ; 3,4 NaH_2PO_4 ; 2,1 mM MgCl_2 ; 1,91 mM MgSO_4 ; 11,9 mM NaHCO_3 e 1 g/L de glicose). Para a curva de tempo do influxo de Ca^{2+} basal, o meio de

incubação foi substituído por 150 μL de Cortland contendo 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de Ca^{2+} radioativo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), onde o testículo ficou incubado por 30 e 60 min em atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5 v/v), pH 7,4 à $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, para avaliar o efeito do BEHP no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, realizou-se uma curva de dose (1 pM, 1 nM e 1 μM) durante 30 min. Os inibidores de proteínas cinases e bloqueadores de canais iônicos, quando utilizados, foram adicionados 15 min antes do tratamento com BEHP. Após a incubação, foi pipetado 300 μL de solução de cloreto de lantânio (127,5 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1,2 mM MgSO_4 , 10 mM HEPES, 11 mM glicose, 10 mM LaCl_3), pH 7,3 a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ para interromper o fluxo de Ca^{2+} (BATRA, 1982; BATRA; SJÖGREN, 1983). Posteriormente, a solução foi substituída por duas lavagens de 150 μL da solução de cloreto de lantânio. Para finalizar, as amostras foram homogeneizadas com NaOH 0,5 M. A radioatividade foi determinada pelo contador automático de cintilação em meio líquido, no qual foi pipetado 50 μL da amostra em 1 mL de líquido de cintilação (MENEGAZ et al., 2010). Outra alíquota da amostra foi utilizada para a dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos em pmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por μg de proteína.

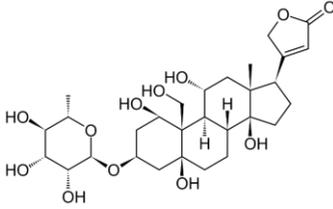
3.3.1 Estrutura química dos bloqueadores, antagonista, agonista e inibidores



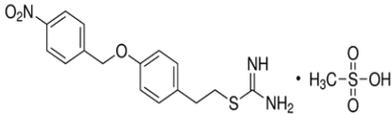
NIFEDIPINA: Bloqueador dos L-CCDV;



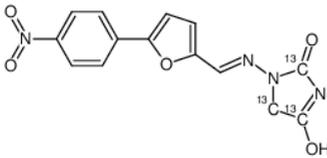
CAPSAICINA: Agonista dos canais TRPV1;



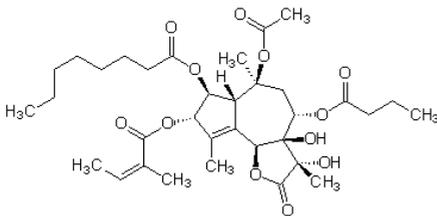
OUABAÍNA: Inibidor da Na^+/K^+ ATPase;



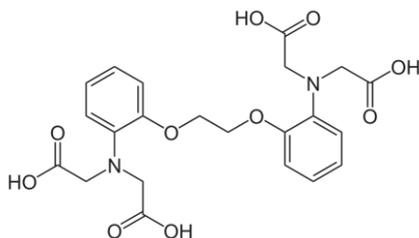
KBR-R7943: Inibidor do NCX (seletivo ao modo reverso);



DANTROLENE: Antagonista do receptor rianodina;



TAPSIGARGINA: Inibidor da Ca^{2+} ATPase SERCA;



BAPTA-AM: Quelante do Ca^{2+} intracelular.

3.4 MENSURAÇÃO DE LACTATO

Primeiramente, os testículos dos peixes foram dissecados e acondicionados em microtubos contendo tampão Cortland, no qual foram incubados *in vitro* por 1 h com tampão Cortland (controle) ou BEHP (1 μM) em atmosfera carbogênica a 28 °C. Posteriormente, realizou-se a mensuração do conteúdo de lactato de acordo com as instruções do fabricante Labtest *Liquiform*. Na presença de oxigênio, a lactato oxidase catalisa a oxidação do ácido láctico, produzindo piruvato e peróxido de hidrogênio, no qual em seguida ocorre um acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e reagente fenólico TOOS, catalisada pela peroxidase, produzindo quinoneimina, sendo que, a intensidade da coloração do produto na reação é diretamente proporcional ao conteúdo de lactato na amostra. A leitura da absorbância foi realizada a 550 nm e os resultados foram expressos por mg de lactato por μg de proteína (LOWRY et al., 1951).

3.5 CAPTAÇÃO DE ^{14}C -DESOXI-D-GLICOSE

Primeiramente, os testículos dos peixes foram dissecados e acondicionados em microtubos contendo tampão Cortland, no qual foram incubados *in vitro* por 1 h com tampão Cortland (controle) ou BEHP (1 μM), ambas as soluções contendo 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^{14}C -desoxi-D-glicose em atmosfera carbogênica a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão Cortland e homogeneizadas em NaOH 0,5 M. Uma alíquota do homogenato foi usada para contagem da radioatividade por

cintilação líquida (KAPPEL et al., 2013). Outra alíquota da amostra foi usada para a dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos em mg de glicosil por mg de proteína.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

Primeiramente, os testículos dos peixes foram dissecados e acondicionados em microtubos contendo tampão Cortland, no qual foram incubados *in vitro* por 1 h com tampão Cortland (controle) ou BEHP (1 μ M). Posteriormente, realizou-se a determinação da atividade da LDH de acordo com as instruções do fabricante Labtest *Liquiform*. Trata-se de um teste de método cinético, no qual a LDH catalisa a conversão de piruvato à lactato na presença de NADH. A leitura foi realizada a 340 nm, no qual o decréscimo da absorbância devido à oxidação do NADH é inversamente proporcional a atividade da LDH da amostra. Os resultados foram expressos por U de LDH por μ g de proteína (LOWRY et al., 1951).

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GGT

A atividade da GGT foi determinada em fígado de *D. rerio* após 12 h de exposição em um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+} . Além disso, a atividade da GGT foi determinada em testículos de *D. rerio* após 12 h de tratamento *in vivo* com BEHP (1 μ M) e em testículos tratados *in vitro* por 1 h com BEHP (1 μ M). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante Labtest *Liquiform*. Trata-se de um teste colorimétrico, método cinético de tempo fixo, utilizando L- γ -glutamil-p-nitroanilina como substrato e glicilglicina como molécula aceptora, sendo que, a quantidade formada de p-nitroanilina é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm e os resultados foram expressos por U de GGT por μ g de proteína (LOWRY et al., 1951).

3.8 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO TOTAL DE EROS

Para a determinação da produção total de EROs, foi utilizado o método da oxidação do 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (H₂-DCFDA) por Paraidathathu, de Groot e Kehrer (1992), no qual foi analisado em testículos de *D. rerio* após tratamento com BEHP (1 µM) *in vitro* por 1 h e em testículos de *D. rerio* tratados *in vivo* por 12 h. Após o tratamento, o testículo foi homogeneizado em tampão fosfato (Na₃PO₄ 20 mM; KCl 140 mM; pH 7,4) e centrifugado (960 xg, 10 min, 4 °C), no qual o sobrenadante foi incubado com H₂-DCFDA por 30 minutos a 37 °C. Quando oxidado, H₂-DCFDA emite fluorescência que pode ser mensurada (485 nm excitação, 520 nm emissão), no qual é estimado o conteúdo de EROs proporcionalmente à taxa de emissão. Os resultados foram expressos em U de fluorescência (UF) por µg de proteína (LOWRY et al., 1951).

3.9 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para a determinação da peroxidação lipídica, utilizou-se a técnica de dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por Bird e Draper (1984), no qual foi analisado em testículos de *D. rerio* após tratamento com BEHP (1 µM) *in vitro* por 1 h e em testículos de *D. rerio* tratados *in vivo* por 12 h. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas no tampão Tris-HCl (60 mM; ácido pentético (DTPA) 0,1 M; pH 7,4) e após, adicionou-se ácido tricloroacético (TCA, 12 %) e ácido tiobarbitúrico (TBA; 0,73 %), no qual, foram incubados a 100 °C por 1 h. Posteriormente, as amostras foram resfriadas a 4 °C e centrifugadas (1.000 xg) por 5 min. A absorbância foi mensurada a 535 nm e os resultados foram expressos em mmol de malonaldeído (MDA) por µg proteína (Lowry et al., 1951).

3.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TGO E TGP

A atividade da TGO e TGP foram determinadas em fígado de *D. rerio* após 12 h de exposição em um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca²⁺. Também foi avaliado a atividade da TGO e TGP em testículos

de *D. rerio* após tratamento *in vivo* com BEHP (1 μ M) por 12 h. Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante Analisa. Trata-se de um teste colorimétrico, pelo método de Reitman-Frankel. O oxaloacetato e piruvato formado no teste da TGO e TGP, respectivamente, reagem com a 2-4-dinitrofenilhidrazina (reagente de cor), formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de NaOH. A intensidade da coloração foi proporcional à atividade enzimática da amostra. A leitura foi realizada a 505 nm e os resultados foram expressos por U de TGO e U de TGP por μ g de proteína (LOWRY et al., 1951).

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados através do programa STATISTICA e GraphPad Prism 5. O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuem uma distribuição normal. Os resultados foram avaliados por teste *t* de *Student* ou análise de variância ANOVA de uma ou duas vias. O teste *post hoc* Bonferroni foi utilizado para comparar os diferentes grupos quando houve diferença significativa. O *post hoc* Dunnett foi utilizado para comparar todos os grupos especificamente com o grupo controle quando houve diferença significativa. As diferenças estatísticas entre os grupos foram consideradas quando $p \leq 0,05$. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

Para estudar a homeostase do Ca^{2+} no testículo de peixes *D. rerio*, primeiramente, como apresentado na figura 5, realizou-se a curva basal do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes *D. rerio* nos tempos de 30 e 60 min após 12 h de exposição *in vivo* à um ambiente aquático com extremas molaridades de Ca^{2+} , com uma baixa (0,02 mM) e uma alta (2 mM) concentração deste íon. Observou-se que a modificação da concentração de Ca^{2+} em um ambiente aquático alterou o influxo de Ca^{2+} *in vitro* em 30 min no testículo [$F(2,10) = 9,98$; $p = 0,004$], no qual o teste *post hoc* Bonferroni apontou que em 30 min de incubação, o grupo que foi exposto ao Ca^{2+} 0,02 e 2 mM *in vivo* resultou em um aumento significativo ($p = 0,011$ e $p = 0,009$, respectivamente) do influxo de Ca^{2+} em relação aos respectivos grupos controle (0,7 mM de Ca^{2+}). A modificação da concentração de Ca^{2+} em um ambiente aquático também alterou o influxo de Ca^{2+} *in vitro* em 60 min de incubação [$F(2,11) = 6,08$; $p = 0,016$], no qual o grupo exposto à maior concentração de Ca^{2+} (2 mM), também estimulou o influxo de Ca^{2+} em testículo de *D. rerio* em 60 min ($p = 0,017$). Além disso, o grupo controle aos 60 min aumentou significativamente o influxo de Ca^{2+} em relação aos 30 min ($p = 0,005$).

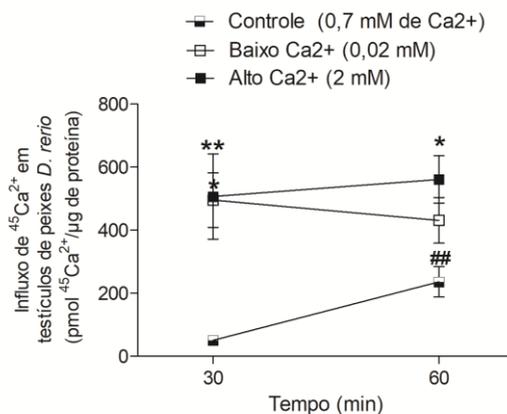
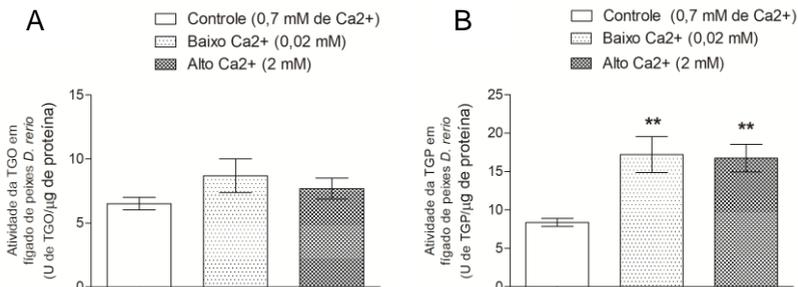


Figura 5: Curva basal do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes *D. rerio* adultos nos tempos de 30 e 60 min após 12 h de exposição *in vivo* à um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e

alta (2 mM) concentração de Ca^{2+} . O grupo controle foi considerado a água normal do aquário (0,7 mM de Ca^{2+}) sem adição de sais. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 4-5 animais por grupo. Diferenças estatísticas entre os grupos foram consideradas quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado com os respectivos grupos controle (30 e 60 min). ## $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle em 30 min.

Para investigar se uma baixa e uma alta concentração de Ca^{2+} poderiam acarretar em lesão hepática, a atividade das enzimas TGO, TGP e GGT (Figuras 6A, B e C, respectivamente) em fígado de peixes *D. rerio* expostos por 12 h em um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+} foram analisadas por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Dunnett. As figuras 6B e 6C, respectivamente, mostram que tanto a baixa, quanto a alta concentração de Ca^{2+} no ambiente aquático acarretou em um aumento significativo da atividade da TGP ($p = 0,0031$ e $p = 0,0034$, respectivamente) em relação ao grupo controle (0,7 mM de Ca^{2+}), além de ocasionar um aumento da atividade GGT ($p = 0,041$ e $p = 0,0028$, respectivamente) em relação ao grupo controle (0,7 mM de Ca^{2+}). Entretanto, não houve alteração da atividade da TGO (Figura 6A).



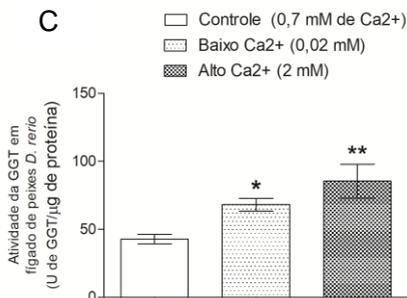


Figura 6: Atividade das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética - TGO (A); transaminase glutâmico-pirúvica - TGP (B) e gama glutamil transpeptidase – GGT (C) em fígado de peixes *D. rerio* após 12 h de exposição *in vivo* a um ambiente aquático com baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+} . O grupo controle foi considerado a água normal do aquário (0,7 mM de Ca^{2+}) sem adição de sais. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Dunnett. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 6 (A), 6-7 (B) e 4-5 (C) animais por grupo. Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado foram consideradas quando $p \leq 0,05$. ** $p < 0,01$ (B), * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (C) quando comparados ao grupo controle.

Para estudar o efeito e mecanismo de ação do BEHP na homeostase do Ca^{2+} em testículo de peixes *D. rerio*, primeiramente analisou-se o efeito *in vitro* do BEHP em uma curva dose-resposta (1 pM, 1 nM e 1 μM) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 30 min (Figura 7), no qual foi analisado por ANOVA de uma via. O teste *post hoc* Dunnett mostrou que somente o BEHP a 1 μM foi capaz de estimular significativamente o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em relação ao grupo controle ($p = 0,03$).

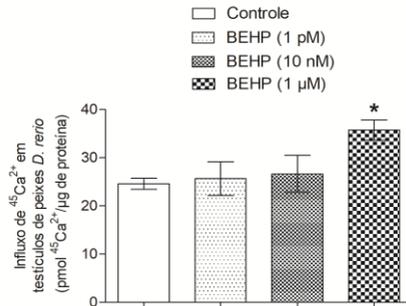


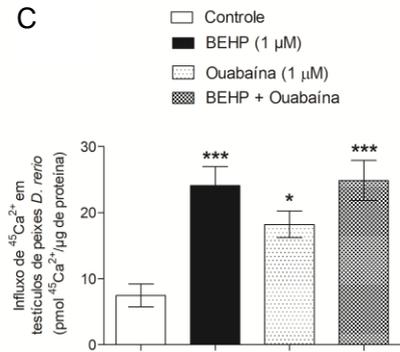
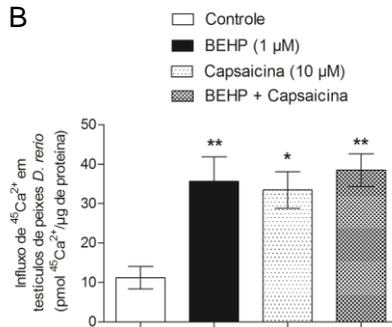
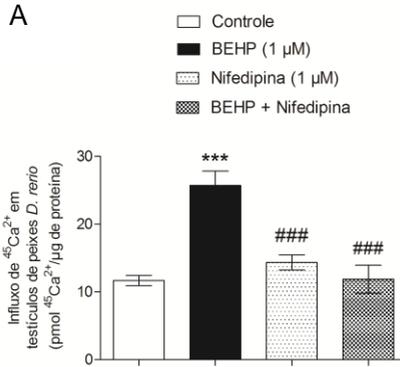
Figura 7: Efeito *in vitro* do bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) em uma curva concentração-resposta durante 30 min no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes *D. rerio*. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc Dunnett. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. Diferenças estatísticas entre os grupos foram consideradas quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Para investigar o mecanismo de ação do BEHP, estudaram-se quais canais iônicos, receptores e enzimas envolvidos utilizando bloqueadores, antagonista, agonista e inibidores. Primeiramente, como ilustrado na figura 8A, foi estudado o envolvimento dos canais L-CCDV, utilizando o inibidor nifedipina, no qual foi analisado por ANOVA de duas vias. Observou-se que houve interação entre o tratamento com BEHP e o bloqueador nifedipina no influxo de Ca^{2+} [$F(1,19) = 23,64$; $p = 0,0001$], sendo que o teste *post hoc* Bonferroni mostrou que o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ promovido pelo BEHP em relação ao grupo controle ($p = 0,00005$) foi inibido quando associado à nifedipina ($p = 0,0001$), evidenciando que o aumento do influxo de Ca^{2+} promovido por BEHP é mediado pelos canais L-CCDV. Além disso, como ilustrado na figura 8B, foi estudado o envolvimento dos canais catiônicos (de Ca^{2+} e Na^+) TRPV1, utilizando o agonista capsaicina, no qual foi analisado por ANOVA de duas vias. O teste *post hoc* Bonferroni mostrou que aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ promovido pelo BEHP em relação ao grupo controle ($p = 0,009$) se manteve aumentado quando associado à capsaicina ($p = 0,002$ em relação ao grupo

controle), mostrando que ambos possuem efeito similar em aumentar o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, indicando que o TRPV1 pode estar envolvido no mecanismo de ação do BEHP.

Para verificar um possível envolvimento da Na^+/K^+ ATPase no mecanismo de ação do BEHP, utilizou-se o inibidor ouabaína. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias (Figura 8C), seguido do teste *post hoc* Bonferroni, no qual mostrou que o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ promovido pelo BEHP em relação ao grupo controle ($p = 0,0006$) manteve-se aumentado quando associado à ouabaína ($p = 0,0006$, em relação ao grupo controle). Além disso, a ouabaína *per se* também estimulou o influxo de Ca^{2+} ($p = 0,04$), evidenciando que a inibição da Na^+/K^+ ATPase estimula o influxo de Ca^{2+} e indicando que ambos possuem um efeito similar, no qual este aumento no influxo de Ca^{2+} foi mediado pela ativação de outro canal iônico.

Considerando que o modo de trabalho do NCX no modo reverso depende principalmente do potencial de membrana e do aumento do gradiente de concentração de Na^+ , com o aumento intracelular de Na^+ através dos canais catiônicos TRPV1 e da inibição da Na^+/K^+ ATPase no presente estudo, investigou-se o possível envolvimento do NCX no modo reverso utilizando o inibidor KB-R7943. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias (Figura 8D), seguido do teste *post hoc* Bonferroni, no qual mostrou que o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ promovido pelo BEHP em relação ao grupo controle ($p = 0,0004$) foi inibido quando associado ao KB-R763 ($p = 0,00008$), revelando que o trocador NCX do modo reverso está envolvido no mecanismo de ação do BEHP em promover o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.



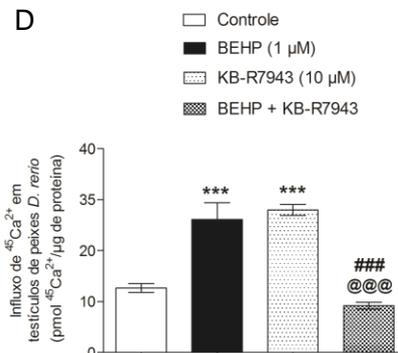
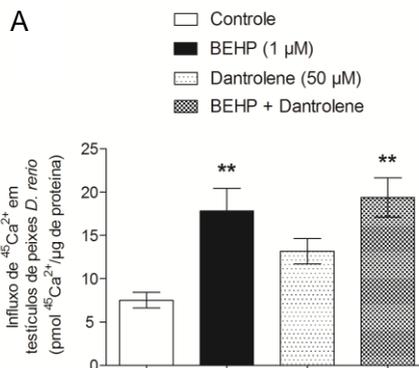


Figura 8: Envolvimento do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L (L-CCDV), utilizando o bloqueador Nifedipina (A), canal catiônico da subfamília vanilóide potencial do receptor transitório 1 (TRPV1), usando o agonista Capsaicina (B), Na^+/K^+ ATPase, utilizando o inibidor Ouabaína (C) e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, utilizando o inibidor KB-R7943 (D) no efeito *in vitro* do bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) durante 30 min no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes *D. rerio*. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 6 (A), 6-7 (B), 4-6 (C) e 5-7 (D) animais por grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram consideradas quando $p \leq 0,05$. *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle, ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo BEHP (A); * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (B); ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (C); *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle, ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo BEHP e @@@ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo KB-R7943 (D).

Para verificar se o Ca^{2+} dos estoques intracelulares estaria envolvido no mecanismo de ação do BEHP em promover o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, analisou-se o envolvimento dos receptores de rianodina utilizando o antagonista dantrolene. Para analisar o envolvimento da Ca^{2+} ATPase SERCA foi utilizado o inibidor tapsigargina e para avaliar o envolvimento do Ca^{2+}

intracelular foi utilizado o quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM (Figuras 9A, B, C, respectivamente). Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* Bonferroni, no qual mostrou que o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ promovido pelo BEHP em relação ao grupo controle ($p = 0,0052$) manteve-se significativamente aumentado quando o BEHP foi associado ao dantrolene ($p = 0,0012$, em relação ao grupo controle), indicando que os receptores de rianodina não estão envolvidos no mecanismo de ação do BEHP. Além disso, através do ANOVA de duas vias, observou-se uma interação entre a o tratamento com BEHP e o inibidor tapsigargina no influxo de Ca^{2+} [$F(1,24) = 13,8$; $p = 0,001$], sendo que, o teste *post hoc* Bonferroni mostrou que o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ promovido pelo BEHP em relação ao grupo controle ($p = 0,00003$) foi inibido quando associado à tapsigargina ($p = 0,00019$), evidenciando que o aumento do influxo de Ca^{2+} promovido por BEHP também é mediado pela inibição da SERCA (Figura 9B). Entretanto, em relação a figura 9C, através do teste *post hoc* Bonferroni, foi evidenciado que o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ promovido pelo BEHP em relação ao grupo controle ($p = 0,004$) não obteve diferença significativa quando o BEHP foi associado ao BAPTA-AM. Além disso, como esperado, o BAPTA-AM *per se* estimulou o influxo de Ca^{2+} ($p = 0,03$) em relação ao grupo controle.



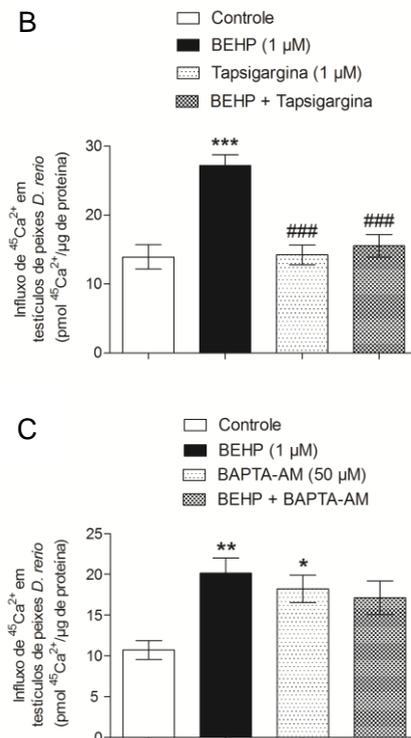


Figura 9: Envolvimento do Ca^{2+} intracelular, incluindo o receptor de rianodina utilizando o antagonista Dantrolene (A), o quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM (B) e a Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA) utilizando o inibidor Tapsigargina (C) no efeito do bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) *in vitro* por 30 min no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de peixes *D. rerio*. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 6-7 (A), 6-7 (B), 7 (C) animais por grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram consideradas quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle, @ $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Dantrolene (A); *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo BEHP (B); ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (C).

Para estudar o impacto do aumento do influxo de Ca^{2+} e aumento intracelular do Ca^{2+} promovido pelo BEHP a $1 \mu\text{M}$, foi estudado possíveis efeitos deletérios ao testículo causados por este, nos quais impactam na fertilidade masculina. Primeiramente, investigou-se o efeito no suporte nutricional e metabólico no testículo de peixes *D. rerio*, no qual foi analisado o efeito agudo (1 h) *in vitro* do BEHP ($1 \mu\text{M}$) no conteúdo de lactato (Figura 10A), captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose (Figura 10B) e atividade da LDH (Figura 10C). Todos estes dados foram analisados por teste *t* de Student, no qual mostrou que houve um decréscimo de 52% no conteúdo de lactato promovido pelo BEHP, em relação ao grupo controle ($p = 0,0034$). Porém, o tratamento agudo (1 h) *in vitro* do BEHP ($1 \mu\text{M}$) não afetou a captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose (Figura 10B) em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). No entanto, a análise da atividade intracelular da LDH (figura 10C), revelou que concomitantemente a redução do lactato, houve uma redução (41%) da atividade enzimática em testículos de *D. rerio* tratados *in vitro* por 1 h com BEHP ($1 \mu\text{M}$) em relação ao grupo controle ($p = 0,0036$).

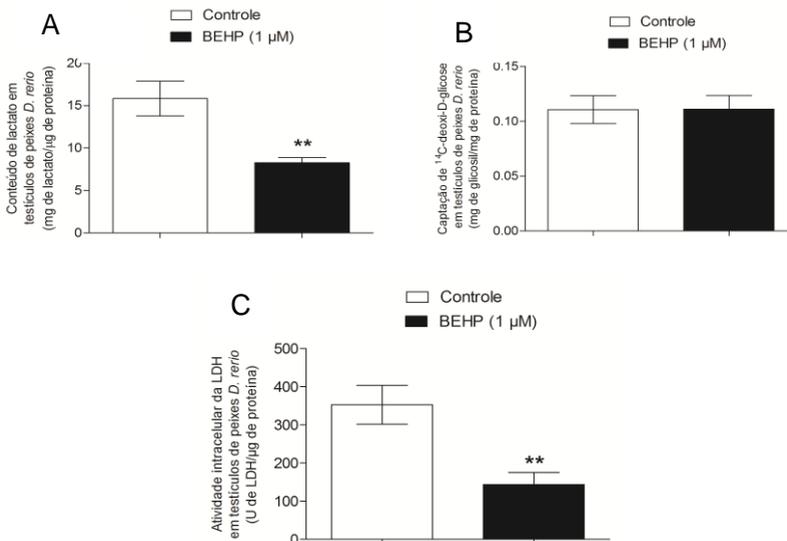


Figura 10: Conteúdo de lactato (A), captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose (B) e atividade da LDH intracelular (C) em testículos de peixes *D. rerio* tratados *in vitro* por 1 h com tampão Cortland (controle) ou bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) a $1\ \mu\text{M}$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 8 animais por grupo. Os dados foram analisados por teste t de Student e as diferenças estatísticas entre os grupos foram consideradas quando $p \leq 0,05$. ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (A e B).

Posteriormente, foi analisado se o tratamento *in vitro* (1 h) e *in vivo* (12 h) com BEHP a $1\ \mu\text{M}$ seria capaz de alterar a atividade da GGT, aumentar a produção de EROs e peroxidação lipídica em testículos de peixes *D. rerio*. A análise por teste t de Student mostrou que somente o tratamento *in vivo* com BEHP levou a um aumento da atividade da GGT ($p = 0,002$) no testículo (Figura 11B). No entanto, através do teste t de Student unicaudal, evidenciou que ambos os tratamentos, *in vitro* e *in vivo*, com BEHP, como mostram a figura 12A e 12B, respectivamente, acarretou em um aumento da produção de EROs ($p = 0,004$ e $p < 0,0001$, respectivamente) nos testículos, com concomitante aumento da peroxidação lipídica ($p = 0,02$ e $p = 0,0017$, respectivamente) em testículos de peixes *D. rerio* (Figura 13A e 13B).

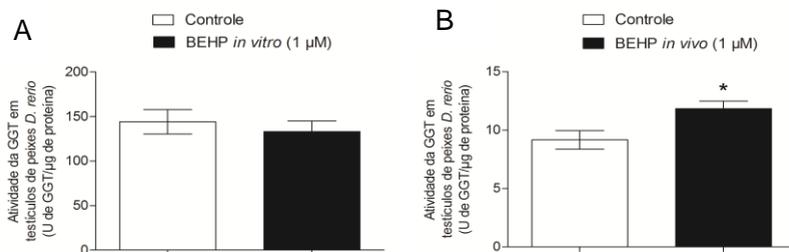


Figura 11: Atividade da gama glutamil transpeptidase (GGT) em testículos de peixes *D. rerio* tratados *in vitro* por 1 h (A) e *in vivo* por 12 h (B) com bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) a $1\ \mu\text{M}$. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 8 (A) e 7 (B) animais por grupo. Os dados foram analisados pelo teste t de Student e as diferenças estatísticas entre os

grupos controle e tratado foram consideradas quando $p \leq 0,05$. Não houve diferença significativa entre os grupos (A); $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (B).

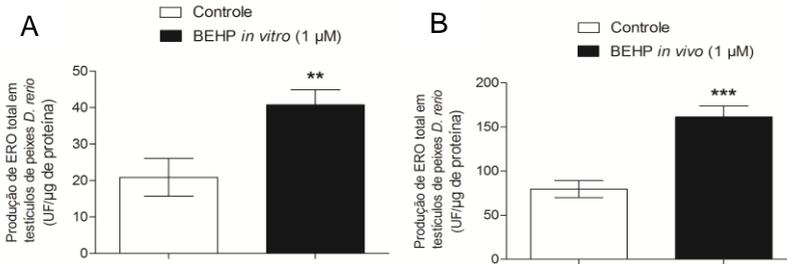


Figura 12: Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em testículos de peixes *D. rerio* tratados *in vitro* por 1 h (A) e *in vivo* por 12 h (B) com bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) a 1 µM. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 8-9 (A) e 6-8 (B) animais por grupo. Os dados foram analisados por teste *t* de Student e as diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado foram consideradas quando $p \leq 0,05$. $**p < 0,01$ (A) e $***p < 0,001$ (B) quando comparado com o grupo controle.

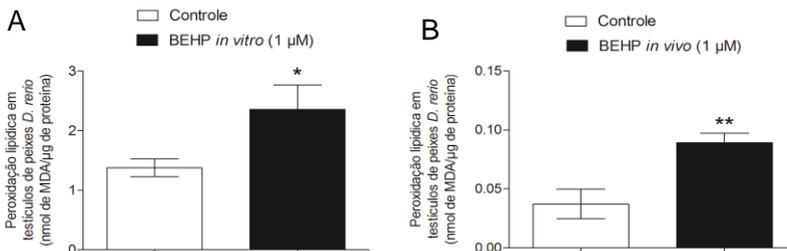


Figura 13: Peroxidação lipídica em testículos de peixes *D. rerio* tratados *in vitro* por 1 h (A) e *in vivo* por 12 h (B) com bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) a 1 µM. Os resultados estão expressos

como média \pm erro padrão da média de 8 (A) e 6-8 (B) animais por grupo. Os dados foram analisados por teste *t* de *Student* e as diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado foram consideradas quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$ (A) e ** $p < 0,01$ (B) quando comparado com o grupo controle.

Para investigar possíveis lesões hepáticas causadas pelo BEHP, analisou-se a atividade das enzimas TGO, TGP e GGT (Figuras 14A, B e C, respectivamente) em fígado de peixes *D. rerio* tratados *in vivo* por 12 h com BEHP (1 μ M). Os resultados foram analisados por teste *t* de *Student*, no qual a figura 14B mostra que houve um aumento significativo da atividade da TGP ($p = 0,002$). Entretanto, não houve alteração na atividade das enzimas TGO e GGT (Figura 14A e C, respectivamente).

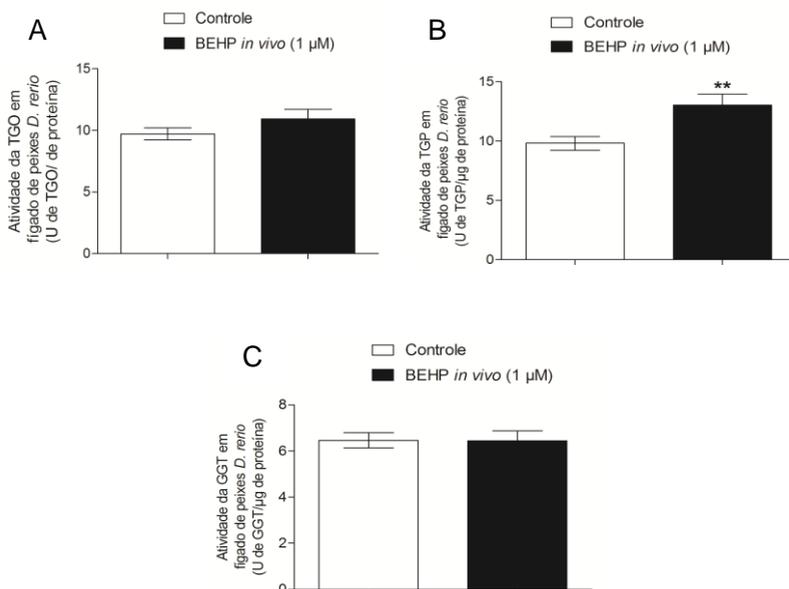


Figura 14: Atividade das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética - TGO (A), transaminase glutâmico-pirúvica - TGP (B) e gama glutamil transpeptidase – GGT (C) em fígado de peixes *D. rerio* tratados *in vivo* por 12 h com bis(2-etilhexil)ftalato

(BEHP) a 1 μ M. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 8 (A e C) e 7-8 (B) animais por grupo. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student e as diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado foram consideradas quando $p \leq 0,05$. Não houve diferença significativa entre os grupos (A e C); * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (B).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a modificação iônica no ambiente aquático e os diferentes tempos de influxo de Ca^{2+} alteraram o equilíbrio do Ca^{2+} no testículo, uma vez que, ambos os grupos tratados *in vivo* com 0,02 e 2 mM de Ca^{2+} e o grupo controle em 60 min estimularam o influxo de Ca^{2+} *in vitro* nos testículos. Ao contrário dos animais terrestres, os peixes estão sempre expostos à água com concentrações variáveis de Ca^{2+} na água doce ou salgada, enfrentando o desafio de equilibrar os gradientes iônicos entre o meio aquático e os fluidos corporais. Este animal é considerado hiper-iônico em relação ao ambiente externo em que vivem, no qual o controle do fluxo de Ca^{2+} para dentro e para fora do organismo é crítico (FLIK et al., 1985; HWANG; CHOU, 2013, GUH; LIN; HWANG, 2015, KWONG; KUMAI; PERRY, 2016).

Assim como no presente estudo, embriões de *D. rerio* e *D. rerio* adultos foram aclimatados em água doce artificial contendo baixa (0,02 mM) e alta (2 mM) concentração de Ca^{2+} , mimetizando situações em que o peixe pode vivenciar em diferentes ambientes aquáticos na natureza. Foi observado que o grupo exposto a uma menor concentração de Ca^{2+} induziu um aumento significativo do influxo de Ca^{2+} . Além disso, a baixa concentração de Ca^{2+} estimulou a expressão de canais epiteliais de Ca^{2+} (ECaC), bem como o aumento do número, tamanho, intensidade e expressão do mRNA de ECaC nas brânquias e pele de *D. rerio* adultos (CHEN et al., 2003; PAN et al., 2005; LIN et al., 2012). Takemoto et al. (1994) sugeriram que o aumento do influxo de Ca^{2+} nos hepatócitos de cães durante o período de reperfusão causou um aumento na atividade da TGP sérica e na atividade mitocondrial da TGO, assim como inchaço mitocondrial e desaparecimento de cristas indicando que o acúmulo de Ca^{2+} era um dos mediadores hepáticos de lesão e dano mitocondrial. O presente estudo mostrou que ambas as concentrações de Ca^{2+} 0,02 e 2 mM no ambiente aquático causaram aumento da atividade da TGP e 2 mM também causou aumento na atividade da GGT no fígado de *D. rerio*.

Embora os efeitos dos ftalatos venham sendo estudados há cerca de 70 anos em vários órgãos e em diferentes animais (NELSEN, 1945; McOMIE, 1946; HARRIS et al., 1956),

principalmente no sistema reprodutor e endócrino, ainda existem poucos estudos bioquímicos sobre estes efeitos e mecanismo de ação no modelo animal *D. rerio*. Pela primeira vez, foi evidenciado que o efeito agudo do BEHP em uma baixa concentração em testículos de *D. rerio* induz respostas rápidas e alteram o equilíbrio do Ca^{2+} mediado pela atividade de canais iônicos e atividades enzimáticas. Há outros estudos mostrando o efeito de outros ftalatos no aumento do influxo de Ca^{2+} e aumento do Ca^{2+} intracelular em outros tecidos de diferentes animais, como nas células germinativas de camundongo (ZHANG et al., 2016), ovário e células renais (SHIBA et al., 2009), mastócitos de ratos (NAKAMURA et al., 2002) e células pancreáticas de ratos (SUN et al., 2015), não foi estudado o mecanismo de ação pelo qual se desencadeou este evento em nível celular. Pela primeira vez, foi evidenciado que o aumento no influxo de Ca^{2+} estimulado pelo BEHP é mediado pelo L-CCDV. É evidenciado que as células de Sertoli e testículos de ratos tratados com nifedipina levam a um bloqueio efetivo do influxo de Ca^{2+} (ROSSO et al., 2012).

Como esperado, a capsaicina (agonista dos canais catiônicos TRPV1) estimulou o influxo de Ca^{2+} *per se*, mas quando o BEHP foi associado com a capsaicina não houve um estímulo ao efeito demonstrado isoladamente de cada composto, indicando que o BEHP e a capsaicina levaram à ativação de TRPV1 e promoveram um aumento do influxo de Ca^{2+} de maneira semelhante, bem como, ao efeito similar do BPA, que também é considerado um EDC utilizado na indústria do plástico (GONÇALVES et al., 2017). Outro estudo que corrobora com este resultado mostra que o DEP, dipentil ftalato, dipropil ftalato, dihexil ftalato e principalmente DBP levaram a um aumento no influxo de Ca^{2+} por ativação de TRPV1 e TRPA1 em células do ovário, gânglios da raiz dorsal de camundongo e células renais de maneira semelhante à capsaicina, mas em concentrações mil vezes maiores do que a utilizada no presente estudo (SHIBA et al., 2009).

Neste estudo também foi verificado que o BEHP estimula o influxo de Ca^{2+} na presença de um agonista de canal catiônico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (TRPV1), bem como, na presença do inibidor da Na^+/K^+ ATPase, os quais promovem o aumento intracelular de Na^+ . Já foi evidenciado que o modo de trabalho do NCX depende principalmente do potencial de membrana e do gradiente

eletroquímico de Na^+ e Ca^{2+} , no qual o aumento da concentração intracelular de Na^+ de qualquer fonte afeta o NCX, favorecendo a entrada de um íon Ca^{2+} em troca do efluxo de três íons Na^+ (modo reverso) (IWAMOTO; WATANO; SHIGEKAWA, 1996; AMRAN; HOMMA; HASHIMOTO, 2003). O aumento intracelular de Na^+ através dos canais catiônicos TRPV1 e da inibição da Na^+/K^+ ATPase observado no presente estudo, possivelmente é o responsável pela ativação do NCX no modo reverso. O inibidor KB-R7943 exibe seletividade para a inibição do NCX no modo reverso, o que produz diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico. No entanto, também já foi demonstrado que o KB-R7943 promove uma fraca inibição do NCX (modo de avanço ou modo de saída de Ca^{2+}), o que favorece um aumento do Ca^{2+} citosólico (IWAMOTO; WATANO; SHIGEKAWA, 1996; AMRAN; HOMMA; HASHIMOTO, 2003). Tendo em vista que poucos relatos da literatura discutem a seletividade do inibidor do NCX no modo reverso e apoiado nos resultados obtidos nestas condições experimentais no testículo do *D. rerio*, concluímos que o efeito *per se* do KB-R7943 no influxo de Ca^{2+} seja devido à inibição do modo avanço do NCX que resultou na entrada de Ca^{2+} através de outros canais. Surpreendentemente, o efeito estimulatório do BEHP foi anulado na presença do KB-R7943. Então, desta forma, concluímos que este efeito estimulatório é mediado pelo NCX no modo reverso.

No presente estudo, a ouabaína *per se* estimulou o influxo de Ca^{2+} e quando a ouabaína foi associada com o BEHP, o influxo de Ca^{2+} permaneceu estimulado, indicando que a entrada de Ca^{2+} possivelmente ocorre através da ativação do NCX no modo reverso, uma vez que, estudos afirmam que a inibição da Na^+/K^+ ATPase acarreta em um aumento na concentração intracelular de Na^+ , no qual é o principal mecanismo responsável pela ativação do NCX no modo reverso (WATANO et al., 1999; AMRAN; HOMMA; HASHIMOTO, 2003). Assim como no presente estudo, Dhanya et al. (2003) mostraram que o BEHP promoveu inibição da Na^+/K^+ ATPase em células cerebrais, hepáticas e em eritrócitos, promovendo também aumento de Ca^{2+} intracelular em eritrócitos. Em células musculares lisas, a entrada de Ca^{2+} mediada pela depleção dos estoques intracelulares culmina na ativação de canais catiônicos não seletivos que medeiam entrada de Na^+ , no qual resulta no

aumento do gradiente de concentração de Na^+ e acúmulo de Na^+ , levando a um aumento do influxo de Ca^{2+} e da concentração citosólica de Ca^{2+} por ativação do NCX no modo reverso (ROBERTS; MATSUDA; BOSE, 2012; LIU et al., 2016; LIU et al., 2018), no qual ocorreu similarmente no presente estudo, uma vez que, os canais catiônicos não seletivos TRPV1 parecem ser ativados também por BEHP que também culmina em um aumento da concentração intracelular de Na^+ , corroborando com a ativação do NCX no modo reverso.

Além de o BEHP aumentar o influxo de Ca^{2+} através do L-CCDV presente na membrana plasmática, também foi evidenciado que o BEHP afeta o armazenamento de Ca^{2+} do retículo através da inibição da SERCA. A inibição do transporte de Ca^{2+} do citoplasma para as organelas de estoque de Ca^{2+} acarreta em diminuição do armazenamento de Ca^{2+} , resultando em um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . No entanto, este estudo mostrou que o aumento de Ca^{2+} promovido pelo BEHP não é mediado pela liberação de Ca^{2+} intracelular, uma vez que, após a inibição do receptor de rianodina pelo dantrolene e pelo uso do quelante intracelular de Ca^{2+} BAPTA-AM, não houve alteração no influxo de Ca^{2+} . A inibição da SERCA pelo BEHP foi semelhante à inibição promovida pelo BPA (GONÇALVES et al., 2017), no qual Woeste et al. (2013) já demonstraram o papel do BPA como um inibidor fraco da SERCA. Ebbinghaus-Kintscher et al. (2006) mostraram que as diamidas de ácido ftálico em baixas concentrações (0,3 até 30 μM) em segundos induziram um aumento significativo da concentração intracelular de Ca^{2+} em neurônios isolados do inseto *Heliothis virescens*. Posteriormente, o quelante extracelular de Ca^{2+} EGTA foi adicionado, porém, o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} permaneceu contínuo, indicando que este aumento de Ca^{2+} foi independente do Ca^{2+} extracelular. Consistentemente, as respostas da diamida ftálica foram suprimidas após incubação com a tapsigargina, um conhecido inibidor da SERCA que causa depleção do estoque intracelular de Ca^{2+} endoplasmático. Além disso, foi analisada a influência da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares utilizando o dantrolene, um antagonista dos receptores rianodina, no qual confirmou que o aumento de Ca^{2+} pelas diamidas ftálicas foi mediado pela via de liberação intracelular de Ca^{2+} endoplasmático. Um estudo recentemente publicado mostra que

o tratamento com DBP por 24 h em células de Sertoli induziu hiperfosforilação da vimentina, que foi significativamente diminuída pelo BAPTA-AM, indicando o envolvimento do Ca^{2+} intracelular neste processo (ZHANG et al., 2018).

O presente estudo está de acordo com relatos anteriores em um modelo animal diferente, onde foi demonstrada uma redução no conteúdo de lactato testicular com uma concomitante redução da atividade da LDH em apenas 1 h de incubação *in vitro* com BEHP em uma baixa concentração (1 μM). El-Fattah et al., (2016) afirmam que a LDH é considerada um marcador de atividade testicular, indicadora funcional da espermatogênese. Além disso, alterações na espermatogênese também podem estar relacionadas à disfunção nas células de Sertoli, tornando-a incapaz de fornecer adequadamente o suporte físico e metabólico às células germinativas (KAVLOCK et al., 2002). O tratamento crônico com BEHP (2 g/kg) durante 45 dias acarretou em redução significativa da atividade da LDH testicular; redução da concentração sérica de testosterona, diminuição da capacidade total antioxidante testicular; aumento significativo da peroxidação lipídica, além de causar atrofia e degeneração resultando na onda espermatogênica incompleta (EL-FATTAH et al., 2016). A diminuição da atividade da LDH testicular promovida pelo BEHP pode representar um defeito na espermatogênese e na maturação testicular, uma vez que, o lactato e o piruvato são cruciais para o metabolismo nutricional e energético no testículo (JUTTE et al., 1981; BOUSSOUAR; BENAHMED, 2004; RATO et al., 2012).

Além da LDH, outra enzima importante para a bioquímica testicular é a GGT, que é considerada um marcador enzimático testicular da função das células de Sertoli (SHERINS; HODGEN, 1976; SCHTEINGART et al., 1988). A GGT também está envolvida em processos de estresse oxidativo, uma vez que, participa da manutenção da homeostase redox da GSH, de células e processos dependentes de oxirredução, como proliferação, diferenciação ou reatividade a condições adversas (MEISTER, 1982; MARES et al., 2005; ZHANG; FORMAN; CHOI, 2005). O presente estudo evidenciou um aumento na atividade da GGT em testículos de peixes tratados *in vivo* com BEHP (1 μM) por 12 h. Por conseguinte, foi investigado se este aumento da atividade da GGT promovido pelo BEHP estava

relacionado à produção de EROs. Portanto, foi confirmado que tanto o tratamento agudo com BEHP em baixa concentração (1 μM) por 1 h *in vitro*, quanto o tratamento *in vivo* por 12 h foi capaz de aumentar significativamente a produção de EROs. Assim, também foi investigado se o aumento na produção de EROs acarretaria em dano oxidativo à lipídeos de membrana, no qual também foi demonstrado que ambos os tratamentos com BEHP foi capaz de aumentar concomitantemente a peroxidação lipídica em testículos de *D. rerio*.

Um fator muito relevante e decisivo na etiologia da infertilidade masculina é o estresse oxidativo (SEDHA; KUMAR; SHUKLA, 2015), no qual a peroxidação lipídica é considerada uma das principais causas do comprometimento da função testicular (PELTOLA et al., 1994). Estudos anteriores estão de acordo com os resultados deste trabalho, nos quais mostraram que o BEHP (3 mM) e MEHP (3 mM) em 30 e 60 min resultaram em aumento na produção de EROs total em linhagem celular de adenocarcinoma da próstata humana (ERKEKOGLU et al., 2011), bem como em células de Leydig de ratos (ERKEKOGLU et al., 2010). O tratamento com BEHP (500 mg/kg) por 14 dias também acarretou em um aumento na produção de EROs em testículo de ratos, interrompeu a espermatogênese, induziu morte celular dos espermatócitos e células de Sertoli, causando atrofia testicular (KASAHARA et al., 2002; LI et al., 2014). Ademais, aumento da produção de EROs e dano oxidativo ao DNA em fígado de ratos (RUSYN; PETERS; CUNNINGHAM, 2006).

Além disso, BEHP (100 mg/kg) por 30 dias aumentou a produção de EROs e peroxidação lipídica no músculo gastrocnêmio de ratos (SRINIVASAN et al., 2011). Após 24 h de exposição, houve uma diminuição da capacidade antioxidante, como diminuição da atividade GPx, redução da GSH e GST; danos ao DNA e também diminuição da expressão da proteína p53 (ERKEKOGLU et al., 2010). Em outro estudo, após 10 dias de tratamento oral com BEHP (1000 mg/kg), houve um aumento na atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD); diminuição da atividade da GPx e GST e aumento da peroxidação lipídica em fígado de ratos (ERKEKOGLU et al., 2014). Além disso, ratos tratados com DBP (2 g/kg) por 9 dias resultou em um aumento significativo da peroxidação lipídica testicular e seminal, a atividade testicular da GGT no testículo,

além de uma diminuição significativa na atividade da GSH, CAT, SOD, glicose-6-fosfato desidrogenase no testículo e atividade seminal da GGT, bem como a redução da testosterona sérica (FAROMBI et al., 2007). Parmar, Srivastava e Seth (1986) relataram um aumento na atividade testicular da GGT promovida por BEHP de maneira dose-dependente (500, 1000 e 2000 mg/kg) por 15 dias, além de resultar em uma redução significativa na contagem de espermatozóides, também de maneira dose-dependente (250-2000 mg/kg).

O presente estudo também mostrou que o tratamento *in vivo* com BEHP resultou um aumento da atividade de TGP em fígado de *D. rerio*. No entanto, não houve alteração da atividade enzimática da TGO, bem como GGT. Estes dados corroboram com outros estudos, nos quais Lo, Wang e Wu (2014) mostraram que o tratamento com BEHP aumentou a liberação da LDH intracelular para o meio extracelular e aumento da atividade da TGP no fígado de maneira dependente da dose. A atividade aumentada da TGP é um indicador de lesão hepática, dano na membrana celular (ZIMMERMAN et al., 1965; GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). A LDH intracelular liberada para o meio extracelular indica a perda da integridade da membrana celular. Assim, um aumento da atividade da LDH e TGP revelou que o BEHP pode interromper a integridade da membrana, causando lesão aos hepatócitos. E assim como no presente estudo, não houve aumento da atividade do TGO (LO; WANG; WU, 2014), o qual é considerado um indicador de dano mitocondrial (ZIMMERMAN et al., 1965).

Estudo com peixes de água doce (*Cirrhina mrigala*) tratados com BEP por 24 h causou 100% de mortalidade observada em 75 e 100 mg/L por 72 h. Aqueles tratados com 25 mg/L apresentaram apenas 10% de mortalidade em 72 h e os peixes sobreviventes foram tratados com 25 mg/L de BEP por 3 dias, resultando em um aumento significativo da atividade da succinato desidrogenase no músculo e atividade da TGP no fígado. Além disso, nenhuma alteração na atividade da TGO (GHORPADE et al., 2002), bem como no presente estudo. O tratamento com BEP (300-900 mg/kg) também acarretou em dano hepático, com aumento significativo da atividade sérica da fosfatase alcalina, LDH, TGO e TGP no fígado de peixes linguado (*Paralichthys olivaceus*) (KANG et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível observar que a modificação iônica com uma baixa e uma alta concentração de Ca^{2+} no ambiente aquático:

- Alterou a homeostase do Ca^{2+} , resultando em um aumento do influxo de Ca^{2+} *in vitro* nos testículos;
- Causou dano hepático, com aumento da atividade da TGP e GGT hepática.

Além disso, foi possível demonstrar que o efeito agudo *in vitro* do BEHP em uma baixa concentração:

- Afeta a homeostase do Ca^{2+} em testículos de *D. rerio*, acarretando no aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais iônicos como o L-CCDV, TRPV1, ativação NCX no modo reverso, inibição da Na^+/K^+ ATPase e SERCA;
- Acarretou em uma diminuição do suporte energético testicular com redução do conteúdo de lactato e redução concomitante da atividade da LDH.

Também foi possível observar que tanto o efeito agudo *in vitro* quanto *in vivo* do BEHP em uma baixa concentração:

- Promoveram estresse oxidativo com aumento da produção de EROs, peroxidação lipídica e atividade da GGT testicular, além de causar dano hepático, com aumento da atividade da TGP.

Diante destes resultados, podemos afirmar que o efeito agudo do BEHP em uma baixa concentração impactou a homeostase do Ca^{2+} testicular acarretando no aumento do Ca^{2+} intracelular, redução do suporte energético testicular e aumento do estresse oxidativo, além de dano hepático. Estes efeitos deletérios à bioquímica testicular do *D. rerio* podem impactar na infertilidade masculina.

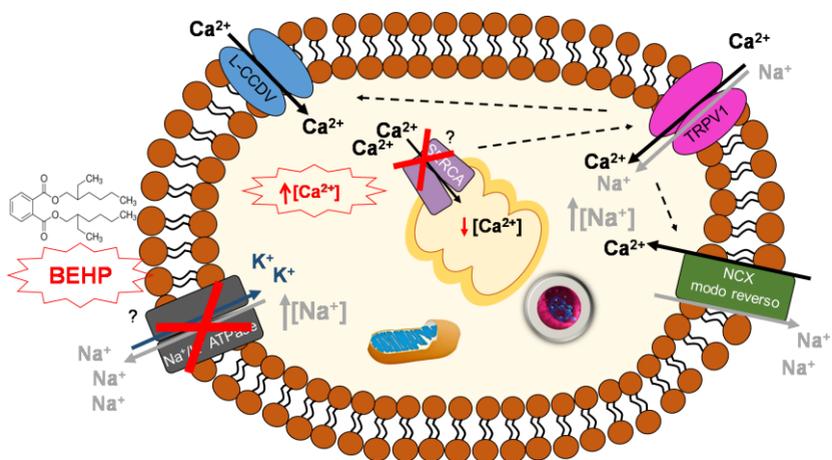


Figura 15: Mecanismo de ação proposto do BEHP na homeostase do Ca²⁺. Fonte: Própria do autor.

REFERÊNCIAS

- ABB, M. et al. Phthalates in house dust. **Environmental International**, v. 35, n. 6, p. 965-970, aug. 2009.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232 p.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15-24, dec. 2008.
- AKINGBEMI, B. T. et al. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 775–780, jan. 2004.
- ALAVI, S. M. H. et al. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 819-828, dec. 2004.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, v. 30, n. p. 1-14, jan. 2006.
- ALY, H. A. et al. Dibutyl phthalate induces oxidative stress and impairs spermatogenesis in adult rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 8, p. 1467-1477, aug. 2016.
- AMRAN, M. S.; HOMMA, N.; HASHIMOTO, K. Pharmacology of KB-R7943: A Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitor. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 21, n. 4, p. 255-276, 2003.
- ANDERSEN, H. R. et al. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 89–108, n. 1, feb.1999.

ASGHARI, M. H.; SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. A Review on the biochemical and molecular mechanisms of phthalate-induced toxicity in various organs with a focus on the reproductive system. **International Journal of Pharmacology**, v. 11, p. 95-105, feb. 2015.

BAJPAI, M.; GUPTA, G.; SETTY, B. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 322–327, mar. 1998.

BAO, A. M. et al. Effects of di-n-butyl phthalate on male rat reproduction following pubertal exposure. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 702–709, sep. 2011.

BATRA, S. Uptake and energy-dependent extrusion of calcium in the rat uterus. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.114, n. 3, p. 447-452, mar. 1982.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 32, n. 4, p. 315-319, jan. 1983.

BAUMANN, L. et al. Reversibility of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the estrogen 17 α -ethinylestradiol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 278, n. 3, p. 230–237, may 2014.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews*. **Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 517-529, jul. 2003.

BERS, D. M.; BARRY, W. H.; DESPA, S. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 57, n. 4, p. 897-912, mar. 2003.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 261, n. 2, p. 122–131, feb. 1992.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 299-305, 1984.

BLANCO-RODRIGUEZ, J.; MARTINEZ-GARCIA, C. Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1541–1547, dec. 1999.

BORNEHAG, C. G. et al. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: A nested case-control study. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 14, 1393-1397, oct. 2004.

BOUSSOUAR, F.; BENAHMED, M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 345–350, sep. 2004.

CAO, X. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 21-43, 2010.

CHATTERJEE, S.; KARLOVSKY, P. Removal of the endocrine disrupter butyl benzyl phthalate from the environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 61-73, jun. 2010.

CHEN, X. et al. Effects of di(n-butyl) and monobutyl phthalate on steroidogenesis pathways in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 332–338, sep. 2013.

CHEN, X. et al. The combined toxicity of dibutyl phthalate and benzo(a) pyrene on the reproductive system of male Sprague Dawley rats in vivo. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 835–841, feb. 2011.

CHEN, X. et al. Toxicity and estrogenic endocrine disrupting activity of phthalates and their mixtures. **International Journal of**

Environmental Research and Public Health, v. 11, n. 3, p. 3156-3168, mar. 2014.

CHEN, Y. Y.; LU, F. I.; HWANG, P. P. Comparisons of calcium regulation in fish larvae. **Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology**, v. 295, n. 2, p. 127–135, feb. 2003.

CLAPHAM, D. E. Calcium Signaling. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1047–1058, dec. 2007.

DARSZON, A. et al. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1305-1355, oct. 2011.

DARSZON A. et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. **Reproduction**, v. 131, v. 6, p. 977–988, jun. 2006.

DESDOITS-LETHIMONIER, C. et al. Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. **Human Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1442-1460, may 2012.

DYMOWSKA, A. K. et al. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 282–292, dec. 2012.

DYMOWSKA, A. K.; HWANG, P. P.; GOSS, G. G. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 282-292, dec. 2012.

EL-FATTAH A.A. et al. Resveratrol and curcumin ameliorate di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular injury in rats. **General and Comparative Endocrinology**, v. 225, p. 45-54, jan. 2016.

ENGEL, S. M.; WOLFF, M. S. Causal inference considerations for endocrine disruptor research in children's health. **Annual Review of Public Health**, v. 34, p. 139-158, 2013.

ERKEKOGLU, P. et al. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and

mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 248, n. 1, p. 52-62, oct. 2010.

ERKEKOGLU, P. et al. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1565-1571, jul. 2011.

ERKEKOGLU, P. et al. The effects of di (2-ethylhexyl)phthalate on rat liver in relation to selenium status. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 1, p. 64-77, feb. 2014.

EVANS, D. H. Freshwater fish gill ion transport: August krogh to morpholinos and microprobes. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 3, p. 349-359, jul 2011.

EVANS, D. H.; PIERMARINI P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 97-177, jan. 2005.

FAROMBI, E. O. et al. Curcumin and kolaviron ameliorate di-n-butylphthalate-induced testicular damage in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v 100, n. 1, p. 43-48, jan. 2007.

FOX, A. P.; NOWYCKY, M. C.; TSIEN, R. W. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. **Journal of Physiology**, v. 394, p. 173–200, dec. 1987.

FREE, M. J.; SCHLUNTZ, G. A.; JAFFE, R. A. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 481–488, may 1976.

[GAZOULI, M.](#) et al. Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis:

Role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2571-2583, jul. 2002.

GOLPOUR, A.; P SENIČKA, M.; NIKSIRAT, H. Subcellular distribution of calcium during spermatogenesis of zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Morphology**, v. 278, n. 8, p. 1149-1159, may 2017.

GONÇALVES, R. et al. Acute effect of bisphenol A: Signaling pathways on calcium influx in immature rat testes. **Reproductive Toxicology**, v. 77, p. 94-102, apr. 2018.

GRANCHI, C., et al. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 672-697, 2010.

GRAY, T. J.; GANGOLLI, S. D., Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, 65, 229–235, 1986.

GUH, Y. J.; LIN, C. H.; HWANG, P. P. Osmoregulation in Zebrafish: Ion transport mechanisms and functional regulation. **Experimental and Clinical Sciences Journal**, v. 14, p. 627-659, may 2015.

HANIGAN, M. H. Gamma-glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 111–112, p. 333 – 342, apr. 1998.

HANNAS, B. R. et al. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisooheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. **Toxicology Science**, v. 123, p. 206-216, jun. 2011.

HARRIS, R. S. et al. Chronic oral toxicity of 2-ethylhexyl phthalate in rats and dogs. **American Medical Association Archives of Industrial Health**, v.13, n. 3, p. 259-264, mar. 1956.

HAUSER, R.; CALAFAT, A. M. Phthalates and human health. *Occupational Environmental Medicine*, v. 62, n. 11, p. 806–818, nov. 2005.

HEINDEL, J. J.; POWELL, C. J. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function *in vitro*: Effects of phthalate side chain and age of animal. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, n. 1, p. 116–123, jul. 1992.

HEUDORF, U., MERSCH-SUNDERMANN, V., ANGERER, J. Phthalates: toxicology and exposure. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, n. 5, p. 623–634, oct. 2007.

HILL, J. R; JANZ, D. M. Developmental estrogenic exposure in Zebrafish (*Danio rerio*): Effects on sex ratio and breeding success. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 417-429, may 2003.

HO, P. W. et al. Assessment of cellular estrogenic activity based on estrogen receptor-mediated reduction of soluble-form catechol-o-methyltransferase (COMT) expression in an ELISA-based system. **Public Library of Science One**, v. 8, n. 9, p. e74065, sep. 2013.

HOSEY, M. M.; LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. **Journal of Membrane Biology**, v. 104, n. 2, p. 81-105, sep. 1988.

HOWDESHELL, K. L. et al., Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: Altered fetal steroid hormones and genes. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 190–202, sep. 2007.

HUHTANIEMI, I. T.; THEMEN, A. P. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. **International Journal of Basic and Clinical Endocrinology**, v. 26, n. 3, apr. 2005, p. 207-217.

HWANG, P. P.; CHOU, M. Y. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 465, n. 9, p. 1233-1247, apr. 2013.

HWANG, P. P.; LEE, T. H.; LIN, L. Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 1, p. 28-47, jul. 2011.

IWAMOTO T.; WATANO T.; SHIGEKAWA M. A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 37, p. 22391–22397, sep. 1996.

JENG, Y. J.; KOCHUKOV, M.; WATSON, C. S. Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter calcium and kinase responses, prolactin release, and membrane estrogen receptor trafficking in rat pituitary cells. **Environmental Health**, p. 9-61, oct. 2010.

JUREWICZ, J. et al. Human urinary phthalate metabolites level and main semen parameters, sperm chromatin structure, sperm chromatin structure, sperm aneuploidy and reproductive hormones. **Reproductive Toxicology**, v. 42, 232–241, dec. 2013.

JUTTE, N. et al. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. **Journal of Reproductive and Fertility**, v. 62, n. 2, p. 399-405, jul. 1981.

KARIYAZONO, Y. et al. Effect of in utero exposure to endocrine disruptors on fetal steroidogenesis governed by the pituitary-gonad axis: A study in rats using different ways of administration. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 40, n 6, p. 909–916, 2015.

KASAHARA, E. et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. **Biochemical Journal**, v. 365, n. 3, p. 849–856, aug. 2002.

KAVLOCK, R. et al., NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 5, p. 529–653, oct. 2002.

KOCH, H. M.; CALAFAT, A. M. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2063-2078, jul. 2009.

KOCH, H. M.; DREXLER, H.; ANGERER, J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, n. 2, p. 77–83, 2003.

KOCH, H. M. et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): Human metabolism and internal exposure - An update and latest results. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 155–165, feb. 2006.

KOULISH, S.; KRAMER, C. R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v. 254, p. 292–311, dec. 2002.

KRASZNAI Z. et al. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 5, p. 2052-2057, feb. 2000.

KUSHNIR, A.; BETZENHAUSER, M. J.; MARKS, A. R. Ryanodine receptor studies using genetically engineered mice. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 584, n. 10, p. 1956-1965, may 2010.

KWONG, R. W. M.; KUMAI, Y.; PERRY S. F. Neuroendocrine control of ionic balance in Zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 234, p. 40-46, may 2016.

LAPINSKAS, P. J. et al. Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. **Toxicology**, v. 207, n. 1, 149-163, feb. 2005.

LEE, D.; MICHALAK, M. Membrane associated Ca²⁺ buffers in the heart. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 151–157, mar. 2010.

LEE, J. et al. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. **Endocrinology**, v. 138, n. 5, p. 2081-2088, may 1997.

LI, L. et al. The immunotoxicity of dibutyl phthalate on the macrophages in mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, n. 2, p. 272-281, mar. 2013.

LIN, C. H. et al. Action of vitamin D and the receptor, VDR α , in calcium handling in Zebrafish (*Danio rerio*). **Public Library of Science One**, v. 7, n. 9, p. e45650, sep. 2012.

LIN, C. H.; HWANG, P. P. The Control of Calcium Metabolism in Zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1783, oct. 2016.

LIN, S. et al. Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan. **Chemosphere**, v. 82, p. 947–955, 2011.

LIU, B. et al. Ca²⁺ entry through reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchanger contributes to store operated channel-mediated neointima formation after arterial injury. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 34, n. 6, p. 791-799, jun. 2018.

LIU, B. et al. NF- κ B-dependent up regulation of NCX1 induced by angiotensin II contributes to calcium influx in rat aortic smooth

muscle cells. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 11, p. 1356.e11-1356.e20, nov. 2016.

LI, X. et al. Di-(2-ethylhexyl)phthalate inhibits DNA replication leading to hyperPARylation SIRT1 attenuation, and mitochondrial dysfunction in the testis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 6434, 2014.

LORZ, P. M. et al. Phthalic acid and derivatives. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Wiley-VCH, Weinheim 2002.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, dec. 2014.

MAIN, K. M. et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 270-276, feb. 2006.

MAMMUCARI, C. et al. Molecular structure and pathophysiological roles of the mitochondrial calcium uniporter. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1863, n. 10, p. 2457-2464, oct. 2016.

MARES, V. et al. Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in growth perturbed C6 astrocytes. **Molecular Brain Research**, v. 136, n. 1-2, p. 75-80, may 2005.

MARTINEZ-ARGUELLES, D. B. et al. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5575–5585, dec. 2009.

MARTINEZ-ARGUELLES, D. B. et al. In utero exposure to the antiandrogen di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases adrenal

aldosterone production in the adult rat. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 51–61, jul. 2011.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 1, p. 148-157, jan. 2010.

MATTA, S. L. et al. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 970–978, mar. 2002.

MATTHEWS M.; VARGA Z. M. Anesthesia and euthanasia in Zebrafish. **Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 53, n. 2, p. 192-204, 2012.

MCGONNELL, I. M.; FOWKES, R. C. Fishing for gene function - endocrine modelling in the zebrafish. **The Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 3, p. 425-439, jun. 2006.

McOMIE, W. A. Certain aspects of the toxicity of diallyl phthalate. **Federation Proceedings**, v. 5, n. 1 pt 2, p. 191, 1946.

MEISTER, A. Metabolism and function of glutathione: An overview. **Biochemical Society Transactions**, v. 10, n. 2, p. 78-79, apr. 1982.

MENEGAZ, D. et al. Rapid stimulatory effect of thyroxine on plasma membrane transport systems: Calcium uptake and neutral amino acid accumulation in immature rat testis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 6, p. 1046-1051, jun. 2010.

MICHAELIS, L. Free radicals as intermediate steps of oxidation-reduction, **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 7, p. 33–49, jan. 1939.

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, n. 1, p. 95-108, 1990.

MINKE, B., COOK, B. TRP channel proteins and signal transduction. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 429-472, apr. 2002.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747–806, oct. 2004.

NAKAMURA, R.; TESHIMA, R.; SAWADA, J. I. Effect of dialkyl phthalates on the degranulation and Ca²⁺ response of RBL-2H3 mast cells. **Immunology Letters**, v. 80, n. 2, p. 119-124, feb. 2002.

National Toxicology Program. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-butyl phthalate (DBP). **NTP CERHR MON**, v. 4, p. i–III90, 2003.

NELSEN, O. E. The use of certain phthalate compounds in embryology. **Stain Technology**, v. 20, n. 4, p. 129-130, oct. 1945.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L.R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 197–206, mar. 2009.

OEARLS, A.; AXFORD, I. P.; BRAYBROOK, J. H. Gas chromatography–mass spectrometry determination of the migration of phthalate plasticisers from polyvinyl chloride toys and childcare articles. **Journal of Chromatography A**, v. 983, n. 1-2, p. 237–246, jan. 2003.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M. T. Antagonistas de canais de cálcio. **HiperAtivo**, v. 2, p. 104-109, 1998.

OLIVEIRA, P. F. Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 6 pt 2, p. e612-620, aug. 2011.

OLLI, K. E. Plasma membrane calcium ATPase 4 (PMCA4) coordinates calcium and nitric oxide signaling in regulating murine sperm functional activity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p.11-22, feb. 2017.

PAN, T. C. et al. Epithelial Ca(2+) channel expression and Ca(2+) uptake in developing zebrafish. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 4, p. R1202-1211, oct. 2005.

PARAIDATHATHU, T.; DE GROOT, H.; KEHRER, J. P. Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 289-297, 1992.

PARMAR, D.; SRIVASTAVA, S. P.; SETH, P. K. Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. **Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 47-55, dec. 1986.

PARVEEN, M. et al. Evaluation of estrogenic activity of phthalate esters by gene expression profiling using a focused microarray (estrarray®). **Environmental Toxicology and Chemical**, v. 27, n. 6, p. 1416–1425, feb. 2008.

PELTOLA, V. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 4, p. 353–361, aug. 1994.

RATO, L. et al. Metabolic modulation induced by oestradiol and DHT in immature rat Sertoli cells cultured in vitro. **Bioscience Reports**, v. 32, n. 1, p. 61-69, 2012a.

RATO, L. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, p. 330-338, 2012b.

REEVES, J. P.; HALE, C. C. The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 12, p. 7733-7739, jun. 1984.

REIS, M. M. S. et al. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 8, p. 870-883, aug. 2015.

RIERA, M. F. et al. Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 4, p. 907–914, oct. 2009.

RIZZUTO, R. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 9, p. 566–578, sep. 2012.

ROBERTS, D. E.; MATSUDA, T.; BOSE, R. Molecular and functional characterization of the human platelet Na(+)/Ca(2+) exchangers. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 922-936, feb. 2012.

ROWDHWAL, S. S. S.; CHEN, J. Toxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate: An overview. **BioMed Research International**, v. 1750368, feb. 2018.

RUSSELL, L. D.; PETERSON, R. N. Determination of the alongate spermatid Sertoli cell ratio in various mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 2, p. 635–641, mar. 1984.

RUSYN, I; PETERS, J; CUNNINGHAM, M. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 459–479, may 2006.

SANZ-SALVADOR, L. et al. Agonist- and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to

lysosomes for degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 23, p. 19462–19471, jun. 2012.

SATHISH, V. et al. Sodium-calcium Exchange in intracellular calcium handling of human airway smooth muscle. **Public Library of Science one**, v. 6, n. 8, p. e23662, aug. 2011.

SCHECTER, A. et al. Phthalate concentrations and dietary exposure from food purchased in New York State. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 4, p. 473-494, apr. 2013.

SCHETTLER, T. Human exposure to phthalates via consumer products. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 134-139, discussion 181-135, feb. 2006.

SCHOLZ, S.; KLÜVER, N. Effects of endocrine disrupters on sexual, gonadal development in fish. **Sexual Development : Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation**, v. 3, n. 2-3, p. 136-151, aug. 2009.

SCHTEINGART, H. F. et al. Hormonal regulation of rat testicular gamma-glutamyl-transpeptidase "in vivo" and "in vitro". **Andrologia**, v. 20, n. 4, p. 351-359, 1988.

SCHULZ, R. W. et al. Sertoli cell proliferation in the adult testis—Evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 891–898, jul. 2005.

SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390-411, feb. 2010.

SEDHA, S.; KUMAR, S.; SHUKLA, S. Role of oxidative stress in male reproductive dysfunctions with reference to phthalate compounds. **Urology Journal**, v. 12, n. 5, p. 2304-2316, nov. 2015.

SEGNER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v.149, n. 2, p. 187-195, mar. 2009.

SHERINS, R. J.; HODGEN, G. D. Testicular gamma glutamyl-transpeptidase: An index of Sertoli cell function in men. **Journal of Reproductive and Fertility**, v. 48, n. 1, p. 191–193, sep. 1976.

SHIBA, T. et al. TRPA1 and TRPV1 activation is a novel adjuvant effect mechanism in contact hypersensitivity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, n. 1-2, p. 66–74, feb. 2009.

SKINNER, M. K. Cell-Cell Interactions in the Testis. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, feb. 1991.

SKINNER, M. K. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: **Sertoli Cell Biology**, Griswold, M. D., Skinner, M. K. (eds) Elsevier-Academic Press: San Diego, CA; p. 107–120, 2005.

SLAUGHTER, G. R.; MEANS, A. R. Follicle-stimulating hormone activation of glycogen phosphorylase in the Sertoli cell-enriched rat testis. **Endocrinology**, v. 113, n. 4, p. 1476–1485, oct. 1983.

SUN X. et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.19, n. 3, p. 581-594, mar. 2015.

TAYLOR, C.W.; TOVEY, S. C. IP(3) receptors: Toward understanding their activation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 12, p. a004010, dec. 2010.

TOTH, A. B.; SHEM, A. K.; PRAKRIYA. Regulation of neurogenesis by calcium signaling. **Cell Calcium**, v. 59, n. 2-3, p. 124–134, mar. 2016.

TU, M. K. et al. Calcium signaling in skeletal muscle development, maintenance and regeneration. **Cell Calcium**, v. 59, n. 2-3, p. 91-97, feb. 2016.

UREN-WEBSTER, T.M. et al. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 360–369, 2010.

URIBE, M. C.; GRIER, H. J.; MEJÍA-ROA, V. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 3, p. e983400, sep-dec. 2015.

ÜSTÜNDAĞ Ü. V. et al. Bisphenol A and di(2-ethylhexyl) phthalate exert divergent effects on apoptosis and the Wnt/ β -catenin pathway in zebrafish embryos: A possible mechanism of endocrine disrupting chemical action. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33, n. 12, p. 901-910, dec. 2017

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, aug. 2007.

VANDENBERG, L. N. et al. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 116–127, jan. 2007.

VAN DER KRAAK, G. J. et al. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, n. 2, p. 224-233, aug. 1992.

VARA, D. C.; LEAL-ZANCHET, A. M.; LIZARDO-DAUDT, H. M. Histological processing techniques for the study of dugesiidae development (platyhelminthes, tricladida, paludicola). **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 2, p. 341-345, may, 2001.

VOLPATO, K. C. et al. Involvement of K⁺ channels and calcium-dependent pathways in the action of T3 on amino acid

accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. **Life Sciences**, v. 74, n. 10, p. 1277-1288, jan. 2004.

WAN, H. T. et al. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 763–769, oct. 2013.

WATANO, T. et al. A novel antagonist, no. 7943, of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 3, p. 555–563, oct. 1996.

WATSON, C. S.; HU, G.; PAULUCCI-HOLTHAUZEN, A. A. Rapid actions of xenoestrogens disrupt normal estrogenic signaling. **Steroids**, v. 81, p. 36-42, mar. 2014.

WOESTE, J. M. et al. Structural requirements for inhibitory effects of bisphenols on the activity of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 3927–3933, 2013.

XIONG, W. P. et al. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. **Reproduction**, v. 137, n. 3, p. 469–479, mar. 2009.

YUWATINI, E.; HATA, N.; TAGUCHI, S. Behavior of di(2-ethylhexyl) phthalate discharged from domestic waste water into aquatic environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 8, n. 1, p. 191-196, jan. 2006.

ZACHAREWSKI, T. R. Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 282–293, dec. 1998.

ZALK, R.; LEHNART, S. E.; MARKS, A. R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 367-385, jul. 2007.

ZHANG, G. et al. DBP-induced endoplasmic reticulum stress in male germ cells causes autophagy, which has a cytoprotective

role against apoptosis in vitro and in vivo. **Toxicology Letters**, v. 245, p. 86–98, jan. 2016.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J.; CHOI, J. γ -Glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. **Methods in Enzymology**, v. 401, p. 468-483, 2005.

ZHANG, W. et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate could disrupt the insulin signaling pathway in liver of SD rats and L02 cells via PPAR γ . **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 316, p. 17–26, feb. 2017.

ZHENG, J. Q.; POO, M. M. Calcium signaling in neuronal motility. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, P. 375-404, JUN. 2007.

ZHU, Y. et al. Chronic exposure to mono-(2-ethylhexyl)-phthalate causes endocrine disruption and reproductive dysfunction in zebrafish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 2117-2124, aug. 2016.

ZIMMERMANN, S. et al. Determination of phthalic acid diesters in human milk at low ppb levels. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 29, n. 11, p. 1780–1790, jul. 2012.