



O Efeito dos ftalatos na Saúde Reprodutiva

Inês Résio Mesquita

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(mestrado integrado)

Orientadora: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira

maio de 2020

Dedicatória

Dedico esta dissertação a todos os que para ela contribuíram, bem como à aqueles em que esta possa contribuir para o seu conhecimento.

Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Elisa Cairrão, obrigada pela sua simpatia, pela sua incondicional disponibilidade, pela sua ajuda e contributo na elaboração deste trabalho, foi um gosto aprender ao seu lado.

À Mestre Margarida Lorigo, obrigada pela sua atenção e paciência, por ter colaborado no trabalho, por partilhar o seu conhecimento comigo e acima de tudo pela amizade.

À minha família pelo apoio incondicional desde sempre demonstrado, por tudo o que me ensinaram e pelos valores transmitidos, obrigada por me terem ensinado a ser quem sou.

Ao meu irmão, agradeço por sempre me ter mostrado o caminho certo.

Ao Vítor, obrigada pela amizade, companhia e sobretudo pelo amor.

Aos meus colegas e amigos da turma de 2014-2020, pela amizade, momentos e memórias, e pelo privilégio de ter aprendido a caminhar ao seu lado.

À Faculdade de Ciências da Saúde da UBI, todos os seus funcionários e professores que contribuíram para a minha formação.

À cidade da Covilhã e aos seus habitantes, pela sua hospitalidade por terem tornado esta etapa da minha vida verdadeiramente especial.

Resumo

Introdução: Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), todos os anos são produzidos cerca de 400 milhões de toneladas de plástico, e conseqüentemente tem existido uma crescente preocupação com o seu impacto na saúde humana. Várias classes de substâncias são usadas como constituintes do plástico. Os ftalatos são um constituinte do plástico usado para o tornar mais maleável, estando presente em várias classes de produtos do consumidor. Os ftalatos comportam-se como um disruptor endócrino (EDC), ou seja, têm a capacidade de interferir na biossíntese, metabolismo e ação hormonal, resultando num desvio da normal homeostase hormonal. Alguns ftalatos foram considerados categoria IB como substâncias tóxicas para a reprodução e conseqüentemente têm sofrido algumas restrições a nível da indústria. No entanto, a sua exposição permanece de forma ubíqua na população.

Os ftalatos conseguem interferir na homeostase normal dos estrogénios e androgénios, bem como no eixo hipotálamo-pituitária-gonadas (HPG), que conseqüentemente podem provocar efeitos adversos no desenvolvimento e na reprodução em homens e mulheres. Alguns desses efeitos já foram caracterizados em estudos epidemiológicos e experimentais em humanos e animais. Apesar de estes não serem consistentes, alguns autores relacionam a exposição aos ftalatos com a puberdade precoce, insuficiência ovariana primária (IOP), endometriose, problemas relacionados com a gravidez e fertilização *in vitro* (IVF), malformações no período fetal e alterações da espermatogénese.

Paralelamente ao aumento crescente da produção de químicos sintéticos com propriedades de disrupção endócrina, a fertilidade humana tem sofrido um declínio nas últimas décadas. Desta forma, tendo em conta os efeitos dos ftalatos no sistema reprodutivo humano é importante clarificar o seu papel na infertilidade.

Metodologia: Para a realização deste trabalho, efetuou-se a pesquisa na internet de artigos científicos relacionados com o tema utilizando como motores de busca o PubMed, Google e Google Scholar, Elsevier, Springer.

Objetivos: Verificar os efeitos dos ftalatos na saúde reprodutiva; averiguar a possível relação entre a crescente produção dos ftalatos e o aumento da infertilidade verificada nas últimas décadas.

Conclusão: A exposição humana a ftalatos pode ter implicações na saúde reprodutiva quer do sexo masculino quer feminino, com potenciais conseqüências na fertilidade. No entanto, é necessário a realização de mais estudos em humanos que esclareçam esta associação, bem como da quantificação do risco exposicional.

Palavras-Chave

Disruptores Endócrinos; Ftalatos; Toxicidade Reprodutiva; Infertilidade; Saúde Preventiva;

Abstract

Introduction: According to the United Nations (UN), every year 400 million tons of plastic are produced, and consequently, there has been an increasing concern about their impact in human health.

Many types of substances are used as components of plastic. Phthalates are one of the components used in order to make plastic more malleable, being present in many types of consumption products. Phthalates work as an endocrine disruptor, therefore, they have the capability of interfering in hormonal action, metabolism and biosynthesis, resulting in a deviation from normal hormonal homeostasis. Some phthalates have been considered category IB as toxic substances for reproduction and consequently have suffered some restrictions on the industrial level. However, their exposure remains ubiquitous in the population.

Phthalates can interfere in the androgens and estrogens normal homeostasis, as in the gonadal-pituitary-hypothalamus axis, causing adverse effects in the development and reproduction of men and women. Some of these effects have already been characterized in epidemiologic and experimental studies in humans and animals. Although not being consistent, some authors relate exposure to phthalates with early puberty, primary ovarian insufficiency, endometriosis, pregnancy related and in vitro fertilization problems, malformations in the fetal period and spermatogenesis alterations.

Parallel to the increasing production of synthetic chemicals with endocrine disruptor properties, human fertility has suffered a decline in the past decades. In this way, having into account the effects of phthalates in the human reproductive system it is important to clarify their part in infertility.

Methodology: In order to carry out this work, a search was made on the Internet for scientific articles related to the theme using PubMed, Google, Google Scholar, Elsevier and Springer as search engines and scientific databases.

Objective: To verify the effects of phthalates in reproductive health; to ascertain the possible relation between the increasing production of phthalates and the increase in infertility registered in the past decades.

Conclusion: Human exposure to phthalates might have reproductive health implications in men as in women, with potential consequences on fertility. However, further studies in humans are needed to clarify this association, as well as the quantification of the exposure risk.

Keywords

Endocrine Disruptor Compounds; Phthalates Exposure; Reproductive toxicity; Infertility; Preventive health

Índice

| | |
|--|----|
| 1- Introdução..... | 1 |
| 2- Metodologia..... | 3 |
| 3- Disruptores Endócrinos..... | 5 |
| 4- Ftalatos | 7 |
| 4.1 Propriedades físicas e químicas..... | 7 |
| 4.1.1 Tipos de ftalatos | 7 |
| 4.2 Exposição | 9 |
| 4.3 Legislação..... | 12 |
| 5- Endocrinologia da Reprodução | 13 |
| 5.1 Hormonas Sexuais Femininas | 13 |
| 5.2Hormonas Sexuais Masculinas | 15 |
| 6- Efeitos dos Ftalatos na Reprodução | 17 |
| 6.1 Efeitos no Sexo Feminino | 18 |
| 6.1.1 Puberdade | 18 |
| 6.1.2 Insuficiência ovariana primária | 19 |
| 6.1.3 Endometriose..... | 21 |
| 6.1.4 Gravidez..... | 22 |
| 6.1.5 Fertilização <i>in vitro</i> | 24 |
| 6.2 Efeitos no sexo Masculino..... | 25 |
| 6.2.1 Efeitos da Exposição Pré-Natal | 26 |
| 6.2.2 Alterações da função Reprodutiva no Adulto | 28 |
| 7- Prevenção | 31 |
| 8- Conclusões | 33 |
| 9- Referências..... | 35 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Vias de biossíntese de androgénios e estrogénios nos ovários..... | 13 |
| Figura 2- Representação esquemática da regulação do eixo HPG masculino e via da biossíntese de testosterona nos testículos | 15 |
| Figura 3 – Representação esquemática dos efeitos dos ftalatos na ovogénese..... | 21 |
| Figura 4- Representação esquemática de alguns efeitos dos ftalatos no sistema reprodutivo masculino..... | 25 |
| Figura 5- Código de identificação de resina e respetiva utilização, contaminante e segurança..... | 31 |
| Figura 6- Resumo esquemático | 33 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Fontes de exposição dos ftalatos | 8 |
| Tabela 2- Concentração média de alguns metabolitos de ftalatos na urina ($\mu\text{g/l}$)..... | 10 |
| Tabela 3- Daily Intake Admissível segundo a UE..... | 11 |
| Tabela 4- Características de um espermograma e alterações induzidas pelos ftalatos.. | 28 |

Lista de Acrónimos e Abreviaturas

| | |
|----------|--|
| 2OH-MiBP | Ftalato de 2-hidroxi-mono-isobutilo |
| AGD | Distância Ano-genital |
| BBzP | Ftalato de Butil benzil |
| BPA | Bisfenol A |
| DBP | Ftalato de Dibutil |
| DEHP | Ftalato de 2-etilhexilo |
| DEHTP | Tetraftalato de diocitilo |
| DEP | Ftalato de dietila |
| DHEAS | Sulfato de desidroepiandrosterona |
| DiBP | Ftalato de di-isobutilo |
| DiDP | Ftalato de Di-isodecilo |
| DiNP | Ftalato de di-isononilo |
| DiPeP | Ftalato de Diisopentil |
| DMP | Ftalato de Dimetil |
| DnOP | Di-n-octil ftalato |
| E2 | Estradiol |
| EDC | Disruptores endócrinos |
| EGFR | Recetor do fator de crescimento epidérmico |
| FSH | Hormona folículo-estimulante |
| GnRH | Hormona libertadora de gonadotrofina |
| HEAL | Health and Environment Alliance |
| HMW | Alto peso molecular |
| HPG | Eixo hipotálamo-pituitária-gonadas |
| INSL3 | Insulina-like 3 |
| IOP | Insuficiência ovariana primaria |
| IVF | Fertilização in Vitro |
| LDL | Lipoproteína de alta densidade |
| LH | Hormona Luteínizante |
| LMW | Baixo peso molecular |
| MBP | Ftalato de Monobutil |
| MBzP | Ftalato de Monobenzilo |
| MCiNP | Ftalato de Mono (carboxi-isononilo) |
| MCiOP | Ftalato de Mono (carboxi-isoocitilo) |
| MCMHP | Ftalato de Mono (2-carboxi-hexil) |
| MCPP | Ftalato de carboxipropilo |
| MCPP | Ftalato de Mono (3-carboxipropilo) |
| MECPP | Ftalato de Mono-2-etil-5-carboxipentil |
| MEHHP | Ftalato de Mono-2-etil-5-hidroxi-hexil |
| MEHP | Ftalato de Monoetilhexil |
| MEOHP | Ftalato de Mono-2-etil-5-oxoetil |
| MEP | Ftalato de Monoetilo |
| MHiDP | Ftalato de Mono (hidroxil-isodecilo) |
| MiBP | Ftalato de Monoisobutilo |
| MiDP | Ftalato de Mono-isodecilo |
| MiNP | Ftalato de Monoisononil |

| | |
|-------|---|
| MMP | Ftalato de Monometilo |
| MMP's | Metaloproteinases de matriz |
| MnBP | Ftalato de Mono-n-butilo |
| MOiDP | Ftalato de Mono (oxo-isodecilo) |
| MOiNP | Ftalato de Mono (oxo-isononil) |
| MOP | Ftalato de Monoctilo |
| Nrf2 | Fator nuclear do eritroide 2 |
| ONU | Organização das Nações Unidas |
| PBDE | Éteres Difenílicos Polibromados |
| PCBs | Bifenilos Policlorados |
| PCP's | Produtos de cuidado pessoal |
| PPAR | Receptores ativados por proliferador de peroxissoma |
| PTESD | Registo de Telarca e Desenvolvimento Sexual Prematuro |
| PVC | Policloreto de vinil |
| TDS | Síndrome de Disgenesia Testicular |
| TRA | Terapia de reprodução assistida |
| UE | União Europeia |

1- Introdução

Segundo a ONU, todos os anos são produzidos cerca de 400 milhões de toneladas de plástico (1) e com o conseqüente aumento da sua produção tem surgido uma crescente preocupação sobre os seus efeitos na saúde humana. Várias classes de substâncias são usadas como constituintes do plástico, sendo os ftalatos usados para tornar o plástico mais maleável. Podemos encontrar este composto em diversos materiais usados pelos consumidores, como dispositivos médicos, brinquedos, embalagens de alimentação, entre outros (2).

Os ftalatos comportam-se como Disruptores Endócrinos. Segundo a Sociedade de Endocrinologia, EDC's são substâncias que estão presentes no ambiente, comida, e outros produtos de consumo que interferem na biossíntese, metabolismo e ação hormonal, resultando num desvio da normal homeostase hormonal (3). Os ftalatos, de uma forma geral funcionam como EDC's que apresentam uma estrutura química que mimetiza as hormonas esteroides, apresentando propriedades antiandrógenicas e pequena atividade estrogénica, competindo pelos recetores endógenos (4,5). Desta forma compreende-se o possível impacto na saúde reprodutiva e a sua associação.

Apesar de atualmente existir uma regulamentação na União Europeia (UE) sobre o tipo de substâncias permitidas na produção de plásticos, os ftalatos continuam disseminados pelo ambiente, sendo absorvidos pelo ser humano, podendo ser encontrados em diversos fluidos corporais, principalmente na urina (6). Os estilos de vida atuais conduzem a uma crescente exposição diária de várias combinações de fatores ambientais potencialmente tóxicos e de EDC's que se acumulam nos tecidos e fluidos. Sabe-se que a saúde reprodutiva é afetada pela exposição a contaminantes ambientais, principalmente se a exposição ocorrer em determinados pontos críticos do desenvolvimento humano (7,8). Desde o final da 2ª Guerra Mundial que se tem verificado um aumento de eventos negativos na saúde reprodutiva, que não é possível explicar apenas por alterações genéticas, tendo em conta a velocidade dos acontecimentos, sendo a explicação mais provável a emergência de novos produtos químicos presentes no ar, solo, comida e outros produtos (8). Ao longo dos últimos anos foram feitos vários estudos experimentais em humanos e animais, que sugeriram uma relação entre a exposição a EDC's e o sistema reprodutivo, incluído malformações e infertilidade (9,10). Com este trabalho pretende-se verificar a influência dos ftalatos na saúde reprodutiva humana, bem como na fertilidade através da análise de dados epidemiológicos, estudos experimentais em humanos, animais e *in vitro*.

2- Metodologia

Para a realização desta dissertação procedeu-se a uma pesquisa da bibliografia entre os meses de Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020. Para o efeito realizou-se a pesquisa na internet de artigos científicos relacionados com o tema utilizando como motores de busca o *PubMed*, *Google* e *Google Scholar*, Elsevier, Springer. Utilizaram-se como palavras-chave para a pesquisa : phthalates AND female reproductive system OR male reproductive system; phthalates AND reproduction OR fertility OR infertility; phthalates AND puberty OR primary ovarian insufficiency OR endometriosis OR pregnancy OR preterm birth OR in vitro fertilization OR oogenesis; phthalates AND testicular function; phthalates AND sperm; phthalates AND phthalates syndrome; phthalates AND anogenital distance OR spermatogenesis; phthalates and human exposure OR human prevention. Foram ainda utilizados livros específicos da área.

Apenas foram incluídos na pesquisa artigos dos idiomas inglês e português, tendo-se dado preferência aos artigos publicados nos últimos 10 anos, contudo sem excluir outros menos recentes sempre que o seu conteúdo fosse considerado relevante para o trabalho.

3- Disruptores Endócrinos

A Sociedade de Endocrinologia publicou em 2009 a Declaração Científica chamada de “EDC-1”, onde foi revisto o conhecimento científico sobre o efeito endocrinológico de químicos disruptores endócrinos, presentes no meio ambiente. EDC’s são definidos como “químicos exógenos, ou mistura de químicos, que interferem com qualquer mecanismo de ação hormonal” (3).

Existem aproximadamente 85,000 produtos químicos conhecidos, e aproximadamente 1000 são reconhecidos como potenciais EDC’s. Dentro dos EDC’s conhecidos, várias classes são bastante mais investigadas, sendo essas o bisfenol A (BPA), ftalatos, herbicidas, pesticidas, e químicos industriais como Bifenilos Policlorados (PCBs) e Éteres Difenílicos Polibromados (PBDE) (11,12).

Os EDC’s, tal como as hormonas, apresentam curvas dose-resposta complexas, conseguindo atuar em concentrações extremamente baixas. O mecanismo pelo qual estes atuam no organismo é um pouco complexo, uma vez que ao contrário das hormonas endógenas, estes não atuam em recetores específicos para os próprios, existindo alterações na afinidade e especificidade (4). A maioria da investigação tem-se focado no efeito em recetores de estrogénio, atividade antiandrogénica e efeitos tiroideios e mais recentemente em atividade nos recetores nucleares como os da família dos glucocorticoides e nos recetores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) (11).

O sistema endócrino apresenta um papel central na saúde humana, regulando importantes funções biológicas como o metabolismo, desenvolvimento, reprodução e comportamento. Desta forma, salienta-se a importância de compreender o papel dos EDC’s no organismo humano e potenciais efeitos prejudiciais. Segundo a *Health and Environment Alliance* (HEAL), publicado em 2014, a UE gasta em média €636 – 637.1 biliões de euros com doenças endócrinas relacionadas com os EDC’s, sendo que estima que poderiam ser poupados cerca de 31 biliões de euros com a redução da exposição (13). Vários estudos têm demonstrado a associação de EDC’s e diversos efeitos no sistema endócrino como: diabetes mellitus, obesidade, doenças cardiovasculares, reprodução masculina e feminina, alguns tumores hormono-dependentes, doença prostática, patologia tiroideia e patologia cerebral nomeadamente associada ao neurodesenvolvimento e sistema neuroendócrino. Como a maioria dos EDC’s apresentam uma estrutura química semelhante as hormonas sexuais, o sistema reprodutivo representa o mais vulnerável a possíveis interferências (14).

De facto, é conhecido que tem existido um aumento crescente de baixas taxas de fertilidade nos países desenvolvidos, assumindo-se que é resultado de alterações sociais e económicas associadas a emancipação da mulher e alteração do paradigma tradicional.

No entanto, existe evidência crescente para suspeitar que as alterações no estilo de vida têm aumentado a exposição a EDC's, que também tem contribuído para a ocorrência de problemas na saúde reprodutiva (15).

Alguns dos xenobióticos conhecidos com efeitos de disrupção endócrina sofreram restrições para a sua colocação no mercado nos últimos anos, tendo em conta a evidência de malefícios para a saúde humana (16). Alguns dos ftalatos sofreram restrições específicas, sendo considerados categoria IB como substâncias tóxicas para a reprodução (17).

4- Ftalatos

A invenção dos ftalatos data a segunda década do século passado, sendo usado o Ftalato de 2-etilhexilo (DEHP) desde 1931 como aditivo do policloreto de vinil (PVC), tendo sido usados também como repelente de insetos e cercaricida (18). Atualmente, passando quase um século da sua existência os ftalatos estão presentes numa enorme quantidade de produtos de consumo incluído materiais de construção civil, vestuário, brinquedos, cosméticos, suplementos alimentares, automóveis e equipamentos médicos.

4.1 Propriedades físicas e químicas

Os ftalatos são diésteres alquílicos do ácido ftálico obtido pela reação anidrido ftálico com álcoois oxo, formando éteres. Podem ser classificados em ftalatos de baixo peso molecular (LMW) e de alto peso molecular (HMW) (19). Ambos os tipos de ftalatos apresentam uma ligação química instável e reversível com o material integrante, o que provoca uma maior suscetibilidade a contaminar o ar, comida e os fluidos humanos (2). Após o contacto, os ftalatos são metabolizados nos respetivos monoésteres. A metabolização envolve 2 fases, a hidrólise e a conjugação. A hidrólise ocorre por um processo catabolizado pelas lípases e esterases no intestino ou outros tecidos, formando monoésteres, que podem ser excretados na urina e nas fezes, sem sofrer mais metabolismo, como ocorre nos LMW. Os HMW por outro lado, podem sofrer hidroxilação ou oxidação, formando metabolitos oxidativos. Na fase da conjugação, os metabolitos oxidativos são catalisados pela enzima UDP-glicuronil transferase formando conjugados hidrofílicos de glicuronídeo, sendo excretados na urina (19).

4.1.1 Tipos de ftalatos

Os ftalatos HMW são caracterizados por ter menos acumulação biológica e incluem DEHP, o ftalato mais comumente usado, que se encontra no PVC, impermeáveis, sapatos e dispositivos médicos os outros incluem: ftalato de butil benzil (BBzP), ftalato de diisononil (DiNP), ftalato de di-n-octil (DnOP) e ftalato de di-isodecilo (DiDP) (19). Os ftalatos LMW ftalato de Dibutil (DBP), ftalato de dimetil (DMP), ftalato de dietil (DEP) e o ftalato de di-isobutilo (DiBP), que apresentam mais fatores de bioacumulação que os HMW, foram primariamente usados em produtos cosméticos, lacas, inseticidas e casacos

(19). Considera-se que o DMP é o ftalato com menos efeitos tóxicos (10). As fontes de exposição, dos diferentes ftalatos são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1- Fontes de exposição dos ftalatos de alto e baixo peso molecular, e os metabolitos correspondentes. LEGENDA: MEHP-Ftalato de Monoetilhexil; MEHHP- Ftalato de Mono-2-etil-5-hidroxihexil ; MEOHP-Ftalato de Mono-2-etil-5-oxoexil; MECPP- Ftalato de Mono-2-etil-5-carboxipentil; MCMHP-Ftalato de Mono (2-carboxi-hexil); MBzP- Ftalato de Monobenzilo; MCP- Ftalato de Mono (3-carboxipropilo); MiNP -Ftalato de Monoisononil; MOiNP Ftalato de Mono (oxo-isononil); MCiOP-Ftalato de Mono (carboxi-isoctilo); MCP- Ftalato de Mono (3-carboxipropilo); MOP- Ftalato de Monoctilo; MiDP-Ftalato de Mono-isodecilo; MHiDP-Ftalato de Mono (hidroxil-isodecilo); MOiDP-Ftalato de Mono (oxo-isodecilo); MCiNP-Ftalato de Mono (oxo-isononil); MnBP-Ftalato de Mono-n-butilo; MMP-Ftalato de Monometilo; MEP-Ftalato de Monoetilo; MiBP- Ftalato de Monoisobutilo ; 2OH-MiBP- Ftalato de 2-hidroxi-mono-isobutilo.

| | Ftalato (abreviatura) | Metabolitos | Fonte de Exposição (2,19) |
|-----------------------------|----------------------------------|--|--|
| Alto Peso Molecular | DEHP | MEHP MEHHP MEOHP MECPP MCMHP | PVC, impermeáveis, sapatos, pacotes alimentares, diapositivos médicos, brinquedos, luvas, estofos de automóveis, cortinas de chuveiro |
| | BBzP | MBzP MCP | Desodorizantes, pinturas, brinquedos, pele sintética, pacotes alimentares |
| | DiNP | MiNP MOiNP MCiOP | Brinquedos, ladrilhos, revestimentos de paredes, adesivos, luvas, lacas, roupas, sapatos, diapositivos médicos, embalagens alimentares, interiores de carros |
| | DnOP | MCP MOP | Selantes de embalagens, forros de tampas de garrafas, pavimentos, carpetes |
| | DiDP | MiDP MHiDP MOiDP MCiNP | Brinquedos, estojos, borrachas, tecidos revestidos, sapatos |
| Baixo Peso Molecular | DBP | MnBP | Pinturas, adesivos, perfumes, aftershaves, produtos de unhas |
| | DMP* | MMP | Desodorizantes, aftershaves, shampoos, adesivos, produtos de cabelo |
| | DEP | MEP | Desodorizantes, aftershaves, shampoos, tratamento de unhas e pele, maquiagem, excipientes em medicamentos e suplementos |
| | DiBP | MiBP, 2OH-MiBP | Adesivos, pinturas |

* Ftalato com menos efeito tóxico

4.2 Exposição

Devido ao comportamento químico dos ftalatos, estes facilmente se desintegram do material constituinte, resultando na sua libertação ambiental, contaminando o solo, comida, atmosfera e conseqüentemente contaminando o ser humano via ingestão, inalação, absorção tópica ou através da aplicação parentérica de instrumentos médicos. Os ftalatos podem também atravessar a placenta (20). A exposição primária aos ftalatos ocorre através da ingestão alimentar. Como estes apresentam uma estrutura lipofílica, ocorre especialmente por alimentos com alto teor de gordura como o leite, manteiga e carne. Para além disto, a exposição oral também pode ser feita através de formulações farmacêuticas como antibióticos, anti-histamínicos e laxantes (21).

Os LMW podem também ser absorvidos por via cutânea, e os ftalatos mais voláteis por via inalatória (2). Comparativamente aos ftalatos absorvidos por via digestiva, os absorvidos por via cutânea podem ser considerados ainda mais tóxicos, uma vez que esta via evita a primeira fase do metabolismo, atingindo diretamente a circulação sistémica. Um estudo piloto, reconhece a possibilidade do gel usado nas ecografias ser uma fonte de exposição tópica dos ftalatos (22).

Apesar de ser possível quantificar a presença dos ftalatos no sangue, sémen, fezes, mecónio, leite materno, líquido amniótico, cordão umbilical e saliva, o biomarcador de exposição mais utilizado é a urina. No entanto, existe evidência que a taxa de deteção de ftalatos é superior se a amostra utilizada for leite materno, contudo o armazenamento do leite pode levar a maior contaminação da amostra. Por outro lado, a urina é mais fácil de colher, e os níveis dos metabolitos são geralmente mais elevados que nas outras amostras (10,21). O DEHP é o ftalato mais abundante no ambiente, está relatado que tem uma produção de mais de 2 milhões de toneladas por ano no mundo (21). As concentrações médias de alguns metabolitos do DEHP na urina observadas em alguns estudos exposicionais, são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2- Concentração média de alguns metabolitos de ftalatos na urina 24 horas ($\mu\text{g/l}$)

| Autor | País | Número | Ano | Idade | ΣDEHP | MBP | MEP | MnBP |
|---|-------------|---------------|------------|--------------|--------------------------------|------------|------------|-------------|
| <i>Shuang Ding et al, 2019(23)</i> | China | 478 | 2017 | 16-20 | 34,5 | 45,65 | 38,38 | - |
| <i>Jonatan Axelsson et al, 2015(24)</i> | Suécia | 314 | 2008-2010 | 17-20 | 48,4 | 47 | 41 | - |
| <i>Gurusankar Saravanabhavana et al, 2016(25)</i> | Canada | 3236 | 2007-2009 | 6-49 | 40,09 | - | 49,1 | 23,8 |
| <i>Thomas Göena et al, 2011(26)</i> | Alemanha | 60 | 2008 | 19-29 | 34,1 | - | - | 19,6 |
| <i>Hanne Frederiksen et al, 2010(27)</i> | Dinamarca | 60 | 2006 | 18-26 | 68,07 | - | 54,44 | 36,83 |
| <i>Manori J. Silva et al, 2004(28)</i> | EUA | 9282 | 1999-2000 | >6 | - | 26 | 164 | - |

Atualmente, cerca de 75-100% da população está exposta aos ftalatos diariamente devido ao seu aumento de produção e uso direto, com conseqüente contaminação ambiental (20).

De acordo com várias fontes, em diferentes grupos de consumidores, a principal fonte de exposição do DMP é através do ar interior. Os produtos de cuidado pessoal como os shampoos, cremes etc. são as principais fontes de exposição do DEP. A comida é o principal veículo de contaminação do DBP e DEHP, no entanto em crianças a ingestão de poeiras e o contacto de objetos com a boca também representam importantes fontes de exposição (2). Relativamente ao BBzP, DiNP e o DiDP, as fontes de exposição variam muito entre adultos e crianças, sendo que a ingestão de poeiras e contacto de objetos com a boca constituem as fontes principais de exposição (2).

O estudo de biomonitorização Norueguês encontra-se inserido no projeto europeu EuroMix (European Test and Risk Assessment Strategies for Mixtures), onde foi feita a associação dos níveis de ftalatos na urina 24-horas, usando a comida e produtos de cuidado pessoal como fontes de exposição. Neste estudo, ocorreu uma associação positiva entre gorduras e óleos e a concentração de DEHP, e o consumo de doces foi também associada a concentração de DEHP e DiBP. Relativamente aos produtos de cuidado pessoal (PCP), existiu uma correlação positiva entre os ftalatos e o uso de géis de banho tanto em homens como em mulheres, no entanto a maioria dos determinantes de PCP diferiu entre géneros, sendo que nos homens encontrou-se uma associação com

o uso de produtos de barbear, enquanto que para as mulheres a associação é maior como o uso de cremes antirrugos, creme de mãos e pasta de dentes (29).

Atualmente, o consumo médio diário de ftalatos considerado seguro é superior aos níveis médios estimados de consumo humano, ver tabela 3, sendo que se estima uma exposição entre 0,3-9,9 µg/Kg/dia (30).

Tabela 3- Daily Intake Admissível segundo a UE (31).

| <i>Ftalato</i> | <i>Daily Intake tolerável (ug/kg/dia)</i> |
|----------------|---|
| DEHP | 50 |
| BBP | 500 |
| DBP | 10 |
| DiNP | 150 |
| DiDP | 150 |
| DnOP | Sem estimativa |
| DiBP | |

Um estudo português usando 19 amostras de vinho, revelou que as amostras de vinho do porto estavam contaminadas com DBP, sendo que a amostra mais contaminada apresentava 825 µg/L, podendo ser um achado preocupante uma vez que o *daily intake* tolerável é 10 µg/kg/dia para o DBP. Para além disso, uma das amostras continha 106 µg/L de DiBP, que não se encontra permitido para o uso em materiais que contactem com alimentos (32).

Tendo em conta a regulamentação existente na indústria e os potenciais efeitos tóxicos dos ftalatos clássicos, outros ftalatos têm surgido como o tetraftalato de diocitilo (DEHTP), como forma alternativa. Um estudo realizado na Alemanha entre 1999 e 2017, usando a urina 24-horas como amostra, observou um aumento crescente de exposição DEHTP durante este período (33). Geralmente o nível de exposição a ftalatos é superior nas crianças. Em Portugal, existe também um estudo realizado na população pediátrica, que revela uma exposição omnipresente de DEHTP nas crianças portuguesas (6). O valor médio urinário do metabolito foi cinco vezes superior ao encontrado em adultos alemães, revelando uma maior exposição das crianças relativamente aos adultos, e uma possível maior exposição aos ftalatos em Portugal do que na Alemanha. Existiu também uma diferença significativa entre crianças que faziam uma dieta com produtos frescos e comida não processada, apresentando um *daily intake* 2,5 inferior aos que apresentavam uma dieta normal (6). Uma vez que estes plasticizantes alternativos não se encontram regulamentados, e a sua potencial toxicidade ainda não se encontra bem estabelecida, o aumento da sua produção pode representar um problema futuro para a saúde.

4.3 Legislação

A UE estabeleceu um regulamento relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH) que definiu o DEHP, DBP, BBP e DiBP, denominados “os quatro ftalatos” como substancias tóxicas para a reprodução, categoria 1B (34).

Desde 1999 que a UE proíbe a colocação no mercado de brinquedos e artigos de puericultura que contenham o DEHP, DBP e BBP em determinadas condições, no entanto foi considerado que o DiBP, usado como substituto dos anteriores, possuía um risco semelhante, tendo sido concluído que este deveria também sofrer restrições (34).

Desta forma, em 2018, foi proposta a restrição da colocação no mercado de artigos contendo os quatro ftalatos numa concentração igual ou superior a 0,1%, em peso, individualmente ou em qualquer combinação nesses materiais plastificados. O dossier propôs isenções para artigos exclusivamente concebidos para utilização ao ar livre, sem contacto prolongado com a pele ou contacto com as mucosas, certos artigos exclusivamente destinados a uso industrial e agrícola, instrumentos de medição, artigos abrangidos pela legislação da UE em vigor e artigos já colocados no mercado da UE (34). Atualmente encontra-se proibida a colocação no mercado de DEHP, DBP e BBP em brinquedos ou artigos de puericultura, individualmente ou em qualquer combinação dos três ftalatos, numa concentração igual ou superior a 0,1% do peso de material plastificado. Está estabelecida a proibição da colocação no mercado de produtos com uma concentração igual ou superior a 0,1% em peso de material plastificado a partir do dia 7 de julho de 2020 (34).

5- Endocrinologia da Reprodução

5.1 Hormonas Sexuais Femininas

Os ovários para além de armazenarem as células germinativas, também representam a maior fonte produtora e excretora hormonal do sexo feminino. Nos ovários, a principal fonte de produção de hormonas são os folículos em maturação. Os folículos são compostos pelas células de teca, as células da granulosa e os ovócitos primários. As células de teca produzem androgénios, e as da granulosa produzem estrogénios (35). As hormonas são produzidas no ovário a partir do colesterol. Na mitocôndria o colesterol é convertido em pregnenolona através da reacção enzimática de fragmentação da cadeia lateral do colesterol. A pregnenolona é transportada para fora da mitocôndria e os restantes passos ocorrem no retículo endoplasmático liso (35), ver Figura 1.

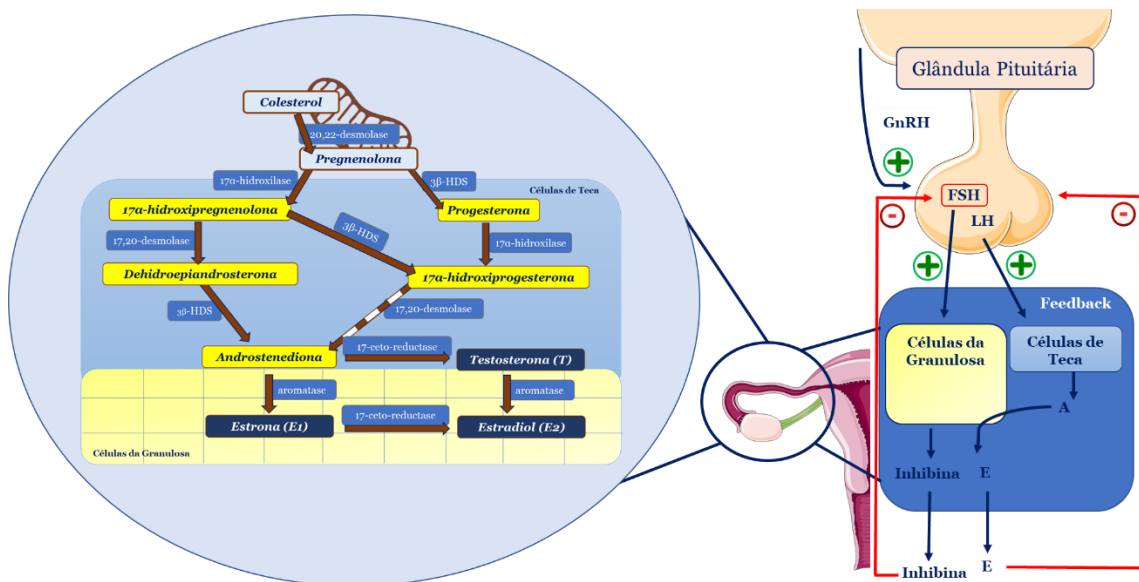


Figura 1 - Vias de biossíntese de androgénios e estrogénios nos ovários. As células de Teca são responsáveis pela produção de androgénios por estimulação da LH. As células da granulosa são reguladas pela FSH, produzindo estrogénios através da conversão dos androgénios produzidos pela célula de Teca. (+)/setas azuis- estimulação; (-)/setas vermelhas - inibição; T- testosterona; GnRH- Hormona libertadora de gonadotrofina; FSH- Hormona folículo-estimulante ; LH- Hormona Luteinizante; 3 β -HDS- 3 β -hidroxisteróide desidrogenase; 17 β -HDS- 17 β -hidroxisteróide desidrogenase; E2-estradiol; E1-Estrona

Os principais androgénios circulantes na mulher são sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), androstenediona e testosterona. A síntese de androgénios na mulher ocorre principalmente na zona reticulada da suprarrenal na forma de sulfato de DHEAS.

Os estrogénios circulantes incluem a estrona, sulfato de estrona, estradiol e estriol (gravidez). Mais de 95% do estradiol em circulação é produzido pelos ovários. No referente à estrona circulante, metade é produzida nos ovários e a outra metade pela conversão periférica, pela conversão de androstenediona através da aromatase no tecido adiposo, folículos pilosos e fígado. O estriol é quase todo produzido durante a gravidez e é secretado a partir da placenta. Os estrogénios desempenham várias funções no organismo, podendo considerar-se como hormonas tróficas, tendo uma ação essencial no crescimento, desenvolvimento, manutenção dos órgãos reprodutivos, apresentando também relevância na regulação de processos metabólicos independentes das funções reprodutivas (35). As suas principais funções são desempenhadas nos órgãos reprodutivos da mulher: regulação das secreções vaginais; crescimento do útero na puberdade; regulação de mecanismos propícios para que a fecundação ocorra; crescimento e proliferação das glândulas, epitélio e estroma da camada funcional do endométrio (35). Os efeitos extragenitais incluem o desenvolvimento mamário na puberdade, indução da síntese proteica e manutenção da densidade óssea (35).

5.2 Hormonas Sexuais Masculinas

Para a função reprodutiva do homem as três hormonas com maior importância são a Testosterona, Di-hidrotestosterona e o Estradiol. Sendo que a testosterona desempenha o papel principal. Os testículos são o principal órgão reprodutor no sexo masculino, sendo compostos por 2 tipos principais de células (Sertoli e Leydig). As células de Sertoli desempenham a sua função na espermatogénese, sendo reguladas pela Hormona Foliculo Estimulante (FSH) (35). As células de Leydig são a principal fonte de testosterona no homem, sendo regulada pela Hormona Luteinizante (LH). Estas células também secretam pequenas quantidades de estradiol, estrona, pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxipregnenolona e 17 α -hidroxiprogesterona (35). A síntese de androgénio nos testículos é iniciada com o substrato de colesterol, como esquematizado na figura 2.

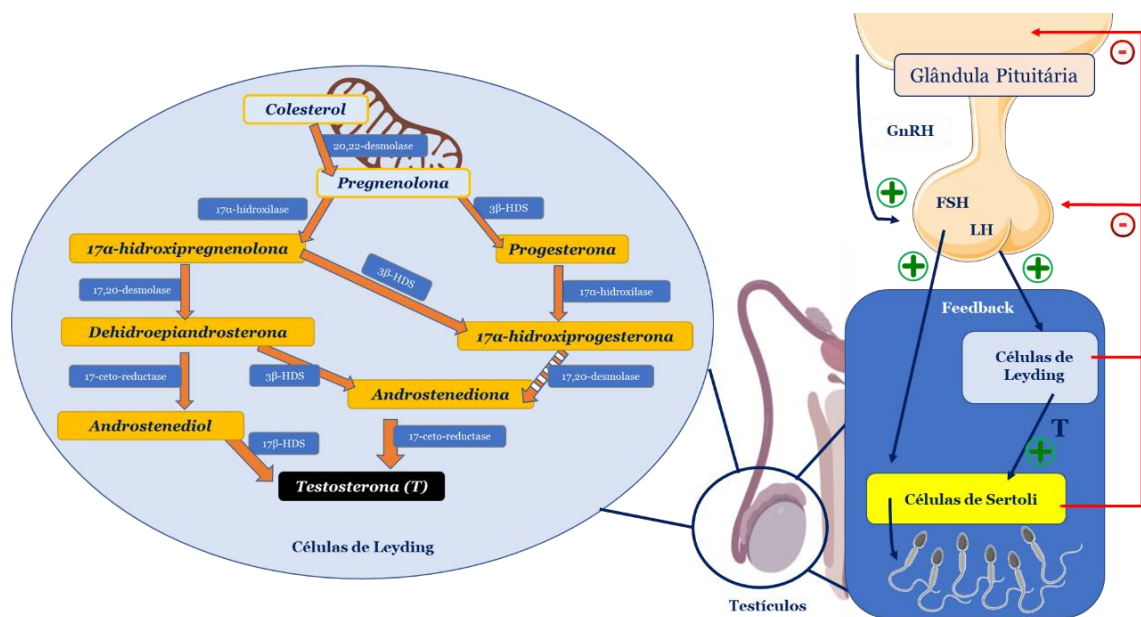


Figura 2- Representação esquemática da regulação por feedback do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) masculino e via da biossíntese de testosterona nos testículos, pelas células de Leydig. LEGENDA: \oplus /setas azuis- estimulação; \ominus /setas vermelhas - inibição; T- testosterona; GnRH- Hormona libertadora de gonadotrofina; FSH- Hormona foliculo-estimulante ; LH- Homona Luteínizante; 3 β -HDS- 3 β -hidroxisteróide desidrogenase; 17 β -HDS- 17 β -hidroxisteróide desidrogenase

A di-hidrotestosterona e o estradiol são produzidos não só pelos testículos, como pela conversão periférica dos respetivos precursores que são produzidos tanto nos testículos como nas glândulas suprarrenais (35) .

No sangue os androgénios e os estrogénios surgem na forma livre ou unidos a proteínas séricas, sendo que 60% da testosterona circula ligado à proteína Globulina Ligadora de Hormonas Sexuais (SHBG), 38% ligada à albumina e 2% na forma livre, sendo esta a forma em que é funcional (35).

As principais funções dos androgénios no sistema reprodutivo do homem são: diferenciação e desenvolvimento sexual durante o período fetal; durante a puberdade, o crescimento dos órgãos sexuais e desenvolvimento dos folículos pilosos e glândulas sebáceas; maturação óssea; aumento da massa muscular; estimulação da eritropoese; e um papel importante na espermatogénese (35).

6- Efeitos dos Ftalatos na Reprodução

O mecanismo de disrupção endócrina dos ftalatos não é completamente compreendido, no entanto alguns estudos indicam uma possível atividade antiandrogénica, bem como atividade de agonista e antagonista de estrogénio (12). Por outro lado o DEHP e os seus metabólitos exercem efeitos metabólicos através da ativação dos PPAR's α e γ , mediadores chave do metabolismo lipídico e adipogénese, podendo contribuir para a dislipidemia e obesidade, que desempenham também um importante papel endócrino na reprodução (36). Atualmente, o consenso geral é que o DEHP, DBP, BBP e o DIBP têm potencial de disrupção endócrina no desenvolvimento e na reprodução, sendo que esses efeitos já foram observados em mais de uma espécie animal (21). Desta forma, o sistema reprodutivo representa o eixo endócrino mais vulnerável para a atuação destes EDC's (4). No entanto, é importante entender que as misturas de vários EDC's podem atingir um sistema comum, sendo difícil de atribuir determinado efeito a um EDC's específico.

Ao longo do desenvolvimento humano existem vários períodos críticos para a possível ocorrência de disrupção endócrina, nomeadamente durante o período embrionário, fetal e nos recém-nascidos.

Atualmente os efeitos dos ftalatos na reprodução masculina estão mais bem documentados que os efeitos na feminina, o que pode ser preocupante uma vez que, possivelmente, estas se encontram mais expostas aos ftalatos por maior utilização de produtos de cuidado pessoal e cosméticos que contêm este EDC's na sua composição.

Assim, nos tópicos seguintes serão abordadas algumas patologias em que existe evidência de disrupção endócrina dos ftalatos.

6.1 Efeitos no Sexo Feminino

6.1.1 Puberdade

A puberdade corresponde a uma fase da vida humana onde ocorre uma série de transformações biológicas e fisiológicas, com a finalidade de atingir a maturação sexual. Uma série de eventos inicia a maturação sexual, o eixo HPG começa a funcionar durante a vida in útero, e permanece ativo durante as primeiras semanas após o nascimento, depois este permanece quiescente devido ao aumento do feedback negativo do estrogênio. Durante a puberdade, o eixo HPG volta a estar ativo, desencadeando a produção de hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH) no hipotálamo com a consequente libertação de LH e FSH pela hipófise, estimulando a produção de hormonas sexuais pelos ovários, dando início às alterações que caracterizam a puberdade (37).

A puberdade feminina inicia-se com o desenvolvimento do botão mamário (Telarca), seguida pelo desenvolvimento dos pelos púbicos (Pubarca) e aparecimento da primeira menstruação (Menarca). Os estrogénios são as hormonas responsáveis pelo desenvolvimento inicial do botão mamário. Na pubarca os estrogénios têm um papel residual, sendo os androgénios produzidos nas glândulas suprarrenais os principais responsáveis (38).

Ao longo das últimas décadas, o início da puberdade tem-se verificado cada vez mais precoce (39). A puberdade precoce, nas mulheres é definida com o seu início antes dos 8 anos de idade (40). Apesar de muitos fatores tentarem explicar este fenómeno, a possível exposição a contaminantes ambientais, como os EDC's, representa uma possível hipótese causal desta evolução.

De uma forma geral, os ftalatos têm sido associados a uma puberdade mais precoce, nomeadamente ao desenvolvimento da telarca precoce, apesar de os estudos não estarem todos em concordância (10).

Na ilha de Puerto Rico, durante a década de 80, verificou-se uma tendência para a telarca precoce nas raparigas. Foi então realizado um estudo com o objetivo de identificar poluentes no sangue das raparigas de Puerto Rico com telarca prematura. Foi usada uma amostra de 41 raparigas com telarca precoce com idades entre os 6 meses e 8 anos, e uma amostra de controlo de 35 raparigas (41). Verificou-se que a presença de DEP, DBP e metabolitos de DEHP atingia 68% da amostra, no entanto apenas houve resultados significativos com o MEHP (o metabolito do DEHP), sendo o rácio da concentração média entre a amostra e o controlo de 70:450 ng/mL, representando resultados sugestivos de uma possível associação entre a exposição aos ftalatos e a telarca prematura (41). Um estudo semelhante realizado por Chou et al. (2009), mostrou algumas

diferenças da concentração de metabolitos dos ftalatos entre o grupo controlo, e o grupo com telarca precoce, mostrando uma maior concentração de MMP no grupo com telarca precoce (42), estando de acordo com o relatado por Colon et al. (2000) (41).

H. Frederiksen e colaboradores (2012) demonstraram que o atraso da pubarca, mas não a telarca precoce, estava associada a um aumento da excreção de ftalatos na urina, uma vez que os androgénios são os responsáveis pelo desenvolvimento da pubarca, o seu atraso pode sugerir atividade antiandrogénica dos ftalatos na amostra de estudo (43).

Mais recentemente, Harley e colaboradores (2019) num estudo de coorte longitudinal em Salinas, demonstraram uma associação positiva entre os ftalatos encontrados nos produtos de cuidado pessoal e a idade da puberdade em rapazes e raparigas. Foram usadas amostras de urina pré-natal e peripuberal, sendo que se observou uma associação entre um início de puberdade mais precoce com maiores concentrações de MEP (metabolito do DEP) na amostra pré-natal (44).

6.1.2 Insuficiência ovariana primária

A IOP, é definida como a perda de função ovárica nas mulheres com idade inferior aos 40 anos, sendo o diagnóstico feito com a presença de oligoamenorreia ou amenorreia há pelo menos 4 meses e a demonstração de baixos níveis de estrogénio e altos níveis de FSH em duas ocasiões, com um intervalo de pelo menos 4 semanas (40). A principal causa de IOP é idiopática, mostrando aqui um *gap* de informação de mecanismos possivelmente subjacentes. Desta forma salienta-se o possível impacto de fatores ambientais, como a exposição a EDC's. De facto, vários estudos demonstraram o impacto dos ftalatos na função ovárica (45). A foliculogénese é um mecanismo complexo, ainda não completamente compreendido.

Os folículos primordiais, constituídos por um ovócito primário rodeado de células da granulosa, representam as unidades reprodutivas fundamentais, que configuram a reserva de células germinativas (46). São produzidos entre o 6 e 9 mês de gestação e contêm a previsão completa de folículos ováricos (46). Qualquer alteração que reduza o número de células germinativas ou que acelere o recrutamento, leva a insuficiência ovariana primária. Um estudo em ratos, revelou que a exposição a DEHP pode induzir apoptose das células dos folículos primordiais (47).

O início do crescimento folicular, começa com a transição do folículo primordial inativo à fase do crescimento, sendo que não se conhece o mecanismo pelo qual se desenvolve esta transição. A foliculogénese pode-se dividir em dois períodos o pré-antral (independente de gonadotropina) e o antral (dependente de FSH) (46). Durante o período pré-antral ocorre a transformação de folículo primordial até folículo pré-antral,

este período compreende várias transformações incluído a diferenciação de células tecais, granulosa e formação do antro. As células tecais intersticiais adquirem recetores de LH e as da granulosa de FSH. A FSH estimula o crescimento das células da granulosa, e caso a FSH seja suprimida ocorre atresia dos folículos. Por outro lado, a FSH estimula as células da granulosa a produzir inibina B, que por feedback negativo inibe a FSH, desta forma a concentração sérica da inibina sugere o volume de células granulosa ativas nos ovários, sendo então usada como estimativa da reserva ovária. Um estudo retrospectivo, usando uma amostra de 415 mulheres recebendo tratamento de infertilidade, relacionou a concentração de inibina B, com a concentração de ftalatos, concluindo-se uma relação negativa entre os ftalatos urinários e os níveis de inibina B, sugerindo um efeito adverso da exposição aos ftalatos no desenvolvimento das células granulosa e consequentemente na reserva ovária (48).

As células de teca e as granulosa representam uma unidade funcional de produção de hormonas. Nas células de teca, a LH aumenta a expressão e atividade da proteína esteroidogénica reguladora aguda (StAR), da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450_{sc}), da 3 β -hidroxisteróide desidrogenase (3 β -HSD-II) e 17 α -hidroxilase para aumentar a produção de androgénios. A FSH aumenta a expressão de aromatase e 17-ceto-redutase dentro das células da granulosa, produzindo estradiol. A toxicidade reprodutiva do DEHP já foi atribuída à supressão da produção de estradiol pelas células granulosa, sendo também capaz de suprimir a aromatase (49). Um estudo mais recente envolveu a exposição de ratos femininos ao DMP (o ftalato considerado mais seguro), por 20 e 40 dias, e demonstrou que a FSH diminuiu significativamente depois da administração de 2g/Kg/d por 40 dias, e o E2 e LH aumentaram marcadamente, para além de demonstrar a interferência do metabólito no eixo HPG, este estudo também demonstrou que o DMP induzia apoptose das células granulosa (50). Resultados semelhantes foram obtidos com a administração de 500mg/dia durante 10 dias de DEHP (51).

A importância do estradiol para o crescimento e desenvolvimento ovulatório não está bem estabelecida, no entanto o seu papel como regulador de retroalimentação negativa e positiva é fundamental. No entanto, um estudo revelou que o DEHP inibe o crescimento dos folículos antrais, mediado em parte pela redução dos níveis de E2 e reguladores do ciclo celular (52). O efeito dos ftalatos na regulação de retroalimentação também foi demonstrado num estudo caso-controlo, realizado na China com uma amostra de 173 mulheres com IOP e 246 controlos. Este estudo conclui que a concentração urinária de ftalatos estava negativamente relacionada com a concentração de estrogénio e positivamente relacionada com a FSH, sugerindo que a exposição a

ftalatos pode ser suficiente para diminuir a produção ovárica de estrogênio e consequentemente aumentar a produção de FSH por feedback positivo (53).

Desta forma, existe evidência que os ftalatos possam ter um papel no desenvolvimento de IOP, quer por alterações no eixo HPG, quer por influência nas próprias células ováricas, para melhor compreensão ver Figura 3.

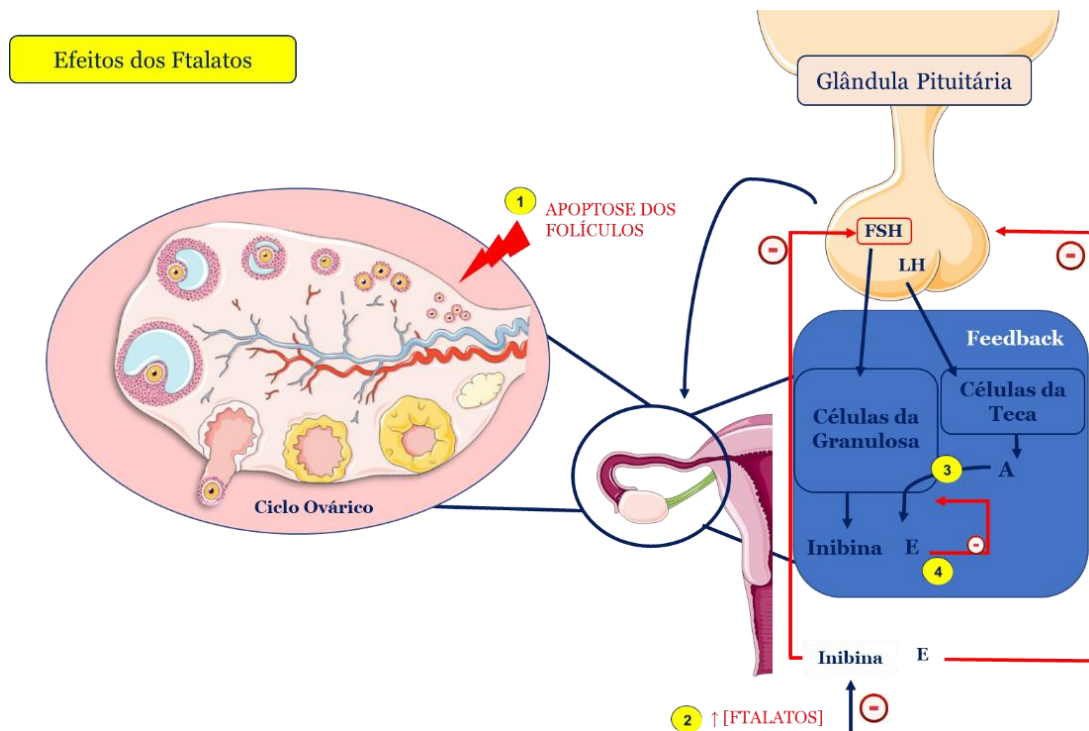


Figura 3 – Representação esquemática dos efeitos dos ftalatos na ovogênese: ⊖- inibição; 1- o DEHP induz apoptose dos folículos primordiais; 2-o aumento da concentração de ftalatos leva a uma inibição da produção de inibina; A exposição aos ftalatos leva a uma 3) Inibição da aromatase e 4) diminuição da produção de estrogênios. Legenda: E- estrogênios; A- androgênios; FSH-Hormona Folículo-estimulante; LH- hormona Luteinizante;

6.1.3 Endometriose

A endometriose consiste na presença de tecido do tipo endometrial fora da cavidade uterina, sendo que se manifesta com sintomas de dismenorreia e dispareunia. A infertilidade é mais comum em mulheres com endometriose, no entanto ainda não foi estabelecida uma relação causa-efeito (40).

A verdadeira causa desta patologia não é conhecida, no entanto as teorias mais aceites são a teoria da menstruação retrograda, a disseminação vascular e linfática e a teoria da metaplasia celômica (40). No entanto, a investigação na patofisiologia da endometriose tem sugerido que o aparecimento e progressão da doença envolvem mecanismos

relacionados com esteroides, incluindo alterações hormonais do endométrio e da cavidade peritoneal, excesso de produção de estrogénio pelas lesões de endometriose e alterações na esteroidogénese no ovário (40). Desta forma, é plausível que os ftalatos possam contribuir para o risco de endometriose.

Pensa-se que a atividade das metaloproteinase de matriz (MMPs) tenha um papel na fase mais precoce da endometriose, tendo sido demonstrado que a sua inibição suprime as lesões ectópicas de endometriose (54), e as MMP-2 e MMP-9 encontram-se presentes nas células de endometriose (55). Foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar o papel dos ftalatos na patogénese da endometriose *in vitro* e *in vivo* (em ratos e em humanos). *In vitro*, as células endométricas tratadas com DEHP aumentaram a expressão de MMP-2 e 9. Em ratos, foram introduzidos implantes de células endometriais no abdómen, e posteriormente expostos a DEHP, tendo-se verificado um aumento do crescimento do implante endometrial. Em humanos, foi avaliada a concentração urinária de DEHP em 88 mulheres com o diagnóstico de endometriose, sendo que os níveis urinários foram superiores aos observados no grupo controlo. Assim, este estudo sugeriu que a exposição a ftalatos pode levar a alterações nas células do endométrio tornando-as mais proliferativas e invasivas, podendo levar a endometriose (56). Um estudo prospetivo caso-controlo, com uma amostra de 97 mulheres com endometriose num estado avançado e 197 de controlo, demonstrou que as concentrações de MEHP e DEHP eram significativamente superiores às do grupo controlo (179.7 ± 32.5 vs 92.5 ± 31.1) ng/mL (57). Um outro estudo, com o objetivo de avaliar o risco de endometriose associada a exposição a ftalatos revelou que as mulheres com uma maior concentração de MEHP e outros metabolitos de ftalatos, tinham risco aumentado de endometriose (58). Vários estudos semelhantes demonstram esta associação (10,59).

6.1.4 Gravidez

Na fase prematura do desenvolvimento fetal, os principais promotores de crescimento e desenvolvimento são genéticos, enquanto que o ambiente materno se torna mais importante nas fases mais tardias da gravidez.

Durante a gravidez, o feto fica exposto a muitos fatores ambientais devido à passagem através da placenta de substâncias lipofílicas. Ao longo da vida, a mulher é exposta a vários EDC's lipofílicos, que se podem acumular nas reservas do tecido adiposo, durante a gravidez ocorre uma redistribuição das reservas de gordura, o que pode levar a libertação destes EDC's para a circulação, conseqüentemente atravessam a placenta atingindo o feto (60). Foi realizado um estudo em ratos onde foram administradas doses de DEHP estimadas equivalentes às doses de exposição em humanos, durante a gravidez

e período de lactação, tendo como objetivo observar os efeitos no eixo HPG a nível morfológico e molecular, nos ratos nascidos nessas condições e os seus efeitos na vida adulta. Tendo sido concluído que os nascidos de ratos fêmea expostas a DEHP apresentavam: peso mais baixo, alteração do peso gonadal, baixa esteroidogênese e baixos níveis de recetores de LH e FSH nas gonadas, e sub-regulação da expressão da subunidade do gene de gonadotrofinas na pituitária (61). Este estudo demonstra os possíveis efeitos na saúde reprodutiva humana em consequência do ambiente fetal.

Um estudo realizado em humanos demonstrou uma relação inversa entre os ftalatos maternos e os androgénios no cordão umbilical e uma associação positiva entre os ftalatos maternos e os estrogénios do cordão, mostrando a influência dos ftalatos na esteroidogênese. Encontraram também níveis significativamente altos de MnBP (metabolito do DBP) no cordão umbilical comparativamente à exposição materna, o que pode indicar uma possível acumulação de EDC's no compartimento fetal (60).

Segundo a *International Society for Developmental Origins of Health and Disease*, o ambiente envolvente durante o período fetal influencia o estado de saúde no futuro e o peso à nascença, o peso da placenta, a idade gestacional entre outros, são considerados marcadores importantes do ambiente intrauterino, com potenciais consequências a longo prazo na saúde do adulto (62). Desta forma, é importante perceber o impacto na exposição aos ftalatos nos estádios mais precoces do desenvolvimento humano.

Um estudo piloto avaliou o impacto da exposição materna a ftalatos, durante o primeiro trimestre, na expressão e metilação de genes placentais humanos. Conclui-se que os ftalatos provocam a metilação de DNA, sendo o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) o principal gene com expressão alterada, o EGFR desempenha um papel importante na fisiologia placentar (63). Contudo, o efeito final na saúde do feto continua por esclarecer.

6.1.4.1 Parto pré-termo

O parto pré-termo, definido como o parto que ocorre antes das 37 semanas de gestação, representa um problema de saúde pública, uma vez que se associa a grande morbimortalidade infantil (40). Os principais processos que levam a um parto pré-termo são a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal quer no feto quer na grávida; o descolamento prematuro da placenta ou inflamação sistémica causada por uma infeção; hemorragia e distensão uterina patológica (40). As possíveis causas ambientais estão pouco estudadas nesta patologia. Contudo, vários estudos têm demonstrado uma associação entre a concentração urinária de ftalatos e o parto pré-termo (64,65,66). No entanto, o mecanismo pelo qual poderá existir essa causalidade permanece pouco

estudado. Alguns autores sustentam que os ftalatos induzem stress-oxidativo na grávida (67). Foi demonstrada uma associação entre a concentração urinária de ftalatos e o 8-isoprostano, um biomarcador de stress oxidativo, que quando aumentado apresenta um risco maior de parto pré-termo (68,69).

6.1.5 Fertilização *in vitro*

Nas últimas décadas tem aumentado do número de tratamentos de reprodução assistida, incluído IVF. Esta técnica permite adquirir evidência do impacto dos poluentes ambientais na qualidade do embrião e eventos críticos da reprodução como a ovulação, fertilização e implantação (70). Uma vez que há acesso direto aos oócitos e fluido folicular, é possível determinar o momento preciso do processo em que uma determinada toxina teve efeito. Desta forma, os estudos em IVF podem providenciar informação sobre os efeitos dos ftalatos na saúde reprodutiva.

Um estudo prospetivo, avaliou a associação entre os níveis de 8 metabolitos de ftalatos urinários de 599 casais e os resultados de IVF. O nível urinário de MEHP estava associado a um maior risco de gravidez bioquímica, falha na gravidez clínica e nascimentos vivos (71). Estes resultados demonstram que a exposição a alguns ftalatos pode influenciar negativamente os resultados da IVF.

Outro estudo semelhante, analisando a urina de 256 mulheres submetidas a IVF. Demonstrou que os metabolitos dos DEHP e DiDP estavam associados com a diminuição ovócitos viáveis e número de oócitos em MII na recuperação, enquanto que só os metabolitos do DiNP e DiDP foram associados a menor taxa de fertilização. A concentração urinária de DEHP foi associada a reduzida probabilidade de gravidez clínica e nascimentos vivos (48).

6.2 Efeitos no sexo Masculino

Esta subsecção será subdividida em Efeitos da Exposição Pré-Natal (6.2.1) e Alterações da função Reprodutiva no Adulto (6.2.2). Na figura 4 encontra-se esquematizado algumas das vias onde os ftalatos podem atuar.

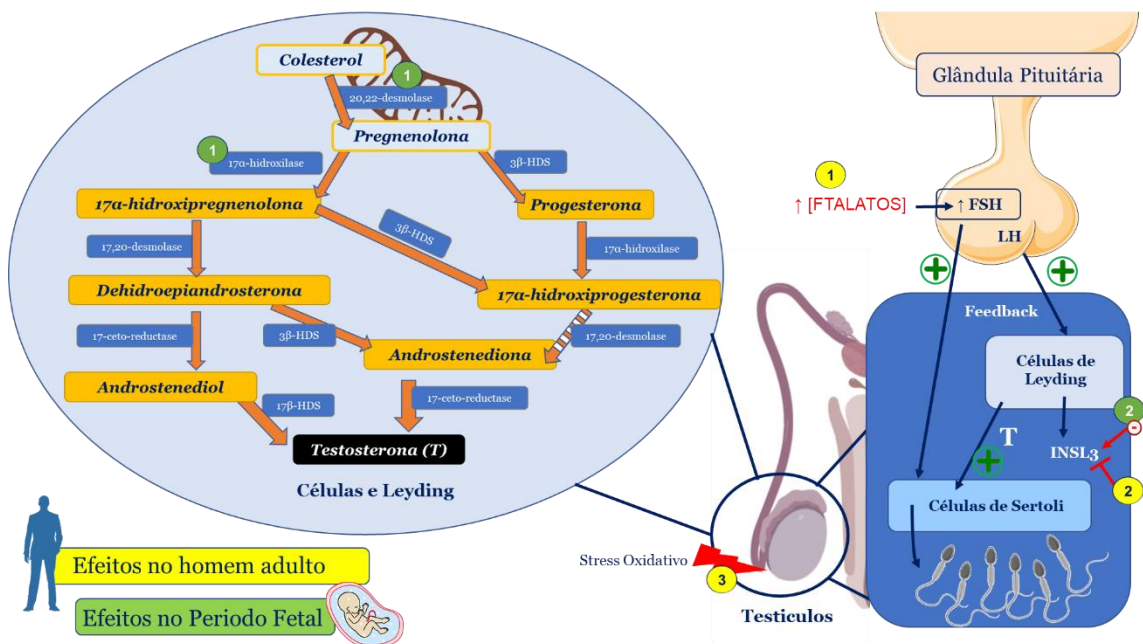


Figura 4- Representação esquemática de alguns efeitos dos ftalatos no sistema reprodutivo masculino.

● Representa os efeitos no Período Fetal e ● representa os efeitos no homem adulto. Durante o período fetal os ftalatos induzem 1) diminuição das enzimas (17α-hidroxilase e 20,22-desmolase), levando a uma deficiência androgénica traduzida em diminuição da AGD. 2) Inibem a INSL3 (Criptorquidia). No homem adulto, os ftalatos 1) têm uma relação positiva com os níveis de FSH (diminuição da espermatogénese); 2) suprimem a INSL3, que se pensa ter um papel antiapoptótico das células germinativas e 3) induzem stress oxidativo nos testículos. LEGENDA: FSH -hormona foliculo-estimulante; LH -Hormona luteinizante; INSL3 - insulin-like3; T- testosterona; /setas azuis – estimulação; /setas vermelhas– inibição;

6.2.1 Efeitos da Exposição Pré-Natal

Os ftalatos podem levar a um conjunto de efeitos no desenvolvimento reprodutivo em ratos, que se designa Síndrome do Ftalato. Esta síndrome é caracterizada por malformações nos órgãos reprodutores masculinos nomeadamente no epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminais, próstata e genitais externos. Malformações como hipospadias, criptorquidia e diminuição da distância ano-genital (AGD) podem ser observadas (72). O termo Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS) foi introduzido em 2001 por Skakkebaek NE., compreendendo várias anomalias do sistema reprodutor masculino, semelhantes a síndrome do ftalato, sendo considerada como uma perturbação do desenvolvimento testicular durante a vida fetal (73). Malformações como a hipospadia e criptorquidia são bastante frequentes, fazendo parte do TDS, implicando uma etiologia comum. A baixa atividade androgénica ou defeitos nos recetores dos mesmos, durante o período fetal são mecanismos precipitantes nestas patologias, tal como na diminuição da AGD (35).

6.2.1.1 Distância Ano-Genital

A AGD corresponde à distância entre o ânus e a genitália externa, representando uma medida sensível de exposição pré-natal a substâncias antiandrogénicas. Esta distância está relacionada com a atividade androgénica durante o desenvolvimento do sistema reprodutor, representando uma marca da produção de testosterona nos testículos fetais. Para além disto, pode ser uma marca de disrupção endócrina in útero, do estado hormonal, fertilidade e saúde reprodutiva no adulto (74). Um estudo em ratos examinou a expressão de proteínas esteroidogénicas nos testículos fetais e investigou os efeitos da exposição a DiPeP in útero no desenvolvimento e função reprodutiva. Os ratos fêmea grávidos foram expostos a 0, 125, 250 e 500 mg/Kg/d, sendo que as transcrições de Star, P450_{sc}, e 17 α -hidroxilase estavam diminuídas nas três doses pré-natais usadas, indicando que a regulação molecular da esteroidogénese estava alterada nos testículos fetais. Para além disso, a AGD estava diminuída (-27,8%) nos ratos neonatais, o que sustenta a ideia de insuficiência androgenia pré-natal induzida pelo DiPeP (75). Em 2005, foi realizado o primeiro estudo que demonstrou que os ftalatos diminuem a distância ano-genital em humanos, usando a concentração de ftalatos na urina pré-natal (76). O mesmo autor, realizou um estudo com 753 grávidas, com idade gestacional <13 semanas, com o objetivo de relacionar a concentração de ftalatos na urina do primeiro trimestre com a AGD. Os resultados obtidos foram semelhantes, obtendo uma relação inversa entre os ftalatos e a AGD em rapazes, mas não em raparigas (77). Mais

recentemente, um estudo transversal com 99 mães e 100 bebês rapazes (um par de gêmeos), relacionou a AGD com a concentração de DEHP no cordão umbilical. O MEHP estava presente em 98,9% das amostras de sangue do cordão umbilical e estudo concluiu que existia uma relação inversa entre a distância ano-genital e a concentração de DEHP (78). Desta forma, a evidência sustenta uma possível relação entre a exposição a ftalatos e o efeito antiandrogênico por estes produzido durante o período fetal, traduzindo-se com uma diminuição da AGD.

6.2.1.2 Criptorquidia

A descida dos testículos para o saco escrotal ocorre entre a 12^a semana de gestação e o nascimento, sendo um mecanismo regulado por fatores mecânicos e hormonais, ocorrendo em duas fases (79). Durante a primeira fase (fase trans-abdominal), as hormonas reguladoras são o INSL3 (insulina-like3) e androgénios. A segunda fase (inguino-escrotal) envolve na sua maioria fatores mecânicos (79). A criptorquidia corresponde a uma incorreta descida dos testículos para o saco escrotal, que pode ocorrer por qualquer mecanismo que afete quer os fatores mecânicos quer hormonais, no entanto a maior causalidade estabelecida é o défice de androgénios durante o período fetal (35). Tem sido sugerido que os ftalatos alterem a secreção de INSL3, produzindo criptorquidia em ratos (80,81,82). No entanto, a evidência sugere que o bloqueio desta hormona não tenha tanto impacto na criptorquidia humana, uma vez que a criptorquidia por interrupção da fase trasabdominal só corresponde a 10% dos casos (79). Um estudo prospetivo com uma amostra de 6246 bebês em que 102 nasceram com criptorquidia, concluiu-se que a exposição a ftalatos representa um fator de risco (83). Contudo, os estudos epidemiológicos em humanos não têm demonstrado uma forte correlação. Para se obter dados que comprovassem este efeito, seria essencial realizar estudos que relacionassem a concentração urinária de ftalatos maternos durante as principais fases críticas do período fetal com as posteriores malformações no nascimento (84). No entanto, os vários estudos que comprovam a atividade antiandrógenica dos ftalatos durante o período fetal não podem ser desprezados, uma vez que sabemos que representa uma causa de criptorquidia.

6.2.1.3 Hipospadias

O desenvolvimento dos órgãos sexuais externos ocorre durante a 9^a e 12^a semanas de gestação, a hipospadias corresponde a uma incorreta implantação uretral no pênis, correspondendo a uma das malformações dos genitais mais comuns no sexo masculino.

Apesar de o mecanismo exato do desenvolvimento desta patologia não ser conhecido, o normal desenvolvimento do pénis depende da ação de androgénios (82). Um estudo realizado com o objetivo de verificar a relação da exposição a DEHP e DiNP durante o período fetal com o desenvolvimento de malformações incluindo a hipospadias, não encontrou nenhuma relação com o DEHP, no entanto não conseguiu excluir a relação com o DiNP, apesar de estatisticamente não ser significativa (85). Apesar desta malformação se incluir na síndrome do ftalato, existem poucos estudos sobre esta relação, e atualmente não existe uma evidência clara que o comprove (19,84).

6.2.2 Alterações da função Reprodutiva no Adulto

Como sugerido anteriormente, os ftalatos podem induzir alterações do sistema reprodutivo durante o período fetal, que conseqüentemente podem ter implicações na saúde do adulto. Um estudo transversal com 1106 homens avaliou a associação entre a AGD e a qualidade do sémen. Este revelou existir uma correlação positiva significativa entre a AGD e a qualidade do sémen. Os homens com a AGD menor (percentil ≤ 10) tinham mais do dobro do risco de serem inférteis de acordo com a concentração do esperma e a morfologia, comparativamente aos homens com uma AGD mediana (86). Desta forma, os ftalatos podem interferir na fertilidade masculina indiretamente por malformações no sistema reprodutivo bem como por dano direto do esperma.

Estima-se que 25-40% dos casos de infertilidade se devem a fatores masculinos, nomeadamente a qualidade do sémen. De facto, tem existido uma preocupação crescente com a diminuição da qualidade do esperma observada nas últimas décadas e a sua possível associação com fatores ambientais. O sémen é constituído por espermatozoides, líquido seminal e líquido prostático, e qualquer alteração induzida nestes constituintes pode resultar em alterações do espermograma. O espermograma é constituído por vários parâmetros que estão padronizados pela OMS, ver tabela 4.

Tabela 4- Características de um espermograma e alterações induzidas pelos ftalatos

| Característica | Efeitos dos ftalatos |
|---------------------------|-----------------------------|
| Volume | ↓(87) |
| pH | - |
| Concentração espermática | ↓(87,88) |
| Número de espermatozoides | - |
| Motilidade | ↓(89,90) |
| Morfologia | - |
| Viabilidade | - |
| Leucócitos | - |

Um estudo prospetivo que inclui a amostra de sémen de 936 homens, que frequentaram uma clínica de fertilidade durante o período de 2000-2017, revelou que a concentração e contagem de esperma diminuíram 37% e 42% respetivamente durante o período de 17 anos. No mesmo estudo também foi demonstrado que a exposição ao DEHP e aos seus metabolitos ainda potenciaram a diminuição da concentração de esperma assim como a sua qualidade (88). Um outro estudo recente, usando a amostra de sémen de 155 homens, revelou que a concentração de esperma tinha uma relação inversa significativa com os níveis de MEP na urina (87).

Para que a espermatogénese ocorra de forma eficiente é necessário que vários mecanismos hormonais atuem de forma equilibrada. A FSH é necessária para a iniciação da espermatogénese, esta estimula as células de Sertoli que rodeiam as células germinativas de modo a proporcionar um ambiente favorável para a diferenciação das mesmas. Para além disto, as células de Sertoli têm a função de libertar espermatozoides maduros e de fagocitar os espermatozoides aberrantes, bem como a secreção de proteína fixadora de androgénios em resposta à FSH (35). A inibina B é também produzida pelas células de Sertoli em resposta à FSH e as concentrações séricas representam o número de células de Sertoli e a produção de espermatozoides, desempenha também um mecanismo de feedback negativo na FSH. Desta forma, um aumento de FSH representa uma alteração na espermatogénese (35). Num estudo com 599 homens, conclui que os metabolitos de DEHP podem alterar os níveis de FSH. Os homens com a maior concentração de MEHP, tinham níveis elevados de FSH e LH (indicando uma produção anormal de esperma), mas níveis baixos de testosterona/LH (indicando disfunção das células de Leydig) e níveis baixos de Testosterona/Estrogénio (indicando inibição da aromatase) (91). Um estudo semelhante mostrou uma relação inversa entre os níveis de estradiol, testosterona total e livre e a concentração de MEHP na urina (92).

O mecanismo pelo qual os ftalatos podem interferir na espermatogénese não está bem estabelecido, para além da disrupção hormonal, outras hipóteses têm surgindo. Um estudo realizado numa clínica de fertilidade usando o esperma de 290 homens, observou uma relação inversa entre a concentração de ftalatos no líquido seminal e a concentração espermática, bem como um nível diminuído de INSL3, sugerindo que os ftalatos reduzem a produção de esperma por suprimir a INSL3 nos testículos humanos (93). Como já discutido anteriormente, o INSL3 desempenha um papel na descida testicular durante o período fetal, no entanto na fase adulta parece desempenhar um papel anti-apoptose nas células germinativas, de forma a manter a espermatogénese, sendo que o nível de INSL3 está correlacionado com a concentração espermática (94).

Também se tem observado que os ftalatos podem induzir alterações no sémen por induzir stress oxidativo nos testículos (90). Em ratos, a administração crónica de baixos níveis de DEP induz disfunção testicular através do stress oxidativo, que induz dano no ADN do esperma e apoptose (95). Um outro estudo revelou que a exposição a DEHP induz toxicidade testicular, através do stress oxidativo, diminui o nível de testosterona e estimula a expressão do fator 2 relacionado ao fator nuclear do eritroide 2 (Nrf2) (96). De facto o stress oxidativo é considerado um dos fatores idiopáticos que afeta os espermatozoides humanos que pode ser associado com dano do ADN, peroxidação da membrana lipídica, instabilidade da membrana lipídica, diminuição da motilidade e baixas taxas de fertilização (90).

O volume do sémen reflete a capacidade de excreção das glândulas acessórias. As glândulas acessórias compreendem as vesículas seminais, próstata e glândulas de Cowper e Littre. Sendo que as vesículas seminais são responsáveis por 60% do volume do sémen, gerando nutrientes para os espermatozoides, os principais constituintes do sémen. Um estudo revelou uma associação negativa entre alguns metabolitos do DEHP e o volume seminal, o que pode indicar uma alteração induzida nas glândulas acessórias pelos ftalatos, no entanto o mecanismo ainda não está bem estabelecido (87).

7- Prevenção

Como referido anteriormente, a maior fonte de exposição dos ftalatos é através de alimentos embalados, desta forma salienta-se a importância do reconhecimento da população em geral das embalagens que contêm estes disruptores endócrinos na sua constituição, sendo que o código de identificação da resina presente nas embalagens plásticas permite a identificação da substância usada na sua produção, ver figura 5.



Figura 5- Código de identificação de resina e respetiva utilização, contaminante e segurança.

Apesar de existir regulamentação para a utilização de ftalatos na indústria, estes continuam presentes de forma ubíqua no nosso dia-dia, desta forma salienta-se a sensibilização da população para medidas preventivas de exposição, de forma a reduzir o contacto com os ftalatos.

Num estudo coorte, com 750 mulheres grávidas, 86 com história de infertilidade e 41 com recurso a tecnologia de reprodução assistida, foi analisado a concentração de ftalatos na urina. O estudo revelou que as mulheres que recorreram a técnicas de reprodução assistida (TRA), apresentavam uma concentração inferior de 4 metabolitos do DEHP, comparativamente com as outras (97). Uma possível explicação para este resultado é o facto de as mulheres que se submetem a TRA adotam estilos de vida que diminuem a exposição, como hábitos de alimentação sem comida embalada, de forma a otimizar a sua oportunidade de engravidar. Desta forma é demonstrada que a redução na utilização de produtos que contenham ftalatos pode ser eficaz na redução da exposição. Os efeitos mais documentados dos ftalatos são consequentes da exposição durante o período fetal, destacando-se a necessidade de as grávidas diminuírem a sua exposição durante a gestação.

8- Conclusões

Apesar da existência de legislação reguladora, os ftalatos encontram-se dissipados pelo meio ambiente, sendo que a exposição humana tem aumentado.

Relativamente aos efeitos no sexo feminino, os estudos sugerem que os ftalatos apresentam atividade estrogénica como mecanismo de disrupção endócrina. Os ftalatos foram relacionados com a telarca precoce e patologias com implicações na fertilidade na mulher. Por outro lado, é importante salientar que a exposição durante a gravidez pode representar um ponto crítico para que ocorram efeitos nocivos dos ftalatos, nomeadamente nos fetos do sexo masculino. No sistema reprodutor masculino, vários estudos relacionam a exposição durante o período fetal com malformações quer em ratos quer em humanos, sendo o mecanismo de patogénese a atividade antiandrogénica que os ftalatos exercem in útero. Para além disto, os ftalatos conseguem alterar a função testicular, induzindo alterações na espermatogénese, com potenciais implicações na fertilidade. Na figura 6 encontra-se esquematizado os principais efeitos dos ftalatos na Saúde Reprodutiva.

Em suma, a exposição humana a ftalatos tem implicações na fertilidade humana, desta forma salienta-se a importância da prevenção exposicional. Apesar do risco exposicional não se encontrar bem estabelecido, é certo que os ftalatos podem induzir disrupção endócrina no sistema reprodutivo humano, sendo o benefício da prevenção exposicional maior que o risco uma vez que evicção de produtos industrializados contribui para um estilo de vida mais saudável. No entanto, é necessário a realização de mais estudos em humanos que esclareçam esta associação, bem como da quantificação do risco exposicional.

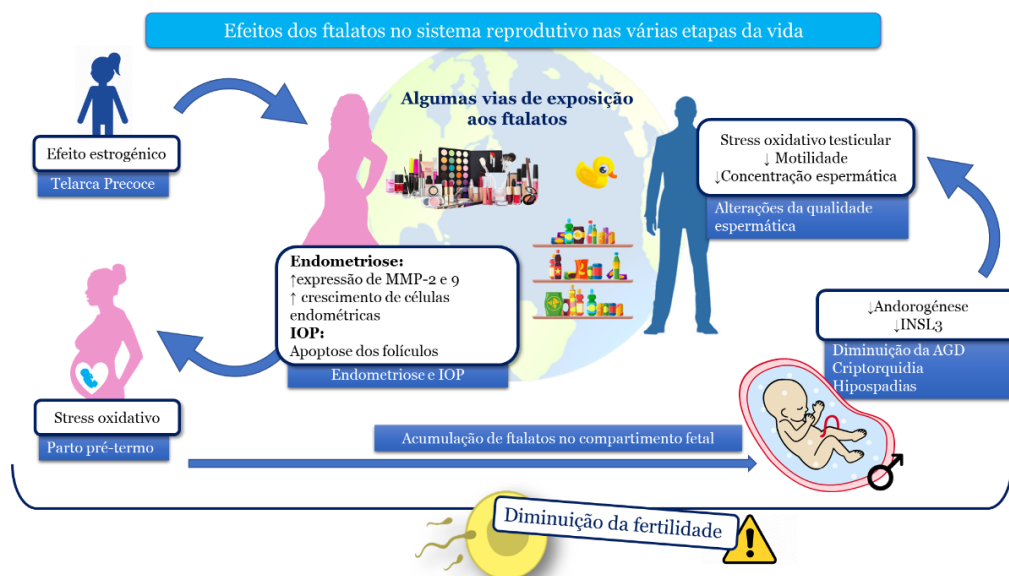


Figura 6- Resumo esquemático dos Efeitos dos ftalatos , em varias etapas da vida humana

9- Referências

1. Agencia Lusa. Mais de 400 milhões de toneladas de plásticos produzidos por ano, só 9% são reciclados [Internet]. [cited 2019 Nov 8]. Available from: <https://observador.pt/2018/06/05/mais-de-400-milhoes-de-toneladas-de-plasticos-produzidos-por-ano-so-9-sao-reciclados/>
2. Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;
3. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293–342.
4. Laretta R, Sansone A, Sansone M, Romanelli F, Appetecchia M. Endocrine disrupting chemicals: Effects on endocrine glands. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(March):1–7.
5. Kiyama R, Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int* [Internet]. 2015;83:11–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.05.012>
6. Lessmann F, Correia-Sá L, Calhau C, Domingues VF, Weiss T, Brüning T, et al. Exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHTP) in Portuguese children – Urinary metabolite levels and estimated daily intakes. *Environ Int* [Internet]. 2017;104(February):25–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2017.03.028>
7. Dominguez F. Phthalates and other endocrine-disrupting chemicals: the 21st century's plague for reproductive health. *Fertil Steril* [Internet]. 2019;111(5):885–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.01.029>
8. American College of Obstetricians & Gynecologists. Exposure to toxic environmental agents Committee Opinion No. 575. *Fertil Steril* [Internet]. 2013;100(4):931–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213030094>
9. Høyer BB, Lenters V, Giwercman A, Jönsson BAG, Toft G, Hougaard KS, et al. Impact of Di-2-Ethylhexyl Phthalate Metabolites on Male Reproductive Function: a Systematic Review of Human Evidence. *Curr Environ Heal reports*. 2018;5(1):20–33.
10. Kay VR, Chambers C, Foster WG. Critical Reviews in Toxicology Reproductive and

- developmental effects of phthalate diesters in females. 2013;8444(3):200–19. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=itxc20>
11. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's second Scientific Statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 2015;36(6):593–602.
 12. Street ME, Angelini S, Bernasconi S, Burgio E, Cassio A, Catellani C, et al. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: Highlights from a national italian meeting. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6).
 13. Hunt A, Ferguson J. HEALTH COSTS IN THE EUROPEAN UNION HOW MUCH IS RELATED TO EDCS ? [Internet]. Health and Environment Alliance (HEAL) 2014. Available from: www.env-health.org
 14. Monneret C. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus - Biologies.* 2017.
 15. Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int* [Internet]. 2015;84:154–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.017>
 16. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu Rev Physiol.* 2011;73(1):135–62.
 17. Regulamento P, Europeu P. 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH). 2015;2015(5):8–31.
 18. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2009;364(1526):2047–62.
 19. Mariana M, Feiteiro J, Verde I, Cairrao E. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environ Int.* 2016;94:758–76.
 20. Baken KA, Lambrechts N, Remy S, Mustieles V, Rodríguez-Carrillo A, Neophytou CM, et al. A strategy to validate a selection of human effect biomarkers using adverse outcome pathways: Proof of concept for phthalates and reproductive effects. *Environ Res.* 2019;175(May):235–56.
 21. Lyche JL, Gutleb AC, Bergman Å, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol Environ Heal -*

Part B Crit Rev. 2009;12(4):225–49.

22. Messerlian C, Mustieles V, Wylie BJ, Ford JB, Keller M, Ye X, et al. Ultrasound gel as an unrecognized source of exposure to phthalates and phenols among pregnant women undergoing routine scan. 2018;220(8):1285–94.
23. Ding S, Zhang Z, Chen Y, Qi W, Zhang Y, Xu Q, et al. Urinary levels of phthalate metabolites and their association with lifestyle behaviors in Chinese adolescents and young adults. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;183(August).
24. Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Jönsson BAG, Lindh CH, Giwercman A. Phthalate exposure and reproductive parameters in young men from the general Swedish population. *Environ Int* [Internet]. 2015;85:54–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.005>
25. Saravanabhavan G, Guay M, Langlois É, Giroux S, Murray J, Haines D. Biomonitoring of phthalate metabolites in the Canadian population through the Canadian Health Measures Survey (2007-2009). *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2013;216(6):652–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.12.009>
26. Göen T, Dobler L, Koschorreck J, Müller J, Wiesmüller GA, Drexler H, et al. Trends of the internal phthalate exposure of young adults in Germany-Follow-up of a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2011;215(1):36–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.07.011>
27. Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson AM. Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2010;34(7):400–10.
28. Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, et al. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect.* 2004;
29. Husøy T, Andreassen M, Hjertholm H, Carlsen MH, Norberg N, Sprong C, et al. The Norwegian biomonitoring study from the EU project EuroMix: Levels of phenols and phthalates in 24-hour urine samples and exposure sources from food and personal care products. *Environ Int* [Internet]. 2019;132(March):105103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105103>
30. Rocha J, Mendes AP. Materiais em Contacto com os Alimentos – Plástico na

Alimentação: Uma Ameaça? *Acta Port Nutr.* 2019;17:28–33.

31. European Commission. Phthalates in school [Internet]. European Commission. 2008 [cited 2020 Apr 2]. p. 1–11. Available from: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/phthalates-school-supplies/1-2/5-safe-daily-exposure.htm#0
32. Putzu C. The occurrence of Bisphenol A and Phthalates in Portuguese wines and the migration of selected substances from coatings in contact with a wine simulant: Universidade Católica Portuguesa. 2016;
33. Lessmann F, Kolossa-gehring M, Apel P, Rütther M, Pälme C, Harth V, et al. German Environmental Specimen Bank: 24-hour urine samples from 1999 to 2017 reveal rapid increase in exposure to the para-phthalate plasticizer di (2-ethylhexyl) terephthalate (DEHTP). *Environ Int* [Internet]. 2019;132(June):105102. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105102>
34. European Commission. Commission Regulation 2018/2005 of 17 December 2018 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bi. *Off J Eur Union* [Internet]. 2018;6(December):L 322/14-L 322/19. Available from: <https://echa.europa.eu/previous-consultations-on-restriction-proposals/-/substance-rev/13919/term>
35. Gardner DG, Shobac D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 2011.
36. Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B. Effects of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on female fertility and adipogenesis in C3H/N Mice. *Environ Health Perspect.* 2012;120(8):1123–9.
37. Guerrero-Fernández J., Cartón Sánchez A, Barreda Bonis A., Menéndez Suso J. RDJ. Manual de Diagnóstico y Terapéutica en Pediatría. 6ªe. Editorial Médica Panamericana; 2018. 1–2360 p.
38. Khonsary S. Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology. *Surg Neurol Int.* 2017;
39. Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Gérard A, Bourguignon JP. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2015;38:12–

36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.12.004>
40. Casanova R, Chuang A, Goepfert A, Hueppchen N, Weiss P, Beckmann C, et al. Beckmann and Ling's Obstetrics and Gynecology. Wolters Kluwer business. 2018.
41. Colón I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect*. 2000;108(9):895–900.
42. Chou YY, Huang PC, Lee CC, Wu MH, Lin SJ. Phthalate exposure in girls during early puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22(1):69–77.
43. Frederiksen H, Sørensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen CP, Petersen JH, et al. High urinary phthalate concentration associated with delayed pubarche in girls. *Int J Androl*. 2012;35(3):216–26.
44. Harley KG, Berger KP, Kogut K, Parra K, Lustig RH, Greenspan LC, et al. Association of phthalates, parabens and phenols found in personal care products with pubertal timing in girls and boys. *Hum Reprod*. 2019;34(1):109–17.
45. Ponzio OJ, Silvia C. Evidence of reproductive disruption associated with neuroendocrine changes induced by UV-B filters, phthalates and nonylphenol during sexual maturation in rats of both gender. *Toxicology* [Internet]. 2013;311(1–2):41–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.05.014>
46. Gardner DG. *Endocrinología básica y clínica*. 9º. Lange, editor. 2011.
47. Zhang JN, Zhang RQ, Liu JC, Li L, Shen W, Sun XF. Di (2-ethylhexyl) Phthalate Exposure Impairs the microRNAs Expression Profile During Primordial Follicle Assembly. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(December):1–12.
48. Du YY, Guo N, Wang YX, Hua X, Deng TR, Teng XM, et al. Urinary phthalate metabolites in relation to serum anti-Müllerian hormone and inhibin B levels among women from a fertility center: A retrospective analysis. *Reprod Health*. 2018;15(1):1–12.
49. Lovekamp TN, Davis BJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;172(3):217–24.
50. Mei Y, Rongshuang M, Ruizhi Z, Hongyuan H, Qiyue T, Shuhua Z. Effects of dimethyl phthalate (DMP) on serum sex hormone levels and apoptosis in C57 female mice. *Int J Endocrinol Metab*. 2019;17(2):0–5.
51. Svechnikova I, Svechnikov K, Söder O. The influence of di-(2-ethylhexyl)

- phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol.* 2007;
52. Gupta RK, Singh JM, Leslie TC, Meachum S, Flaws JA, Yao HHC. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;
 53. Cao M, Pan W, Shen X, Li C, Zhou J, Liu J. Urinary levels of phthalate metabolites in women associated with risk of premature ovarian failure and reproductive hormones. *Chemosphere.* 2020;
 54. Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest.* 1997;
 55. Collette T, Maheux R, Mailloux J, Akoum A. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2006;
 56. Kim SH, Cho SH, Ihm HJ, Oh YS, Heo SH, Chun S, et al. Possible role of phthalate in the pathogenesis of endometriosis: In vitro, animal, and human data. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(12):E1502–11.
 57. Kim SH, Chun S, Jang JY, Chae HD, Kim CH, Kang BM. Increased plasma levels of phthalate esters in women with advanced-stage endometriosis: A prospective case-control study. *Fertil Steril [Internet].* 2011;95(1):357–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1059>
 58. Upson K, Sathyanarayana S, De Roos AJ, Thompson M Lou, Scholes D, Dills R, et al. Phthalates and risk of endometriosis. *Environ Res [Internet].* 2013;126:91–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2013.07.003>
 59. Cai W, Yang J, Liu Y, Bi Y, Wang H. Association between phthalate metabolites and risk of endometriosis: A meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(19).
 60. Kolatorova-Sosvorova L, Vitku J, Vavrous A, Hampl R, Adamcova K, Simkova M, et al. Phthalate metabolites in maternal and cord plasma and their relations to other selected endocrine disruptors and steroids. *Physiol Res.* 2018;67:S473–87.
 61. Pocar P, Fiandanese N, Secchi C, Berrini A, Fischer B, Schmidt JS, et al. Exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in Utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. *Endocrinology.* 2012;

62. Gluckman PD, Buklijas T, Hanson MA. The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Concept: Past, Present, and Future. In: *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease*. 2015.
63. Grindler NM, Vanderlinden L, Karthikraj R, Kannan K, Teal S, Polotsky AJ, et al. Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting Chemical, Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24505-w>
64. Ferguson KK, Rosen EM, Rosario Z, Feric Z, Calafat AM, McElrath TF, et al. Environmental phthalate exposure and preterm birth in the PROTECT birth cohort. *Environ Int* [Internet]. 2019;132(August):105099. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105099>
65. J. B, J. Z, M.T. A, K.K. F, L.E. J, T.F. M, et al. Associations between mixtures of urinary phthalate metabolites with gestational age at delivery: A time to event analysis using summative phthalate risk scores. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* [Internet]. 2018;17(1):1–13. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&iid=L622632130%0Ahttp://dx.doi.org/10.1186/s12940-018-0400-3>
66. Ferguson KK, McElrath TF, Meeker JD. Environmental phthalate exposure and preterm birth. *JAMA Pediatr*. 2014;168(1):61–7.
67. Yaghjian L, Ghita GL, Dumont-Driscoll M, Yost RA, Chang SH. Maternal exposure to di-2-ethylhexylphthalate and adverse delivery outcomes: A systematic review. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2016;65:76–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.07.002>
68. Ferguson KK, Chen YH, Vanderweele TJ, McElrath TF, Meeker JD, Mukherjee B. Mediation of the relationship between maternal phthalate exposure and preterm birth by oxidative stress with repeated measurements across pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2017;125(3):488–94.
69. Ferguson KK, McElrath TF, Chen YH, Mukherjee B, Meeker JD. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in pregnant women: A repeated measures analysis. *Environ Health Perspect*. 2015;123(3):217–22.
70. Kadhel P, Monnier P, Boucoiran I, Chaillet N, Fraser WD. Organochlorine pollutants and female fertility: A systematic review focusing on in vitro fertilization studies. *Reproductive Sciences*. 2012.
71. Al-Saleh I, Coskun S, Al-Doush I, Abduljabbar M, Al-Rouqi R, Al-Rajudi T, et al. Couples exposure to phthalates and its influence on in vitro fertilization outcomes.

- Chemosphere. 2019;226:597–606.
72. Foster PMD, Gray E, Leffers H, Skakkebaek NE. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. In: International Journal of Andrology. 2006.
 73. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. Hum Reprod. 2001;
 74. Zarean M, Keikha M, Feizi A, Kazemitabae M, Kelishadi R. The role of exposure to phthalates in variations of anogenital distance: A systematic review and meta-analysis. Environ Pollut [Internet]. 2019;247:172–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.026>
 75. Curi TZ, Neubert da Silva G, Passoni MT, Lima Tolouei SE, Meldola H, Romano RM, et al. In Utero and Lactational Exposure to Diisopentyl Phthalate Induces Fetal Toxicity and Antiandrogenic Effects in Rats. Toxicol Sci. 2019;171(2):347–58.
 76. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Environ Health Perspect. 2005;
 77. Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RHN, et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. Hum Reprod. 2015;
 78. Sunman B, Yurdakök K, Kocer-Gumusel B, Özyüncü Ö, Akbıyık F, Balcı A, et al. Prenatal bisphenol a and phthalate exposure are risk factors for male reproductive system development and cord blood sex hormone levels. Reprod Toxicol. 2019;87(July 2018):146–55.
 79. Hutson JM, Southwell BR, Li R, Lie G, Ismail K, Harisis G, et al. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism. Endocr Rev. 2013;34(5):725–52.
 80. Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, et al. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. Toxicol Lett. 2004;
 81. Howdeshell KL, Rider C V., Wilson VS, Gray LE. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. Environ Res. 2008;

82. Wang Y, Ni C, Li X, Lin Z, Zhu Q, Li L, et al. Phthalate-induced fetal leydig cell dysfunction mediates male reproductive tract anomalies. *Front Pharmacol.* 2019;10(November):1–11.
83. Wagner-Mahler K, Kurzenne JY, Delattre I, Bérard E, Mas JC, Bornebush L, et al. Prospective study on the prevalence and associated risk factors of cryptorchidism in 6246 newborn boys from Nice area, France. *Int J Androl.* 2011;34(5 PART 2):499–510.
84. Kay VR, Bloom MS, Foster WG. Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in males. *Crit Rev Toxicol.* 2014;44(6):467–98.
85. Jensen MS, Anand-Ivell R, Nørgaard-Pedersen B, Jönsson BAG, Bonde JP, Hougaard DM, et al. Amniotic fluid phthalate levels and male fetal gonad function. *Epidemiology.* 2015;
86. Priskorn L, Bang AK, Nordkap L, Krause M, Mendiola J, Jensen TK, et al. Anogenital distance is associated with semen quality but not reproductive hormones in 1106 young men from the general population. *Hum Reprod.* 2019;34(1):12–24.
87. Caporossi L, Alteri A, Campo G, Paci E, Tranfo G, Capanna S, et al. Cross Sectional Study on Exposure to BPA and Phthalates and Semen Parameters in Men Attending a Fertility Center. *Int J Environ Res Public Health [Internet].* 2020;17(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31940982>
88. Mínguez-Alarcón L, Williams P, Chiu Y-H, Gaskins A, Nassan FL, Dadd R, et al. Secular trends in semen parameters among men attending a fertility center between 2000 and 2017: Identifying potential predictors. *Environment International.* 2018.
89. Thurston SW, Mendiola J, Bellamy AR, Levine H, Wang C, Sparks A, et al. Phthalate exposure and semen quality in fertile US men. *Andrology.* 2016;4(4):632–8.
90. Harchegani AB, Rahmani H, Tahmasbpour E, Shahriary A. Hyperviscous Semen Causes Poor Sperm Quality and Male Infertility through Induction of Oxidative Stress. *Curr Urol.* 2019;13(1):1–6.
91. Al-Saleh I, Coskun S, Al-Doush I, Al-Rajudi T, Abduljabbar M, Al-Rouqi R, et al. The relationships between urinary phthalate metabolites, reproductive hormones and semen parameters in men attending in vitro fertilization clinic. *Sci Total Environ [Internet].* 2019;658:982–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.261>

92. Wang YX, Zeng Q, Sun Y, You L, Wang P, Li M, et al. Phthalate exposure in association with serum hormone levels, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis: A cross-sectional study in China. *Environ Res.* 2016;
93. Chang WH, Wu MH, Pan HA, Guo PL, Lee CC. Semen quality and insulin-like factor 3: Associations with urinary and seminal levels of phthalate metabolites in adult males. *Chemosphere* [Internet]. 2017;173:594–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.056>
94. Ivell R, Heng K, Anand-Ivell R. Insulin-like factor 3 and the HPG axis in the male. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5(JAN):1–8.
95. Mondal S, Ghosh S, Bhattacharya S, Mukherjee S. Chronic dietary administration of lower levels of diethyl phthalate induces murine testicular germ cell inflammation and sperm pathologies: Involvement of oxidative stress. *Chemosphere* [Internet]. 2019;229:443–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.017>
96. Tang X, Wu S, Shen L, Wei Y, Cao X, Wang Y, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular toxicity through Nrf2-mediated Notch1 signaling pathway in Sprague–Dawley rats. *Environ Toxicol.* 2018;33(7):720–8.
97. Alur S, Wang H, Hoeger K, Swan SH, Sathyanarayana S, Redmon BJ, et al. Urinary phthalate metabolite concentrations in relation to history of infertility and use of assisted reproductive technology. *Fertil Steril* [Internet]. 2015;104(5):1227–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1150>