



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

RACHEL BRAZ ARCANJO

EFEITOS DO NONILFENOL NA REPRODUÇÃO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGO

BRASÍLIA – DF

2014

RACHEL BRAZ ARCANJO

EFEITOS DO NONILFENOL NA REPRODUÇÃO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Nair Bão.

BRASÍLIA – DF

2014

RACHEL BRAZ ARCANJO

EFEITOS DO NONILFENOL NA REPRODUÇÃO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão (orientadora)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. César Koppe Grisólia
Universidade de Brasília

Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Carolina Madeira Lucci (suplente)
Universidade de Brasília

Ao Eugênio, Cláudia, Elis e Theo,
por me acolherem em sua casa e em sua
família, durante esses dois anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos guia em todas as realizações.

À professora Sônia Bão, por ter me integrado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela orientação, acompanhamento e incentivo a este trabalho. Pelos dois anos de aprendizado e exemplo.

À professora Maria de Fátima Almeida Santos, pela dedicação e empenho ao trabalho, desde sua elaboração até o produto final.

Aos professores Zulmira Guerrero e César Grisólia, pelo uso de alguns equipamentos de seus laboratórios. À professora Concepta McManus, pelo auxílio na interpretação e execução de algumas análises estatísticas.

À minha família, Estevão, Isabelle e Cecília, por sempre apoiarem meus projetos, mesmo que isso tenha me mantido longe deles. Por todo amor, carinho, dedicação, cuidado e exemplo de toda a vida, que me tornaram quem eu sou hoje.

À Márcia Rocha, Mariana Egas e Ingrid Gracielle, por me ajudarem durante todo o trabalho, desde a criação dos animais até a obtenção das imagens. E também por toda a amizade, que tornaram os dias de trabalho e a vida em Brasília mais alegres.

A todos os colegas de laboratório, Ingrid, Márcia, Mariana, Bruna, Natália Lemos, Cláudio, Rafaela, Nathalia Vasconcelos, Ludmilla, Yasmin, Núbia, Shaiane, Karine, Mayara, João, Edna, Thatiane e Misléia, pelo ótimo ambiente de trabalho em que fui recebida e por terem se tornado também uma família para mim.

Ao Marcos, pelo amor, carinho, amizade e companheirismo nessa estrada que percorremos lado a lado. Por sempre incentivar o meu crescimento profissional e pessoal. Por ser um porto seguro que tornou esse trabalho possível. Por sempre despertar o que há de melhor de mim.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília.

Ao Sabin Laboratório Clínico, pelas análises realizadas.

À CAPES, pela concessão da bolsa, e demais agências de fomento, CNPq, FINATEC, FINEP e FAP-DF, sem as quais a pesquisa neste país não seria possível.

“Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

O 4-nonilfenol (NP) é proveniente da degradação, em meio aquoso, do nonilfenol etoxilato, composto de massiva produção mundial, presente em formulações de tintas, detergente, pesticidas e estabilizantes de plásticos. O NP é considerado um desregulador endócrino, pois é capaz de atuar como mimetizador de estrógeno. O período da vida em que ocorre a exposição aos desreguladores endócrinos é crucial para determinar a extensão dos efeitos, pois organismos em desenvolvimento são mais sensíveis e os danos causados podem ser mais graves. O NP é um poluente mundial, encontrado frequentemente na população humana, em amostras de sangue, gordura corporal, leite materno e fluido folicular. O objetivo deste trabalho foi verificar alterações em diversos parâmetros reprodutivos em fêmeas de camundongos Balb/C tratadas com NP à dosagem de 50 mg/kg de peso corpóreo, durante 21 dias, período em que atingiram a maturidade sexual. Após o tratamento, um grupo de fêmeas passou por duas tentativas de acasalamento, a fim de se analisar o efeito sobre os filhotes. O NP não causou alterações no peso dos animais durante o tratamento, nem no dia da abertura vaginal e na taxa de fecundidade das fêmeas. Os parâmetros de número de filhotes vivos nascidos, peso destes no primeiro dia de vida e proporção de fêmeas da ninhada também não foram alterados pelo NP. O peso relativo dos ovários, útero, fígado, rins e baço, independentemente da idade da fêmea, foram semelhantes para todos os grupos experimentais. A proporção de folículos ovarianos antrais, pré-antrais e degenerados não foi alterada pelo tratamento com NP, assim como não foram observadas alterações morfológicas ou patológicas, inclusive na ultraestrutura. Acredita-se que o NP disponível ou acumulado durante o período de maturação sexual das fêmeas não alcançou níveis que produzissem uma alteração significativa nos parâmetros analisados, alguns dias depois de cessada a exposição.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos, interferente endócrino, alquilfenol, toxicologia reprodutiva, folículo ovariano.

ABSTRACT

4-Nonylphenol (NP) is the product of the aqueous degradation of nonylphenol ethoxylate, a widely used substance present in paints, detergents, pesticides and plastic stabilizers. NP is considered an endocrine disruptor due to its capacity to interact with the endocrine system, mimicking estrogen activity. The period of life in which exposure occurs is crucial for determining the extension of effects of NP on living organisms, since developing organisms are usually more sensitive to endocrine disruptors. NP is a global pollutant, frequently found in human populations in samples of blood, body fat, breast milk and follicular fluid. The objective of this study was to evaluate changes in several reproductive parameters in female Balb/C mice treated with NP at 50 mg/kg body weight during 21 days, period in which they reach sexual maturity. After treatment, a group of animals passed by two chances of mating, for analysis of some effect in littermate. NP had no effect on body mass during treatment, nor did it alter the day of vaginal opening and the fertility index of females. Also the number of liveborn offspring, the weight of pups on the first day of life and the sex-ratio on littermates were not affected by NP. The relative weights of ovaries, uterus, liver, kidneys and spleen, independently of the animal age, were similar between the experimental groups. The proportion of preantral, antral and degenerated ovarian follicles was not modified by treatment with NP, and no morphological or pathological alterations were observed, even in the ultrastructure of follicles. It is suggested that NP available or accumulated during the period of sexual maturation did not reach levels capable of producing significant alterations on the analyzed reproductive parameters.

Key-words: endocrine disrupting chemicals, alkylphenol, reproductive toxicology, ovarian follicle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estruturas químicas das moléculas de 4-nonilfenol e 17 β -estradiol	16
Figura 2 – Peso dos animais antes e durante as três semanas de tratamento	27
Figura 3 – Observação do parâmetro de abertura vaginal, indicando a maturação sexual das fêmeas de camundongos	28
Figura 4 – Curva da abertura vaginal das fêmeas	28
Figura 5 – Taxa de fecundidade das fêmeas prenhes entre 48 e 60 dias de vida	29
Figura 6 – Taxa de fecundidade das fêmeas prenhes entre 84 e 98 dias de vida	29
Figura 7 – Número de filhotes nascidos vivos entre 48 e 60 dias de vida da mãe	30
Figura 8 – Número de filhotes nascidos vivos entre 84 e 98 dias de vida da mãe	31
Figura 9 – Peso dos filhotes no primeiro dia de vida, nascidos entre 48 e 60 dias de vida das mães	31
Figura 10 – Peso dos filhotes no primeiro dia de vida, nascidos entre 84 e 98 dias de vida das mães	32
Figura 11 – Porcentagem de fêmeas entre os filhotes nascidos entre 48 e 60 dias de vida da mãe	32
Figura 12 – Porcentagem de fêmeas entre os filhotes nascidos entre 84 e 98 dias de vida da mãe	33
Figura 13 – Fotografia dos úteros dissecados, ainda ligados aos ovários, das fêmeas nulíparas	35
Figura 14 – Diversos tipos de folículos ovarianos	37
Figura 15 – Porcentagem dos tipos foliculares encontrados nas fêmeas nulíparas submetidas aos quatro tratamentos	38
Figura 16 – Porcentagem dos tipos foliculares encontrados nas fêmeas prenhes após a primeira tentativa, nos diferentes tratamentos	38
Figura 17 – Porcentagem dos tipos foliculares encontrados nas fêmeas prenhes após segunda tentativa, nos diferentes tratamentos	39
Figura 18 – Proporção dos tipos foliculares dos grupos controle em diferentes idades e das fêmeas que não obtiveram prenhez	40
Figura 19 – Microscopia eletrônica de transmissão de folículos ovarianos de animais do grupo veículo e grupo NP	41
Figura 20 – Análise histológica do útero	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação dos hormônios estradiol, FSH e LH para as fêmeas que obtiveram prenhez	34
Tabela 2 – Peso relativo médio dos órgãos das fêmeas nulíparas, em gramas \pm desvio padrão	35
Tabela 3 – Peso relativo médio dos órgãos das fêmeas prenhes com 48 e 60 dias de vida (primeira tentativa), em gramas \pm desvio padrão	36
Tabela 4 – Peso relativo médio dos órgãos das fêmeas prenhes com 84 a 98 dias de vida (segunda tentativa), em gramas \pm desvio padrão	36

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1 Desreguladores endócrinos	11
1.2 Estrógenos	14
1.3 Nonilfenol	15
1.4 Desenvolvimento folicular	17
2. Justificativa	20
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. Materiais e Métodos	22
4.1 Delineamento experimental	22
4.2 Fêmeas nulíparas	22
4.3 Fêmeas prenhes	23
4.4 Eutanásia, coleta de sangue e análises dos níveis hormonais	24
4.5 Análise histológica e ultraestrutural	24
4.6 Análises estatísticas	25
5. Resultados	27
5.1 Peso dos animais durante o tratamento	27
5.2 Maturidade sexual	28
5.3 Taxa de fecundidade	29
5.4 Parâmetros analisados nos filhotes	30
5.5 Níveis hormonais das fêmeas	33
5.6 Peso relativo dos órgãos	34
5.7 Folículos ovarianos: morfologia	36
5.8 Histologia do útero	42
6. Discussão	44
7. Conclusão e Perspectivas	50
Referências Bibliográficas	51
Anexo A – Protocolo de processamento histológico	61
Anexo B – Protocolo de coloração Hematoxilina-Eosina	62
Anexo C – Protocolo de processamento do ovário para microscopia eletrônica de transmissão	63

1. Introdução

1.1 Desreguladores endócrinos

A partir da Revolução Industrial, disseminada pelo mundo no século XIX, o homem vem criando e produzindo em larga escala substâncias que são liberadas no meio ambiente (Petro *et al.*, 2012a). Essa produção se intensificou após a Segunda Guerra Mundial, quando novas técnicas possibilitaram uma expansão significativa da indústria química, com o desenvolvimento de novas moléculas. Um exemplo dessa magnitude foi a produção de 205 bilhões de quilogramas de substâncias sintéticas nos Estados Unidos, em 1992 (Colborn *et al.*, 2002). Dessa forma, os organismos vivos atualmente estão expostos a uma maior concentração e variedade de compostos. Essas substâncias podem ser detectadas no ar (Onofrio *et al.*, 2011), no solo (Covaci *et al.*, 2002), na água de rios e oceanos (Josefsson *et al.*, 2011) e em tecidos animais (Ying *et al.*, 2002; Jaspers *et al.*, 2006), incluindo humanos (Covaci *et al.*, 2008).

A maioria desses compostos não foi investigada profundamente quanto aos seus efeitos nos seres vivos. Os dados toxicológicos disponíveis para muitos compostos químicos comercializados são escassos. Por exemplo, dos 3.000 compostos químicos produzidos em grande volume (mais de 453.592,37 kg/ano), apenas 7% passaram por um conjunto de seis testes toxicológicos básicos e 43% desses compostos não passaram por nenhum deles (Rudel & Perovich, 2009). Como resultado dos poucos requisitos para a regulamentação, ações adversas de muitos compostos são descobertas somente após sua liberação no mercado e ampla utilização pelos consumidores (Rudel & Perovich, 2009; Knez, 2013).

Algumas dessas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos (DE) (em inglês, *endocrine disrupting chemicals*), pois possuem a capacidade de interferir na síntese, função, armazenamento e/ou metabolismo de hormônios (Petro *et al.*, 2012a). A Agência de Proteção Ambiental dos EUA define desregulador endócrino como “agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais, transportados pelo sangue, presentes no organismo e responsáveis pela homeostase, reprodução e desenvolvimento” (Gore, 2008).

O sistema endócrino tem funções fundamentais nos organismos, atuando, juntamente com o sistema nervoso, na coordenação e comunicação das diversas partes do corpo, garantindo assim a homeostase. Os hormônios regulam desde a pressão sanguínea e a concentração de íons no sangue até o funcionamento do sistema imunológico, incluindo o

crescimento, o desenvolvimento sexual e a consolidação do comportamento e da inteligência (Colborn *et al.*, 2002; Costanzo, 2004).

Algumas pesquisas identificadoras de DE abrangem inclusive produtos considerados inertes, como o plástico (Soto *et al.*, 1991). A pesquisa com essas substâncias ganhou notoriedade desde que Colborn *et al.* (1994) publicaram a primeira revisão sobre esse assunto. Relatos em seres humanos e estudos com animais relacionam diversos DE a inúmeros problemas, tais como, baixa contagem de espermatozoides, infertilidade, deformações nos órgãos genitais, cânceres, desordens neurológicas em crianças e problemas de desenvolvimento e reprodução em animais silvestres (Herbst *et al.*, 1971; McLachlan *et al.*, 1975; Bush *et al.*, 1986; Ness *et al.*, 1993; Wilcox *et al.*, 1995). Essas substâncias podem contribuir para a queda de fertilidade global ou estar interagindo com outros fatores relacionados a esta, como a dieta (Petro *et al.*, 2012a).

Exemplos de substâncias suspeitas ou comprovadas de serem DE são: pesticidas, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), metoxicloro (MXC), vinclozolina e atrazina (Bretveld *et al.*, 2006); bifenilos policlorados (PCBs), tais como dioxinas (Chung & Clemens, 1999; Mandal, 2005); retardantes de chama (Vos *et al.*, 2003); parabenos (Darbre & Harvey, 2008); compostos perfluorados (Jensen & Leffers, 2008); plastificantes, como ftalatos (Lovekamp-Swan & Davis, 2003); bisfenol A (BPA) (Welshons *et al.*, 2006); alquilfenóis, por exemplo, octilfenol e nonilfenol (Nagao *et al.*, 2001); e ainda compostos naturais, como os estrógenos vegetais genistéina e coumesterol (Uzumcu & Zachow, 2007). O uso ou fabricação de alguns desses desreguladores endócrinos, como PCBs (Vorhees, 2001); éteres difenil-polibromados (PBDEs) (Allen *et al.*, 2007); e organoclorados, como DDT (Soto *et al.*, 1994) e metoxicloro (Gupta & Ali, 2008), já foram banidos ou restritos nos Estados Unidos ou União Europeia. Contudo, estes compostos continuam sendo encontrados no ambiente (Soares *et al.*, 2008).

Uma característica preocupante dos DE para os ecossistemas é o fato de muitos desses compostos possuírem meia-vida longa, ou seja, são persistentes no ambiente (Bergeron *et al.*, 1994). A maioria deles também é lipofílica, acumulando-se no tecido adiposo, alcançando as maiores concentrações em animais de topo de cadeia alimentar (Brevini *et al.*, 2005). Em mamíferos, os DE podem ser transmitidos aos embriões em desenvolvimento no útero, pois têm a capacidade de transpor a barreira placentária (Barr *et al.*, 2007). Também podem ser repassados à prole através do aleitamento, já que, nesse período, o tecido adiposo da mãe é metabolizado e os DE ali acumulados são mobilizados para o leite materno, contaminando os neonatos (Vos *et al.*, 2003; Darbre & Harvey, 2008). Como o ambiente pré-

natal tem um papel determinante na fisiologia e comportamento adulto, os DE possuem habilidade de agir não só nos animais expostos, mas em gerações subsequentes (Dumesic *et al.*, 2007; Gore, 2008).

Os DE podem interagir com qualquer hormônio do nosso corpo, inclusive os sexuais. Destes, existem os que possuem potencial estrogênico e androgênico (Colborn *et al.*, 2002). Embora possuam, em geral, um potencial estrogênico menor que os estrógenos naturais, muitas vezes estão mais biodisponíveis no corpo do que os hormônios naturais, pois não possuem afinidade com proteínas de ligação no sangue, as quais se ligam ao estrógeno natural tornando-o indisponível (Déchaud *et al.*, 1999; Nagel *et al.*, 1999). Devido a estes aspectos, os DE podem permanecer ainda por muito tempo no ambiente e na cadeia alimentar, atravessando gerações, apesar dos esforços para limpar os locais contaminados e para evitar o uso de DE conhecidos ou suspeitos (Planas *et al.*, 2002).

Nos vertebrados, o desenvolvimento da capacidade reprodutiva quando adultos depende da correta organização da rede hipotalâmica no cérebro, que é sensível a esteroides no período do desenvolvimento. Sua formação ocorre no fim da vida embrionária e início da pós-natal, em mamíferos (Gore, 2008). Muitos estudos indicam que a exposição perinatal a DE influencia a função reprodutiva neuroendócrina em diferentes níveis (Gore, 2008). Por exemplo, o coumestrol (estrógeno vegetal encontrado em sementes e óleo de girassol e brotos de alfafa) administrado a ratos machos em desenvolvimento reduziu o número de coberturas e de ejaculações, assim como, quando administrado em fêmeas, inibiu o comportamento reprodutivo de lordose (Whitten & Naftolin, 1992; Kouki *et al.*, 2005). Da mesma forma, a ingestão diária de isoflavonas de soja (outro fitoestrógeno) à dosagem de 20 mg/kg de peso corpóreo por coelhos, durante a gestação e mais 33 semanas de vida, diminuiu a massa corpórea, a ingestão de comida e o volume de sêmen (Cardoso & Bão, 2007).

Pak *et al.* (2003) mostraram que a administração de hormônios exógenos, como estradiol e testosterona, a roedores imaturos desregula a progressão da puberdade, sugerindo que a época de exposição é um fator determinante do potencial dos efeitos. Camundongos machos tratados com dietilestilbestrol (DES) tiveram expressão gênica de DNA metiltransferases, enzimas envolvidas na regulação da metilação do DNA, alterada no epidídimo (Sato *et al.*, 2006). Da mesma forma, outros estudos mostraram que a exposição pré-natal a DE causa alterações no padrão de metilação do DNA, resultando em infertilidade masculina, cânceres em órgãos reprodutivos e outras disfunções que são transmitidas para múltiplas gerações da linhagem paterna (Anway *et al.*, 2005; Anway & Skinner, 2006).

Ainda, estudos recentes têm demonstrado efeito de desreguladores endócrinos no circuito neural hipotalâmico, na morfologia do hipotálamo, no fenótipo de células hipotalâmicas e na expressão de receptores de hormônios esteroides (Shibutani *et al.*, 2005; Patisaul *et al.*, 2006, 2007). Crews *et al.* (2007) mostraram que comportamentos reprodutivos, como a preferência de parceiros e a atratividade do indivíduo, podem ser alterados na terceira geração de animais expostos *in utero* a desreguladores endócrinos.

Existem regiões no cérebro relacionadas com o comportamento sexual adulto, como o núcleo periventricular anteroventral (AVPV) e o núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica (SDN-POA), que apresentam dimorfismo sexual, ou seja, são diferentes de acordo com o sexo do indivíduo (Patisaul *et al.*, 2006; Gore, 2008). Essas regiões são diferenciadas pela influência de hormônios endógenos, sendo protegidas da ação dos estrógenos maternos pela α -fetoproteína, e podem ter o seu tamanho manipulado pela castração ou pela administração de hormônios exógenos (Bakker *et al.*, 2006). Essas regiões são mais um alvo dos desreguladores endócrinos. Estes não afetam somente as regiões dimórficas sexualmente, mas também a expressão de receptores hormonais e de neurotransmissores que são expressos nas regiões pré-ópticas hipotalâmicas (Gore, 2008).

1.2 Estrógenos

A classe de hormônios estrógenos, juntamente com os hormônios cortisol, aldosterona, progesterona e testosterona, integra o grupo dos hormônios esteroides, derivados da molécula de colesterol, que é modificada pela hidroxilação ou aromatização no núcleo esteroide. O estradiol, estrógeno mais importante, é produzido pelo ovário das fêmeas, mais precisamente pelas células da granulosa dos folículos ovarianos. As células da teca sintetizam testosterona e esta se difunde para as células da granulosa, que possuem a enzima aromatase, responsável pela conversão de testosterona em 17β -estradiol (Simpson *et al.*, 2000; Costanzo, 2004).

Os estrógenos promovem o crescimento e o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino por meio da regulação da proliferação celular e expressão de alguns genes no trato reprodutor feminino, hipófise e glândulas mamárias. Eles atuam na maturação e na manutenção do útero, das tubas uterinas, da cérvix uterina e da vagina; desenvolvimento das mamas; sensibilização dos receptores de progesterona e LH; desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas; e manutenção da gravidez (Soto *et al.* 1991; Costanzo, 2004).

Os estrógenos agem no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, exercendo *feedback* positivo ou negativo no hipotálamo, controlando a produção e secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) (Costanzo, 2004, Junqueira & Carneiro, 2004). No entanto, para exercer seu papel biológico, os estrógenos devem interagir com seus receptores e, então, modular a expressão de alguns genes. Existem dois receptores de estrógeno (ER) conhecidos: ER α e ER β (Couse & Korach, 1999).

Embora considerado um hormônio tipicamente feminino, a presença de estrógenos nas gônadas masculinas já é conhecida desde que foi relatada por Zondek (1934), em seu trabalho com cavalos. Sabe-se que hormônios femininos são um dos fatores parácrinos ao testículo que podem exercer papéis no processo de espermatogênese, bem como regular o número de células tronco germinativas (Li *et al.*, 1997; Carreau & Levallet, 2000; Simpson *et al.*, 2000). Os estrógenos são necessários para o desenvolvimento da fertilidade masculina, como foi demonstrado em estudos com camundongos modificados que não expressam receptores de estrógeno α (*knock out* ER α), embora camundongos que não expressam receptores de estrógeno β (*knock out* ER β) apresentem desenvolvimento normal das células germinativas e sejam férteis (Couse & Korach, 1999).

Alterações nas taxas de fertilidade na espécie humana relacionados com estrógenos também foram relatadas. Purvis *et al.* (1975) encontraram uma correlação entre a concentração de estradiol no plasma seminal e o número de células germinativas, assim como, Cheng & Boettcher (1981) notaram que o 17 β -estradiol foi capaz de estimular a mobilidade de espermatozoides humanos.

1.3 Nonilfenol

Dentre os compostos que mimetizam estrógeno encontra-se o 4-nonilfenol (NP), cuja estrutura química é representada na Figura 1, em comparação com a molécula de 17 β -estradiol. O NP é produzido pela degradação do nonilfenol etoxilato (NPE) em meio aquoso (Sone *et al.*, 2004). O NPE pertence ao grupo dos alquilfenóis (grupo abrangendo também os octilfenóis etoxilatos), cuja produção anual foi estimada em 154.200 toneladas nos Estados Unidos e 73.500 toneladas na União Europeia (Soares *et al.*, 2008).

NPE é vastamente utilizado na indústria de surfactantes não iônicos, lubrificantes, antioxidantes, detergentes, tintas, inseticidas e herbicidas, além de ser um estabilizador de polímeros plásticos (Oliveira-Filho *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2008). Devido à ausência de tratamento dos resíduos dessas indústrias, ou dos resíduos domésticos, o NPE

atinge os corpos d'água, contaminando-os (Maguire, 1999). Estudos mostram que este poluente é encontrado em esgotos, sedimentos, águas fluviais e na água potável (Tsuda *et al.*, 2000; Berryman *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2005). Os alquilfenóis etoxilatos aumentam sua toxicidade após o processo de degradação ambiental, quando são transformados em 4-n-octilfenol e 4-n-nonilfenol (Knez, 2013). A via de intoxicação humana mais provável é a ingestão, seguida da inalação e da via transdermal (Wilson *et al.*, 2001).

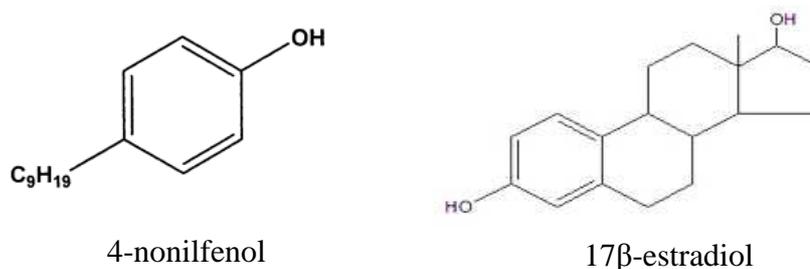


Figura 1: Estruturas químicas das moléculas de 4-n-nonilfenol e 17β-estradiol. Fonte disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/290858?lang=pt®ion=BR> e <http://www.cyberlipid.org/simple/simple0008.htm>

Embora o NP seja de 1.000 a 1.000.000 vezes menos potente que o 17β-estradiol, sua ação estrogênica é descrita para diversos grupos animais, como aves (Razia *et al.*, 2006), peixes (Rivero *et al.*, 2008) e mamíferos (Chapin *et al.*, 1999; Tagaki *et al.*, 2004). Isso se deve ao fato de que as moléculas sinalizadoras de estrógenos são bem conservadas evolutivamente, assim, compostos semelhantes podem agir em diversos táxons (Colborn *et al.*, 2002). Por exemplo, em hepatócitos de truta cultivados, NP estimula a produção de vitelogenina, processo dependente de estrógenos (White *et al.*, 1994). Assim como, NP em uma concentração de apenas 10 μM induz a proliferação celular e a expressão de receptores de progesterona em células de câncer de mama sensíveis a estrógeno, linhagem MCF-7 (Soto *et al.*, 1991).

Um estudo feito na Suécia revelou a presença de 4-n-nonilfenol (NP) em diversos itens alimentares humanos, obtendo um cálculo de consumo diário igual a 0,37 μg/kg de peso corpóreo/dia (Gyllenhammar *et al.*, 2012). A ingestão diária para adultos em Taiwan foi estimada em 31,40 μg/dia (Lu *et al.*, 2007). A ingestão diária de NP também foi calculada para crianças, sendo de 0,01 a 0,08 μg/kg de peso corpóreo para bebês até 12 meses de idade e de 0,04 a 0,05 μg/kg de peso corpóreo para crianças de 1 a 3 anos (Raecker *et al.*, 2011). Gyllenhammar *et al.* (2012) detectaram a presença de NP no sangue de mulheres em período de lactação em 43% das participantes do estudo, enquanto Ademollo *et al.* (2008) detectaram

uma concentração média de NP no leite materno de 32 ng/mL, sendo o alquilfenol mais abundante entre os mensurados. Estudos com tecido adiposo mostram uma concentração média de 57 ng/g de tecido em amostras do sul da Espanha (Lopez-Espinosa *et al.*, 2009) e 122 ng/g de tecido em amostragem feita na Itália (Ferrara *et al.*, 2011). Embora a concentração varie de acordo com a região estudada e os hábitos alimentares da população, o NP mostra-se um poluente mundial, frequente na população humana e presente em diversos tecidos corpóreos.

El-Dakdoky e Helal (2007) calcularam a dose letal para 50% da população (DL₅₀) do NP administrado intraperitonealmente em 170 mg/kg de massa corpórea para camundongos machos adultos. NP foi capaz de reduzir a expressão do gene do receptor de estrógeno, nos tecidos da placenta e fetos de ratas expostas a uma dose de 50 mg/kg de peso corpóreo, quando grávidas, tanto por via oral, quanto intraperitoneal (ter Veld *et al.*, 2009).

Estudos com enfoque na fertilidade do macho mostram que ratos tratados por 50 dias com NP a 250 mg/kg de peso corpóreo por via oral, apresentaram redução na massa relativa do epidídimo, enquanto a massa relativa do rim e do fígado aumentaram. A densidade de espermatozoides na cabeça do epidídimo e o nível de testosterona diminuíram ao mesmo tempo em que o nível de LH e FSH aumentaram. Análises histológicas e ultraestruturais de secções do testículo mostraram células menos compactas e um arranjo irregular das mesmas, assim como uma maior presença de vacúolos e lisossomos nas células dos animais tratados, de forma dose-dependente. Também foi encontrado um maior número de células apoptóticas nos testículos (Han *et al.*, 2004).

Machos tratados com uma dose menor de NP (42,5 mg/kg de peso corpóreo) por via intraperitoneal, por 35 dias, apresentaram também uma redução na massa do epidídimo e do testículo, além de uma diminuição na contagem de espermatozoides e na motilidade dos mesmos. No mesmo estudo, foram identificados também indicativos de estresse oxidativo e redução dos níveis das enzimas antioxidantes glutathione reduzida (GSH) e superóxido redutase (SOD) no testículo (El-Dakdoky & Helal, 2007).

1.4 Desenvolvimento folicular

Os folículos primordiais se formam ainda na vida embrionária. O feto ou neonato já possui sua reserva de folículos que poderão ovular durante toda a vida adulta (Uzumcu & Zachow, 2007). Alguns trabalhos sugerem a existência de células tronco germinativas no

ovário e/ou medula óssea de fêmeas adultas de camundongo, contudo essa descoberta ainda não é amplamente aceita (Johnson *et al.*, 2004, 2005).

A fase de formação dos folículos primordiais é regulada por fatores de crescimento parácrinos e concentrações locais de hormônios esteroides, com pouca participação das gonadotrofinas, FSH e LH, assim como a transição do folículo primordial para o primário, chamada de ativação do folículo (Hunter *et al.*, 2004; Uzumcu & Zachow, 2007). A transição inicia o crescimento de alguns folículos, enquanto outros permanecem dormentes por meses ou anos.

O folículo continua o desenvolvimento, com a proliferação das células da granulosa e da teca e o surgimento da cavidade antral. As células da granulosa e da teca, são importantes na manutenção da viabilidade do folículo, pois são responsáveis pela entrega de nutrientes ao ovócito e também estabelecem uma ligação entre este e o tecido ovariano adjacente (Scaramuzzi *et al.*, 2011). O folículo se torna dependente de FSH e LH para continuação do processo de maturação (Hunter *et al.*, 2004). A partir de então, o crescimento do folículo é controlado, principalmente, pelo hormônio FSH, cuja produção é modulada pela secreção de estradiol e inibina A (Petro *et al.*, 2012a). Durante a maturação final, ainda no interior do folículo, o núcleo e o citoplasma do ovócito passam por mudanças a fim de prepará-lo para a fertilização. O ovócito quiescente em prófase I da primeira divisão meiótica retoma o processo de divisão, após o pico de LH, até a fase de metáfase da segunda divisão meiótica, quando atinge a maturidade (Scaramuzzi *et al.*, 2011).

Para o desenvolvimento de um ovócito competente, há interações entre componentes celulares do folículo, hormônios e fatores de crescimento, que devem estar em harmonia. Dessa forma, o folículo ovariano é considerado um microambiente frágil (Petro *et al.*, 2012b). DE podem comprometer a sobrevivência do ovócito e o crescimento normal do folículo interferindo diretamente no folículo ou indiretamente, agindo no eixo hipotálamo-hipófise (Petro *et al.*, 2012a). Exposições moderadas a DE no ambiente folicular podem diminuir a qualidade do ovócito ou mesmo prejudicar o desenvolvimento do futuro embrião (Petro *et al.*, 2012a).

Estudos identificaram em fluido folicular ovariano humano a presença de DE, como bisfenol A (Ikezuki *et al.*, 2002), diversos congêneres de PCBs, e vestígios de pesticidas, como hexaclorobenzeno e hexaclorociclohexanos, além de um metabólito do DDT (Meeker *et al.*, 2009; Jirsová *et al.*, 2010; Petro *et al.*, 2012b). Outros trabalhos relataram a incapacidade de ovócitos cultivados *in vitro* de atingirem a completa maturação, quando expostos a altas concentrações de DE (Alm *et al.*, 1998; Krogenæs *et al.*, 1998; Pocar *et al.*,

2001a). Outras alterações foram observadas, por exemplo, complexos cumulus-ovócito (COC) de bovinos, quando expostos a Aroclor 1254 (mistura de PCBs comercialmente disponível) durante o processo de maturação *in vitro*, apresentaram o comprimento alterado da cauda poli-A dos RNA mensageiros transcritos dos genes conexina 32, conexina 43, proteína de choque térmico 70, transportador de glicose-tipo1 e placofilina, podendo interferir no mecanismo de regulação temporal da ativação do RNA (Pocar *et al.*, 2001b). Da mesma forma, durante a fertilização, a dispersão dos grânulos corticais foi atrasada, provocando uma falha na reação cortical, resultando em maior grau de poliespermia (Pocar *et al.*, 2001a). Outro estudo com COC expostos a PCB mostrou um menor percentual de maturação dos complexos, quando comparados aos ovócitos isolados (nus), sugerindo um papel importante das células do *cumulus oophorus* na mediação da toxicidade induzida por PCB, durante a maturação dos folículos ovarianos (Pocar *et al.*, 2005).

2. Justificativa

Na natureza, uma série de substâncias produzidas pelo homem podem confundir os receptores celulares dos hormônios no organismo, interferindo nas mensagens bioquímicas naturais. Eles podem mimetizar ou bloquear a atividade dos hormônios naturais, além de serem capazes de alterar a forma como os hormônios e seus receptores proteicos são elaborados e metabolizados (Markey *et al.*, 2003). Essas substâncias químicas, conhecidas como desreguladores endócrinos, podem causar mudanças no padrão reprodutivo, assim como na qualidade da prole, acarretando um desequilíbrio na estrutura das populações e levando a alterações na dinâmica da comunidade e em todo o ambiente, já que muitos animais de reprodução sexuada podem ser atingidos. A população humana também está suscetível aos efeitos destes poluentes. Muitas substâncias mimetizadoras de estrógenos afetam negativamente a saúde humana por meio da água, do alimento, do ar e da contaminação pela pele (Rivero *et al.*, 2008). Essas substâncias, em razão de se degradarem muito lentamente, espalharam-se por todo o planeta tanto pelo ar, como pelas águas e, ao integrar os tecidos vivos, continuarão a existir na natureza por décadas, pois esses compostos biomagnificam, alcançando as maiores concentrações no topo da cadeia alimentar, onde estão seres como os humanos e outros carnívoros (Markey *et al.*, 2003).

Mais estudos precisam ser feitos abordando este tema, englobando quais compostos afetam a função reprodutiva, em que quantidade, qual o mecanismo de ação e como contornar este problema. Este estudo procura entender como uma substância produzida pelo homem pode afetar a fisiologia reprodutiva de mamíferos, utilizando o camundongo como modelo experimental. Dessa forma, objetiva-se também alertar para a modificação do ambiente por meio de interações químicas e auxiliar na prevenção dos efeitos negativos produzidos por estas substâncias na fisiologia e comportamento dos animais, incluindo os seres humanos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo se propôs a avaliar os efeitos do 4-nonilfenol (NP) em parâmetros reprodutivos em fêmeas de camundongos, tratadas antes da puberdade.

3.2 Objetivos Específicos

Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a fertilidade das fêmeas tratadas;
- Analisar morfologicamente os folículos ovarianos;
- Analisar os níveis séricos dos hormônios sexuais nas fêmeas;
- Avaliar o peso relativo dos ovários, útero, fígado, baço e rins;
- Determinar a ocorrência de efeitos nos filhotes.

4. Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, registrado sob o número 98076/2012. P-nonilfenol (technical grade, CAS 84852-15-3) e o estradiol (17 β -estradiol, CAS 50-28-2) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. O óleo de milho foi obtido comercialmente.

Cento e vinte e nove camundongos Balb/C, sendo 97 fêmeas e 32 machos, foram obtidos do Centro de criação de animais de laboratório (Cecal) da Fundação Oswaldo Cruz logo após o desmame (com 21 dias de vida) e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas, com temperatura controlada, água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.1 Delineamento experimental

Aos 25 dias de vida, as fêmeas foram divididas em quatro grupos, de acordo com os tratamentos: (1) controle negativo (animais receberam apenas água), contendo 26 animais; (2) controle do veículo (animais tratados apenas com óleo de milho), contendo 28 animais; (3) animais tratados com NP diluído em óleo de milho (50 mg/kg de peso corpóreo em 0,05 ml de óleo de milho) (Nagao *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2007), contendo 22 animais; (4) controle positivo [tratados com 1 mg/kg de peso corpóreo de 17 β -estradiol (E²)] (ter Veld *et al.*, 2009), contendo 21 animais.

Nesta idade, ainda juvenis, as fêmeas iniciaram os tratamentos, por via oral (com auxílio de uma agulha de gavagem), de acordo com o seu grupo. O tratamento foi administrado aos animais diariamente, durante 21 dias, tempo necessário para que todas atingissem a maturidade sexual (Paiva *et al.*, 2005). As fêmeas foram pesadas semanalmente durante todo o tratamento e observadas, a partir do início do tratamento, para determinação do dia da abertura vaginal, um indicativo da maturação sexual. Após o fim do tratamento, as fêmeas de cada grupo experimental foram separadas em dois subgrupos experimentais, nulíparas e prenhes.

4.2 Fêmeas nulíparas

Um grupo de oito fêmeas de cada tratamento (exceto o grupo veículo que teve n=10) não teve contato com machos. Essas fêmeas foram mantidas em gaiolas coletivas até o

15º dia após o término do tratamento, ou seja, 61º dia de vida (data provável do início da gestação das outras fêmeas), quando foram eutanasiadas. Antes da eutanásia, amostras de sangue dos animais foram coletadas para a medição dos níveis dos hormônios FSH, LH e estradiol. Posteriormente, tiveram fígado, rins, baço, útero e ovários coletados e pesados. O peso relativo de cada órgão, em gramas, foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso do animal}} \times 100$$

Destes animais obtiveram-se os dados dos níveis hormonais e a análise da morfologia e ultraestrutura dos ovários anteriores à prenhez, ou seja, uma análise de como estariam os folículos e os ovócitos que viriam a ser fecundados.

4.3 Fêmeas prenhes

Subgrupos experimentais de cada tratamento foram colocados em coabitação com machos da mesma idade durante 15 dias, para estabelecimento de prenhez. Duas fêmeas do mesmo grupo experimental e um macho foram mantidos na mesma gaiola e receberam água e ração *ad libitum*. Essa disposição dos animais permite o monitoramento da fertilidade do macho. Após esse período, as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais e a ocorrência de prenhez foi observada. Quando confirmada a prenhez, esperou-se o parto natural dos filhotes e os mesmos foram pesados no primeiro dia de vida. Os animais foram mantidos até o 13º dia de vida dos filhotes, quando estes tiveram seu sexo identificado.

As fêmeas que não obtiveram prenhez foram colocadas novamente em gaiolas com machos, respeitando-se a proporção de um macho para duas fêmeas, por mais 15 dias (2ª tentativa de acasalamento). Após esse período, foi observada novamente a ocorrência de prenhez e aguardado o parto natural dos filhotes. O procedimento com os filhotes foi o mesmo descrito anteriormente. Todos os animais foram eutanasiados no 13º dia de vida dos filhotes e as mães tiveram o sangue e os órgãos coletados da mesma forma que o grupo de fêmeas nulíparas. A ninhada foi analisada quanto ao número de filhotes vivos, peso no primeiro dia de vida, proporção de machos e fêmeas e ocorrência de alguma malformação.

A taxa de fecundidade foi calculada pela proporção de fêmeas que obtiveram prenhez em relação ao total de fêmeas que acasalaram. Uma taxa de fecundidade foi calculada para cada tentativa de prenhez, uma vez que os animais estavam com idades diferentes.

4.4 Eutanásia, coleta de sangue e análises dos níveis hormonais

As fêmeas foram anestesiadas com cetamina (80 mg/kg de peso corpóreo por via intraperitoneal) e xilazina (10 mg/kg de peso corpóreo por via intraperitoneal) e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca. Posteriormente, foram eutanasiadas por deslocamento cervical e tiveram ovários, útero, fígado, rins e baço coletados e pesados. Os machos utilizados no experimento e os filhotes nascidos foram eutanasiados com uma superdose de anestesia composta de cetamina e xilazina.

O sangue coletado foi centrifugado em tubos contendo gel separador a 1.150 g durante quatro minutos para obtenção do soro. Em seguida, esse soro foi levado ao Sabin Laboratório Clínico para determinação dos valores plasmáticos dos hormônios FSH, LH e estradiol, por meio do método de quimioluminescência.

4.5 Análise histológica e ultraestrutural

Para a análise histológica, o ovário direito de cada animal foi fixado em paraformaldeído (4%) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), desidratado em uma série de concentrações crescente de álcool etílico, diafanizado com xilol e incluído em parafina, com o auxílio do histotécnico Oma DM-40 (protocolo apresentado no Anexo A). Foram feitos cortes de 5 µm de espessura, de forma seriada a cada 25 µm de profundidade, no micrótomo Leica RM 2235. Os mesmos foram corados com hematoxilina-eosina (protocolo apresentado no Anexo B), para análise dos folículos ovarianos quanto à ocorrência de alterações morfológicas e classificação dos folículos (Silva, 2010). As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópico de luz Axioskop 2 e as imagens obtidas com o programa Zen lite 2011.

Foram observados aproximadamente 200 folículos ovarianos de cada animal, considerando apenas os folículos que apresentavam ovócito e células da granulosa, não necessariamente exibindo o núcleo do ovócito. Esses folículos foram classificados em pré-antrais, antrais e degenerados, sendo considerados degenerados os folículos com ovócitos possuindo citoplasma retraído ou sem contato com as células da granulosa. A média da proporção de cada tipo de folículo foi calculada para cada grupo experimental.

Três animais do grupo controle negativo e seis do grupo tratado com 4-nonilfenol tiveram o útero processado para análise histológica seguindo o protocolo descrito acima. Os cortes de 5 µm de espessura foram obtidos da porção mais próxima do ovário de um dos

cornos uterinos. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas utilizando o microscópio de luz citado anteriormente.

O ovário esquerdo dos animais foi utilizado para estudo da ultraestrutura. Para tal, foi feita a fixação dos órgãos utilizando-se o fixador Karnovsky (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído, 3% de sacarose e 5 mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,3), pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e 5 mM de cloreto de cálcio, contrastação com acetato de uranila a 0,5%, desidratação em um gradiente de concentrações crescente de acetona (30 a 100%) e inclusão em resina Spurr (protocolo apresentado no Anexo C). Finalmente, os órgãos foram seccionados em cortes ultrafinos de 60 nm de espessura com o ultramicrotomo Leica EM UC 7 e analisados ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011 (Magalhães *et al.*, 2009; Silva, 2010). A ultraestrutura dos folículos foi avaliada quanto a aspectos como, características citoplasmáticas do ovócito e das células da granulosa, presença e distribuição de organelas, aspectos da membrana plasmática e do núcleo. As imagens foram obtidas com o programa Gatan Digital Micrograph 1.84.1282.

4.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos de cada tratamento com fêmeas nulíparas foram comparados entre si, os dados de cada tratamento com fêmeas prenhes na primeira tentativa comparados entre si, e aqueles obtidos das fêmeas prenhes na segunda tentativa comparados entre si.

Os dados obtidos de peso dos animais durante o tratamento, número de filhotes nascidos vivos, peso dos filhotes no primeiro dia de vida, proporção de fêmeas da ninhada, peso relativo dos órgãos das fêmeas tratadas e proporção de folículos de cada tipo tiveram as médias de cada grupo calculadas, com desvio padrão. Estes dados foram submetidos ao teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov ou teste de Shapiro-Wilk) para a definição do teste estatístico adequado. Se comprovada a normalidade dos valores, utilizaram-se testes paramétricos, neste caso, análise de variância (ANOVA) e, nas situações em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o pós-teste, teste de Tukey, ambos ao nível de significância de 5%. Quando não foi comprovada a normalidade dos dados, os mesmos foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, juntamente com o pós-teste de Dunn, ambos ao nível de significância de 5%. Essas análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.00.

Os dados relativos a idade em que 50% das fêmeas do grupo experimental já haviam atingido a maturidade sexual, de acordo com o parâmetro de abertura vaginal, foram analisados pelo teste de Mantel-Cox, ao nível de significância de 5%, realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.00.

As taxas de fecundidade nas diferentes tentativas de prenhez para cada grupo experimental foram analisadas usando o procedimento LOGISTICA do programa SAS v.9.3 usando o teste de chi quadrado, ao nível de significância de 5%.

5. Resultados

5.1 Peso dos animais durante o tratamento

A Figura 2 mostra a média do peso dos animais de cada grupo experimental antes e durante as três semanas de tratamento. No primeiro dia de tratamento (dia 1), o peso médio dos animais do grupo controle negativo era de $15,05 \pm 1,30$ g, o do grupo tratado com veículo era $14,48 \pm 1,50$ g, o do grupo 4-nonilfenol era $14,90 \pm 1,45$ g e o do grupo 17β -estradiol era $13,69 \pm 1,71$ g. Após sete dias de tratamento (dia 8), os animais do grupo controle pesavam $17,79 \pm 0,95$ g, os do grupo veículo $17,50 \pm 1,27$ g, os do grupo 4-nonilfenol $18,02 \pm 1,18$ g e os do grupo 17β -estradiol $17,60 \pm 0,82$ g. No 15º dia de tratamento os animais pesavam $18,81 \pm 1,27$ g; $18,38 \pm 1,64$ g; $18,77 \pm 1,49$ g e $18,60 \pm 1,44$ g para os grupos controle, veículo, 4-nonilfenol e 17β -estradiol, respectivamente. Após o término do tratamento (dia 22), os animais do grupo controle pesavam $19,58 \pm 1,21$ g, o grupo veículo $19,23 \pm 1,47$ g, o grupo 4-nonilfenol $19,39 \pm 1,44$ g e o grupo 17β -estradiol $19,09 \pm 1,15$ g. Houve diferença significativa apenas entre os grupos controle e 4-nonilfenol em relação ao grupo tratado com 17β -estradiol no primeiro dia de tratamento, o que reflete que não houve efeito do tratamento no crescimento dos animais.

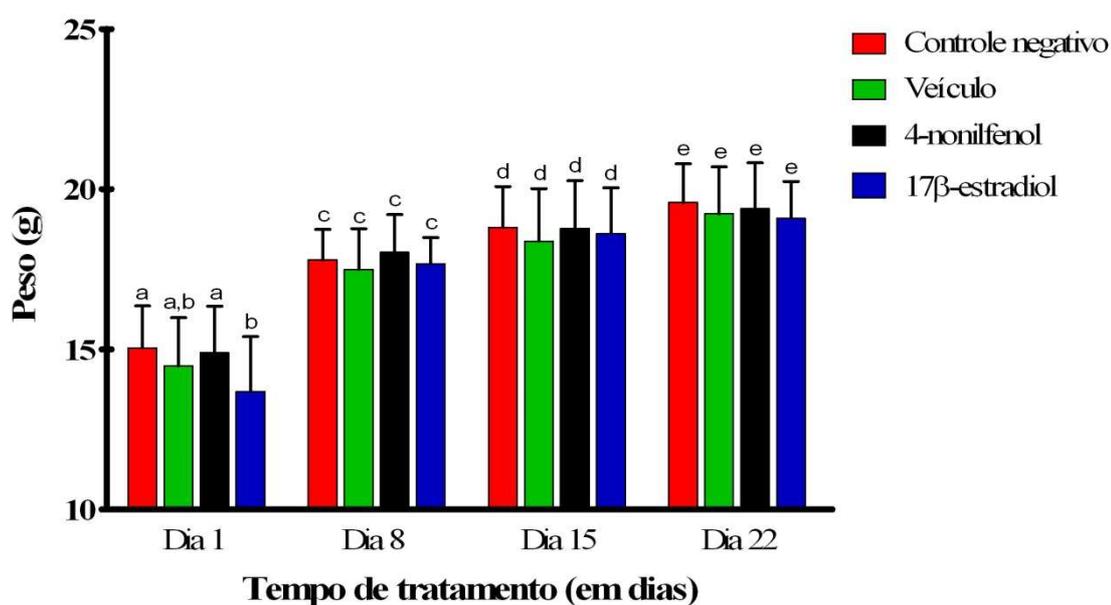


Figura 2: Peso dos animais antes e durante as três semanas de tratamento. Testes de normalidade: Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk. ANOVA com pós-teste de Tukey, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

5.2 Maturidade sexual

A abertura vaginal é uma característica que pode ser utilizada para inferir a maturidade sexual de fêmeas (Figura 3). O tempo de vida em que 50% dos animais do grupo se encontravam maduros foi de 31, 30, 30 e 29 dias de vida, respectivamente, para os grupos controle, veículo, 4-nonilfenol e 17β -estradiol. A curva de abertura vaginal, analisada pelo teste estatístico de Mantel-Cox, não apresentou diferença entre os grupos (Figura 4).



Figura 3: Observação do parâmetro de abertura vaginal, indicando a maturação sexual das fêmeas de camundongos. A foto da esquerda mostra uma fêmea antes da abertura vaginal, enquanto a foto da direita mostra uma fêmea após a abertura, quando se observa a vulva mais protuberante (seta) e o lúmen do canal vaginal.

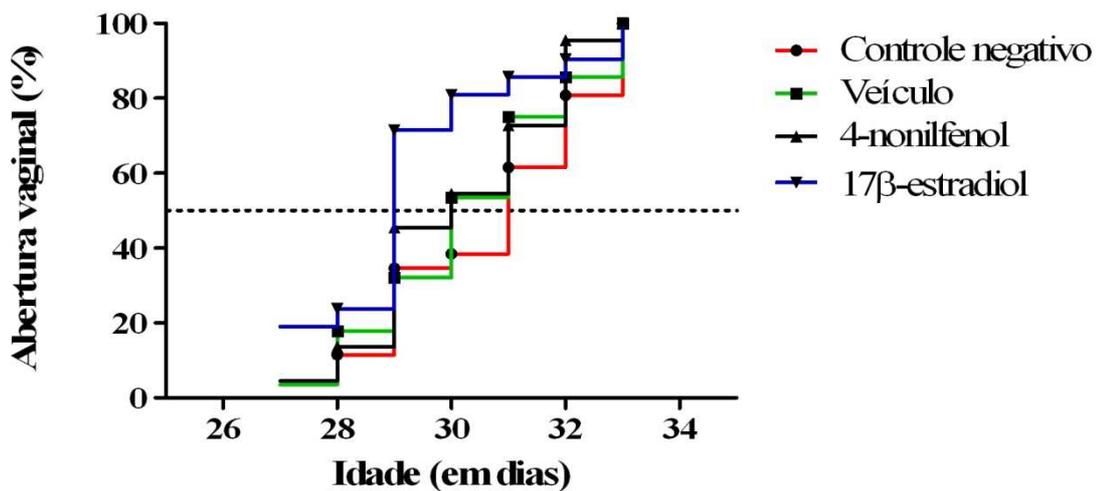


Figura 4: Curva da abertura vaginal das fêmeas. Teste: Mantel-Cox. A linha tracejada indica a ocorrência da abertura vaginal em metade das fêmeas do grupo experimental.

5.3 Taxa de fecundidade

A taxa de fecundidade das fêmeas na primeira tentativa de prenhez foi de 38,9% para o grupo controle, 38,9% para o grupo veículo, 57,1% para o grupo 4-nonilfenol e 61,5% para o grupo 17 β -estradiol. Após a segunda tentativa de prenhez, a taxa de fecundidade das fêmeas foi de 81,8% para o grupo controle, 90,9% para o grupo veículo, 100,0% para o grupo 4-nonilfenol e 40,0% para o grupo 17 β -estradiol. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos para as taxas de fecundidade (Figuras 5 e 6).

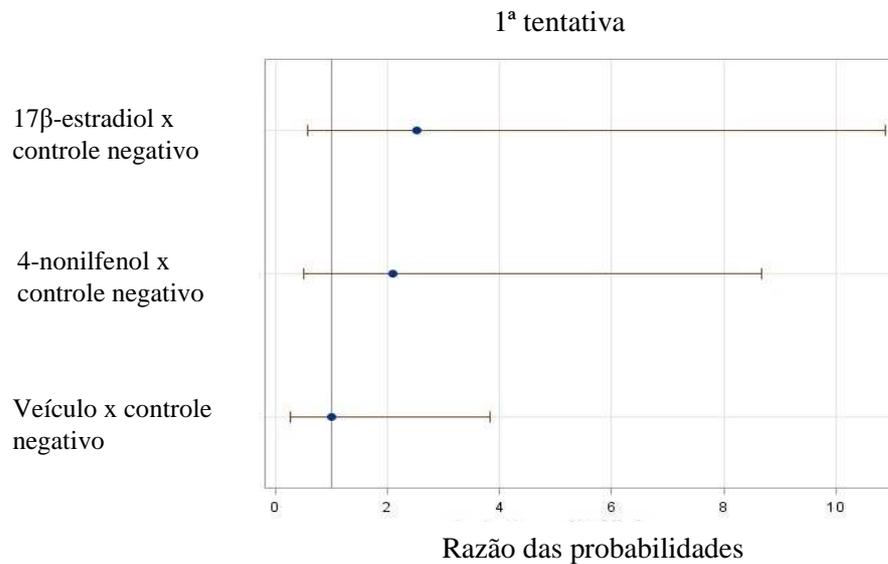


Figura 5: Taxa de fecundidade das fêmeas prenhes entre 48 e 60 dias de vida. O gráfico mostra que probabilidade destas taxas de fecundidade ocorrerem entre os grupos é a mesma.

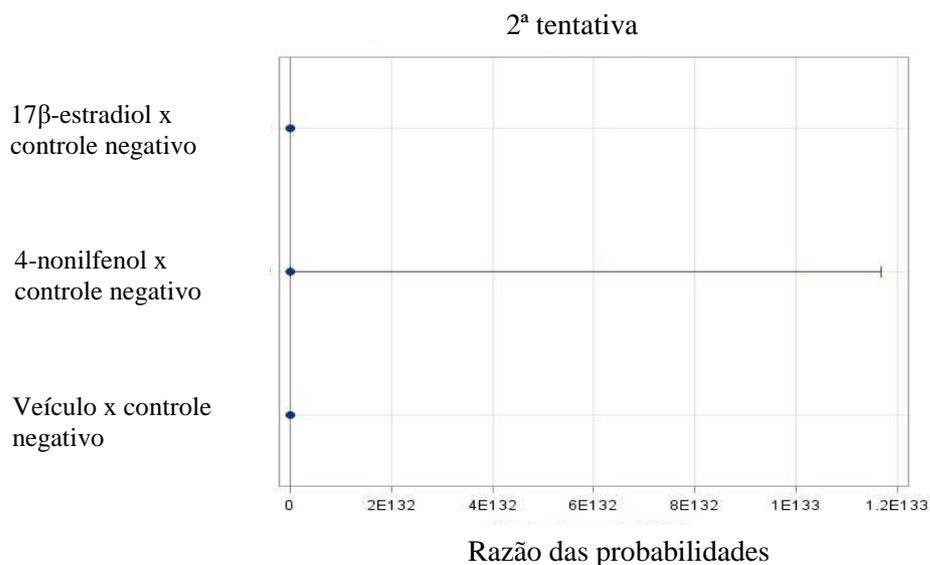


Figura 6: Taxa de fecundidade das fêmeas prenhes entre 84 e 98 dias de vida. O gráfico mostra que probabilidade destas taxas de fecundidade ocorrerem entre os grupos é a mesma.

5.4 Parâmetros analisados nos filhotes

A média do número de filhotes nascidos vivos após a primeira tentativa de prenhez (nascidos entre 48 e 60 dias de vida da mãe) para os grupos controle ($3,29 \pm 1,25$), veículo ($5,14 \pm 1,22$), 4-nonilfenol ($3,88 \pm 1,46$) e 17β -estradiol ($4,86 \pm 1,95$), analisada estatisticamente por ANOVA, não se mostrou significativamente diferente entre os grupos (Figura 7).

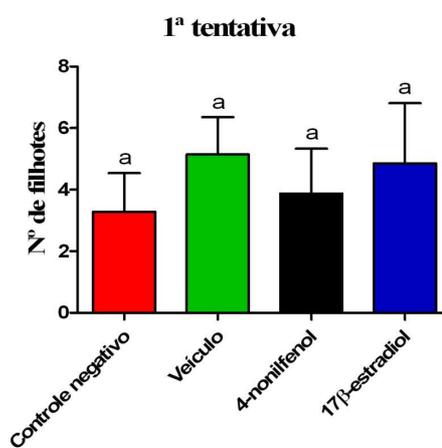


Figura 7: Número de filhotes nascidos vivos entre 48 e 60 dias de vida da mãe. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk. ANOVA com pós-teste de Tukey, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

As médias do número de filhotes nascidos vivos após a segunda tentativa de prenhez (nascidos entre 84 e 98 dias de vida da mãe) também foram analisadas por ANOVA. O grupo controle teve $6,78 \pm 2,44$ filhotes, o grupo veículo teve $7,33 \pm 2,65$, enquanto o grupo 4-nonilfenol teve $8,33 \pm 3,27$ e o grupo 17β -estradiol teve $8,50 \pm 0,71$ filhotes. O número de filhotes provenientes de cada grupo experimental não diferiu (Figura 8).

Os animais nascidos entre 48 e 60 dias de vida da mãe tiveram uma média de peso no primeiro dia de vida de $1,63 \pm 0,24$ g para o grupo controle; $1,55 \pm 0,16$ g para o grupo veículo; $1,56 \pm 0,24$ g para o grupo 4-nonilfenol e $1,52 \pm 0,20$ g para o grupo 17β -estradiol. Estes dados não tiveram uma distribuição normal e, portanto, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para analisar a diferença estatística entre os valores. O peso médio dos filhotes no primeiro dia de vida não sofreu alteração devido ao tratamento aplicado nas mães (Figura 9).

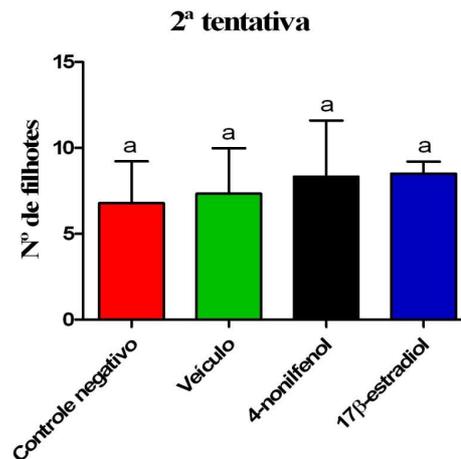


Figura 8: Número de filhotes nascidos vivos entre 84 e 98 dias de vida da mãe. Teste de normalidade: Shapiro-Wilk. ANOVA com pós-teste de Tukey, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

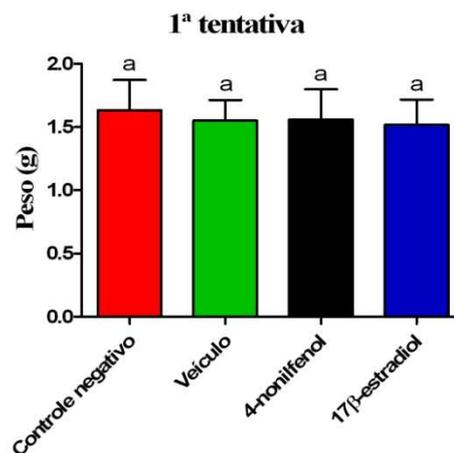


Figura 9: Peso dos filhotes no primeiro dia de vida, nascidos entre 48 e 60 dias de vida das mães. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

Os filhotes nascidos entre 84 e 98 dias de vida da mãe (após a segunda tentativa de prenhez) tiveram a média de peso no primeiro dia de vida de $1,47 \pm 0,21$ g para o grupo controle; $1,46 \pm 0,17$ g para o grupo veículo; $1,39 \pm 0,13$ g para o grupo 4-nonylfenol e $1,55 \pm 0,10$ g para o grupo 17β-estradiol. Estes dados também foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. O peso dos filhotes foi significativamente maior no grupo 17β-estradiol (Figura 10).

A porcentagem de fêmeas entre os filhotes nascidos entre 48 e 60 dias de vida da mãe foi de $54,8 \pm 23,7\%$ no grupo controle, $59,8 \pm 26,4\%$ para o grupo veículo, $51,0 \pm 32,9\%$ para o grupo 4-nonylfenol e $54,0 \pm 27,0\%$ para o grupo 17β-estradiol. Estes dados tiveram

uma distribuição normal e foram analisados por ANOVA, que mostrou que não há diferença significativa entre a porcentagem de fêmeas nascidas nos diferentes grupos (Figura 11).

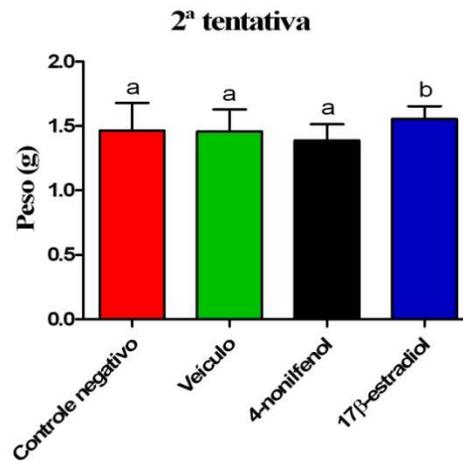


Figura 10: Peso dos filhotes no primeiro dia de vida, nascidos entre 84 e 98 dias de vida das mães. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

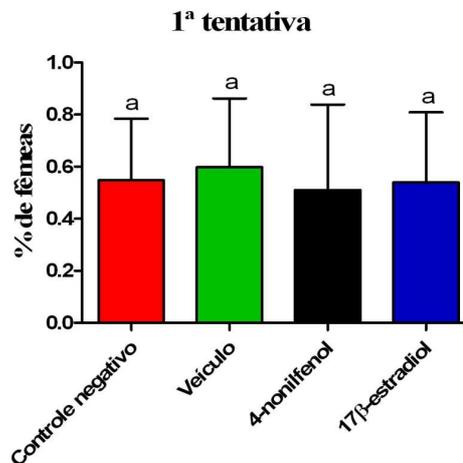


Figura 11: Porcentagem de fêmeas entre os filhotes nascidos entre 48 e 60 dias de vida da mãe. Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

A porcentagem de fêmeas entre os filhotes nascidos entre os dias 84 e 98 dias de vida da mãe foi de $56,2 \pm 22,4\%$ no grupo controle, $52,0 \pm 16,6\%$ no grupo veículo, $55,0 \pm 7,1\%$ no grupo 4-nonilfenol e $58,3 \pm 11,8\%$ no grupo 17β-estradiol. A diferença estatística entre os grupos foi analisada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, que apontou que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 12). Os dados de porcentagem de fêmeas entre os filhotes apontam que não houve ação tardia dos compostos estrogênicos,

aplicados nas fêmeas durante a maturação sexual, sobre o desenvolvimento do sexo dos filhotes.

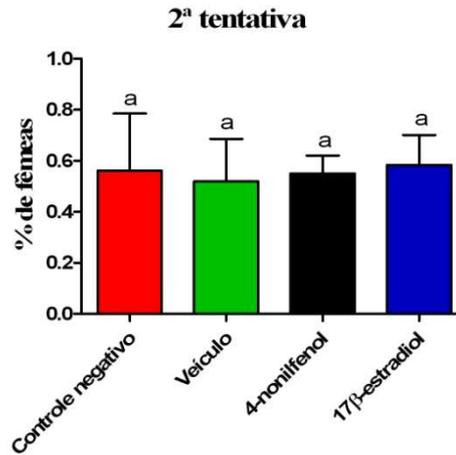


Figura 12: Porcentagem de fêmeas entre os filhotes nascidos entre 84 e 98 dias de vida da mãe. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

5.5 Níveis hormonais das fêmeas

Após a eutanásia das fêmeas nulíparas, foi realizada a quantificação dos hormônios estradiol, FSH e LH pelo Sabin Laboratório Clínico. Quanto ao hormônio estradiol, apenas alguns animais tiveram valores quantificáveis, acima do limite de detecção de 11,80 pg/ml. No grupo controle, quatro resultados foram obtidos e variaram entre 13,89 e 46,10 pg/ml. No grupo veículo, apenas um resultado foi obtido no valor de 27,22 pg/ml. No grupo 4-nonilfenol, seis resultados foram obtidos, variando de 15,17 a 66,70 pg/ml. Já no grupo 17β-estradiol, dois resultados foram obtidos e tiveram valores próximos, 80,31 e 91,57 pg/ml.

Quanto ao hormônio FSH, nenhum animal teve valores detectáveis acima do limite de detecção de 0,30 mIU/ml. O mesmo ocorreu com a quantificação do hormônio LH, em que nenhum animal ultrapassou o limite de detecção de 0,07 mIU/ml. Dessa forma, não foi possível fazer uma relação entre os hormônios sexuais, nem uma inferência sobre o ciclo estral desses animais.

Os mesmos hormônios foram quantificados para as fêmeas que obtiveram prenhez na primeira e na segunda tentativa. O número de animais que tiveram resultados superiores ao limite de detecção e a amplitude dos valores obtidos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Quantificação dos hormônios estradiol, FSH e LH para as fêmeas que obtiveram prenhez.

Grupos	Hormônios					
	Estradiol (pg/ml)		FSH (mIU/ml)		LH (mIU/ml)	
	N	Amplitude	N	Amplitude	N	Amplitude
<i>Prenhez na primeira tentativa</i>						
Controle negativo	5	14,87 – 58,28	2	0,31 – 0,36	2	0,1
Veículo	5	13,80 – 27,07	1	1,06	1	0,1
4-nonilfenol	6	21,94 – 66,86	4	0,32 – 1,00	2	0,1
17 β -estradiol	4	11,90 – 35,98	2	0,51 – 1,31	2	0,1
<i>Prenhez na segunda tentativa</i>						
Controle negativo	3	15,24 – 435,78	4	0,45 – 0,80	3	0,10 – 0,20
Veículo	9	15,54 – 86,36	3	0,62 – 0,82	3	0,10 – 0,20
4-nonilfenol	5	18,82 – 129,16	1	0,30	1	0,10
17 β -estradiol	2	16,07 – 23,03	2	0,30 – 0,48	-	-

N = número de resultados obtidos, acima do limite de detecção.

5.6 Peso relativo dos órgãos

As médias dos pesos relativos dos órgãos das fêmeas nulíparas submetidas a cada tratamento são mostradas na Tabela 2. Os valores que apresentaram distribuição normal foram analisados por ANOVA, enquanto os que não tiveram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Nota-se que o grupo tratado com 17 β -estradiol teve o peso relativo do baço inferior, em relação ao grupo controle. Também se pode observar que o desvio padrão do peso relativo do útero dos animais tratados com 4-nonilfenol foi elevado, inclusive sendo maior que a média do grupo. Este fato, provavelmente deve-se a três animais, de um total de oito, apresentarem o útero visivelmente hipertrofiado em relação aos outros do grupo (Figura 13). Estes três animais tiveram uma média de peso relativo do útero de 2,35 g, enquanto o restante do grupo possui média de 0,45 g.

A Tabela 3 mostra as médias do peso relativo dos órgãos das fêmeas eutanasiadas após a primeira tentativa de reprodução, correspondente a cada tratamento. A análise dos valores se deu da mesma forma que no grupo anterior. Não foi observada diferença entre o peso relativo de nenhum órgão nos diversos tratamentos.

A Tabela 4 traz as médias do peso relativo dos órgãos das fêmeas eutanasiadas após a segunda tentativa de reprodução. A análise dos valores se deu da mesma forma que no grupo anterior. Não houve diferença de peso relativo em nenhum dos órgãos analisados.

Tabela 2: Peso relativo médio dos órgãos das fêmeas nulíparas, em gramas \pm desvio padrão.

	Ovário direito	Ovário esquerdo	Útero	Fígado	Rins	Baço
Controle	0,11 \pm 0,02 ^a	0,15 \pm 0,03 ^a	0,49 \pm 0,20 ^a	5,64 \pm 0,31 ^a	1,42 \pm 0,11 ^a	0,90 \pm 0,08 ^a
negativo						
Veículo	0,12 \pm 0,05 ^a	0,12 \pm 0,03 ^a	0,38 \pm 0,12 ^a	5,58 \pm 0,49 ^a	1,37 \pm 0,10 ^a	0,80 \pm 0,14 ^{ab}
4-nonilfenol	0,15 \pm 0,02 ^a	0,15 \pm 0,05 ^a	1,17 \pm 1,50 ^a	5,41 \pm 0,35 ^a	1,43 \pm 0,14 ^a	0,73 \pm 0,07 ^{ab}
17β-estradiol	0,12 \pm 0,05 ^a	0,12 \pm 0,03 ^a	0,33 \pm 0,13 ^a	5,59 \pm 0,38 ^a	1,41 \pm 0,07 ^a	0,62 \pm 0,25 ^b

Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (útero e rins), $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

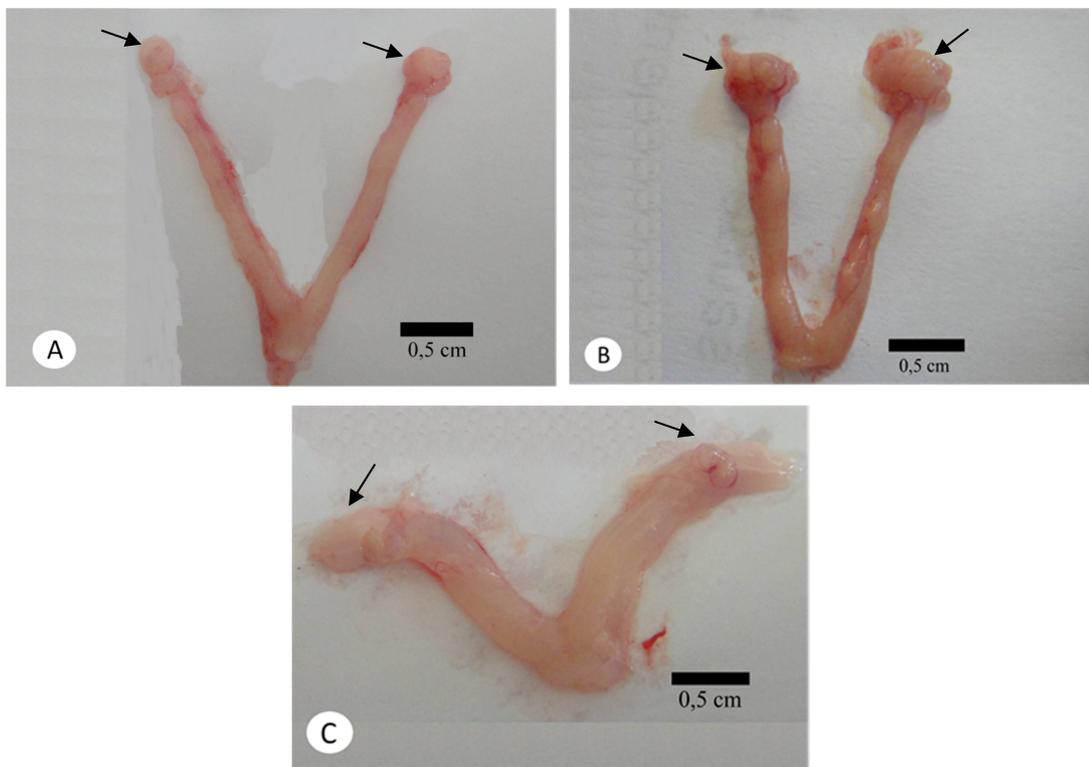


Figura 13: Fotografia dos úteros dissecados, ainda ligados aos ovários (setas), das fêmeas nulíparas. A: Útero e ovários de fêmea do grupo controle. B: exemplo de fêmea do grupo 4-nonilfenol com útero semelhante ao controle. C: fêmea do grupo 4-nonilfenol com útero hipertrofiado.

Tabela 3: Peso relativo médio dos órgãos das fêmeas prenhes com 48 a 60 dias de vida (primeira tentativa), em gramas \pm desvio padrão.

	Ovário direito	Ovário esquerdo	Útero	Fígado	Rins	Baço
Controle negativo	0,04 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,009 ^a	0,32 \pm 0,19 ^a	6,76 \pm 0,55 ^a	1,16 \pm 0,04 ^a	0,46 \pm 0,11 ^a
Veículo	0,05 \pm 0,03 ^a	0,05 \pm 0,02 ^a	0,33 \pm 0,19 ^a	6,54 \pm 0,64 ^a	1,22 \pm 0,10 ^a	0,46 \pm 0,11 ^a
4-nonilfenol	0,05 \pm 0,007 ^a	0,05 \pm 0,02 ^a	0,33 \pm 0,20 ^a	6,64 \pm 0,58 ^a	1,20 \pm 0,06 ^a	0,52 \pm 0,08 ^a
17β-estradiol	0,05 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,11 ^a	0,31 \pm 0,14 ^a	6,54 \pm 0,73 ^a	1,25 \pm 0,05 ^a	0,48 \pm 0,09 ^a

Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (ovário direito, útero e, baço), $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

Tabela 4: Peso relativo médio dos órgãos das fêmeas prenhes com 84 a 98 dias de vida (segunda tentativa) em gramas \pm desvio padrão.

	Ovário direito	Ovário esquerdo	Útero	Fígado	Rins	Baço
Controle negativo	0,04 \pm 0,008 ^a	0,04 \pm 0,009 ^a	0,24 \pm 0,05 ^a	6,98 \pm 0,30 ^a	1,24 \pm 0,12 ^a	0,39 \pm 0,08 ^a
Veículo	0,04 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a	0,23 \pm 0,08 ^a	6,76 \pm 0,47 ^a	1,20 \pm 0,05 ^a	0,41 \pm 0,08 ^a
4-nonilfenol	0,04 \pm 0,007 ^a	0,04 \pm 0,006 ^a	0,24 \pm 0,03 ^a	6,89 \pm 0,44 ^a	1,25 \pm 0,07 ^a	0,50 \pm 0,33 ^a
17β-estradiol	0,04 \pm 0,001 ^a	0,03 \pm 0,004 ^a	0,20 \pm 0,04 ^a	6,45 \pm 0,23 ^a	1,12 \pm 0,03 ^a	0,34 \pm 0,03 ^a

Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (ovário esquerdo, útero, rins e baço), $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

5.7 Folículos ovarianos: morfologia

Folículos pré-antrais, antrais e degenerados foram encontrados em todos os animais analisados, independentemente do grupo experimental e da idade do animal. Exemplos desses folículos são mostrados na Figura 14.

As fêmeas nulíparas tiveram as seguintes porcentagens para cada tipo de folículo: o grupo controle apresentou 59,14 \pm 5,48% dos folículos no estágio pré-antral, 32,10 \pm 4,09% no estágio antral e 8,76 \pm 2,54% degenerados. O grupo tratado com veículo apresentou 63,69 \pm 2,66% dos folículos encontrados no estágio pré-antral, 29,71 \pm 4,58% no estágio antral e 6,60 \pm 2,86% degenerados. No grupo tratado com 4-nonilfenol, 60,88 \pm 3,69% dos folículos estavam no estágio pré-antral, 31,94 \pm 3,31% estavam no estágio antral e 7,19 \pm 2,21% estavam degenerados. Os animais tratados com 17 β -estradiol apresentaram 62,60 \pm 5,19% dos folículos no estágio pré-antral, 30,79 \pm 4,55% deles no estágio antral e 6,61 \pm 1,65% estavam degenerados. As porcentagens de cada tipo folicular foram comparadas entre os tratamentos

pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis, que mostraram que não houve diferença entre os valores obtidos (Figura 15). A porcentagem de folículos pré-antrais, antrais e degenerados encontrados no ovário não foi alterada pelo tratamento.

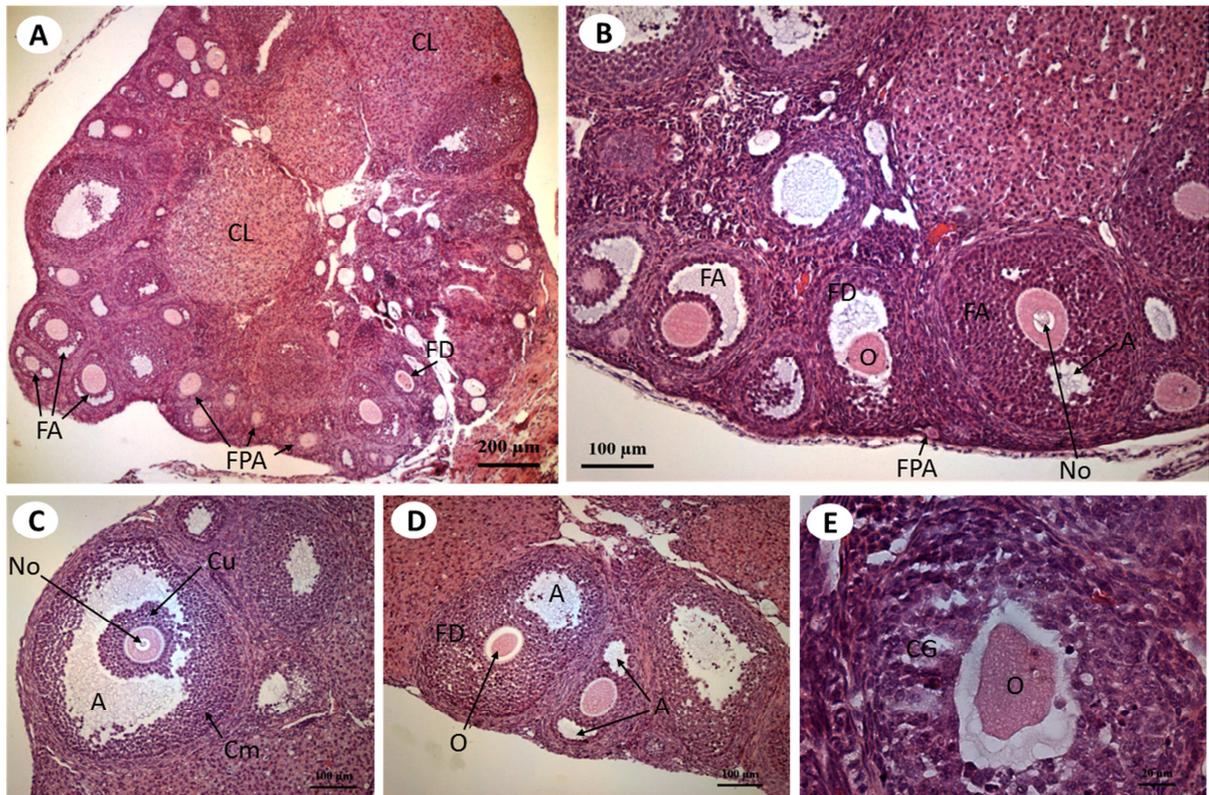


Figura 14: Diversos tipos de folículos ovarianos. A: visão geral do ovário de fêmea tratada com NP prenhe na 1ª tentativa. B: visão geral do ovário de fêmea do grupo controle negativo, prenhe na 1ª tentativa. C: Folículo antral encontrado em fêmea tratada com E² prenhe na 1ª tentativa. D: Folículo degenerado ao lado de um antral no ovário de animal tratado com NP prenhe na 1ª tentativa. E: Detalhe de folículo degenerado, mostrando que o ovócito perdeu o contato com as células da granulosa, encontrado em fêmea tratada com NP prenhe na 2ª tentativa. A: antro; CG: células da granulosa; CL: corpo lúteo; Cm: células murais; Cu: células do cumulus; FA: folículo antral; FD: folículo degenerado; FPA: folículo pré-antral; No: núcleo do ovócito; O: ovócito.

Nas fêmeas que obtiveram prenhez na primeira tentativa a porcentagem de folículos se apresenta da seguinte forma. Os animais controle tiveram $62,50 \pm 8,54\%$ dos folículos no estágio pré-antral, $29,18 \pm 5,72\%$ nos estágio antral e $8,33 \pm 4,94\%$ degenerados. O grupo veículo teve $57,93 \pm 2,12\%$ de folículos classificados como pré-antrais, $32,20 \pm 4,14\%$ deles classificados como antrais e $9,87 \pm 3,38\%$ classificados como degenerados. No grupo tratado com 4-nonilfenol, $55,25 \pm 8,63\%$ dos folículos encontrados estavam no estágio pré-antral, $33,57 \pm 4,82\%$ estavam no estágio antral e $11,18 \pm 5,96\%$ estavam degenerados. O grupo tratado com 17β -estradiol teve $61,67 \pm 8,89\%$ dos folículos no estágio pré-antral, $24,26$

$\pm 5,30\%$ no estágio antral e $14,07 \pm 9,14\%$ degenerados. Os tipos de folículo foram comparados entre os tratamentos recebidos através de ANOVA. Apenas a porcentagem de folículos antrais diferiu entre os grupos 4-nonilfenol e 17β -estradiol, sendo menor no grupo tratado com 17β -estradiol (Figura 16).

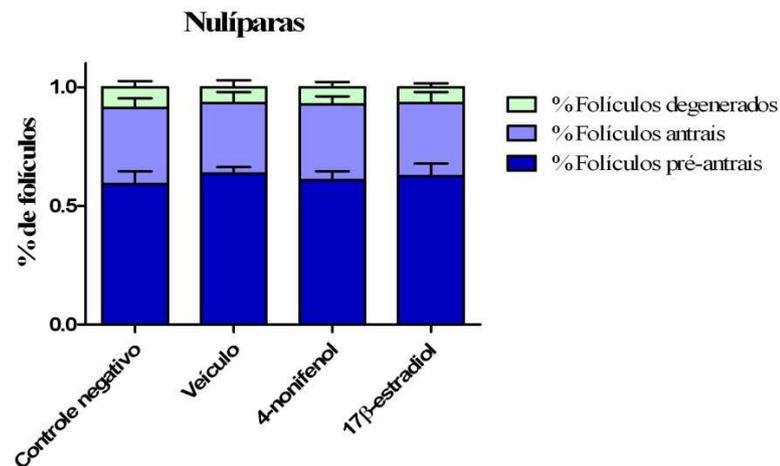


Figura 15: Porcentagem dos tipos foliculares encontrados nas fêmeas nulíparas submetidas aos quatro tratamentos. Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (folículos antrais), $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

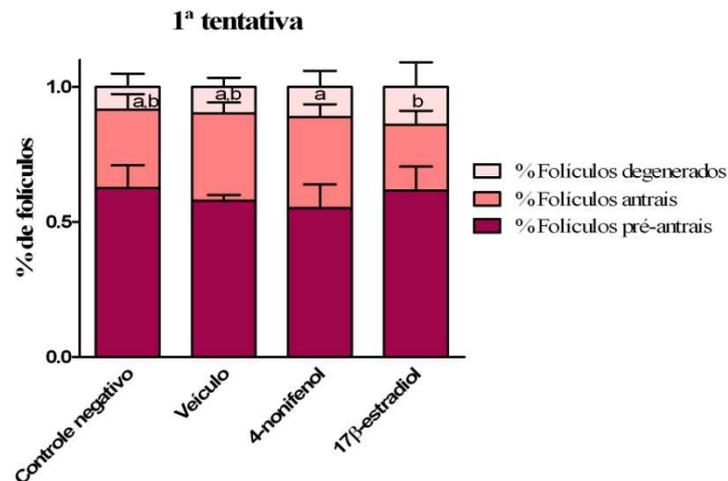


Figura 16: Porcentagem dos tipos foliculares encontrados nas fêmeas prenhes após a primeira tentativa, nos diferentes tratamentos. Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

As fêmeas que obtiverem prenhez apenas na segunda tentativa também tiveram seus folículos ovarianos classificados. No grupo controle, $55,97 \pm 6,66\%$ dos folículos eram

pré-antrais, $33,56 \pm 4,66\%$ dos folículos eram antrais e $10,47 \pm 3,71\%$ dos folículos eram degenerados. No grupo veículo, $57,30 \pm 8,82\%$ dos folículos eram pré-antrais, $29,41 \pm 5,66\%$ eram antrais e $13,29 \pm 4,83\%$ eram degenerados. No grupo 4-nonilfenol, $55,18 \pm 3,00\%$ dos folículos foram classificados como pré-antrais, $33,13 \pm 6,33\%$ como antrais e $11,70 \pm 5,45\%$ como degenerados. O grupo 17β -estradiol teve $62,27 \pm 1,29\%$ dos folículos classificados como pré-antrais, $32,12 \pm 1,02\%$ como antrais e $5,62 \pm 2,31\%$ como degenerados. As diferentes porcentagens para cada tratamento foram analisadas por ANOVA. Não foi constatada diferença em nenhuma proporção dos tipos foliculares de acordo com o tratamento do animal (Figura 17).

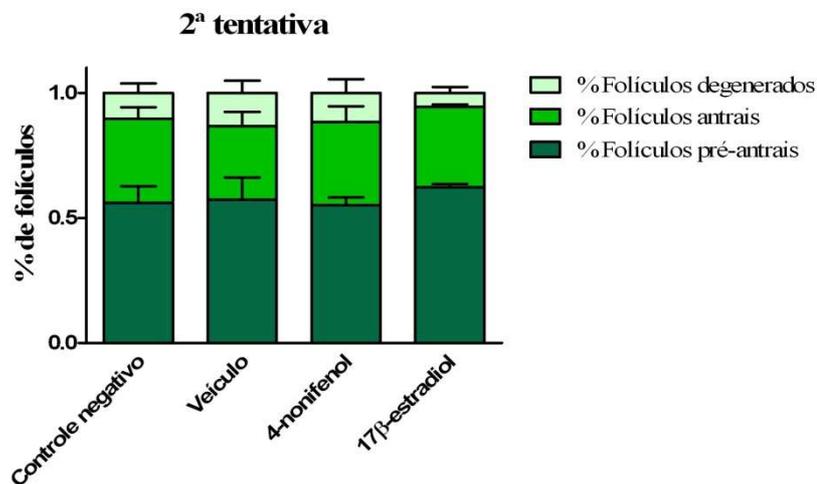


Figura 17: Porcentagem dos tipos foliculares encontrados nas fêmeas prenhes após segunda tentativa, nos diferentes tratamentos. Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey, $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

Seis fêmeas não obtiveram prenhez em nenhuma das tentativas, sendo duas do grupo controle, uma do grupo veículo e três do grupo 17β -estradiol. Estas fêmeas também tiveram seus ovários analisados quanto à proporção de folículos em cada categoria. A média dessas proporções, independentemente do grupo experimental ao qual pertencia a fêmea, foram comparadas com as médias do grupo controle, nas diferentes idades, em busca de uma explicação para a ausência de prenhez (possível esterilidade). Não foi encontrada diferença entre a proporção de folículos pré-antrais, antrais ou degenerados entre o grupo controle e as fêmeas que não tiveram prenhez (Figura 18).

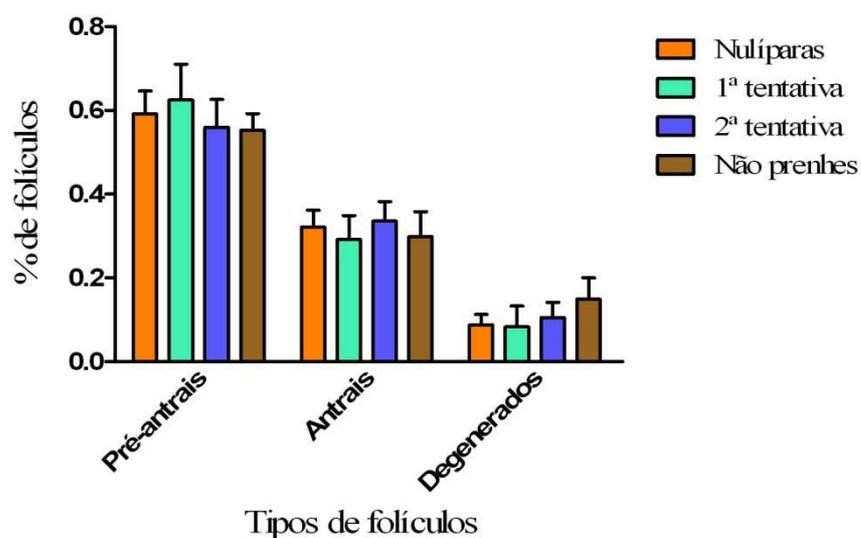


Figura 18: Proporção dos tipos foliculares dos grupos controle em diferentes idades e das fêmeas que não obtiveram prenhez. Teste de normalidade: Kolmogorov-Smirnov. ANOVA com pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (folículos antrais), $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores.

Os ovários de fêmeas nulíparas foram utilizados para análise ultraestrutural dos folículos ovarianos (Figura 19). O grupo veículo foi utilizado como controle para a microscopia eletrônica de transmissão. O folículo pré-antral do grupo veículo apresentou morfologia normal, com ovócito em contato com as células da granulosa. O núcleo do ovócito mostrou-se grande e claro, apresentando regiões de eucromatina e heterocromatina e o envelope nuclear íntegro (Figura 19A). As mitocôndrias apresentaram-se normais, com cristas visíveis, e abundantes (Figura 19B). Por sua vez, as células da granulosa apresentaram-se justapostas e separadas das células do estroma ovariano por uma lâmina basal (Figura 19C).

O folículo pré-antral do grupo tratado com NP apresentou morfologia diferente do grupo tratado apenas com veículo. O ovócito se mostrou normal, com núcleo apresentando região de eucromatina e heterocromatina e envelope nuclear íntegro (Figura 19D). Em relação às mitocôndrias, não foram observadas diferenças quando comparado ao controle (Figura 19E). A maior diferença se percebeu nas células da granulosa, que não se apresentaram justapostas, verificando-se a ocorrência de lacunas entre elas. Estas células continuam separadas das células do estroma ovariano por uma lâmina basal (Figura 19F).

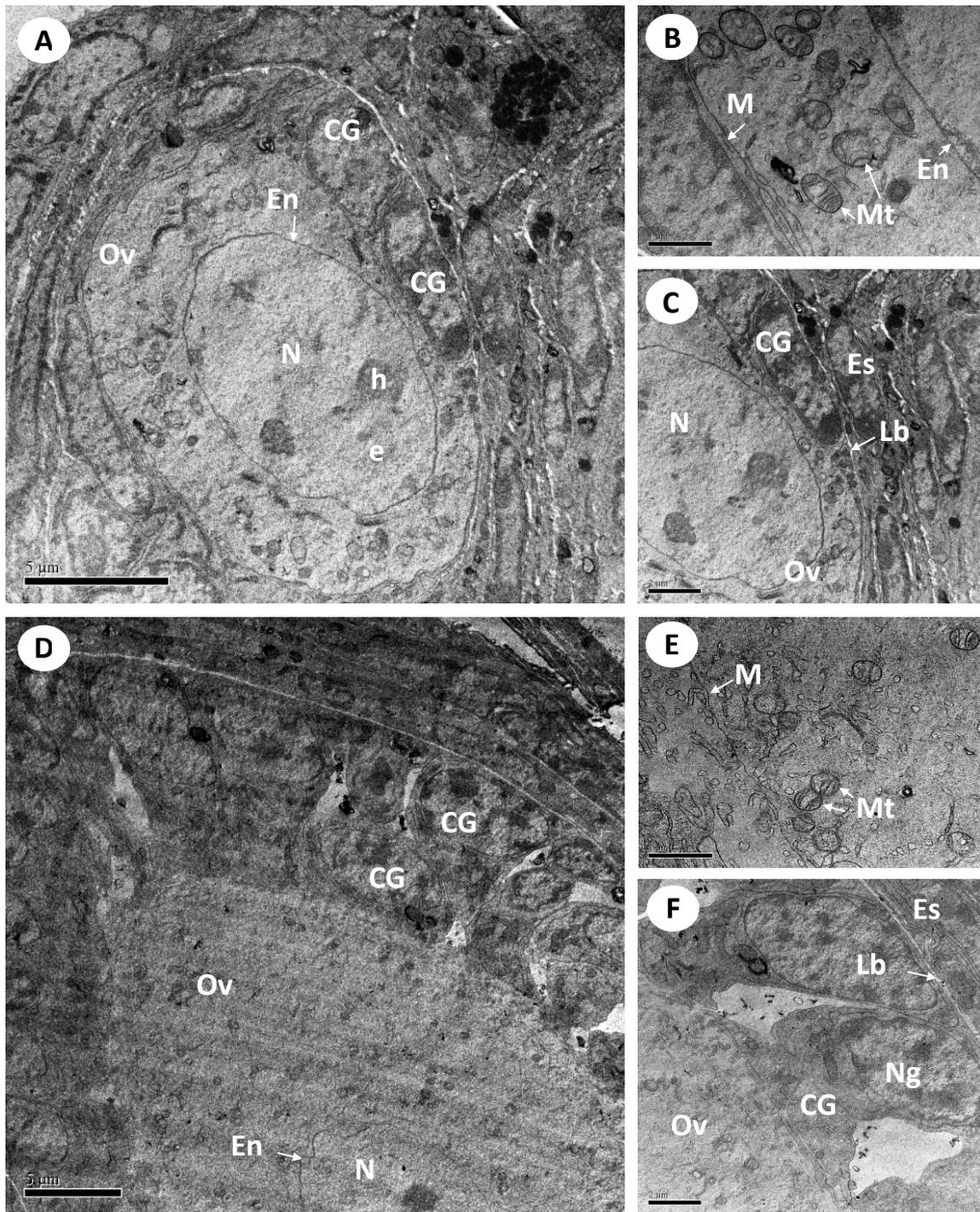


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão de folículos ovarianos de animal do grupo veículo (A, B e C) e grupo NP (D, E e F). A: visão geral do ovócito e células da granulosa. B: detalhe das mitocôndrias. C: detalhe das células da granulosa justapostas. D: visão geral do ovócito e das células da granulosa. E: maior aumento na região contendo mitocôndrias. F: detalhe das células da granulosa apresentando lacunas entre si. CG: células da granulosa; e: eucromatina; En: envelope nuclear; Es: estroma ovariano; h: heterocromatina; Lb: lâmina basal; M: membrana celular; Mt: mitocôndrias; N: núcleo; Ng: núcleo da célula da granulosa; Ov: ovócito.

5.8 Histologia do útero

Após a observação de úteros anatomicamente hipertrofiados, foi realizada a análise histológica dos mesmos, seguindo o mesmo protocolo utilizado para os ovários, para verificação de alguma anomalia (Figura 20). O útero sem alterações (Figura 20A) apresenta um grande lúmen no centro. Este é revestido por um epitélio cilíndrico simples que, juntamente com a camada de tecido conjuntivo que se encontra logo abaixo, forma o endométrio, porção que sofre mais alterações durante o ciclo estral das fêmeas. A camada de tecido conjuntivo contém as glândulas endometriais e é rica em material extracelular, especialmente fibras reticulares. Estas fibras se tornam mais abundantes conforme se distanciam do lúmen, enquanto as células se tornam mais raras. Abaixo do tecido conjuntivo, encontra-se a musculatura. Esta descrição está de acordo com a de Junqueira & Carneiro (2004) e a de Kierszenbaum (2008).

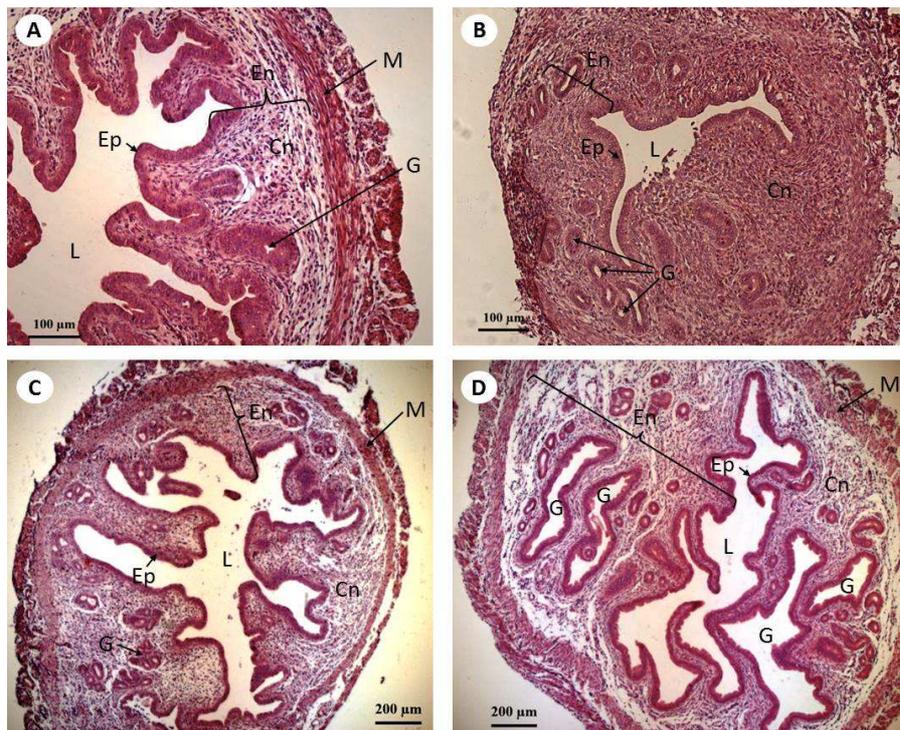


Figura 20: Análise histológica do útero. A: animal do grupo controle apresentando todas as camadas do útero normais. B: animal tratado com NP, cujo útero tinha o peso relativo considerado normal, demonstrando espessamento no endométrio. C e D: animais do grupo tratado com NP, com peso relativo do útero acima da média, se mostraram histologicamente semelhantes ao controle, embora com glândulas de lúmen bem amplo (D). Cn: tecido conjuntivo; En: endométrio; Ep: epitélio; G: glândulas; L: lúmen; M: musculatura.

Uma fêmea tratada com NP, cujo peso relativo do útero foi considerado normal, apresentou alterações morfológicas em relação ao grupo controle. O epitélio se encontrava baixo, a região do endométrio muito espessa e o lúmen do órgão reduzido (Figura 20B). Já os animais que tiveram o peso relativo do útero considerado anormal, não apresentaram alterações histológicas significativas, em relação ao controle (Figura 20C e D). Exceto um animal, que apresentou glândulas com o lúmen maior em relação aos outros, o que pode ter contribuído para o aumento no diâmetro do órgão (Figura 20D).

6. Discussão

O período de vida em que ocorre a exposição aos desreguladores endócrinos é crucial para avaliar a extensão do dano. Os tecidos em desenvolvimento são mais sensíveis à sinalização endócrina, de forma que a desregulação dessa sinalização pode resultar em dano permanente à estrutura ou função do tecido, fazendo com que exposições durante o desenvolvimento (*in utero*, neonatos e imaturos) possam ter consequências mais graves (Markey *et al.*, 2003; Rudel & Perovich, 2009). Considerando esse fator, o presente estudo visou analisar se o NP administrado em fêmeas após o desmame, durante o período de desenvolvimento sexual, induz efeitos prejudiciais à função reprodutiva das mesmas.

Devido à característica lipofílica do NP, à sua capacidade de acúmulo nos tecidos e biomagnificação na cadeia trófica, trabalhou-se com um cenário de exposição superior à encontrada em humanos. Outra razão para utilização deste cenário foi que, para obter uma margem de segurança em humanos, estudos com animais devem sempre extrapolar a dose, a fim de obter uma dose mínima em que o efeito adverso pode ser observado. Dessa forma, a dose de 50 mg/kg de peso corpóreo/dia foi escolhida, visto que esta foi utilizada em diversos trabalhos e tem se mostrado a dose limiar em que se observam os efeitos estrogênicos do NP (Nagao *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2003).

Além disso, a exposição humana não está limitada a apenas um tóxico, mas a uma combinação de desreguladores endócrinos (Knez, 2013). E esta interação, ainda pouco estudada, pode potencializar os efeitos adversos destes compostos químicos, além da simples adição dos efeitos, devido à complexidade da sinalização endócrina (Kortenkamp, 2007). Estes efeitos potencializados precisam ser conhecidos para que possam ser remediados.

O peso dos animais não foi alterado durante o tratamento em relação ao grupo controle negativo e veículo, um indício de que o 4-nonilfenol e o 17 β -estradiol não apresentaram toxicidade geral para as fêmeas, na dose administrada. Embora o grupo 17 β -estradiol tenha iniciado o tratamento com peso menor que os outros grupos, estes animais logo na primeira semana ganharam peso e se mantiveram no padrão considerado normal.

Kim *et al.* (2002) afirmam que o NP altera o ciclo estrogênico em ratas, podendo acarretar em uma maturação sexual precoce. A exposição oral ao NP, contínua por três gerações de ratas, indicou atividade estrogênica, acelerando a abertura vaginal em dois dias para o grupo exposto a 650 ppm de NP (30 – 100 mg/kg de peso corpóreo/dia) e em seis dias para o grupo exposto a 2000 ppm de NP (100 – 350 mg/kg de peso corpóreo/dia) em todas as gerações. No mesmo estudo, o ciclo estral das fêmeas foi desregulado, apenas no grupo

tratado com a maior dose (Chapin *et al.*, 1999). Porém, no presente estudo, não houve diferença significativa entre o dia de abertura vaginal das fêmeas expostas ao NP. Esta divergência entre os estudos, provavelmente, se deve a dose administrada.

O NP não se mostrou um impedimento para o acasalamento e fecundação, visto que a taxa de fecundidade de todos os grupos foi similar. A primeira tentativa de acasalamento teve sucesso menor que a segunda (exceto para o grupo 17 β -estradiol), devido às fêmeas serem mais novas, entre 48 e 60 dias de vida, e estarem no início de sua vida reprodutiva, logo após a puberdade. Enquanto na segunda tentativa, as fêmeas já tinham entre 84 e 98 dias de idade, e assim, estavam plenamente maduras sexualmente (Chorilli *et al.*, 2007).

O NP também não teve influência no número de filhotes vivos nascidos após as duas tentativas de acasalamento, nem no peso registrado no primeiro dia de vida. Nagao *et al.* (2001), em seu estudo com duas gerações de ratos, tratando machos e fêmeas com NP à dosagem de 50 mg/kg de peso corpóreo, não encontrou diferença significativa na taxa de fertilidade e no número de filhotes da geração parental quando comparada ao controle. Da mesma forma, machos tratados com NP a 42,5 mg/kg de peso corpóreo, via intraperitoneal, por 35 dias, quando colocados para acasalar com fêmeas não-tratadas, obtiveram taxa de prenhez, número de implantações, número de fetos vivos, peso dos fetos e ocorrência de anormalidades externas igual ao grupo controle, apesar de observados outros efeitos adversos nos testículos e espermatozoides (El-Dakdoky & Helal, 2007).

A diferenciação sexual em machos, em mamíferos, é desencadeada pela expressão do gene Sry presente no cromossomo Y. O gene Sry induz uma cascata genética que leva a formação de testículos (Hacker *et al.*, 1995). Os testículos, por sua vez, iniciam a produção de hormônios, entre eles o esteroide testosterona e o peptídeo antimulleriano, que são responsáveis pelo crescimento e diferenciação dos ductos de Wolf e atrofia dos ductos de Muller, levando ao desenvolvimento do fenótipo masculino (Costanzo, 2004). Acredita-se que o ovário se desenvolva na ausência do gene Sry e consequente ausência de testosterona e peptídeo antimulleriano (Costanzo, 2004; Majdic & Tobet, 2011).

Embora o sexo genético, determinado pelos cromossomos presentes, seja considerado o fator mais importante para o desenvolvimento das diferenças sexuais, sabe-se que a maior parte delas pode ocorrer devido a diferenças de exposição a hormônios sexuais durante o desenvolvimento (Majdic & Tobet, 2011). Além disso, sabe-se que o ambiente intrauterino e a concentração de hormônios sexuais a que os fetos estão expostos podem modular diferenças sexuais, especialmente o desenvolvimento cerebral e características

comportamentais (vom Saal *et al.*, 1999). Dessa forma, este estudo avaliou se a exposição de fêmeas ao NP, enquanto jovens, seria capaz de alterar o sexo de seus filhotes. Esse efeito não se mostrou presente, já que a proporção de fêmeas entre os filhotes, independente da idade da mãe, foi semelhante entre os grupos. Esse resultado aponta que a dose de 50 mg/kg de peso corpóreo de NP administrado às fêmeas durante 21 dias não foi suficiente para que o NP acumulado no corpo da mãe produzisse efeito nos filhotes.

O NP influenciou o ciclo reprodutivo das espécies, modificando os níveis do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) em ratas (Nagao *et al.*, 2001). No presente trabalho não foi possível detectar essas modificações. No caso das fêmeas nulíparas, nenhuma teve concentração dos hormônios FSH ou LH acima do nível de detecção, o que tornou impossível fazer uma relação entre os três hormônios a fim de inferir o período do ciclo estral em que as fêmeas se encontravam e avaliar alterações nos níveis hormonais produzidas pelo tratamento. Entre as fêmeas com prenhez entre 48 e 60 dias de vida, mais resultados foram obtidos, porém, apenas quatro animais tiveram as medidas de todos os hormônios. Da mesma forma, entre as fêmeas que obtiveram prenhez entre 84 e 98 dias de vida, apenas duas tiveram resultados para todos os hormônios analisados.

A falta de valores de referência destes hormônios, em camundongos, nas diferentes fases do ciclo estral, assim como a impossibilidade de determiná-los através dos animais do grupo controle deste experimento, devido ao baixo número de resultados, foram dificuldades encontradas para análise desses dados. Dessa forma, não foi possível concluir se o NP na dose de 50 mg/kg de peso corpóreo afeta os níveis dos hormônios estradiol, FSH e LH em camundongos fêmeas. Uma forma de possibilitar a análise dos valores seria monitorar o ciclo estral das fêmeas, através do lavado vaginal, e padronizar o dia da coleta de sangue de acordo com o período do ciclo. Como o ciclo estral em camundongos dura, em média, 4 a 5 dias, a oscilação diária nos níveis hormonais pode ser significativa (Chorilli *et al.*, 2007).

O efeito tóxico mais consistente, encontrado em muitos trabalhos com NP, é a mineralização dos rins em ratos machos, embora haja uma diferença das doses em que este efeito foi observado (Green *et al.*, 2003). NP foi capaz de produzir aumento da massa relativa do rim e do fígado e redução na massa do timo em machos da geração parental tratada com 50 mg/kg de massa corpórea de NP (Nagao *et al.*, 2001), enquanto alterações na estrutura e massa do rim de machos também foi observada em doses maiores, de 30 – 350 mg/kg de peso corpóreo/dia (Chapin *et al.*, 1999). Entretanto, no presente trabalho, no qual foram analisados somente os órgãos das fêmeas, não foram encontradas diferenças no peso relativo dos ovários, do útero, do fígado ou dos rins entre os tratamentos, independentemente da idade da fêmea na

eutanásia. Embora Nagao *et al.* (2001) tenham observado uma diminuição no peso do ovário de ratas, administrando a mesma dose, isso pode dever-se a diferença de animal experimental ou ao tempo de exposição.

Apenas nas fêmeas nulíparas houve uma redução no peso relativo do baço no grupo tratado com 17β -estradiol em relação ao grupo controle negativo. Esse efeito pode ser devido à capacidade do estradiol, e de alguns desreguladores endócrinos, de inibir a proliferação de linfócitos isolados do baço (Sakazaki *et al.*, 2002). Esse efeito também foi observado em cachorros tratados com estrógeno (Hart, 1990). Em idades mais avançadas, os animais não apresentaram esse efeito, possivelmente por uma recuperação do órgão depois de finalizada a exposição à droga.

Durante o ciclo ovariano de desenvolvimento folicular, no período de maturação final do folículo, a quantidade de estrógeno circulante aumenta, ativando o mecanismo de *feedback* negativo na hipófise, que diminui a secreção de FSH, hormônio que atua na maturação dos folículos. Dessa forma há uma interrupção no desenvolvimento dos folículos menos maduros (Zelevnik, 2004). Assim, com a administração de estrógeno exógeno, espera-se que o mecanismo de *feedback* seja ativado e haja uma interrupção contínua no desenvolvimento folicular. Conseqüentemente, uma diminuição da proporção de folículos antrais e aumento da proporção de pré-antrais seria esperada (Zelevnik, 1981). Entretanto, o NP não foi capaz de alterar a proporção entre os tipos antrais, pré-antrais e degenerados. Esse efeito só foi observado no grupo tratado com 17β -estradiol nas fêmeas prenhes depois da 1ª tentativa de acasalamento, e não foi muito pronunciado (divergiu apenas do grupo tratado com 4-nonilfenol). Da mesma forma, não foram observadas alterações ou deformações nos folículos ovarianos dos animais de nenhum tratamento, nem no ovócito, nem nas células da granulosa.

Mehranjani *et al.* (2010) concluíram que os filhotes de ratas submetidos ao tratamento, *in utero* e após o nascimento, com 250 mg/kg de peso corpóreo de NP via oral apresentam redução do número de folículos antrais e pré-ovulatórios e um aumento no número de folículos atrésicos. Mais uma vez, a diferença de dose e período de exposição ao tóxico explica a diferença entre os resultados.

Em todos os grupos experimentais, exceto no tratado com NP, ocorreram fêmeas que não obtiveram prenhez em nenhuma das tentativas. A ausência de prenhez não pode ser explicada por alterações no número de folículos, visto que não foi encontrada diferença entre a proporção de folículos pré-antrais, antrais ou degenerados entre o grupo controle e as fêmeas que não tiveram prenhez, independentemente da idade do animal.

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que o veículo utilizado para administração do NP, óleo de milho, não causou alterações na ultraestrutura do folículo ovariano, nem nas células da granulosa, nem no ovócito, que permaneceu com o núcleo intacto e as mitocôndrias com aparência normal. Quanto aos folículos ovarianos do grupo tratado com NP, esses também não apresentaram anomalias. A principal diferença, quando comparado ao grupo tratado com veículo, foi a presença de lacunas entre as células da granulosa. Entretanto, essas lacunas devem-se, provavelmente, ao crescimento, proliferação e reorganização das mesmas (Junqueira & Carneiro, 2004; Kierszenbaum, 2008). Apesar desses espaços entre as células da granulosa, pode-se perceber que elas não perderam o contato com o ovócito.

Os achados histológicos no útero dos animais não confirmam efeitos adversos que possam ter sido causados pelo NP. Ao contrário, os órgãos com pesos relativos discrepantes em relação ao restante do grupo se mostraram histologicamente semelhantes ao útero controle. A única alteração observada foi o aumento das glândulas secretoras na região do endométrio, o que pode ser caracterizado como efeito estrogênico, visto que o estrógeno atua no desenvolvimento e proliferação do endométrio uterino (Junqueira & Carneiro, 2004; Kierszenbaum, 2008). Porém, mais estudos precisam ser feitos para confirmar se este efeito é prejudicial ao animal. O efeito no aumento do peso do útero já foi relatado na dose de 100 e 200 mg/kg de peso corpóreo, em ratas. Este efeito foi comparável ao efeito do DES, um conhecido desregulador endócrino (Kim *et al.*, 2002). Embora no presente estudo não tenham sido observadas anomalias, NP foi capaz de promover focos de metaplasia na mucosa do endométrio e glândulas uterinas, quando administrado durante 14 dias na dose de 40 mg/kg de peso corpóreo em porquinhos-da-Índia (Danzo *et al.*, 2002). A diferença entre os estudos pode ser devida ao animal experimental utilizado, visto que há variações na susceptibilidade das espécies ao composto.

NP é rapidamente absorvido em ratos. Após administração de NP a 10 mg/kg de peso corpóreo em dose única, o pico de sua concentração no sangue ocorre em 30 minutos, em machos, e em 1 hora, em fêmeas. A eliminação da maior parte desse composto ocorre, em média, 48 horas após a aplicação de dose única, seja por via oral ou intravenosa, predominantemente nas fezes (Green *et al.*, 2003). Porém, após uma aplicação de 10 mg/kg de peso corpóreo por via intravenosa, aproximadamente 14% da dose permanece acumulada nas carcaças em machos e 10% em fêmeas, enquanto 0,3% da dose permanece no tecido adiposo decorridos sete dias da aplicação (Green *et al.*, 2003). A meia-vida deste composto

não é alterada pelo aumento da dose (10 ou 100 mg/kg de peso corpóreo), em machos. Entretanto, em fêmeas, a meia-vida para a maior dose é quatro vezes aumentada.

Quando submetidos a um tratamento por 14 dias, a concentração plasmática de NP dobra e a concentração no tecido adiposo aumenta quatro a cinco vezes durante os primeiros sete dias. Depois deste período, elas permanecem constantes, mostrando que os animais atingem um estado de estabilidade após sete dias de tratamento (Green *et al.*, 2003).

Green *et al.* (2003) sugerem que a atividade estrogênica do NP *in vivo* descrita em doses de 50 mg/kg de peso corpóreo ou maiores, é resultado do aumento da biodisponibilidade do NP que ocorre após a saturação metabólica. No presente estudo, acredita-se que o NP disponível ou acumulado durante o período de maturação sexual das fêmeas de camundongo Balb/C, não alcançou níveis que produzissem uma alteração significativa nos parâmetros analisados, dias depois de cessada a exposição.

7. Conclusão e Perspectivas

O desregulador endócrino 4-nonilfenol, na dose de 50 mg/kg de peso corpóreo, administrado em fêmeas de camundongos Balb/C, durante o período de maturação sexual, não produziu alterações nos parâmetros reprodutivos analisados. Acredita-se que o NP disponível ou acumulado no corpo das fêmeas durante o período de maturação sexual (21 dias de tratamento) não foi capaz de alterar os parâmetros reprodutivos quando estas, efetivamente iniciaram sua vida reprodutiva.

As pesquisas com desreguladores endócrinos, particularmente o 4-nonilfenol, ainda são contraditórias. Desse modo, estudos futuros são necessários para melhor avaliar a segurança da exposição a esse composto, explorando novas doses, tempos de exposição, período de vida, e, especialmente, utilizando misturas de compostos químicos, o que representa um cenário mais realista da exposição a que humanos e outros animais estão submetidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMOLLO, N.; FERRARA, F.; DELISE, M.; FABIETTI, F.; FUNARI, E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. **Environment International**. 34: 984–987. 2008.
- ALLEN, J. G.; MCCLEAN, M. D.; STAPLETON, H. M.; NELSON, J. W.; WEBSTER, T. F. Personal Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Residential Indoor Air. **Environmental Science & Technology**. 41(13): 4574-4579. 2007.
- ALM, H.; TORNER, H.; TIEMANN, U.; KANITZ, W. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes *in vitro*. **Reproductive Toxicology**. 12(5): 559–563. 1998.
- ANWAY M. D.; CUPP, A. S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**. 308: 1466-1469. 2005.
- ANWAY, M. D.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. **Endocrinology**. 147(6):S43–S49 (suplemento). 2006.
- BAKKER, J.; DE MEES, C.; DOUHARD, Q.; BALTHAZART, J.; GABANT, P.; SZPIRER, J.; SZPIRER, C. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. **Nature Neuroscience**. 9(2): 220-226. 2006.
- BARR, D. B.; BISHOP, A.; NEEDHAM, L. L. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. **Reproductive Toxicology**. 23: 260–266. 2007.
- BERGERON, J. M.; CREWS, D.; MCLACHLAN, J. A. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. **Environmental Health Perspectives**. 102(9): 780-781. 1994.
- BERRYMAN, D.; HOUDE, F.; DEBLOIS, C.; O'SHEA, M. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. **Chemosphere**. 56: 247–255. 2004.
- BRETVELD, R. W.; THOMAS, C. M. G.; SCHEEPERS, P. T. J.; ZIELHUIS, G. A.; ROELEVELD, N. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? **Reproductive Biology and Endocrinology**. 4:30. 2006.
- BREVINI, T. A. L.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; GANDOFI, F. Effects of endocrine disruptors on the oocytes and embryos of farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**. 40: 291–299. 2005.

- BUSH, B.; BENNETT, A. H.; SNOW, J. T. Polychlorobiphenyl congeners, p,p'-DDE, and sperm function in humans. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 15: 333-341. 1986.
- CARDOSO, J. R.; BÁO, S. N. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. **Animal Reproduction Science**. 97: 237-245. 2007.
- CARREAU, S.; LEVALLET, J. Testicular estrogens and male reproduction. **News in Physiological Science**. 15: 195-198. 2000.
- CHAPIN, R. E.; DELANEY, J.; WANG, Y.; LANNING, L.; DAVIS, B.; COLLINS, B.; MINTZ, N.; WOLFE, G. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. **Toxicological Sciences**. 52: 80-91. 1999.
- CHENG, C. Y.; BOETTCHER, B. Effects of steroids on the *in vitro* forward migration of human spermatozoa. **Contraception**. 24(2): 183-194. 1981.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 28(1): 11-23. 2007.
- CHUNG, Y. W.; CLEMENS, L. G. Effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls on development of female sexual behavior. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 62: 664-670. 1999.
- COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and human. **Environmental Impact Assessment Review**. 14: 469-489. 1994.
- COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O Futuro Roubado**. Porto Alegre: L&PM. 354 p. 2002.
- COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2ª edição. 464 p. 2004.
- COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocrine Reviews**. 20(3): 358-417. 1999.
- COVACI, A.; MANIRAKIZA, P.; SCHEPENS, P. Persistent organochlorine pollutants in soils from Belgium, Italy, Greece, and Romania. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 68: 97-103. 2002.
- COVACI, A.; VOORSPOELS, S.; ROOSENS, L.; JACOBS, W.; BLUST, R.; NEELS, H. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium. **Chemosphere**. 73: 170-175. 2008.
- CREWS, D.; GORE, A. C.; HSU, T. S.; DANGLEBEN, N. L.; SPINETTA, M.; SCHALLERT, T.; ANWAY, M. D.; SKINNER, M. K. Transgenerational epigenetic

imprints on mate preference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 104(14): 5942–5946. 2007.

DANZO B. J.; SHAPPELL, H. W.; BANERJEE, A.; HACHEY, D. L. Effects of nonylphenol, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE), and pentachlorophenol on the adult female guinea pig reproductive tract. **Reproductive Toxicology.** 16: 29 – 43. 2002.

DARBRE, P. D.; HARVEY, P. W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **Journal of Applied Toxicology.** 28: 561–578. 2008.

DÉCHAUD, H.; RAVARD, C.; CLAUSTRAT, F.; PERRIÈRE, A. B.; PUGEAT, M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). **Steroids.** 64: 328 –334. 1999.

DUMESIC, D. A.; ABBOTT, D. H.; PADMANABHAN, V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.** Disord. 8: 127– 141. 2007.

EL-DAKDOKY, M. H.; HELAL, M. A. M. Reproductive toxicity of male mice after exposure to nonylphenol. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** 79: 188–191. 2007.

FERRARA, F.; ADEMOLLO, N.; ORRÙ, M. A.; SILVESTRONI, L.; FUNARI, E. Alkylphenols in adipose tissues of Italian population. **Chemosphere.** 82: 1044–1049. 2011.

GORE, A. C. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology.** 29: 358–374. 2008.

GREEN, T.; SWAIN, C.; VAN MILLER, J. P.; JOINER, R. L. Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat. **Regulatory Toxicology and Pharmacology.** 38: 43–51. 2003.

GUPTA, V. K.; ALI, I. Removal of Endosulfan and Methoxychlor from water on carbon slurry. **Environmental Science & Technology.** 42(3): 766–770. 2008.

GYLLENHAMMAR, I.; GLYNN, A.; DARNERUD, P. O.; LIGNELL, S.; VAN DELFT, R.; AUNE, M. 4-Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. **Environment International.** 43: 21– 28. 2012.

HACKER, A.; CAPEL, B.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. **Development.** 121: 1603-1614. 1995.

HAN, X. D.; TU, Z. G.; GONG, Y.; SHEN, S. N.; WANG, X. Y.; KANG, L. N.; HOU, Y. Y.; CHEN, J. X. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. **Reproductive Toxicology.** 19: 215–221. 2004.

- HART, J. E. Endocrine pathology of estrogens: species differences. **Pharmacology & Therapeutics**. 47: 203-218. 1990.
- HERBST, A. L.; ULFELDER, H. POSKANZER, D. C. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **The New England Journal of Medicine**. 284(16): 878-881. 1971.
- HUNTER, M. G.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**. 82-83: 461-477. 2004.
- IKEZUKI, Y.; TSUTSUMI, O.; TAKAI, Y.; KAMEI, Y.; TAKETANI, Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. **Human Reproduction**. 17(11): 2839-2841. 2002.
- JASPERS, V. L. B.; COVACI, A.; VOORSPOELS, S.; DAUWE, T.; EENS, M.; SCHEPENS, P. Brominated flame retardants and organochlorine pollutants in aquatic and terrestrial predatory birds of Belgium: levels, patterns, tissue distribution and condition factors. **Environmental Pollution**. 139: 340-352. 2006.
- JENSEN, A. A.; LEFFERS, H. Emerging endocrine disrupters: perfluoroalkylated substances. **International Journal of Andrology**. 31: 161-169. 2008.
- JIRSOVÁ, S.; MAŠATA, J.; JECH, L.; ZVÁROVÁ, J. Effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)-ethane (DDT) in follicular fluid on the results of *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) programs. **Fertility and Sterility**. 93(6): 1831-1836. 2010.
- JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**. 428: 145-150. 2004.
- JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.; ADAMS, G. B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K. S.; TILLY, J. C.; CORTES, M. L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D. T.; TILLY, J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**. 122: 303-315. 2005.
- JOSEFSSON, S.; KARLSSON, O. M.; MALMAEUS, J. M.; CORNELISSEN, G.; WIBERG, K. Structure-related distribution of PCDD/Fs, PCBs and HCB in a river-sea system. **Chemosphere**. 83: 85-94. 2011.
- JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Santos, 1983.
- JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 10ª edição. 488 p. 2004.
- KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2ª edição. 677 p. 2008.

- KIM, H. S.; SHIN, J. H.; KANG, I. H.; KIM, T. S.; KIM, I. Y.; SEOK, J. H.; PYO, M. Y.; HAN, S. Y. Comparative estrogenic effects of nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. **Reproductive Toxicology**. 16: 259–268. 2002.
- KIMURA, T.; KIMURA, N.; TOTSUKAWA, K. Effect of compound exposure to bisphenol A and nonylphenol on the development and fertility of fetal mice. **Journal of Mammalian Ova Research**. 24(1): 35-41. 2007.
- KNEZ, J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. **Reproductive BioMedicine Online**. 26: 440–448. 2013.
- KORTENKAMP, A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. **Environmental Health Perspectives**. 115 (supl.1): 98 – 105. 2007.
- KOUKI, T.; OKAMOTO, M.; WADA, S.; KISHITAKE, M.; YAMANOUCHI, K. Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. **Brain Research Bulletin**. 64: 449–454. 2005.
- KROGENÆS, A. K.; NAFSTAD, I.; SKÅRE, J. U.; FARSTAD, W.; HAFNE, A. L. *In vitro* reproductive toxicity of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. **Reproductive Toxicology**. 12(6): 575–580. 1998.
- LI, H.; PAPADOPOULOS, V.; VIDIC, B.; DYM, M.; CULTY, M. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. **Endocrinology**. 138: 1289-1298. 1997.
- LOPEZ-ESPINOSA, M. J.; FREIRE, C.; ARREBOLA, J. P.; NAVEA, N.; TAOUFIKI, J.; FERNANDEZ, M. F., BALLESTEROS, O.; PRADA, R; OLEA, N. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. **Chemosphere**. 76: 847–852. 2009.
- LOVEKAMP-SWAN, T.; DAVIS, B. J. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. **Environmental Health Perspectives**. 111(2): 139-145. 2003.
- LU, Y.; CHEN, M.; SUNG, F.; WANG, P. S.; MAO, I. Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. **Environment International**. 33: 903 – 910. 2007.
- MAGALHÃES, D.M.; ARAÚJO, V.R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SILVA, R.C.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. **Biocell**. 33(2): 91-97. 2009.
- MAGUIRE, R. J. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. **Water Quality Research Journal of Canada**. 34: 37 – 78. 1999.

- MAJDIC, G.; TOBET, S. Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. **Frontiers in Neuroendocrinology**. 32: 137–145. 2011.
- MANDAL, P. K. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. **Journal of Comparative Physiology B**. 175: 221–230. 2005.
- MARKEY, C. M.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M. SONNENSCHNEIN, C. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 83: 235–244. 2003.
- MC LACHLAN, J. A.; NEWBOLD, R. R.; BULLOCK, B. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. **Science**. 190: 991-992. 1975.
- MEEKER, J. D.; MISSMER, S. A.; ALTSHUL, L.; VITONIS, A. F.; RYAN, L.; CRAMER, D. W.; HAUSER, R. Serum and follicular fluid organochlorine concentrations among women undergoing assisted reproduction technologies. **Environmental Health**. 8(32). 2009.
- MEHRANJANI, M. S.; NOORAFSHAN, A.; HAMTA, A.; MOMENI, H. R.; ABNOSI, M. H.; MAHMOODI, M.; ANVARI, M.; HAZAVEH, M. Effects of vitamin E on ovarian tissue of rats following treatment with p-nonylphenol: a stereological study. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**. 8: 1-9. 2010.
- NAGAO, T.; WADA, K.; MARUMO, H.; YOSHIMURA, S.; ONO, H. Reproductive effects of nonilfenol in rats after gavage administration: a two-generation study. **Reproductive Toxicology**. 15: 293–315. 2001.
- NAGEL, S. C.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an *in vitro* assay incorporating modification of cell uptake by serum. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 69: 343-357. 1999.
- NESS, D. K.; SCHANTZ, S. L.; MOSHTAGHIAN, J.; HANSEN, L. G. Effects of perinatal exposure to specific PCB congeners on thyroid hormone concentrations and thyroid histology in the rat. **Toxicology Letters**. 68: 311-323. 1993.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C.; GERALDINO, B. R.; GRISOLIA, C. K.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 75: 1185 – 1190. 2005.
- ONOFRIO, M.; SPATARO, R.; BOTTA, S. The role of a steel plant in north-west Italy to the local air concentrations of PCDD/Fs. **Chemosphere**. 82: 708–717. 2011.
- PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. (orgs.) **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório – Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**. Salvador: Ministério da Saúde, 2005

- PAK, T. R.; LYNCH, G. R.; ZIEGLER, D. M.; LUNDEN, J. B.; TSAI, P. S. Disruption of pubertal onset by exogenous testosterone and estrogen in two species of rodents. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. 284: E206–E212. 2003.
- PATISAUL, H. B.; FORTINO, A. E.; POLSTON, E. K. Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. **Neurotoxicology and Teratology**. 28: 111–118. 2006.
- PATISAUL, H. B.; FORTINO, A. E.; POLSTON, E. K. Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. **NeuroToxicology**. 28: 1–12. 2007.
- PETRO, E. M. L.; LEROYA, J. L. M. R.; VAN CRUCHTENB, S. J. M.; COVACIC, A.; JORSSENA, E. P. A.; BOLS, P. E. J. Endocrine disruptors and female fertility: focus on (bovine) ovarian follicular physiology. **Theriogenology**. 78(9): 1887–1900. 2012a.
- PETRO, E. M. L.; LEROY, J. L. M. R.; COVACI, A.; FRANSEN, E.; NEUBOURG, D.; DIRTU, A. C.; PAUW, I.; BOLS, P. E. J. Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair *in vitro* oocyte developmental competence. **Human Reproduction**. 27(4): 1025-1033. 2012b.
- PLANAS, C.; GUADAYOL, J.M.; DROGUET, M.; ESCALAS, A.; RIVERA, J.; CAIXACH, J. Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. **Water Research**. 36: 982–988. 2002.
- POCAR, P.; PERAZZOLI, F.; LUCIANO, A. M.; GANDOLFI, F. *In vitro* reproductive toxicity of Polychlorinated Biphenyls: effects on oocyte maturation and developmental competence in cattle. **Molecular Reproduction and Development**. 58: 411-416. 2001a.
- POCAR, P.; BREVINI, T. A. L.; PERAZZOLI, F.; CILLO, F.; MODINA, S.; GANDOLFI, F. Cellular and molecular mechanisms mediating the effects of Polychlorinated Biphenyls on oocyte developmental competence in cattle. **Molecular Reproduction and Development**. 60: 535-541. 2001b.
- POCAR, P.; NESTLER, D.; RISCH, M.; FISCHER, B. Apoptosis in bovine cumulus-oocyte complexes after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during *in vitro* maturation. **Reproduction**. 130: 857–868. 2005.
- PURVIS, K.; LNDGREN, M.; CEKAN, Z.; DICZFALUSY, E. Indices of gonadal function in the human male. Seminal plasma levels of steroids in normal and pathological conditions. **Clinical Endocrinology**. 4: 247-248. 1975.
- RAZIA, S.; MAEGAWA, Y.; TAMOTSU, S.; OISHI, T. Histological changes in immune and endocrine organs of quail embryos: Exposure to estrogen and nonylphenol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 65: 364-371. 2006.

- RAECKER, T.; THIELE, B.; BOEHME, R. M.; GUENTHER, K. Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. **Chemosphere**. 82: 1533–1540. 2011.
- RIVERO, C. L. G.; BARBOSA, A. C.; FERREIRA, M. F. N.; DOREA, J. G.; GRISOLIA, C. K. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). **Ecotoxicology**. 17: 732 – 737. 2008.
- RUDEL, R. A.; PEROVICH, L. J. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. **Atmospheric Environment**. 43: 170–181. 2009.
- vom SAAL, F. S.; CLARK, M. M.; GALEF-JR, B. G. DRICKAMER, L. C.; VANDENBERGH, J. G. Intrauterine position phenomenon. **Encyclopedia of reproduction**. 2: 893-900. 1999.
- SAKAZAKI, H.; UENO, H.; NAKAMURO, K. Estrogen receptor α in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. **Toxicology Letters**. 133: 221–229. 2002.
- SATO, K.; FUKATA, H.; KOGO, Y.; OHGANE, J.; SHIOTA, K.; MORI, C. Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters the expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the epididymis of mice. **Endocrine Journal**. 53(3): 331-337. 2006.
- SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**. 23: 444–467. 2011.
- SHAO, B.; HU, J.; YANG, M.; AN, W.; TAO, S. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 48: 467–473. 2005.
- SHIBUTANI, M.; MASUTOMI, N.; UNEYAMA, C.; ABE, N.; TAKAGI, H.; LEE, K. Y.; HIROSE, M. Down-regulation of GAT-1 mRNA expression in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat offspring exposed maternally to ethinylestradiol. **Toxicology**. 208: 35–48. 2005.
- SILVA, R. C. Caracterização morfológica e ultraestrutural e descrição do perfil lipídico de folículos ovarianos de suínos. (Dissertação de mestrado) Universidade de Brasília. 2010.
- SIMPSON, E.; RUBIN, G.; CLYNE, C.; ROBERTSON, C.; O'DONNELL, L.; JONES, M.; DAVIS, S. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. **TEM**. 11(5): 184-188. 2000.
- SONE, K.; HINAGO, M.; KITAYAMA, A.; MOROKUMA, J.; UENO, N.; WATANABE, H.; IGUCHI, T. Effects of 17 β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on

- developing *Xenopus laevis* embryos. **General and Comparative Endocrinology**. 138: 228–236. 2004.
- SOTO, A. M.; JUSTICIA, H.; WRAY, J. W.; SONNENSCHNEIN, C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. **Environmental Health Perspectives**. 92: 167-173. 1991.
- SOTO, A. M.; CHUNG, K. L.; SONNENSCHNEIN, C. The pesticides Endosulfan, Toxaphene, and Dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. **Environmental Health Perspectives**. 102(4): 380-383. 1994.
- SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J. N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**. 34: 1033–1049. 2008.
- TAGAKI, H.; SHIBUTANI, M.; MASUTOMI, N.; UNEYAMA, C.; TAKAHASHI, N.; MITSUMORI, K.; HIROSE, M. Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. **Archives of Toxicology**. 78: 97-105. 2004.
- TSUDA, T.; TAKINO, A.; KOJIMA, M.; HARADA, K.; MURAKI, T.; TSUJI, M. 4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into lake Biwa. **Chemosphere**. 41: 757–762. 2000.
- UZUMCU, M.; ZACHOW, R. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. **Reproductive Toxicology**. 23: 337–352. 2007.
- ter VELD M. G. R.; ZAWADZKA, E.; RIETJENS, I. M. C. M.; MURK, A. J. Estrogenicity of food-associated estrogenic compounds in the fetuses of female transgenic mice upon oral and IP maternal exposure. **Reproductive Toxicology**. 27: 133–139. 2009.
- VORHEES, D.J. Polychlorinated Biphenyls. In: SPENGLER, J. D.; SAMET, J. M.; MCCARTHY, J. F. (Eds.). *Indoor Air Quality Handbook*. New York: McGraw-Hill. 2001.
- VOS J. G.; BECHER, G.; VAN DEN BERG, M.; DE BOER, J.; LEONARDS, P. E. G. Brominated flame retardants and endocrine disruption. **Pure and Applied Chemistry**. 75: 2039–2046. 2003.
- WELSHONS, W. V.; NAGEL, S. C.; VOM SAAL, F. S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol-A at levels of human exposure. **Endocrinology**. 147(6):S56 –S69 (suplemento). 2006.
- WHITE, R.; JOBLING, S.; HOARE, S. A.; SUMPTER, J. P.; PARKER, M. G. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. **Endocrinology**. 135(1): 175-182. 1994.

- WHITTEN, P. L.; NAFTOLIN, F. Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. **Steroids**. 57: 56-61. 1992.
- WILCOX, A. J.; BAIRD, D. D.; WEINBERG, C. R.; HORNSBY, P. P.; HERBST, A. L. Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. **The New England Journal of Medicine**. 332(21): 1411-1416. 1995.
- WILSON, N. K.; CHUANG, J. C.; LYU, C. Levels of persistent organic pollutants in several child day care centers. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**. 11(6): 449-458. 2001.
- YING, G. G.; WILLIAMS, B.; KOOKANA, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. **Environment International**. 28: 215-226. 2002.
- ZELEZNIK, A. J. Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in Rhesus monkeys. **Endocrinology**. 109(2): 352-355. 1981.
- ZELEZNIK, A. J. The physiology of follicle selection. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 2(31). 2004.
- ZONDEK, B. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. **Nature (London)**. 193: 209-210. 1934.

ANEXO A – PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.

Solução	Tempo
Fixador: paraformaldeído a 4% + tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4)	24 horas
Álcool etílico a 70%	No mínimo, 1 hora
Álcool etílico a 80%	1 hora
Álcool etílico a 90%	1 hora
Álcool etílico a 100%	1 hora
Álcool etílico a 100%	1 hora
Álcool etílico a 100%	1 hora
Álcool etílico a 100% e Xilol a 100% (na proporção 1:1 v/v)	1 hora
Xilol a 100%	45 minutos
Xilol a 100%	45 minutos
Parafina histológica	45 minutos
Parafina histológica	45 minutos
Embocamento	

ANEXO B – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.

Solução	Tempo
Xilol a 100%	3 minutos
Xilol a 100%	3 minutos
Álcool etílico a 100% e Xilol a 100% (na proporção 1:1 v/v)	2 minutos
Álcool etílico a 100%	2 minutos
Álcool etílico a 95%	2 minutos
Álcool etílico a 70%	2 minutos
Água destilada	2 minutos
Hematoxilina de Harris	2 minutos
Água destilada	2 minutos
Eosina Y (amarelada)	4 minutos
Água corrente	20 segundos
Água destilada	20 segundos
Álcool etílico a 70%	20 segundos
Álcool etílico a 95%	20 segundos
Álcool etílico a 100%	20 segundos
Xilol a 100%	20 segundos
Xilol a 100%	20 segundos
Montar lamínula com solução de Entellan e Xilol a 100% (na proporção 1:1 v/v)	

Adaptado de: Junqueira & Junqueira, 1983.

**ANEXO C – PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DO OVÁRIO PARA
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.**

Solução	Tempo
Fixador Karnovsky a 0,01 M	Overnight, a 4°C
Lavar duas vezes com tampão cacodilato de sódio a 0,1 M	—
Ferrocianeto de potássio a 0,8% e tetróxido de ósmio a 1% (proporção 1:1 v/v)	1 hora, protegido da luz
Lavar três vezes com água destilada	—
Acetato de uranila a 0,5%	Overnight, protegido da luz, a 4°C
Lavar três vezes com água destilada	—
Acetona a 30%	15 minutos
Acetona a 50%	15 minutos
Acetona a 70%	15 minutos
Acetona a 90%	15 minutos
Acetona a 100%	15 minutos
Acetona a 100%	15 minutos
Acetona a 100% e Resina (proporção de 2:1 v/v)	Overnight
Acetona a 100% e Resina (proporção de 1:1 v/v)	12 horas
Acetona a 100% e Resina (proporção de 1:2 v/v)	Overnight
Resina	7 horas
Polimerização da resina	48 horas, a 37°C