



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANNA FACHETTI FRIGOLI

**EXPOSIÇÃO À BAIXAS DOSES DE MALATION DURANTE A
PERIPUBERDADE CAUSA PREJUÍZOS REPRODUTIVOS EM
RATAS *WISTAR*: REPERCUSSÕES NA FERTILIDADE,
PLACENTAÇÃO E PARÂMETROS FETAIS**

Londrina
2024

GIOVANNA FACHETTI FRIGOLI

**EXPOSIÇÃO À BAIXAS DOSES DE MALATION DURANTE A
PERIPUBERDADE CAUSA PREJUÍZOS REPRODUTIVOS EM
RATAS *WISTAR*: REPERCUSSÕES NA FERTILIDADE,
PLACENTAÇÃO E PARÂMETROS FETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron

Londrina
2024

GIOVANNA FACHETTI FRIGOLI

**EXPOSIÇÃO À BAIXAS DOSES DE MALATION DURANTE A
PERIPUBERDADE CAUSA PREJUÍZOS REPRODUTIVOS EM
RATAS *WISTAR*: REPERCUSSÕES NA FERTILIDADE,
PLACENTAÇÃO E PARÂMETROS FETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Alessandra Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de Julho de 2024.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Frigoli, Giovanna Fachetti.

Exposição à baixas doses de malation durante a peripuberdade causa prejuízos reprodutivos em ratas Wistar: repercussões na fertilidade, placentação e parâmetros fetais. / Giovanna Fachetti Frigoli. - Londrina, 2024. 87 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Coorientador: Phelipe Oliveira Favaron.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Organofosforados - Tese. 2. Sistema genital feminino - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. I. Fernandes, Glaura Scantamburlo Alves. II. Favaron, Phelipe Oliveira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

Aos pilares que me mantêm em pé: meus pais,
Alessandra e Marcos.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, por me proporcionar oportunidades e estruturas para realizar esse trabalho. Foi nela que meus sonhos profissionais começaram a tomar formas concretas. E à cidade que eu tive o prazer de chamar de lar por 6 anos incríveis da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, à coordenação e à todo corpo docente, pela dedicação em garantir a existência de um programa de excelência, do qual sinto muito orgulho em ser aluna. E à CAPES, pelo apoio financeiro que me permitiu dedicação exclusiva à pesquisa nos últimos dois anos.

À minha orientadora, prof. Glaurinha, admiração, por ter construído um grupo de pesquisa tão acolhedor, leve e cooperativo. Obrigada professora, por me acolher em seu laboratório durante 6 anos, acreditar em meu potencial até mesmo quando eu não acreditava, e não me permitir desistir. Obrigada pela confiança, acolhimento, amparo e por todo conhecimento que foi compartilhado comigo.

Ao professor Phelipe Favaron, meu corientador, por ampliar meu horizonte e me apresentar ao lindo mundo das placentas. Obrigada pelo apoio.

Aos professores Fábio Goulart de Andrade, pelas aulas durante a graduação, palavras de conforto, cafés compartilhados, e Fábio Seiva, pela colaboração e financiamento de parte de meu trabalho. Sem que eles acreditassem no potencial desse projeto, e no meu, o trabalho sempre estaria incompleto.

À professora Andrea Name Colado Simão, do Centro de Ciências da Saúde, pela dosagem de estradiol de minhas amostras.

Aos professores Marina e Waldiceu, por comporem a banca avaliadora da qualificação deste trabalho, com palavras construtivas e considerações pertinentes. E aos professores Alessandra e Marcelo, por comporem a banca avaliadora da defesa de minha dissertação, também com considerações construtivas.

À minhas colegas e amigas de laboratório, Rafa, Ana Paula, Ivy, Déb, Day e Karenzinha, que me acompanharam durante grande parte da minha jornada no LT&DMR, me ensinaram o real significado de sororidade, me apoiaram nos momentos mais sombrios, e compartilharam comigo angústias, felicidades, risos, cafés e choros, muito além de

experimentos. E em especial à Ivana, por ter me ajudado em tantas noites longas de experimento e pela amizade inesperada.

À minha amiga Milena, que compartilhou dos sentimentos de angústia e felicidade que é fazer parte de um programa de excelência, e que me ajudou tanto no desenvolvimento deste trabalho, e ao meu amigo Pedro, pela ajuda em análises e surtos durante as avaliações histopatológicas. Às minhas amigas de infância, Bruna e Bianca, por mais que quase 600 km nos separassem nos últimos anos nossa amizade permaneceu. Vocês são luz nos momentos de escuridão, riso no silêncio e aconchego no coração. Obrigada pela amizade duradoura – que já tem mais de década e entrega nossa real idade –, leve e feliz. Obrigada por mesmo longe se fazerem presentes em todas as etapas de minha vida. Obrigada por serem vocês. Aos meus amigos Thiago, Mariana e Isadora, obrigada por me acompanharem durante a graduação, serem companheiros, sinceros, carinhosos, e cascas de bala. Vocês foram minha família nessa cidade. Não existem palavras na língua portuguesa capaz de expressarem o tamanho da gratidão que sinto por terem todos vocês em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Alessandra e Marcos, pela minha criação e educação. Pelo amparo e amor incondicional que me foi dado por eles ao longo de minha vida. Obrigada por me trazerem ao mundo e continuamente garantir que nada me faltasse, inclusive apoio em meus sonhos mais loucos. Obrigada por me criarem forte, independente e íntegra. Por sempre estarem presente, me fazer rabos de cavalo, me levar à escola, dentre outros. Se cheguei até aqui hoje, foi porque vocês sempre batalharam pelo meu futuro e prezaram pela minha educação.

Aos meus avós, Elza e Roberto (*in memoriam*) Frigoli, Rosa e Maurício (*in memoriam*) Fachetti, e padrinhos, Katia e Ronaldo, por cuidarem e olharem por mim quando meus pais não podiam, pelo amor e carinho que me deram e por serem partes essenciais da minha criação.

Às minhas tias, Daniela, Karla e Cynthia, pela companhia, amor e cumplicidade. E aos meus primo, Enzo, e afilhado, Pietro, pelas brincadeiras, sustos e amor compartilhado.

Ao Victor Negri, por ser meu parceiro na vida, compartilhar seu tempo comigo, e principalmente, ter me ensinado a viver um dia de cada vez, com muita cumplicidade e amor. Obrigada por não me deixar cair e por sempre segurar a minha mão na caminhada da vida. Obrigada por acreditar em mim. E à sua família, por terem me acolhido como parte deles

desde o início.

Aos pais que a vida me deu, Melissa Rose e Tim Medina, e meus irmãos, Makenna Foht, Antonio e Elliot Medina, por cuidarem de mim quando meus pais estavam longe demais, por me apoiarem em momentos tão difíceis e abrirem seu lar e seus corações pra mim, me tratando como parte de sua família.

À Jo-ann e Nicholas Valdivia, por terem me acolhido e apoiado, me tomando como parte de seu lar, sempre acreditando em mim.

**“Porque para almejar, amar com paixão,
tropeçar e mesmo assim prosseguir na luta é
preciso crer que aquilo pelo que passam jamais
foi vivenciado da forma como *nós* o
vivenciamos.”**

Amor Towles

FRIGOLI, Giovanna Fachetti. **Exposição à baixas doses de malation durante a peripuberdade causa prejuízos reprodutivos em ratas *Wistar*: repercussões na fertilidade, placentação e parâmetros fetais.** 2024. 87. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O malation, um inseticida organofosforado amplamente utilizado desde a década de 1980, é ainda hoje um dos pesticidas mais usados, inclusive no combate ao mosquito *Aedes* em áreas endêmicas de dengue no Brasil. Sua pulverização expõe toda a população, incluindo crianças e adolescentes, ao pesticida. A puberdade é um período crítico para a maturação do sistema genital e o estabelecimento do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. Com base no conceito DOHaD (Origens do Desenvolvimento da Saúde e Doença), que sugere que condições ambientais e nutricionais durante janelas de desenvolvimento podem influenciar a saúde futura por meio de reprogramação metabólica, este estudo busca avaliar se a exposição pré-concepcional a baixas doses de malation durante os períodos juvenil e puberal afeta a fertilidade, placentação e desenvolvimento intrauterino em ratas *Wistar*. No estudo, 36 ratas foram divididas em três grupos (n=12/grupo) e expostas diariamente via gavagem ao malation nas doses de 10 e 50 mg/kg, do dia pós-natal (DPN) 22 ao 60. A partir do DPN 27, foi monitorada a abertura vaginal e a ocorrência do primeiro estro. No primeiro proestro após o DPN 60, as fêmeas foram acasaladas, e a prenhez foi confirmada pela presença de espermatozoides no lavado vaginal, marcando o dia gestacional (DG) 0. As fêmeas prenhes foram mantidas em condições controladas e com acesso *ad libitum* à água e ração até o DG 18, no qual foram anestesiadas e submetidas à eutanásia. Sangue foi coletado para dosagem hormonal e análises bioquímicas. Líquido amniótico, útero e ovários foram coletados para análises bioquímicas, do perfil oxidativo e histológicas. A exposição ao malation adiantou em um dia a instalação da puberdade nas fêmeas expostas à maior dose, porém, não houve comprometimento da fertilidade. Houve aumento dos níveis de sódio no líquido amniótico na prole e na concentração sérica de ureia nas fêmeas expostas à dose mais alta (M50). Observou-se ainda prejuízos na integridade uterina, placentação e desenvolvimento intrauterino em ambos os grupos expostos ao malation. Verificou-se estresse oxidativo no útero e nas placentas em ambos os grupos expostos ao inseticida, e redução na reserva placentária de glicogênio em M10. Contudo, a produção de estrógeno e progesterona pela placenta não foi alterada após a exposição ao inseticida. Este modelo experimental mostra que a exposição a baixas doses do inseticida malation durante os períodos juvenil e peripuberal adianta a instalação da puberdade, mas não afeta a fertilidade em ratas *Wistar*. Além disso, a exposição antes da concepção prejudica a placentação, afetando o tamanho dos fetos, sugerindo reprogramação metabólica nos animais. Nossos resultados indicam que o malation compromete a saúde reprodutiva de fêmeas expostas durante a puberdade.

Palavras-chave: Organofosforado. Sistema genital feminino. Líquido amniótico. Estresse oxidativo. Reprogramação metabólica.

FRIGOLI, Giovanna Fachetti. **Exposition to low doses of malathion during peripuberty impairs reproduction in female *Wistar* rats: repercussions onto fertility, placentation and fetal parameters.** 2024. 87. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Malathion, an organophosphate insecticide widely used since the 1980s, remains one of the most used pesticides today, including in the fight against *Aedes* mosquitoes in dengue-endemic areas of Brazil. Its application exposes the entire population, including children and adolescents, to the pesticide. Puberty is a critical period for the maturation of the genital system and the establishment of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Based on the DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) concept, which suggests that environmental and nutritional conditions during key developmental windows can influence future health through metabolic reprogramming, this study aims to evaluate whether pre-conceptional exposure to low doses of malathion during juvenile and pubertal periods affects fertility, placentation, and intrauterine development in Wistar rats. In this study, 36 rats were divided into three groups (n=12/group) and were exposed daily via gavage to malathion at doses of 10 and 50 mg/kg from postnatal day (PND) 22 to 60. From PND 27, vaginal opening and the occurrence of the first estrus were monitored. On the first proestrus after PND 60, the females were mated, and pregnancy was confirmed by the presence of sperm in the vaginal smear, that being considered gestational day (GD) 0. Pregnant females were maintained under controlled conditions with ad libitum access to water and food until GD 18, when they were anesthetized and euthanized. Blood was collected for hormonal dosage and biochemical analyses. Amniotic fluid, uterus and ovaries were collected for biochemical, oxidative profile and histological analyses. Malathion exposure advanced the onset of puberty by one day in the females exposed to the highest dose, but there was no impairment of fertility. An increase in sodium levels in the amniotic fluid of the offspring and in serum urea concentration in the females exposed to the highest dose (M50) was observed. Additionally, there were impairments in uterine integrity, placentation, and intrauterine development in both malathion-exposed groups. Oxidative stress was observed in the uterus and placentas in both insecticide-exposed groups, along with a reduction in placental glycogen reserves in M10. However, placental estrogen and progesterone production were not altered after insecticide exposure. This experimental model shows that exposure to low doses of malathion during the juvenile and peripubertal periods advances the onset of puberty but does not affect fertility in Wistar rats. Moreover, pre-conceptional exposure impairs placentation, affecting fetal size and suggesting metabolic reprogramming in the animals. Our results indicate that malathion compromises the reproductive health of females exposed during puberty.

Key words: Organophosphate. Female reproductive system. Amniotic Fluid. Oxidative stress. Metabolic programming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da posição anatômica e anatomia do sistema reprodutor feminino humano	18
Figura 2 – Representação esquemática da posição anatômica e anatomia do sistema reprodutor feminino de ratas	19
Figura 3 – Síntese de hormônios ovarianos.....	23
Figura 4 – Representação esquemática dos ciclos menstrual e ovariano	25
Figura 5 – Representação esquemática do conteúdo encontrado no lavado vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral	28
Figura 6 – Representação esquemática do desenvolvimento do zigoto até a fase de embrião recém implantado em ratos	30
Figura 7 – Desenvolvimento da placenta em roedores.....	31
Figura 8 – Representação anatômica da placenta de ratas	32
Figura 9 – Representação das camadas atravessadas pelos nutrientes entre a troca materno-fetal em ratos Wistar	33
Figura 10 – Representação esquemática da esteroidogênese na interface materno-fetal.	35
Figura 11 – Representação esquemática da via de síntese de progesterona pelas células sinciotrofoblásticas	36
Figura 12 – Interação entre o sistema antioxidante e as espécies reativas de oxigênio	40
Figura 13 – Fórmula estrutural do Dietil 2-dimetoxifosfinotioilsulfanilbutanodioato.....	44
Figura 14 – Mecanismo de ação do malaoxon	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais antioxidantes e sua ação	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH-	Ânion hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singlete
16α-OHDHEA	16α-hidroxi-dehidroepiandrosterona
17β-HSD	17-β hidroxíesterase desidrogenase
3β-HSD	3-β hidroxíesterase desidrogenase
4-HNE	4-hidroxinoneal
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AOEL	do inglês, <i>Acceptable Operator Exposure Level</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
ATSDR	Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças dos EUA
CAT	Catalase
CDNB	2,4-Dinitroclorobenzeno
CGTs	Células gigantes trofoblásticas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYP17A	Citocromo P450 17A
CYP1A2	Citocromo P450 1A2
CYP2B6	Citocromo P450 2B6
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
CYP450scc	Colesterol desmolase
DCA	Ácido dicarboxílico malaoxon
DE	Dia embrionário
Dec	Decídua materna
DG	Dia gestacional
DHEA-S	Sulfato de deidroepiandrosterona
DL50	Dose Letal 50
DMP	O,O-dimetilfosfato
DMPDT	O,O-dimetil-fosforofitioato
DMPT	Ácido fosforotióico dimetil
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DPN	Dia pós-natal
E ₁	Estrona
E ₂	Estradiol
E ₃	Estriol
ER- α	Receptor de estrogênio alpha
ER- β	Receptor de estrogênio beta
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAO	do inglês, <i>Food and Agriculture Organization</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GCs	Células trofoblásticas de glicogênio
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropinas
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione s-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HHG	Eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
HO ₂	Hidroperoxila
IDA	Ingestão diária aceitável
LH	Hormônio luteinizante
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MCA	Ácido monocarboxílico malation
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBT	Nitro azul tetrazólio
NOAEL	do inglês, <i>No Observed Adverse Effect Level</i>
O ₂	Gás oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OF	Organofosforado
P38 MAPK	do inglês, <i>p38 mitogen activated protein kinase</i>
SOD	Superóxido Dismutase
STB	Sinciotrofoblasto
T	Testosterona

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UE	União Européia
EE	Ectoderma extra-embrionário
EPC	Cone ectoplacentário

SUMÁRIO

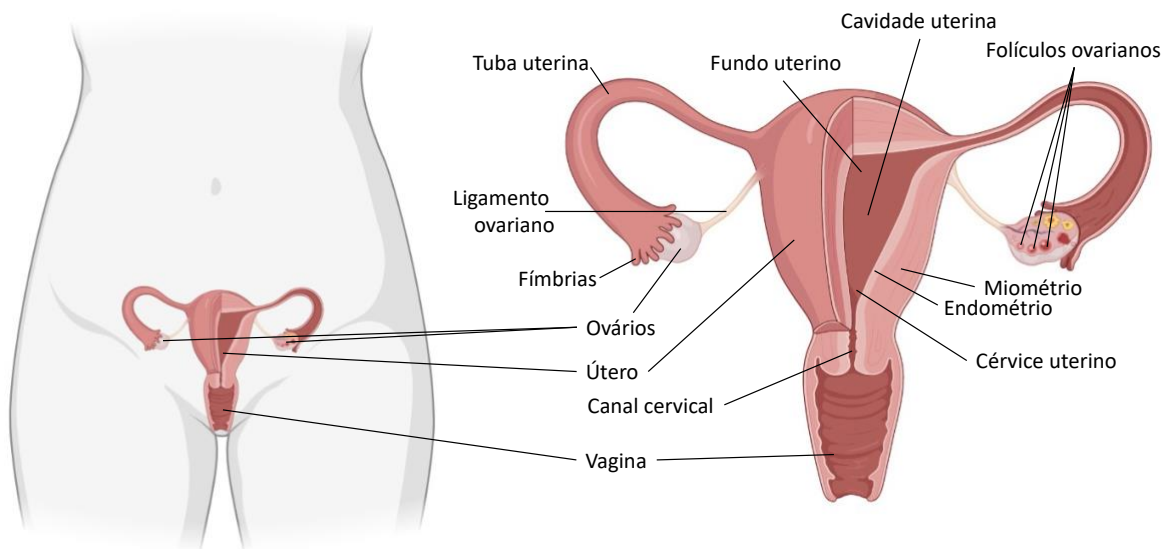
1 REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1 SISTEMA GENITAL FEMININO	18
1.2 FECUNDAÇÃO, IMPLANTAÇÃO E PLACENTAÇÃO EM RATOS WISTAR	29
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO	37
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA GENITAL FEMININO	40
1.5 AGROTÓXICOS	42
1.6 ORGANOFOSFORADOS E O MALATION	43
1.7 TOXICIDADE REPRODUTIVA DO MALATION	48
2 JUSTIFICATIVA	50
3 OBJETIVO	51
2.1 OBJETIVO GERAL	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 ARTIGO	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA REVISÃO DE LITERATURA	79
ANEXO A	86
ANEXO B	87

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 SISTEMA GENITAL FEMININO

O sistema genital feminino é constituído pelos órgãos envolvidos nos processos reprodutivos. Os órgãos reprodutivos de humanos são os ovários, o útero, as tubas uterinas e a vagina (GRAZIOTTIN; GAMBINI, 2015; HALL, 2017). Os órgãos deste sistema se encontram ilustrados na Figura 1. Em ratas, o sistema genital é composto por um par de ovários, com seus respectivos ovidutos, um útero bicornificado e a vagina (DIXON et al., 2017; HAMID; ZAKARIA, 2013). A anatomia deste sistema pode ser verificada na Figura 2. As principais funções exercidas pelos órgãos do sistema genital feminino são: a produção e maturação dos oócitos, as células reprodutivas femininas; a manutenção de um novo indivíduo durante todo seu desenvolvimento, desde a fase embrionária até o nascimento; e a produção dos hormônios sexuais femininos, estrógeno e progesterona (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 1. Representação esquemática da posição anatômica e anatomia do sistema reprodutor feminino humano.

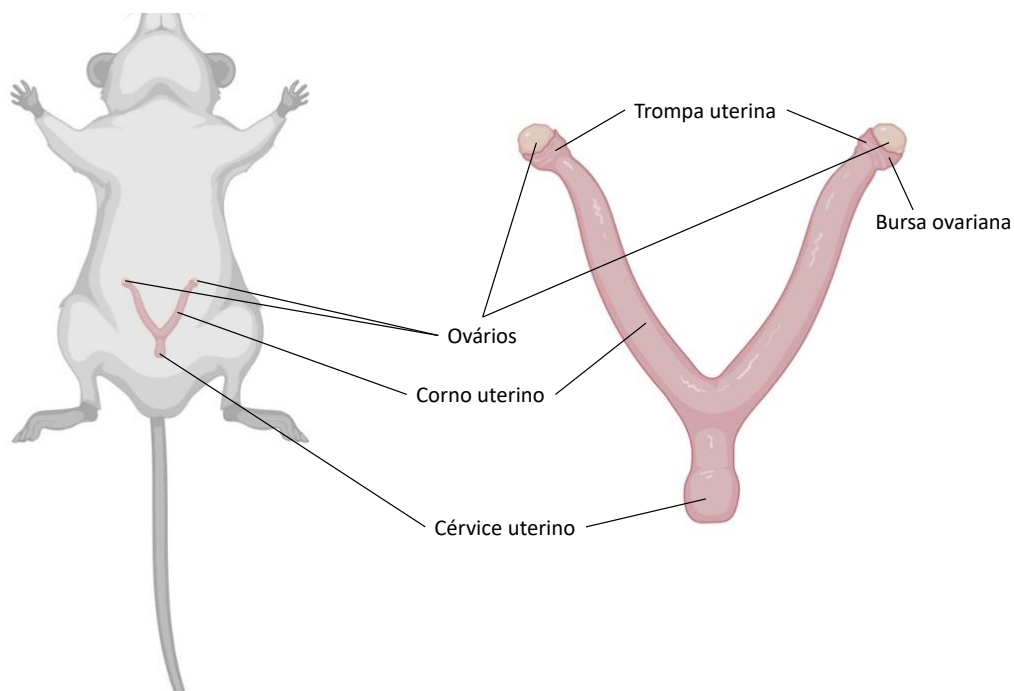


Fonte: o próprio autor. Criado no biorender.com.

Os ovários são órgãos pares localizados na região pélvica da cavidade abdominal e revestidos por epitélio, que envolve a túnica albugínea. Os ovários podem ser divididos em duas regiões: o córtex e a medula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A região cortical é a mais externa, adjacente à túnica albugínea, e é nela que se encontram os folículos

ovarianos. A região medular é a mais interna, formada por tecido conjuntivo frouxo onde são encontrados os vasos sanguíneos ovarianos de maior calibre (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 2. Representação esquemática da posição anatômica e anatomia do sistema reprodutor feminino de ratas.



Fonte: o próprio autor. Criado no biorender.com.

Os folículos ovarianos são estruturas compostas pelo oócito, o gameta feminino, e um agrupamento de células que o envolvem, as células foliculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Essas estruturas podem ser classificadas de acordo com a organização das células que envolvem os oócitos como: folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários, folículos antrais e folículos de Graaf – ou folículos maduros (BEZERRA et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Ao nascimento, todos os folículos que virão a se desenvolver durante o período reprodutivo já se encontram presentes nos ovários, quiescentes (PETERS; BYSKOV; GRINSTED, 1978).

Os folículos primordiais são estruturas caracterizadas por um oócito, com grande núcleo esférico, circundado por uma única camada de células foliculares achatadas (BORGEEST et al., 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Por estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH), essa estrutura cresce, diferenciando-se em folículo primário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), caracterizado por um oócito, com tamanho máximo de 120 μm , circundado por uma única camada de células foliculares cuboidais (BORGEEST et al.,

2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Esse folículo, por sua vez, cresce e se diferencia em folículo secundário, que apresenta oócito circundando por duas ou mais camadas de células da granulosa cuboidais, e já é possível de se observar o início da organização da zona pelúcida e das tecas (ALVES, 2010).

São considerados pré-antrais, os folículos primordiais, primários, e secundários, ou seja, os que ainda não possuem antro (BORGEEST et al., 2002). Como antrais, são classificados os folículos que já apresentam antro, cavidade cheia de líquido, em desenvolvimento (BEZERRA et al., 2011; BORGEEST et al., 2002). Uma vez maduro, os folículos passam a ser denominados de folículos de Graaf, que apresentam o antro em seu ápice de tamanho. Esses folículos maduros podem atingir até 2,5 cm de diâmetro em humanos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As tubas uterinas são dois tubos musculares que, em uma extremidade apresenta abertura para a cavidade peritoneal próximo ao ovário, o infundíbulo, e na extremidade oposta, a intramural, penetra no óstio do útero e se abre no interior deste (DIXON et al., 2017). Em humanos, possui aproximadamente 10 cm de comprimento (GRAZIOTTIN; GAMBINI, 2015), e na porção do infundíbulo estão presentes fimbrias, que auxiliam na captação do oócito, além de um epitélio ciliado, que se movimenta ativamente, direcionando o oócito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Em ratas, o oviduto envolve os ovários, como uma cápsula, numa estrutura denominada de bursa ovariana (HAMID; ZAKARIA, 2013).

Histologicamente, as tubas uterinas são compostas também por três camadas: a camada serosa é a mais externa e é constituída de peritônio; a camada muscular, média, é composta por fibras musculares lisas; e a camada mais interna, mucosa, composta por epitélio colunar ciliado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). É nas tubas uterinas que ocorre a fertilização do oócito, e os cílios presentes na mucosa deste órgão apresentam papel importante no transporte do embrião em direção ao útero (GRAZIOTTIN; GAMBINI, 2015), local de sua implantação para posterior desenvolvimento (SADLER, 2005).

O útero humano é um órgão em formato de pera, sendo a porção mais dilatada e superior denominada de fundo uterino e a mais estreita e inferior, que se abre na vagina, denominada de colo uterino. Este órgão está localizado na cavidade peritoneal anteriormente adjacente à bexiga (NETTER, 2014). Já o útero de ratas é constituído por dois cornos parcialmente fundidos em sua porção caudal, que apresentam cada um seu próprio lúmen e canal cervical (DIXON et al., 2017). Esse fator anatômico contribui para que sejam gestados muitos filhotes concomitantemente (HAMID; ZAKARIA, 2013). Histologicamente, o útero é composto por três camadas: endométrio, miométrio e perimétrio (JUNQUEIRA; CARNEIRO,

2013).

O endométrio, camada mais interna, pode ser subdividido em duas camadas: a camada basal, mais externa, adjacente ao miométrio, constituída principalmente por tecido conjuntivo, pela base das glândulas uterinas e arterias espiraladas; e a camada funcional, a porção mais interna, onde estão localizadas a maior parte das glândulas uterinas e o epitélio luminal. O endométrio humano é altamente irrigado por diversos vasos sanguíneos que são de extrema importância para nutrição deste tecido e do embrião, por meio da placenta. A porção funcional é a que mais sofre alterações durante o ciclo menstrual, além de ser perdida durante a menstruação e no parto. O miométrio e o perimétrio são as camadas mais externas do útero. A primeira é formada por camadas de fibras musculares lisas dispostas em diferentes sentidos, e a segunda é composta principalmente por tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A vagina é um órgão fibromuscular em formato tubular, em humanos com comprimento de 6 a 12 cm, que se estende entre a vulva e o cérvix uterino. Histologicamente, a parede vaginal é composta por três camadas. A mais interna, mucosa, é formada por epitélio estratificado não queratinizado apoiado numa lâmina própria de tecido conjuntivo extremamente vascularizada. A camada média, muscular, é composta por duas camadas de fibras musculares lisas, estando na mais interna as fibras dispostas longitudinalmente e na mais externa dispostas circularmente (GRAZIOTTIN; GAMBINI, 2015). Já a camada mais externa desse órgão, a adventícia, é composta por tecido conjuntivo denso rico em fibras colágenas e elastina, o que garante sua elasticidade (GRAZIOTTIN; GAMBINI, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Em ratas, a vagina apresenta entre 15 e 20 mm de comprimento, e assim como a de humanas, sua abertura é separada do orifício uretral (DIXON et al., 2017).

A diferenciação do sistema genital feminino de mamíferos tem início ainda no período embrionário em humanos, na sétima semana do desenvolvimento (SADLER, 2005), e em ratas, ocorre dentre os dias 14 e 18 do desenvolvimento (DIXON et al., 2017). Essa diferenciação é decorrente da ausência da expressão da proteína SRY, cujo material genético correspondente se encontra no gene Y, que não está presente em indivíduos deste sexo (GRAZIOTTIN; GAMBINI, 2015).

Logo após o nascimento, tanto em roedores quanto em humanos, ocorrem pulsos de liberação de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) pelo hipotálamo. Após esse curto período, há um longo período de quiescência, marcado por níveis basais deste hormônio em indivíduos infantis (LAFFAN et al., 2018).

A puberdade é o período pelo qual os indivíduos adquirem capacidade

reprodutiva através da maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (GOLUB et al., 2008; OJEDA et al., 1980) que tem início a partir de alterações epigenéticas que permitem a ocorrência de “pulsos geradores” de GnRH e posterior secreção deste hormônio pelo hipotálamo (LOMNICZI; WRIGHT; OJEDA, 2015). Em seres humanos, esses pulsos neuroendócrinos podem ocorrer a partir do sétimo ano de vida, e todo o processo púbere pode durar aproximadamente 10 anos. Já em ratos, costumam ocorrer a partir do 15º dia pós natal (DPN); já a maturação sexual ocorre aproximadamente no 65º DPN (LAFFAN et al., 2018). A secreção de GnRH em pulsos curtos pouco se altera durante o decorrer do ciclo menstrual em humanas, ocorrendo aproximadamente, a cada 90 minutos (HALL, 2017).

A liberação de GnRH é responsável por estimular a produção de hormônio luteinizante (LH) (HALL, 2017; URBANSKI; OJEDA, 1987). Em ratas costuma-se observar esse fenômeno, denominado de “anestro” por Andrews e Ojeda em 1980, em meados do DPN 30. Essa produção pulsada de LH, por sua vez, estimula a maturação ovariana, e precede o primeiro ciclo estral por aproximadamente 8 ou 9 dias (WESTWOOD, 2008).

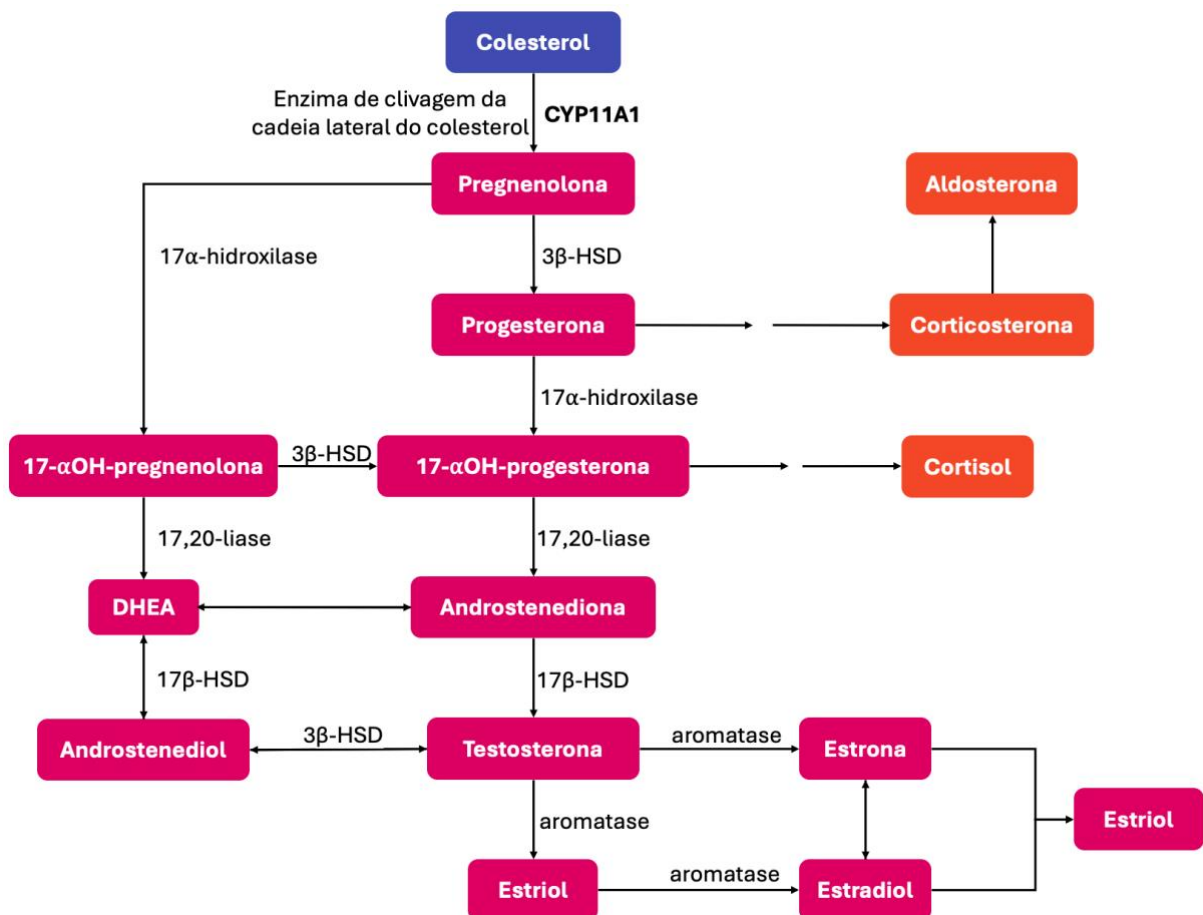
Após a puberdade, os principais hormônios envolvidos nas funções reprodutivas do organismo feminino são: o GnRH; o FSH e o LH, secretados em resposta à liberação de GnRH; e, finalmente, o estrógeno e a progesterona, liberados pelos ovários em resposta à presença de FSH e LH (HALL, 2017). A via de síntese dos hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona, se encontra melhor elucidada na figura 3.

Ciclos menstrual e ovulatório são os nomes dados a uma série de alterações cíclicas que ocorrem no organismo feminino humano, mais especificamente no útero e ovários, respectivamente, durante os anos reprodutivos. Ambos ciclos apresentam duração aproximada de 28 dias, podendo, contudo, serem mais curtos ou longos. Essas alterações cíclicas dependem da ação de dois principais hormônios, LH e FSH, secretados pela adenohipófise. Esses hormônios, uma vez na corrente sanguínea, chegam aos seus respectivos receptores específicos nos ovários, induzindo a proliferação celular e a secreção de estrógeno e progesterona. O ciclo ovariano pode ser dividido em duas principais fases, separadas pela oocitação: a fase folicular e a fase lútea (HALL, 2017).

Na fase folicular, pelo estímulo de LH e FSH, mas principalmente do último, ocorre o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos (ZELEZNIK, 2004). O início do desenvolvimento folicular é mediado por fatores de transcrição e outros fatores que apresentam ação local, sabe-se que os folículos primordiais e primários ainda não apresentam receptores hormonais, portanto não respondem a presença dos mesmos (OKTEM; URMAN, 2010). A cada ciclo, em humanos, de 6 a 12 folículos iniciam seu desenvolvimento, mas apenas

um chega ao final desse processo e é ovocado (HALL, 2017). A partir da ativação dos receptores hormonais, o oócito começa a crescer e as células da granulosa também crescem e se multiplicam, resultando no aparecimento de mais camadas destas. Algumas células fusiformes, presentes no interstício dos ovários, começam a se agrupar em camadas ao redor das células foliculares, organizando-se e originando uma estrutura denominada teca (ZELEZNIK, 2004). A teca pode ser dividida em interna e externa e apresenta duas principais funções. A teca interna secreta os hormônios andrógenos, já a teca externa é uma capsula de tecido conjuntivo altamente vascularizada, que envolve o folículo em desenvolvimento (HALL, 2017).

Figura 3. Via de síntese dos hormônios esteróides.



Fonte: o próprio autor.

Nessa figura está ilustrada a via de síntese dos hormônios esteróides, demonstrando as diferentes enzimas que participam desse processo. Primeiramente o colesterol, uma vez nas mitocôndrias, pode ser convertido em pregeolona pela enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CYP11A1). A enzima 3β-hidroxiesterase desidrogenase (3β-HSD), no retículo endoplasmático, realiza a conversão de pregnenolona em progesterona, e de 17-OH-pregnenolona em 17α-OH-progesterona, além da isomerização de androstenediol em testosterona – e vice-versa. Progesterona e 17α-OH-progesterona podem ser convertidas em corticosterona e cortisol, respectivamente, na glândula suprarrenal. A enzima

17,20-liase catalisa a conversão de 17-OH-pregnenolona em dihidroepiandrosterona (DHEA), e da 17 α -OH-progesterona em androstenediona, também no retículo endoplasmático. Já a enzima 17 β -hidroxilesterase desidrogenase (17 β -HSD), faz a desidrogenização do DHEA em androstenediol e da androstenediona em testosterona, e vice-versa. Por fim, a enzima aromatase, catalisa a conversão de testosterona em estriol ou estradiol, e de androstenediona em estrona. Estrona e estradiol também podem ser convertidos em estriol no fígado e na placenta. As enzimas 17 β -HSD e aromatase também se encontram no retículo endoplasmático.

Após a formação das tecas, as células da granulosa secretam o líquido folicular, altamente rico em estrógeno, cujo acúmulo no interior do folículo dá origem à estrutura denominada de antro folicular. A partir desta fase, os folículos passam a ser denominados de vesiculares, e passam a crescer de modo acelerado por três principais fatores. O acúmulo de líquido folicular estimula a expressão de receptores de FSH nas células da granulosa, sensibilizando ainda mais essas células à ação deste hormônio. Além disso, a combinação da ação do FSH e do estrógeno promove a expressão de receptores para LH nas células da granulosa, aumentando a secreção folicular também por meio da ação deste hormônio. E, finalmente, a alta concentração de estrógeno nos folículos, somada à alta concentração de LH, causam a proliferação das células foliculares, aumentando consequentemente a secreção do primeiro hormônio. Após aproximadamente uma semana de crescimento folicular, a maioria dos que iniciaram seu desenvolvimento ficam atrésicos, ou seja, involuem, e apenas um continua seu desenvolvimento e atinge maturação. Quando maduro, o folículo apresenta diâmetro aproximado de 1 a 1,5 cm e é oocitado. A oocitação é o processo pelo qual o oócito e a *corona radiata* são expelidos do ovário para a tuba uterina, e depende de um pico de LH para acontecer (HALL, 2017).

O pico de LH ocorre aproximadamente 16 horas antes da oocitação e é decorrente de um aumento de 6 a 10 vezes em sua produção, acompanhado de um aumento, em menor grau, da produção de FSH. Além disso, o LH é responsável por converter as células da teca e da granulosa em células secretoras de progesterona após a oocitação. Por isso, um dia antes da oocitação, pode-se observar uma queda na concentração sérica de estrógeno e aumento na concentração de progesterona (HALL, 2017; SUGINO, 2007).

Após a oocitação tem início a denominada fase lútea, na qual as células da granulosa e teca interna remanescentes no ovário se transformam em células luteínicas. Durante o processo de luteinização, promovido pela ação do LH, essas células aumentam expressivamente de tamanho e apresentam inclusões lipídicas, que lhes conferem um aspecto amarelado (HALL, 2017).

O corpo lúteo cresce por 7 ou 8 dias após a oocitação, atingindo um tamanho

de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro em humanas. Após esse período ocorre sua involução, que compreende também a perda de suas funções secretoras. Após aproximadamente 12 dias da oocitação, essa estrutura passa a ser conhecida como *corpo albicans*, que é substituído por tecido conjuntivo e absorvido pelo ovário no decorrer de outros ciclos (HALL, 2017).

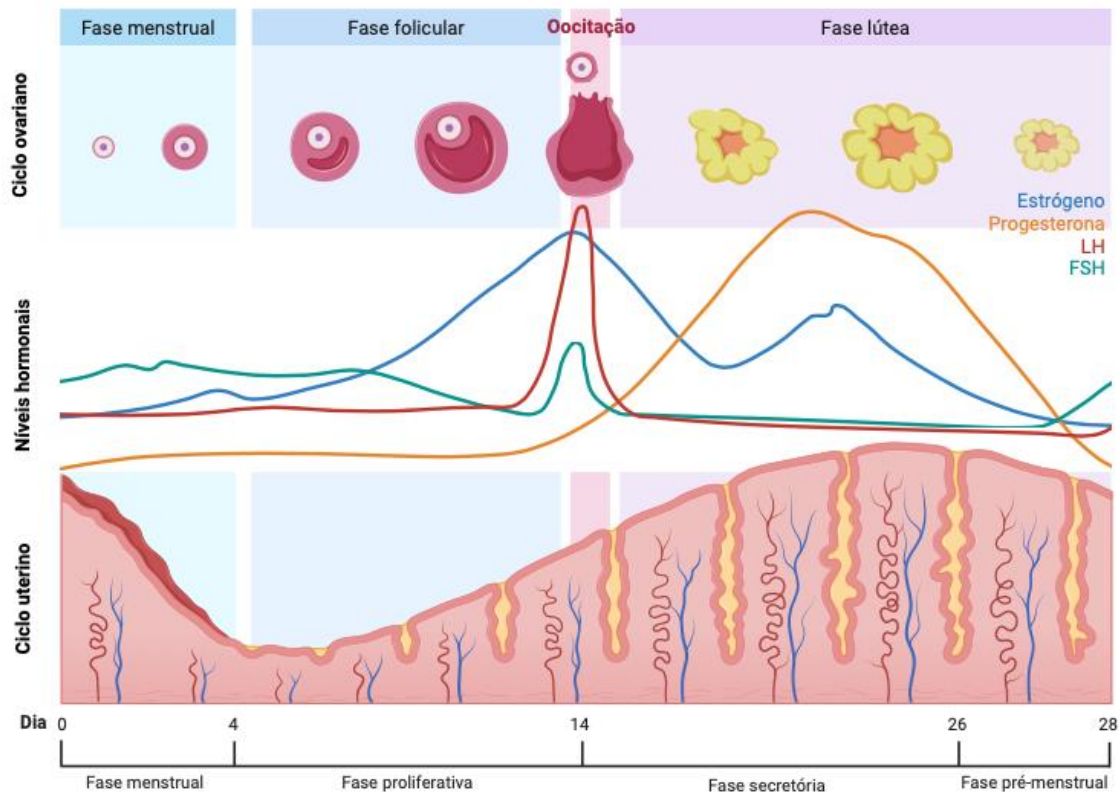
O estrógeno e a progesterona secretados pelo corpo lúteo exercem *feedback* negativo na adenohipófise, reduzindo a secreção de LH e FSH. A baixa concentração desses hormônios promove a involução do corpo lúteo. Devido a involução desta estrutura, que ocorre aproximadamente dois dias antes da menstruação, a inibição por *feedback* da hipófise anterior é cessada, ocasionando a produção de FSH e LH novamente por esta glândula, dando início, assim, a um novo ciclo ovariano (HALL, 2017).

Concomitantemente ao ciclo ovulatório, descrito anteriormente, ocorre o ciclo menstrual no útero, caracterizado por uma série de alterações, também cíclicas, que ocorrem no endométrio. Num primeiro momento, ocorre a proliferação do endométrio, seguida de alterações secretórias nas glândulas deste tecido e, por fim, sua descamação, fenômeno conhecido como menstruação (HALL, 2017).

Na fase proliferativa do ciclo, que tem duração aproximada de 11 dias, ocorre a proliferação das células estromais e glandulares que compoem o endométrio (HALL, 2017), devido à ação dos estrógenos secretados pelos ovários nos primeiros dias do ciclo (REYNOLDS; KILLILEA; REDMER, 1992). Esse crescimento é progressivo e, durante a oocitação, o endométrio apresenta de 3 a 5 milímetros de espessura, normalmente. Nessa fase, as glândulas endometriais secretam muco fino e pegajoso (HALL, 2017).

Na fase secretora, ou fase progestacional, do ciclo menstrual, devido à alta concentração de estrógenos e progesterona secretados pelo corpo lúteo no ovário, o endométrio se espessa ainda mais, e as glândulas uterinas se tornam mais tortuosas, propiciando um acúmulo de substâncias secretórias no lúmen glandular. Pode-se observar ainda um aumento no citoplasma das células estromais do endométrio, com aumento nas reservas de lipídios e glicogênio, acompanhado de um aumento na vascularização deste tecido. No auge desta fase, que ocorre aproximadamente 7 dias após a oocitação, o endométrio apresenta entre 5 a 6 cm de espessura em humanos. As alterações que ocorrem durante essa fase do ciclo se dão com a finalidade de tornar o útero um lugar propício à implantação do blastocisto, permitindo a gestação (HALL, 2017).

Figura 4. Representação esquemática dos ciclos menstrual e ovariano.



Fonte: o próprio autor. Criado no biorender.com.

Nessa figura estão correlacionadas esquematicamente os eventos que ocorrem durante os ciclos menstrual e ovulatório. Na fase folicular do ciclo, conforme a adenohipófise libera quantidades crescentes de FSH, a concentração de LH se mantém em níveis basais. Assim, por meio do estímulo de FSH ocorre o crescimento dos folículos ovarianos. Esses folículos, por sua vez, são compostos por células responsáveis pela produção de estrógeno, cuja concentração gradativamente cresce ao longo desta fase, até atingir seu máximo próximo da oocitação. Enquanto isso, no útero, ocorre reepitelização do endométrio e início do crescimento do mesmo, devido a ação do estrogênio. Para que ocorra a oocitação são necessários picos nas concentrações de LH e FSH. Após esse fenômeno, inicia-se fase lútea dos ciclos. Nesta fase ocorre aumento da secreção de estrógeno e progesterona pelo corpo lúteo durante seu crescimento. No útero, por ação destes hormônios, o endométrio cresce cada vez mais, tornando-se altamente vascularizado. Por *feedback* negativo, o aumento na concentração de estrógeno e progesterona diminui a produção de LH e FSH. A diminuição na concentração destes hormônios, principalmente do LH, causa involução do corpo lúteo e diminuição na sua atividade secretória. A concentração de estrógeno e progesterona começa a decair, causando descamação e necrose no endométrio uterino e retorno na produção dos hormônios da hipófise anterior, por ausência de *feedback* negativo. A partir destes eventos têm-se o início de um novo ciclo.

Caso não ocorra a fertilização do oócito liberado pelo ovário neste mês, consequentemente não há a implantação do blastocisto na parede uterina. A redução nas concentrações de estrógeno e progesterona que ocorre a partir da involução do corpo lúteo levam à ocorrência da menstruação (SUGINO, 2007). A partir da ausência da influência do progesterona sobre as células do endométrio, as mesmas começam a involuir. Devido à

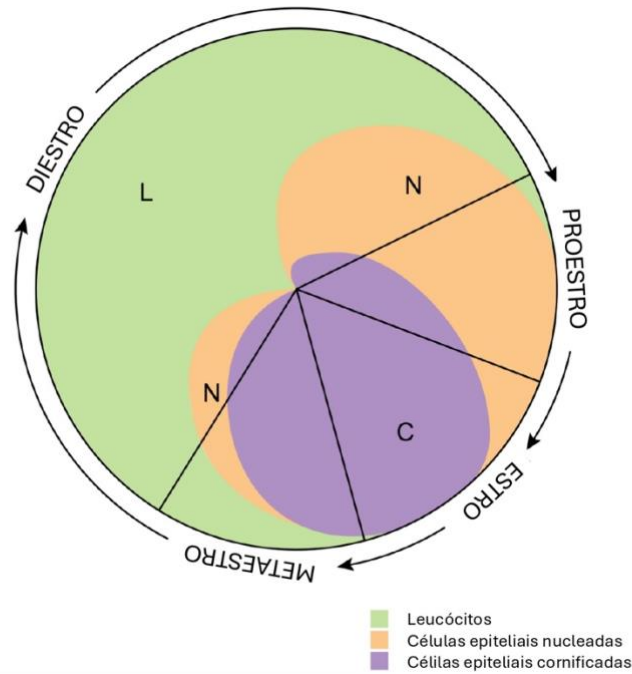
involução deste tecido, os vasos sanguíneos que o irriga em abundância se tornam vasoespásticos (HALL, 2017).

Devido a essas alterações, somada à diminuição da chegada de nutrientes a este local e a desestimulação hormonal, ocorre necrose no endométrio. As camadas necróticas do endométrio se separam da parte sadia desse tecido, originando pequenas hemorragias. A massa de tecido necrótico descamado e sangue na cavidade uterina são expelidos através da vagina por pequenas contrações involuntárias uterinas, no fenômeno conhecido como menstruação. Após 4 a 7 dias do início da menstruação, ocorre a reepitelização do endométrio uterino, consequentemente cessando as hemorragias e permitindo o reinício do ciclo (HALL, 2017). Os ciclos ovariano e uterino estão esquematizados, ilustrados e resumidos na Figura 4.

Em ratas, durante o ciclo estral, o epitélio vaginal e cervical passam por alterações significativas que caracterizam as diferentes fases do ciclo (DIXON et al., 2017). Roedores apresentam ciclo estral com duração dentre 4 a 5 dias que é dividido em 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro (HAMID; ZAKARIA, 2013; OJEDA; URBANSKI, 1994). O primeiro ciclo estral regular de uma rata costuma ocorrer aproximadamente uma semana após a abertura do canal vaginal, entre os dias pós natais 33 e 42 (MAEDA; OKURA; TSUKAMURA, 2000). As fases estrais das ratas apresentam duração de horas, sendo a mais longa o diestro, com aproximadamente 57 horas (LOHMILLER; SWING, 2005).

O proestro é caracterizado pela presença de fluido aquoso no útero e é nessa fase em que são encontrados as maiores concentrações de estrógeno de todo o ciclo (DIXON et al., 2017). No útero, o epitélio apresenta-se cuboidal ou colunar, e pode-se visualizar a presença de infiltrado inflamatório, acompanhada de pouca ou nenhuma degeneração. No proestro folicular, o proestro pode ser caracterizado pela degeneração dos corpos luteos e a presença de alguns vacuolos citoplasmáticos, resultantes do processo esteroidogênico (WESTWOOD, 2008). Ao final dessa fase, as ratas já se encontram receptivas aos machos (LOHMILLER; SWING, 2005). Na vagina, pode-se observar a presença de mitoses no epitélio, pouca degeneração e descamação, e a formação do estrato granuloso. Ao final desta fase, o epitélio se encontra totalmente cornificado e queratinizado (WESTWOOD, 2008; DIXON et al., 2017).

Figura 5. Representação esquemática do conteúdo encontrado no lavado vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral.



Fonte: adaptado de HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ et al., 2019.

No início da fase estral, pode-se observar no útero de ratas a presença de degeneração acompanhada de processo necrótico nas células epiteliais uterinas, sendo as células glandulares as primeiras a passarem por esse processo. Além disso, pode-se visualizar também infiltração leucocitária e diminuição da atividade mitótica dessas células. A dilatação uterina pode persistir até o final do estro. Nos ovários, nessa fase, pode-se observar a oocitação (WESTWOOD, 2008). É nessa fase do ciclo que as fêmeas se encontram mais receptivas aos machos, permitindo a cópula (HAMID; ZAKARIA, 2013). Já na vagina de fêmeas nessa fase, pode-se visualizar a descamação das camadas mucosas e cornificadas e uma diminuição na altura do epitélio, acompanhados do aumento de infiltrado leucocitário nesse órgão (WESTWOOD, 2008).

O útero na fase de metaestro é caracterizado pela visualização tanto de células epiteliais uterinas quanto degeneração destas mesmas células. Já nos ovários, os corpos lúteos ainda contém resquícios de fluido na cavidade central, algumas células basofílicas e completamente livre de tecido fibroso. O início dessa fase, na vagina, é marcado pelo completo descolamento da camada cornificada e pela descamação contínua dos estratos granulosa e

germinativos, pode-se visualizar também a presença de infiltrado leucocitário (WESTWOOD, 2008).

Já em diestro, o útero se encontra com seu menor diâmetro, avascularizado. Inicialmente podem ser observadas algumas poucas mitoses, porém, com o avançar da fase sua presença se torna mais abundante, e algumas raras células degenerativas podem ser visualizadas. No final desta fase pode-se observar edema no estroma do órgão. Nos ovários, podem ser observados corpos lúteos em seu maior tamanho, que podem apresentar pequenos vacúolos citoplasmáticos ou não, e formação de tecido fibroso na cavidade central (WESTWOOD, 2008). Tanto no metaestro quanto em diestro, as fêmeas não apresentam comportamento receptivo aos machos (LOHMILLER; SWING, 2005). Na vagina, o início dessa fase é marcado por apresentar o epitélio em sua menor altura e pela presença abundante de leucócitos. No avançar desta fase, ocorre o alargamento do epitélio, sem formação clara do estrato granuloso e uma redução na infiltração de leucócitos (WESTWOOD, 2008). O epitélio vaginal atinge seu ápice em tamanho ao final desta fase, e mantém-se alargado até o início do estro (DIXON et al., 2017). A proporção de células epiteliais, nucleadas e cornificadas, e leucócitos presentes no lavado vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral se encontra esquematizada na Figura 5.

1.2 FECUNDAÇÃO, IMPLANTAÇÃO E PLACENTAÇÃO EM RATOS WISTAR

Em ratas, a fecundação ocorre nos ovidutos e, assim como em humanos, o encontro do espermatozoide com o oócito é um processo complexo que depende de vários processos. Primeiramente, o espermatozoide atravessa a corona radiata do oócito, em seguida ocorre o encontro do espermatozoide com a zona pelúcida do oócito seguida da reação acrossômica e penetração do espermatozoide pela zona pelúcida. Então, ocorre a junção das membranas celulares dos gametas feminino e masculino e posterior junção de seus pró-núcleos, originando assim o zigoto (HAMID; ZAKARIA, 2013; YANAGIMACHI, 1994).

O zigoto então se divide em duas células e entra em uma série de clivagens, crescendo e se multiplicando, passando pelo estágio de mórula no quarto dia de gestação, até originar o blastocisto, no quinto dia gestacional. O blastocisto é composto por duas populações celulares diferentes: as células embrioblásticas, que darão origem ao embrião propriamente dito, e as células trofoblásticas que originarão a placenta (HAMID; ZAKARIA, 2013), esse processo se encontra ilustrado na figura 6.

Uma vez livre das células da zona pelúcida, o embrião – ainda em fase de blastocisto – adquire a capacidade de aderir à parede uterina (LEE; DEMAYO, 2004), iniciando um processo denominado de implantação.

Figura 6. Representação esquemática do desenvolvimento do zigoto até a fase de embrião recém implantado em ratos.

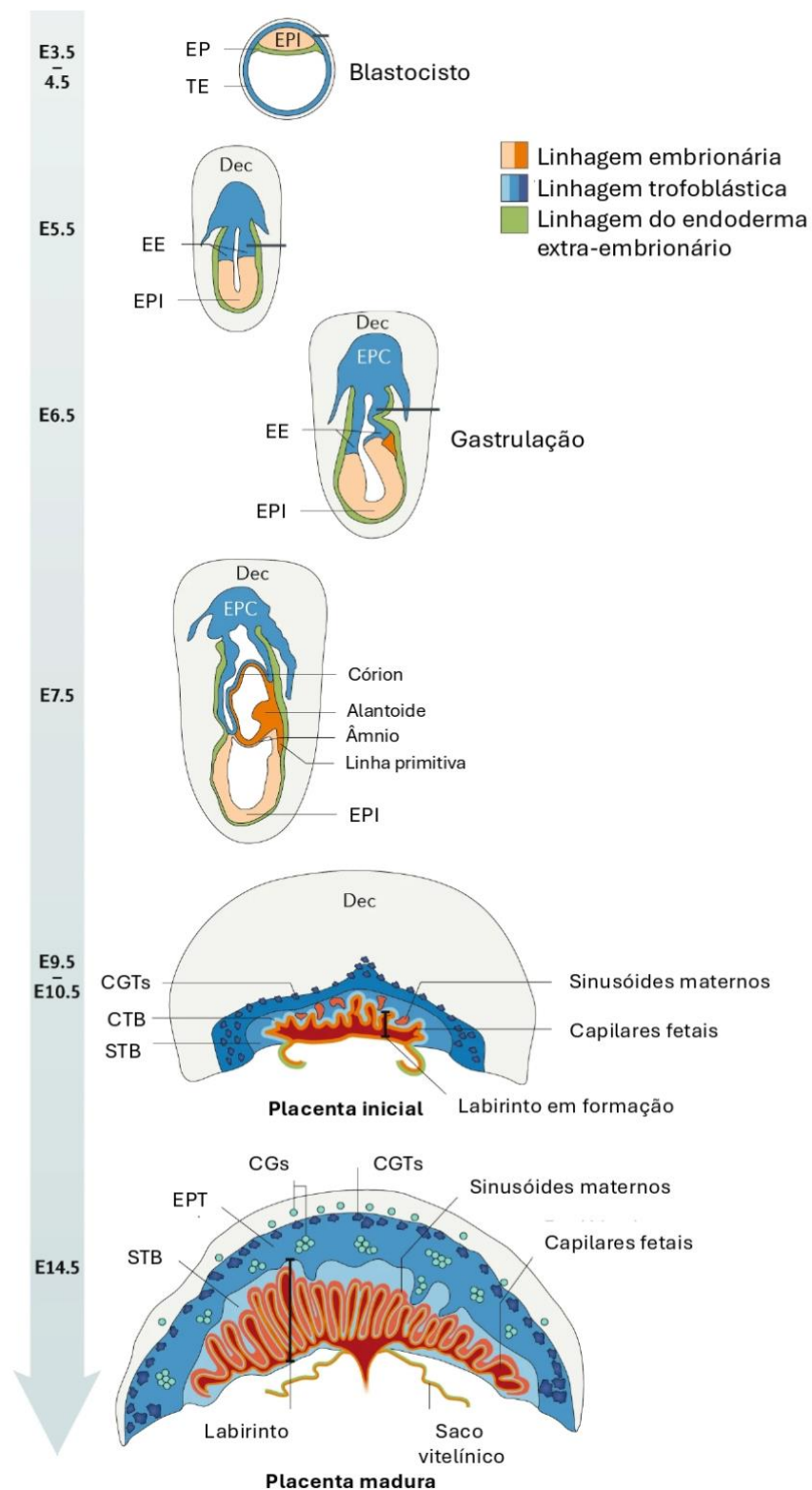


Fonte: o próprio autor. Criado no biorender.com.

Após a união de ambos os pró-núcleos, provenientes do espermatozoide e do oócito, ocorre a formação do zigoto. Essa única célula totipotente dará origem a um novo indivíduo. Essa célula sofre então uma série de divisões, no processo denominado de clivagem, passando pelo estágio de mórula, até originar o blastocisto, ainda rodeado pelas células da zona pelúcida – aqui representadas pelo círculo azul contínuo. Na fase de blastocisto inicial existem 2 populações celulares difentes: a massa de células internas, aqui representadas em azul/roxo, e o trofoectoderma, em rosa.

A implantação é dividida em três fases: aposição, adesão ou fixação e invasão (ENDERS; SCHLAFKE, 1967). A aposição ocorre quando o lúmen uterino se estreita, propiciando o contato entre o blastocisto e o epitélio luminal (PARR; PARR, 1989). Em seguida, o blastocisto se adere ao endométrio. Então, as células epiteliais uterinas que estão em contato com o blastocisto entram em apoptose e são fagocitadas pelas células trofoblásticas, facilitando assim a invasão. Durante este processo, as células do trofoblasto rompem a lâmina basal do epitélio luminal uterino, migrando para o estroma do endométrio (BOWEN; BURGHARDT, 2000; SCHLAFKE; ENDERS, 1975).

Figura 7. Desenvolvimento da placenta em roedores.



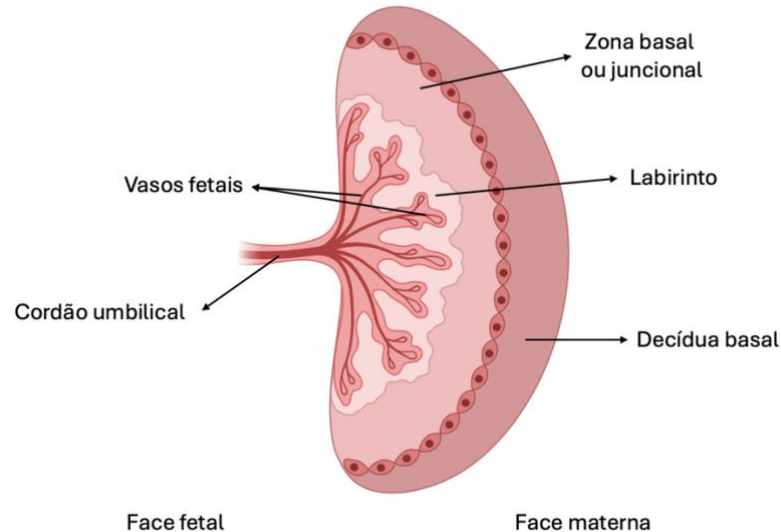
Fonte: adaptado de Hemberger, Hanna e Dean, 2019.

As células do trofoectoderma que recobrem a massa celular interna do blastocisto continuam a proliferar após a implantação, originando o ectoderma extra-embrionário (EE) e o cone ectoplacentário (EPC). Na

gastrulação, que se inicia no dia embrionário (DE) 6,5, é gerado o mesoderma extra-embriônico a partir do epiblasto. Esse mesoderma formará o alantoide e as camadas mesodérmicas extra-embriônicas do âmnio e do cório. Do polo posterior do embrião emerge a linha primitiva, que permite a entrada do mesoderma entre o endoderma e o ectoderma, estabelecendo as três camadas germinativas. Em seguida, a fusão do cório e do alantoide permite a invaginação de vasos sanguíneos, derivados do mesoderma extra-embriônico, na camada do trofoblasto corial. A interdigitação dos vasos sanguíneos fetais com os seios sanguíneos maternos revestidos de trofoblasto gera a estrutura básica do labirinto placentário, que permite o fornecimento de nutrientes e gases para o embrião. Células citotrofoblásticas e sinciciotrofoblásticas, provenientes da fusão das células trofoblásticas coriônicas, estabelecem a principal superfície de troca do labirinto. As células gigantes trofoblásticas (CGTs) revestem o local de implantação e estão em contato direto com a decídua materna (Dec). Juntamente com o sinciciotrofoblasto (STB) e as células trofoblásticas de glicogênio (GCs), elas formam o principal compartimento endócrino da placenta.

Após a invasão do estroma endometrial pelo trofoblasto, as células do estroma endometriais iniciam sua diferenciação para formar a decídua (JOHNSON; MUELLER; DALING, 2003), num processo altamente dependente de estrógeno e progesterona (WANG; DEY, 2006). Já as células de linhagem trofoblástica se diferenciam e invadem a decídua, originando as estruturas fetais da placenta (CROSS, 2005), conforme ilustrado na figura 7.

Figura 8. Representação anatômica da placenta de ratas.



Fonte: o próprio autor. Criado no biorender.com.

A placenta é um órgão materno-fetal que se desenvolve no útero durante a gestação, desempenhando funções cruciais para a manutenção da gravidez e o desenvolvimento do feto. Entre suas principais funções estão a troca de gases e nutrientes entre mãe e feto, a produção de hormônios essenciais para a manutenção da gestação, como estrógeno e progesterona, e sua ação como barreira imunológica, protegendo o feto de possíveis infecções

e do sistema imune materno, que poderia reconhecer o feto como um elemento estranho (non-self) (BURTON; FOWDEN, 2015; CARTER, 2012). A placenta de ratas é classificada como discoidal e hemotricorial (ENDERS, 1965; KAUFMANN; BURTON, 1994). Histologicamente, é dividida nas partes fetal e materna. À termo, a primeira é composta pelo labirinto e zona basal; a última, pela decídua, como disposto na figura 8.

Durante a formação da placenta, as células do trofoectoderma polar formam o cone ectoplacental, uma estrutura que invade a decídua e se diferencia na região basal (CROSS, 2005). Enquanto isso, no útero, a decídua se diferencia rapidamente e se alastra pelo útero.

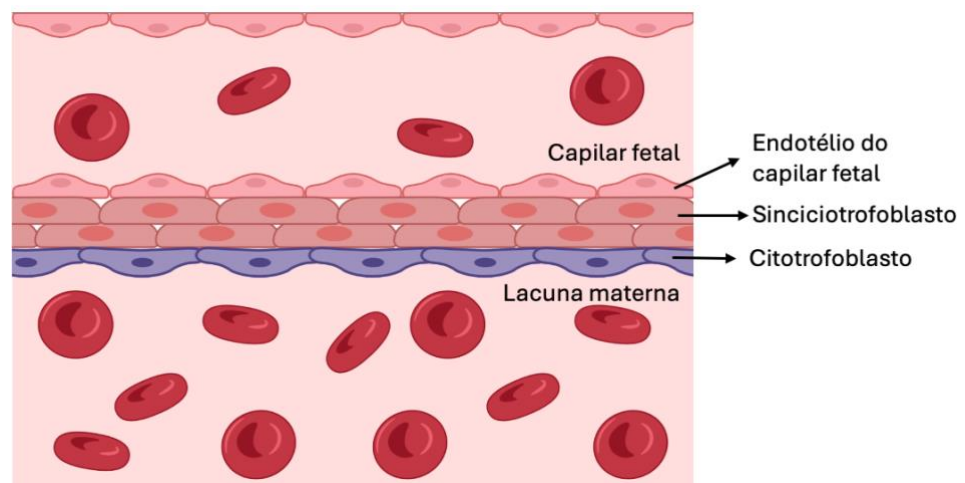
O labirinto ocupa a porção mais fetal da placenta, e é onde o cordão umbilical está inserido (BOLON, 2014). Essa região placentária é composta pelas lacunas maternas, os septos trofoblásticos e os capilares fetais, e é nela que ocorrem as trocas de oxigênio e nutrientes entre a circulação materna e a circulação fetal. Para que essa troca ocorra, as moléculas devem atravessar três distintas camadas de células, que juntas formam os septos trofoblásticos (GEORGIADES; FERGYSO-SMITH; BURTON, 2002). É devido a presença destes três estratos que a placenta de ratas é classificada como hemotricorial. As camadas atravessadas pelos gases, nutrientes e metabólitos na interface materno-fetal em ratos Wistar estão ilustradas na figura 9.

O citotrofoblasto é a superfície microvilosa que está em contato com o sangue materno. Este está apoiado em duas camadas de sinciciotrofoblasto – sinciciotrofoblastos I e II, cuja continuidade origina a barreira placentária (GEORGIADES; FERGYSO-SMITH; BURTON, 2002). As células do sinciciotrofoblasto são intimamente unidas por junções do tipo GAP com conexinas 25, assim, estas duas camadas funcionam como uma única, permitindo a passagem de moléculas pequenas através da barreira (LEAZER; KLAASSEN, 2003). Nesta região estão presentes variados transportadores transmembrana (FURUKAWA; TSUJI; SUGIYAMA, 2019). O trofoectoderma, estrutura que origina os cito e sinciciotrofoblastos, é originado no dia embrionário (DE) 10 (DAVIES; GLASSER, 1968), apresentando pico de atividade proliferativa em suas células no DE 13, que decai gradualmente até o final da gestação, aumentando a septação na região labiríntica (FURUKAWA et al., 2015).

A zona basal, também denominada de juncional, é adjacente ao labirinto, e é composta pelos trofoblastos, células gicogênicas e as células trofoblásticas gigantes (JOLLIE, 1965). Durante o desenvolvimento placentário, há duas populações de células gigantes trofoblásticas distintas. As células gigantes trofoblásticas primárias são derivadas do trofoectoderma mural, participam ativamente da implantação, porém não são constituintes da

zona basal (CROSS, 2006). As células gigantes trofoblásticas secundárias, por sua vez, são derivadas da região mais externa do cone trofoblástico ectoplacentar. Essas células apresentam citoplasma extenso, e um núcleo gigante e altamente dividido, e são o primeiro contato entre o trofoblasto e a decídua basal, ao ocupar a porção marginal do cone (KAUFMANN, 1983).

Figura 9. Representação das camadas atravessadas pelos nutrientes entre a troca materno-fetal em ratos Wistar.



Fonte: o próprio autor. Criado no biorender.com.

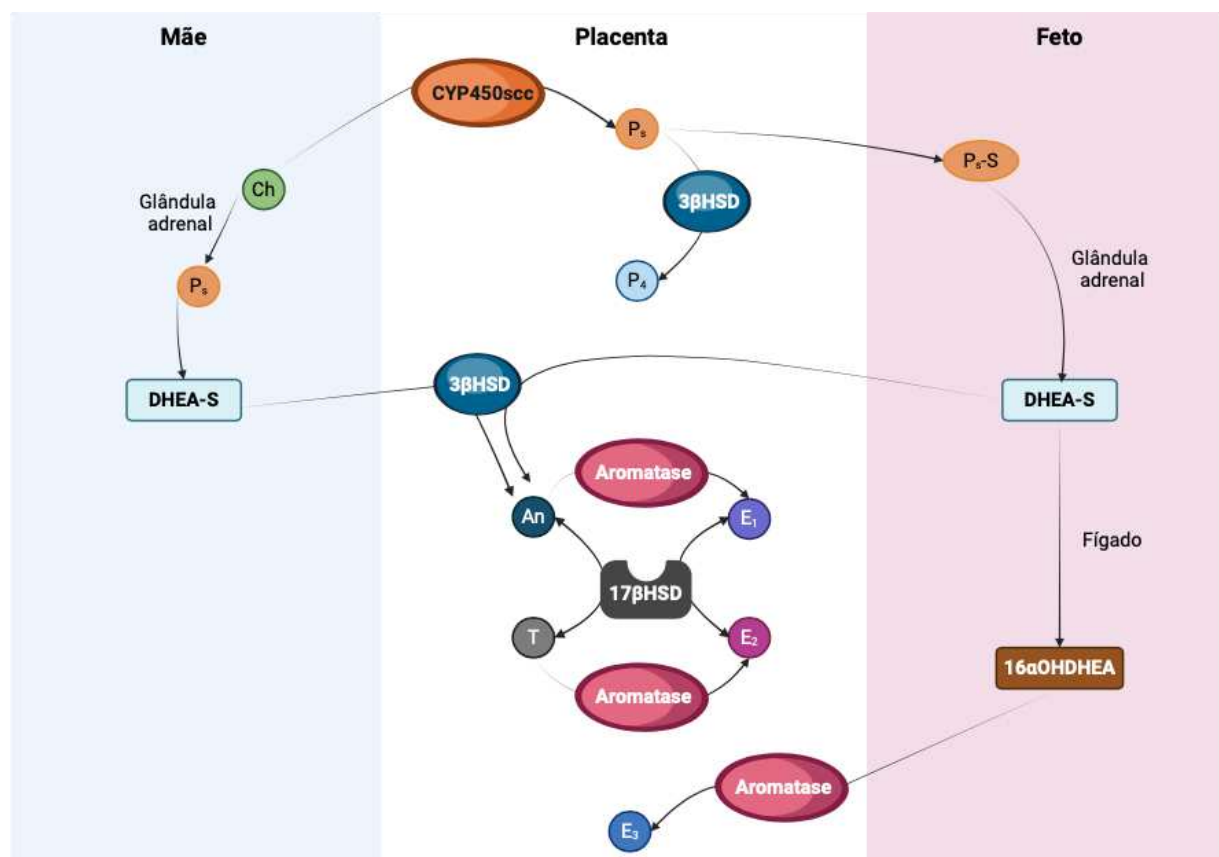
A placenta de roedores é classificada como hemotricorial, devido ao número de camadas celulares que separam o sangue materno do sangue fetal. Em ratos, as moléculas de oxigênio, nutrientes, metabólitos, etc., devem atravessar uma camada de citotrofoblasto (células arroxeadas) e duas camadas de sinciciotrofoblasto (células de coloração salmão). É a união das duas camadas de sinciciotrofoblasto em junções do tipo GAP, que origina a barreira placentária.

As células gigantes trofoblásticas apresentam alta atividade fagocítica, assim, medeiam a implantação e a invasão ao estroma endometrial (CROSS, 2006). No decorrer da gestação a atividade fagocítica destas células decai, sendo quase nula ao final do período (LEVARIO-CARRILLO et al., 2004). Além de sua função fagocítica, essas células também secretam diversos fatores que controlam o crescimento placentário e as respostas maternas à gestação. No mais, são imunologicamente especializadas e não expressam determinantes do complexo principal de histocompatibilidade em suas membranas plasmáticas. Portanto, acredita-se que as células gigantes trofoblásticas desempenhem o papel de manter uma zona imunologicamente neutra na interface entre os tecidos fetal e materno (FURUKAWA; TSUJI; SUGIYAMA, 2019).

As células glicogênicas são assim denominadas por acumularem grânulos ricos em glicogênio em seu citoplasma. Essas células aparecem transitóriamente na zona basal no DE 12, formando pequenos aglomerados no DE 14. Entre os DG 15-16, representam a maior

parte constituinte da zona juncional, formando grandes ilhas de células glicogênicas, e a partir do DG 17 apresentam picnose e lenta degradação, até seu completo desaparecimento no DG 21 (FURUKAWA; TSUJI; SUGIYAMA, 2019). Acredita-se que essas células armazenam energia na forma de glicogênio, proveniente da glicose materna, com a finalidade de suprir a demanda energética ao final do desenvolvimento fetal, entre os DG 17 e 21, visto que sua degradação coincide com o período de maior crescimento intrauterino (SFERRUZZI-PERRI et al., 2009; VERCRUYSSSE et al., 2006).

Figura 10. Representação esquemática da esteroidogênese na interface materno-fetal.



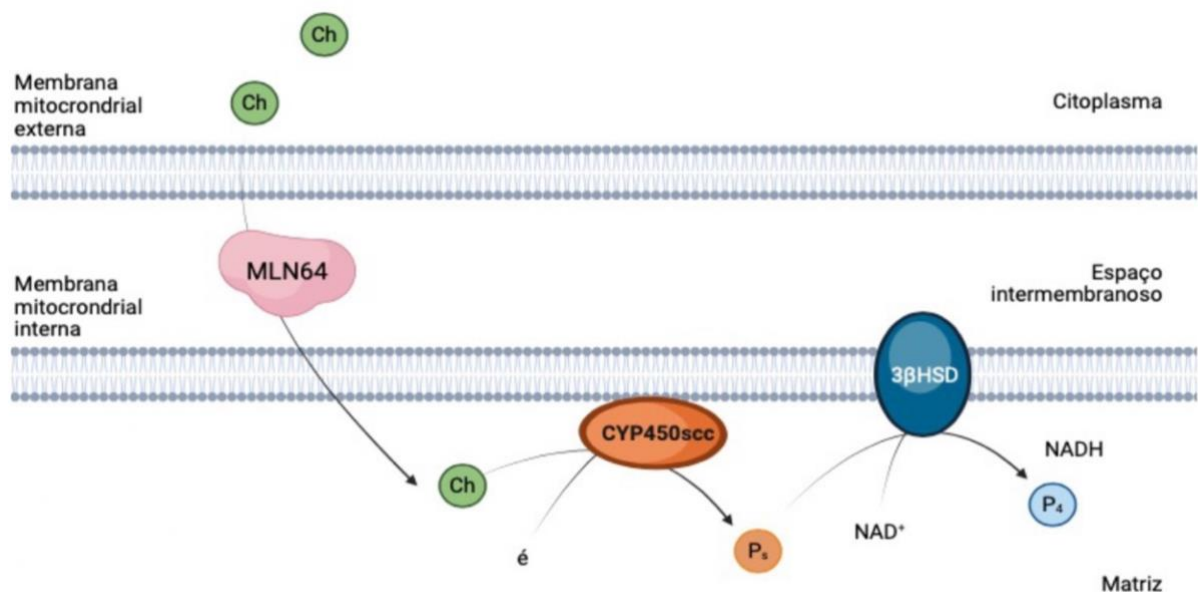
Fonte: adaptado de Costa, 2016. Criado no biorender.com.

Uma vez na placenta, o colesterol (Ch) de origem materna é convertido em pregnenolona pela colesterol desmolase (CYP450scc). A pregnenolona (P_5) é então convertida em progesterona (P_4) pela enzima 3- β hidroxisterase desidrogenase (3 β -HSD). Esse processo está ilustrado com maior riqueza de detalhes na figura 11. Os estrogênios produzidos pela placenta utilizam o sulfato de deidroepiandrosterona (DHEA-S) como substrato. Essa molécula pode ser produzida tanto pela adrenal da mãe quanto do feto, e uma vez na placenta, é convertida em androstenediona (An) pela 3 β -HSD. A enzima 17- β hidroxisterase desidrogenase (17 β -HSD) interconverte androstenediona em testosterona (T), e estrona (E_1) em estradiol (E_2). A enzima aromatase, por sua vez, converte androstenediona em estrona e testosterona em estradiol, e o 16 α -hidroxideidroepiandrosterona (16 α -OHDHEA), sintetizada pelo fígado fetal com DHEA-S como precursor, em estriol (E_3).

A zona basal é responsável pela síntese de hormônios esteróides, como a

progesterona, e peptídicos essenciais para a manutenção da gestação (SHIOTA et al., 1997). Os níveis de progesterona e testosterona secretados pela placenta crescem exponencialmente até atingir seu máximo no DG 17, a partir do qual são reduzidos; concomitantemente, a ocorrência de apoptose nessa região aumenta a partir desse dia (MATT; MACDONALD, 1985). A via de síntese dos hormônios esteróides na placenta se encontra esquematizada na figura 10, e a figura 11 apresenta uma esquematização de como a progesterona é sintetizada nas mitocôndrias do sinciciotrofoblasto. Ademais, as células dessa região expressam proteínas da família das prolactinas (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; SOARES, 2004), que são importantes para o desenvolvimento das glândulas mamárias, dentre outras funções, durante a gestação (SOARES, 2004). Além disso, essa região também realiza o metabolismo de xenobióticos, visto que nesta foram identificados componentes da família das CYP (EJIRI et al., 2001).

Figura 11. Representação esquemática da via de síntese de progesterona pelas células sinciciotrofoblásticas.



Fonte: adaptado de Costa, 2016. Criado no biorender.com.

Assim como nas demais células onde ocorre a síntese deste hormônio, o colesterol é internalizado para a matriz mitocondrial. Especificamente nas células do sinciciotrofoblasto, o colesterol de origem materna é internalizado para a membrana interna da mitocôndria por intermédio do transportador metastático de linfonodo 64 (MLN64) através do espaço intermembranoso desta organela. Na matriz mitocondrial, a enzima colesterol desmolase (CYP450scc) converte o colesterol em pregnenolona (P₅), que posteriormente é convertida em progesterona (P₄) pela enzima 3-β hidroxisterase desidrogenase (3β-HSD), que para isso utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) como cofator, com liberação de NADH.

A decídua é derivada do estroma endometrial, formada na decidualização, e pode ser dividida em capsular, parietal, e basal. Sendo a última o componente materno da

placenta. Inicialmente, a decídua é composta por uma fina camada de células que rodeiam o embrião; neste momento, ela é denominada de decídua primária. Em seguida, células menos compactadas ao redor da decídua primária formam a decídua secundária (DEY; LIM, 2006). Lentamente, ocorre o desenvolvimento das decíduas capsular e parietal (WELSH; ENDERS, 1983), assim, a decidualização se propaga pelo útero como uma onda a partir do ponto de implantação. A decídua capsular, que envolve o embrião, começa a regredir a partir do DG 8, até sua completa ruptura entre os DG 17-18, que então expõe o saco amniótico ao epitélio uterino, que foi formado novamente no DG 16 (WELSH; ENDERS, 1983). A decídua basal, localizada na base da placenta, é importante para a angiogênese materna. Seu desenvolvimento é pronunciado no início da gestação, e esta estrutura passa a regredir a partir do DG 11, num processo de apoptose (DAI; MOULTON; OGLE, 2000). Histologicamente, há duas populações celulares nesta porção: células grandes com núcleo alargado e bem arredondado, que desaparecem da constituição decidual no DG 14; e outras células menores, com núcleo pequeno e e vacúolos citoplasmáticos que são muito bem corados com ácido periódico de Schiff (DE RIJK; VAN ESCH; FLIK, 2002).

Fisiologicamente, no início da gestação, a decídua funciona como uma barreira entre o blastocisto em implantação e os tecidos maternos. Na placenta madura, apresenta importância no armazenamento energético, na forma de glicogênio e lipídeos, e na síntese de hormônios, como a prolactina, prostaglandinas esteróides, relaxina, e outros (WOODING; BURTON, 2008). Assim como o endométrio, a decídua é um tecido hormônio dependente, e o estrógeno apresenta papel fundamental na sua diferenciação. Além deste, a progesterona e a prolactina também são essenciais para seu desenvolvimento (FURUKAWA; TSUJI; SUGIYAMA, 2019).

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é considerado uma condição fisiopatológica importante, conhecido por promover lesões celulares significativas e até mesmo morte celular (MELCHIORRI et al., 1996). Essa condição é caracterizada pela alteração na homeostase entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e agentes antioxidantes, sejam estes enzimáticos ou não (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Os agentes antioxidantes e suas ações se encontram melhor elucidados na Tabela 1. O perfil oxidativo pode ser alterado tanto por um aumento nas concentrações de ERO como por prejuízos no sistema antioxidante celular (RUDER; HARTMAN; GOLDMAN, 2009).

O termo ERO foi cunhado de modo a abranger os radicais de oxigênio e outros agentes oxidantes não radicalares que podem facilmente ser transformados em radicais livres (BAYIR, 2005). Os radicais de oxigênio são moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência e pelo menos um átomo de oxigênio em sua composição (BAYIR, 2005), sendo as principais envolvidas no dano oxidativo o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (MELCHIORRI et al., 1996). Já as espécies oxidantes não radicalares de oxigênio principais são a hidroperoxila (HO_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MELCHIORRI et al., 1996).

Tabela 1. Principais antioxidantes e sua ação.

	Antioxidante	Ação
Enzimáticos	SOD	Catalisa a converção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2
	CAT	Catalisam a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2
	GPx	
Não enzimáticos	Vitamina E (α -tocoferol)	Proteção contra a peroxidação de ácidos graxos insaturados das membranas celulares; Converte $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 em formas menos reativas
	Vitamina A (β -caroteno)	Proteção contra oxidação de lipídeos e DNA
	Vitamina C (ácido ascórbico)	Inibição das ERO;
		Estimula o poder antioxidante da vitamina E

Fonte: adaptado de BARBOSA et al., 2010.

As ERO são normalmente formadas nas mitocôndrias, durante o processo de produção de energia pela respiração celular (RUDER; HARTMAN; GOLDMAN, 2009), porém sua produção também pode ocorrer na cadeia curta de elétrons no retículo endoplasmático, no citocromo P450 e na enzima NADPH oxidase (AGARWAL et al., 2012).

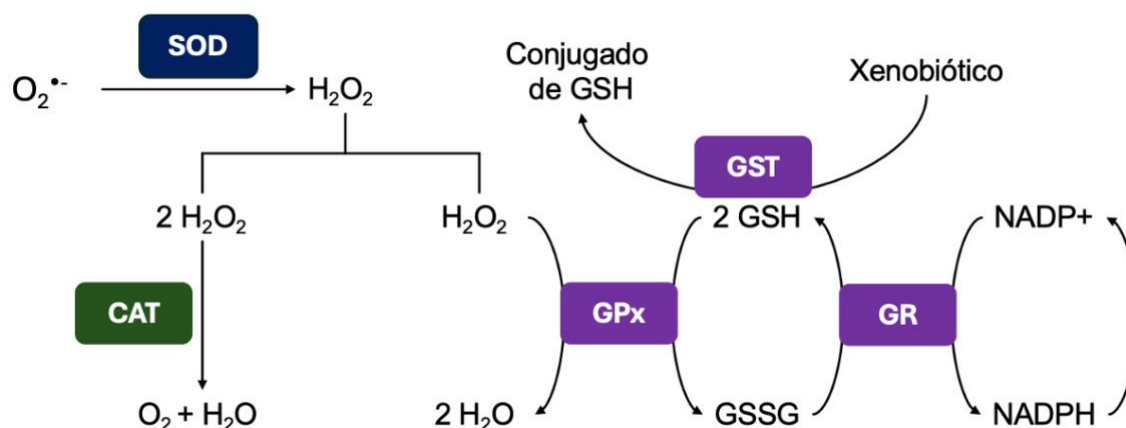
Em concentrações fisiológicas, as ERO possibilitam a geração de ATP – na cadeia transportadora de elétrons (RUDER; HARTMAN; GOLDMAN, 2009), atuam na sinalização e no controle de proliferação celular (FINKEL, 1998), ativam genes e participam de mecanismos de defesa do organismo contra infecções (BARBOSA et al., 2010). Quando em altas concentrações, as ERO são citotóxicas, reagindo com e desestabilizando diversos tipos de moléculas biológicas. Num primeiro momento, ocorre peroxidação lipídica, seguida de

degradação proteica e finalmente danos à integridade ao DNA (SUN, 1990). A peroxidação lipídica sofrida pelas membranas celulares resulta em alterações em sua estrutura e permeabilidade (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENECHINI, 1984), ocasionando perda de seletividade iônica e liberação de enzimas lisossomais hidrolíticas, contidas em organelas. Além disso, a lipoperoxidação também ocasiona a formação de aldeídos de baixo peso molecular, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinoneal (4-HNE), que por sua vez reagem com proteínas citoplasmáticas formando outros produtos tóxicos, frequentemente culminando em morte celular (HERSHKO, 1989).

Há mecanismos responsáveis por proteger as células de danos oxidativos causados pelas ERO (Tabela 1), sendo esses conhecidos como o sistema antioxidante. Os antioxidantes são moléculas que, quando presentes em concentrações menores que o estrato oxidável, sejam capazes de inibir ou reduzir a oxidação dessas outras moléculas de modo eficaz (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O efeito antioxidante pode ser alcançado através de mecanismos de ação distintos: pela inibição da formação de espécies reativas; pela inibição da ação das ERO; ou pela reparação do dano oxidativo (BARBOSA et al., 2010). Os elementos antioxidantes podem ser classificados como não enzimáticos ou enzimáticos. Os principais antioxidantes não enzimáticos são obtidos pela dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol e β -caroteno (precursores das vitaminas E e A, respectivamente). Já os enzimáticos são compostos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e pela glutathione peroxidase (GPx) (BARBOSA et al., 2010), que atuam catalizando diferentes substratos reativos em produtos menos reativos.

A SOD cataliza a reação de dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Complementando o sistema antioxidante, as enzimas CAT e GPx catalisam a conversão do peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio. Essa etapa sendo de suma importância para a prevenção de estresse oxidativo, visto que do peróxido de hidrogênio origina o radical $\bullet\text{OH}$ -, por meio da reação de Fenton, contra o qual não existe defesa antioxidante (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). A enzima GPx depende da manutenção do equilíbrio redox das glutathionas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (ROVER JÚNIOR et al., 2001). O sistema das glutathionas também está envolvido no metabolismo de xenobióticos, tais como drogas e poluentes ambientais, por meio da conjugação destes com a GSH, numa reação catalizada pela enzima glutathione S-transferase (GST) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A interação entre o sistema antioxidante e as espécies reativas de oxigênio se encontra ilustrada na Figura 12.

Figura 12. Interação entre o sistema antioxidante e as espécies reativas de oxigênio.



A ERO mais formada na cadeia de transferência de elétrons durante a respiração celular é o ânion superóxido. Esse ânion é dismutado em peróxido de hidrogênio, numa reação catalizada pela enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode ser transformado em oxigênio e água, por ação da enzima catalase, ou em água, por ação da enzima glutathione peroxidase. Essa última enzima, durante sua ação, oxida a glutathione reduzida. Para que a reserva de glutathione reduzida seja mantida, a enzima glutathione reductase reduz a glutathione oxidada, e para isso doa elétrons para o NADPH, oxidando-o em $NADP^+$. Ainda, há o funcionamento da enzima glutathione S-transferase, que realiza a conjugação de xenobióticos às moléculas de GSH, formando complexos que são mais facilmente excretados. SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; GPx – glutathione peroxidase; GR – glutathione reductase; GST – glutathione S-transferase; $O_2^{\bullet-}$ - ânion superóxido; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; H_2O – água; O_2 – gás oxigênio; GSH – glutathione reduzida; GSSG – glutathione oxidada; NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida); $NADP^+$ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada);

Hábitos como o tabagismo e o consumo de álcool, e a exposição a poluentes ambientais também são capazes de estimular a produção de ERO (RUDER *et al.*, 2009), alterando assim o perfil oxidativo.

1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA GENITAL FEMININO

As espécies reativas de oxigênio, em concentrações adequadas, apresentam atividades fisiológicas no sistema genital feminino, assim como nos demais órgãos e sistemas. Em concentrações elevadas, as ERO podem ocasionar outras alterações celulares já apresentadas anteriormente. Alterações estas que estão relacionadas com uma série de distúrbios do trato genital feminino, como endometriose (MIER-CABRERA *et al.*, 2011), síndrome dos ovários policísticos (PALACIO *et al.*, 2006), além de poder causar complicações na gravidez, causando abortos espontâneos (HEMPSTOCK *et al.*, 2003) e até mesmo pré-

eclâmpsia (RUMBOLD et al., 2008).

Nos ovários, as ERO podem inibir a esteroidogênese por desacoplar a adenilato ciclase do receptor de LH, interrompendo o transporte mitocondrial de colesterol (BEHRMAN et al., 2001); porém, podem também estimular a finalização da meiose I no oócito dominante num processo que pode ser inibido pela presença de antioxidantes. Antioxidantes esses responsáveis pela progressão da meiose II nesse tipo celular (BEHRMAN et al., 2001). Neste órgão, na fase folicular, os oócitos em crescimento aumentam a atividade de P450, resultando em maior formação de ERO, cujo aumento está intimamente correlacionado à oocitação (RUDER; HARTMAN; GOLDMAN, 2009). As ERO promovem apoptose nos folículos, enquanto GSH e FSH contrabalançam esse estímulo no folículo em desenvolvimento. A produção de estrógeno, estimulada pelo FSH, aumenta a produção de catalase no folículo dominante, evitando que esse folículo entre em apoptose, finalizando seu desenvolvimento e sendo oocitado (BEHRMAN et al., 2001).

Na fase lútea, o corpo lúteo em involução parece ser uma grande fonte de ERO, pela grande presença de leucócitos neste local, principalmente neutrófilos, residentes e infiltrados (BEHRMAN et al., 2001). A enzima SOD parece estar intimamente ligada à manutenção do corpo lúteo do início ao meio desta fase. As concentrações de Cu,Zn-SOD no corpo lúteo no início desta são maiores e reduzem com o decorrer de sua regressão, assim permitindo o aumento da concentração de ERO característica da involução (AGARWAL et al., 2012).

No útero, há relação entre a atividade e produção das diferentes isoformas da enzima SOD com a descamação e com a decidualização do endométrio. Pelo estímulo da progesterona, a SOD protege o endométrio do dano oxidativo. Na ausência desse hormônio, essa enzima desencadeia a produção de outros fatores mediadores, culminando em vasoconstrição e eventual descamação do endométrio (SUGINO, 2007).

Em condições fisiológicas, as ERO influenciam positivamente a placentação (BURTON; JAUNIAUX, 2004). Durante o desenvolvimento da placenta, uma vez completa a formação das lacunas maternas, ou espaços intervilosos, ocorre um burst respiratório (AGARWAL et al., 2012), quando as concentrações de ERO elevam-se rapidamente devido a súbita chegada de O₂ ao tecido. Em humanos, o burst costuma ocorrer entre a 10^a e 12^a semana de gestação e, caso antecipado, está relacionado ao acontecimento de abortos espontâneos e ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia (AGARWAL et al., 2012; WEBSTER; ROBERTS; MYATT, 2008). Ainda no início do desenvolvimento placentário, níveis elevados de ERO podem causar aumento na nitração da p38 MAPK, diminuindo assim sua atividade catalítica,

ocasionando implantações em porções mais luminais do endométrio e restrição no crescimento placentário, observado em pacientes com pré-eclampsia (AGARWAL et al., 2012).

1.5 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos são substâncias ou produtos químicos destinados à prevenção ou controle de pragas, dentre elas, os vetores de doenças. No Brasil, o uso de agrotóxicos é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Atualmente, o Brasil ocupa posição de destaque entre os maiores consumidores mundiais dessas substâncias, juntamente com a China e os Estados Unidos. No ano de 2018, o Brasil foi país que mais importou substâncias que apresentam uso banido na União Européia (UE) (TYGEL et al., 2024). Desde janeiro de 2019, foram liberados e registrados mais de 1059 substâncias pelo IBAMA, ANVISA e Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (DAUFENBACK et al., 2022), dos quais um terço apresenta uso proibido na UE por conta de riscos à saúde e ao meio ambiente (CARNEIRO; SANTORUM, 2021). Em 2022, houve aumento de 86% no número de famílias atingidas por contaminações durante pulverizações de agrotóxicos no território nacional, em relação ao ano anterior (TYGEL et al., 2024).

Os agrotóxicos são classificados de acordo com seus alvos de ação e graus de periculosidade ambiental. De acordo com seus alvos de ação, eles podem ser classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, fumegantes e rodenticidas (RIBAS; MATSUMURA, 2009). De acordo com sua periculosidade, essas substâncias podem ser classificadas em classes de I – altamente perigosos, à IV – pouco perigosos. A população pode ser contaminada por três diferentes modos: pela via ocupacional, caracterizada pela contaminação de trabalhadores que manuseiam diretamente os compostos; pela via ambiental, no qual a população entra em contato pela dispersão dessas substâncias no meio ambiente; e a via alimentar, na qual ocorre a ingestão de alimentos contaminados com essas substâncias (MOREIRA et al., 2002).

No Brasil, aproximadamente 80% dos agricultores utilizam os agrotóxicos a fim de aumentar sua produtividade, assim, a via ocupacional é a principal em casos de contaminação e intoxicação aguda. Dentre 2006 e 2017, as vendas de agrotóxicos cresceram 2,5 vezes (DAUFENBACK et al., 2022), e foram notificados mais de cem mil casos de intoxicação por agrotóxicos, dos quais três mil resultaram em óbito (DATASUS 2020). Dentre os anos de 2010 e 2020, 1.987 pessoas foram à óbito em decorrência de intoxicação aguda por agrotóxicos (CARNEIRO; SANTORUM, 2021).

A via de exposição alimentar também é de extrema relevância no Brasil, uma vez que os agrotóxicos podem atingir os lençóis freáticos e alimentos que serão posteriormente ingeridos pela população. De acordo com o Ministério da Saúde e a Anvisa, um quarto dos municípios brasileiros apresentam 27 agrotóxicos na água potável e 51% dos alimentos contêm resíduos de agrotóxicos.

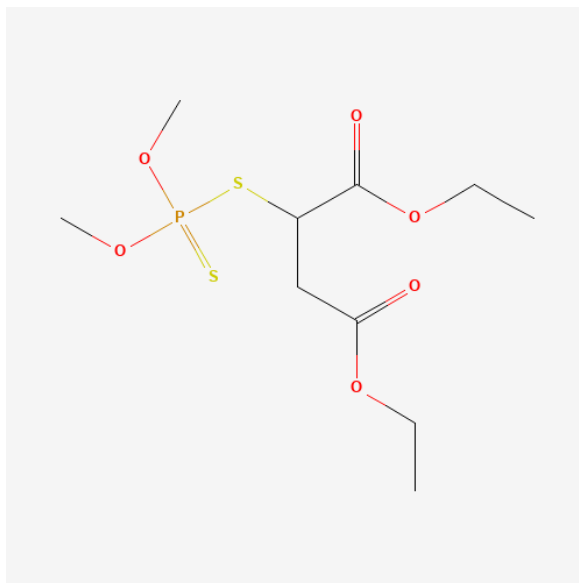
Essas substâncias, as quais estamos constantemente expostos, podem interferir na síntese e ação de hormônios, agindo como desreguladores endócrinos, atuando em receptores de estrógenos e andrógenos (FONTENELE et al., 2010). Além disso, recentemente têm-se correlacionado a exposição à agrotóxicos e o aumento dos casos de câncer e doenças nos sistemas reprodutivos e endócrino (DAUFENBACK et al., 2022).

1.6 ORGANOFOSFORADOS E O MALATION

Um dos grupos de agrotóxicos mais utilizados em larga escala é da classe dos organofosforados (OFs). Essas substâncias apresentam atividade inseticida, portanto são utilizadas no controle e combate de pragas e mosquitos vetores. Essas substâncias e seus metabólitos são frequentemente detectados em tecidos humanos (TSAI; LEIN, 2021), pois são altamente lipossolúveis e hidrolizados rapidamente (ALONZO; CORRÊA, 2003), sendo absorvidos por vias dérmica, respiratória e/ou digestiva.

O malation é um inseticida pertencente a classe dos organofosforados, cuja nomenclatura química é Dietil 2-dimetoxifosfinotioilsulfanilbutanodioato (PubChem, 2024), e é utilizado na agricultura, indústria e prática veterinária desde a década de 1980 (BADR, 2020). Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ (PubChem, 2024) e sua fórmula estrutural se encontra demonstrada na Figura 13. Compostos pertencentes a classe dos organofosforados são considerados moderadamente ou fracamente polares, e moderados ou não persistentes quanto à sua meia vida (EPA, 2000). O malation apresenta meia vida de 32 horas em pH 7,4 e temperatura de 37,4°C (EPA, 2000). Quanto à classificação toxicológica, a OMS classifica este inseticida como classe III – moderadamente tóxico, além de ser classificado como classe II – muito perigoso ao meio ambiente, quanto à seu grau de periculosidade (ATSDR, 2003). O malation é altamente utilizado por possuir alta eficácia como inseticida e baixa toxicidade em mamíferos quando comparado com outros OFs, apresentando dose letal 50 (DL50) em ratos varia entre 1500 e 2000 mg/kg, por via oral (EPA, 2000).

Figura 13. Fórmula estrutural do Dietil 2-dimetoxifosfinotioilsulfanilbutanodioato.



Fonte: PubChem, 2024.

No Brasil, o uso do malation no combate ao mosquito do gênero *Aedes* – vetor dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya – teve início no ano de 2009 (Brasil, 2016a), substituindo o uso dos inseticidas piretróides, para o qual esses mosquitos já apresentavam resistência (IOC, Fiocruz, 2011). Além da resistência aos inseticidas previamente utilizados, características como a alta atividade biológica, instabilidade na biosfera, fácil produção e baixo custo tornaram ainda mais atrativo o uso do malation (SILVA; DE CARLI, 2021). Em 2015, as medidas de combate ao *Aedes* foram intensificadas, devido ao aumento no número de casos de microcefalia em recém-nascidos relacionados à infecção com o vírus Zika, com a criação do Plano Nacional de Enfrentamento à Microcefalia. Neste plano, preconizou-se o combate do mosquito adulto com o uso de inseticidas químicos, e assim, reduzir a proliferação da doença (Brasil, 2015b).

Nesse contexto, os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e os Agentes de Combate a Endemias (ACE) são os mais expostos diretamente ao composto através de equipamentos contaminados (ZARA et al., 2016) e por meio da manipulação do inseticida durante seu uso (PESSOA et al., 2016). Leme e colaboradores (2014), evidenciaram que o uso de EPIs não é o suficiente para bloquear 100% do composto, assim, este entra em contato com a pele dos manuseadores. Além disso, as vestimentas retêm o composto, assim exibindo risco de contaminação ambiental para a população que vive nas áreas de pulverização e dos agentes responsáveis por esse processo (ATSDR, 2003). De acordo com Possavatz e colaboradores (2014), a principal fonte de contaminação do malation é pela água, além disso, resíduos desse

pesticida foram encontrados na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, uma vez que a atividade agrícola nessa região é elevada, principalmente com cultivo de soja, milho e algodão (IBGE, 2013; MATO GROSSO, 2005).

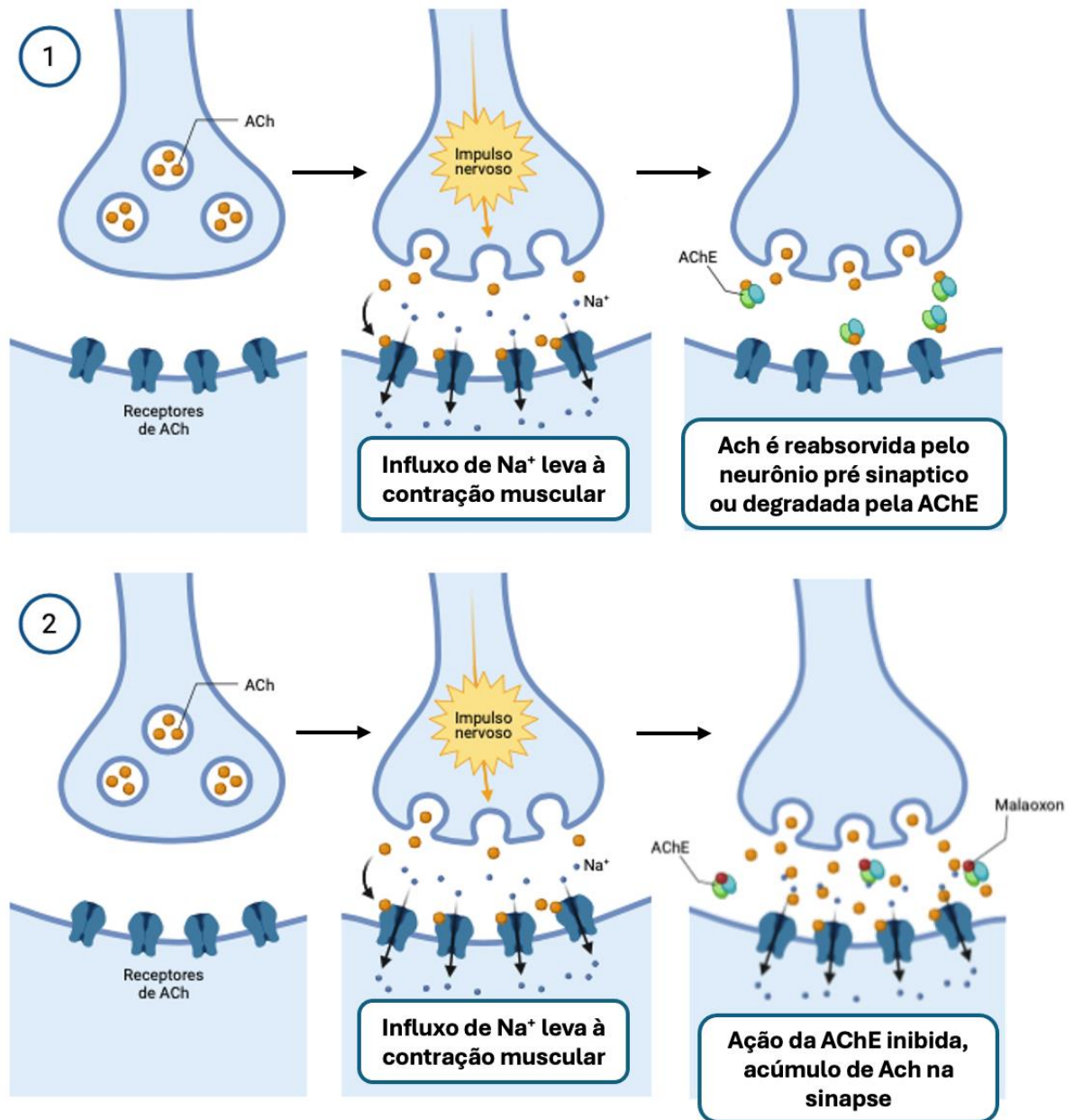
O uso do malation no Brasil é aprovado pela Anvisa para culturas como alface, citros, arroz, feijão e soja (ANVISA, 2012), e também pode ser utilizado na erradicação de insetos, formigas e piolhos por meio de formulação comercial, disponível para venda em casas agropecuárias.

Durante a degradação ambiental do inseticida em questão é formado um metabólito primário do mesmo, o malaaxon. Esse metabólito é considerado aproximadamente 40 vezes mais tóxico que o malation propriamente dito (BAIOMY et al., 2015), e fica disponível ao contato humano direto (EPA, 2000). Por ser considerado menos tóxico que outras substâncias de sua classe, o malation é um dos pesticidas mais utilizados na atualidade (BOGEN; SINGHAL, 2017; OZSOY et al., 2016a), aumentando, assim, a probabilidade de contato e intoxicação.

Esse inseticida pode ser absorvido pelo organismo por diferentes vias: dérmica, respiratória e digestiva, sendo a última de maior importancia nas intoxicações acidentais em crianças, principalmente, e em adultos durante o consumo e preparo de alimentos contaminados (LARINI, 1996), porém, a via dérmica representa a maior via de exposição ocupacional (TCHOUNWOU et al., 2015). Devido a sua natureza lipofílica, esse inseticida é rapidamente absorvido e distribuído em diversos tecidos e órgãos, podendo ser danoso aos diferentes sistemas do organismo (SELMi et al., 2018).

Uma vez no organismo, o malation é metabolizado em malaaxon, metabólito responsável por seu mecanismo de ação, no fígado, por intermédio da ação do citocromo P-450, que realiza sua desulfuração (ABDOLLAHI et al., 2004; HALL, 2017). Em baixas concentrações, essa desulfuração é catalizada pelas CYP1A2, majoritariamente, e CYP2B6. Já em altas concentrações, a CYP3A4 também apresenta papel importante na metabolização deste (BURATTI et al., 2005). Em ratos, a meia vida do malaaxon no sangue é de 1,4 dias, quando administrado via oral (ATSDR, 2003) e, da mesma forma que o malation, é rapidamente excretado pela urina (84%) e pelas fezes (6%) nas primeiras 24h (EPA 2000).

Figura 14. Mecanismo de ação do malaoxon.



Fonte: o próprio autor. Criado no biorender.com.

Em 1, o impulso nervoso chega à região da fenda sináptica, culminando na liberação da acetilcolina (ACh), o neurotransmissor envolvido nesse processo, na fenda. Uma vez na sinapse, a ACh se liga ao seu receptor no músculo, levando ao influxo de Na^+ e consequente contração muscular. Após a ativação de seu receptor, a ACh é retirada da sinapse pela reabsorção pelo neurônio pré-sináptico, por meio de vesículas, ou por sua degradação pela enzima acetilcolinesterase (AChE), que degrada a ACh em colina e acetato. Uma vez retirada da sinapse, seu estímulo é cessado e a fenda sináptica retorna ao estado inicial de repouso. Em 2, está representada a fenda sináptica após a administração de malaoxon. Assim como na situação fisiológica, o impulso nervoso chega à região da fenda sináptica, causando a liberação de ACh na sinapse. Por sua vez, a ACh na fenda liga-se ao seu receptor, culminando nos eventos descritos acima. Entretanto, o estímulo não é cessado pois a enzima AChE apresenta seu sítio de ligação ocupado pelo malaoxon, o metabólito do malaoxon responsável pelo seu mecanismo de ação. Essa inibição na atividade da AChE propicia um acúmulo de ACh na fenda sináptica, que continua se ligando

ininterruptamente ao seu receptor. Quanto mais estímulo nervoso chega pelo neurônio pré-sináptico, mais ACh é liberada na fenda e maior o estímulo dela no músculo, levando assim a um estímulo contrátil ininterrupto, eventual tetania e demais efeitos tóxicos.

Sua ação se dá no sistema nervoso, tanto de insetos quanto de mamíferos, por meio da inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE) através de sua fosforilação, conforme esquematizado na Figura 14. Ocasionalmente, assim, um acúmulo de acetilcolina (ACh) nas fendas sinápticas e junções neuromusculares (DHOUIB et al., 2015). Em insetos, o acúmulo deste neurotransmissor nas fendas causa hiperestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos (FIGUEIREDO et al., 2018), com posterior interrupção da propagação dos estímulos nervosos, paralização e morte desses indivíduos (BRAGA; VALLE, 2007 ; TAYLOR, 1996). Em mamíferos, o acúmulo de ACh nas sinapses também induz a uma ativação exacerbada dos receptores muscarínicos e nicotínicos nos músculos e nervos, causando agitação, hipersalivação, convulsões, falhas respiratórias e a eventual morte (MILESON et al., 1998; VELMURUGAN et al., 2017). Dentre os efeitos de intoxicação aguda por malation pode-se citar: dificuldade respiratória (CHOI et al., 1998), distúrbios cardiovasculares (DIVE et al., 1994) e gastrointestinais (RIVETT; POTGIETER, 1987).

Além disso, alguns contaminantes nas formulações comerciais deste inseticida podem aumentar sua toxicidade (BURATTI et al., 2005), como alguns inibidores das carboxilesterases. Tanto o malation como o malaoxon podem ser detoxificados por meio da ação destas enzimas, originando ácido monocarboxílico, que compete com o malation pelo citocromo P-450. Uma vez inibidas, ocorre um desbalanço da competição por esse citocromo, promovendo a formação de malaoxon (BURATTI et al., 2005; CHEN et al., 2013).

De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO), a NOAEL (do inglês, No Observable Adverse Effect Level) para a toxicidade sistêmica de ratos, em exposição via oral de 1 a 26 semanas, foi de 34 mg/kg de peso corpóreo ao dia. Para humanos, a NOAEL foi considerada de 29 mg/kg ao dia, via oral por dois anos. Enquanto as doses de: 400 mg/kg não causou toxicidade materna; 130 mg/kg não causou alterações nos sistemas reprodutivos; e 0,3 mg/kg por 47 dias não apresentou toxicidade em humanos. A ingestão diária aceitável (IDA) deste composto para humanos é de 0-0,3 mg/kg de peso corpóreo (FAO, 1997; ANVISA) e a concentração máxima aceitável na água, para a OMS, é de 1 µg/L (VASSEGHIAN et al., 2022).

A principal causa de toxicidade do malation é pela formação de radicais livres e desbalanço no sistema antioxidante enzimático, causando assim estresse oxidativo (BROCARDI et al., 2005; FORTUNATO et al., 2006; KOVACIC, 2003). O estresse oxidativo pode variar de acordo com a via e as doses de exposição ao malation, idade dos animais e

distribuição tecidual (SILVA et al., 2014). Além disso, mais recentemente, têm-se apontado a indução de resposta inflamatória, genotoxicidade, apoptose e imunomodulação como mecanismos tóxicos deste inseticida (BADR, 2020).

1.7 TOXICIDADE REPRODUTIVA DO MALATION

Em 2003, a Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças dos EUA (ATSDR) declarou que as evidências gerais observadas até o momento sugeriam que o malation não apresentava toxicidade geral para o sistema genital feminino, mas que a falta de estudos de qualidade não permitiam chegar a uma conclusão definitiva (ATSDR, 2003). Desde então, têm-se melhor elucidado os efeitos danosos da exposição ao malation, que abrange os diferentes sistemas do organismo, e estudos recentes têm demonstrado um potencial tóxico do malation para o sistema genital feminino.

Koç e colaboradores (2009), demonstraram redução no peso dos ovários, diminuição no número de folículos ovarianos viáveis e aumento de folículos atrésicos em associação à estresse oxidativo em ratas adultas expostas ao malation na dose de 33 mg/kg ao dia, por 15 dias, via intraperitoneal. Em um estudo mais recente, Ozsoy e colaboradores (2016), demonstraram que uma única exposição de ratas adultas ao malation na dose de 100 mg/kg *via gavage* induziu alterações histopatológicas nos ovários e apoptose de folículos ovarianos, demonstradas por aumento da caspase-3, além de reduzir os níveis de SOD neste órgão. De maneira semelhante, num modelo de exposição intraperitoneal a 50 mg/kg ao dia de malation por duas semanas, demonstrou aumento nos níveis de estresse oxidativo nos ovários, por redução nas reservas de GSH e aumento de MDA neste órgão (ABBASABAD ARAB et al., 2018).

Num modelo de exposição intraperitoneal a 30 mg/kg de malation ao dia, por 35 dias, Yong e colaboradores (2021) demonstraram uma redução no número estros, promoção de autofagia e apoptose nas células ovarianas e redução nos níveis de estrógeno. Essas alterações se deram por meio de danos oxidativos, aumento de ERO e redução nas enzimas CAT, SOD1 e SOD2, além de redução na atividade das enzimas StAR e CYP17A, que participam na via de síntese de esteroides. Controversamente, outro estudo com ratas adultas expostas ao malation, nas doses de 10 e 100 mg/kg administrado *via gavage* durante 15 semanas, não apresentaram alteração na concentração de estradiol, tampouco alterações histopatológicas nos ovários (OZMEN; AKAY, 1993).

Um estudo recente de nosso grupo de pesquisa, em um modelo de exposição juvenil e peripuberal ao malation, nas doses de 10 e 50 mg/kg ao dia *via gavage* por 38 dias, demonstrou alterações histopatológicas nos ovários e úteros de fêmeas expostas. Essas alterações foram mediadas por dano oxidativo e alteração na expressão de genes relacionados ao ciclo celular, proto-oncogenes e oncogenes, porém, sem alterar a concentração plasmática de estrógeno. Neste estudo, visualizamos aumento no tamanho dos folículos ovarianos e ovócitos, além de maior número de folículos atresícos, aumento de MDA e SOD e redução na atividade da enzima GST nos ovários desses animais. A expressão ovariana de genes como ER- β , β -catenina, Bcl-2, FOXO e Slug, um supressor tumoral e um proto oncogene, foi alterada pela exposição à esse pesticida. No útero, verificamos aumento na atividade de GST e SOD, indicando uma situação de estresse oxidativo também neste órgão, além da expressão alterada de genes como ER- α , β -catenina, Bcl-2, Slug e TP53 (ERTHAL-MICHELATO, FRIGOLI, et al., 2024).

Em relação à fertilidade, Waldron Lechner e Abdel-Rahman (1984), num modelo de exposição de fêmeas Sprague-Dawley a 1 e 50 mg/kg de malation diariamente *via gavage* por 3 meses e durante a gestação, não verificaram alteração na fertilidade desses animais, nem no peso das placentas ou fetos dessas fêmeas. Contudo, na dose de 50 mg/kg, verificou-se aumento de pontos hemorrágicos no útero das ratas expostas. Um estudo com modelo de exposição de pré-concepcional de ratas adultas ao malation, nas doses de 0,1, 14 e 140 mg/kg diariamente *via gavage* por 21 a 25 dias, não alterou o desenvolvimento intrauterino, porém, a prole de fêmeas expostas apresentaram intolerância a glicose, indicando o ocorrimto de reprogramação metabólica e potenciais alterações epigenéticas (BRUXEL et al., 2023). De forma conflitante, Souza (2017) em um modelo de exposição gestacional, na dose de 200 mg/kg *via gavage* diariamente nos últimos 13 dias da prenhes, não observou efeitos prejudiciais ao desenvolvimento intrauterino de ratos.

2 JUSTIFICATIVA

O malation é um inseticida utilizado desde a década de 1980 nas mais diversas culturas agrícolas e prática agropecuária. No Brasil, o Ministério da Saúde autorizou seu uso para o combate de mosquitos vetores de doenças de importância para a saúde pública desde 2009. No ano de 2015, devido ao aumento de casos de microcefalia relacionados a infecção por Zika durante a gestação, intensificou-se o combate ao mosquito do gênero *Aedes*, por meio da pulverização de pesticidas, na tentativa de conter o aumento de casos e a disseminação dessas doenças.

Evidências têm demonstrado o potencial tóxico do malation para o sistema reprodutor feminino em humanos e em modelos experimentais com animais, tanto em fêmeas adultas quanto em fêmeas em idade peripuberal. Os eventos promovidos pela exposição ao malation estão ligados a danos mediados por estresse oxidativo e alterações em genes que controlam o ciclo celular. Contudo, há escassez na literatura acerca da repercussão da exposição a esse inseticida durante a peripuberdade sobre a fertilidade feminina. Devido à importância da puberdade para a maturação do sistema genital feminino e para o estabelecimento do eixo HHG, que coordena as funções deste sistema, é de suma importância a avaliação de risco da exposição a esse composto nesta janela crítica do desenvolvimento. Além disso, a reserva folicular ovariana já é estabelecida ao nascimento, assim, quaisquer insultos sofridos por estas células, ainda nos ovários, podem apresentar repercussões tanto para a fertilidade dos indivíduos expostos, quanto para a prole destes.

O conceito DOHaD refere-se à ideia de que condições ambientais e nutricionais às quais um indivíduo está exposto durante janelas críticas do desenvolvimento, como a vida intrauterina, a infância e a puberdade, podem influenciar de forma significativa e duradoura na saúde e desenvolvimento de doenças ao longo da vida. Assim, sob a luz do conceito DOHaD e sabendo da importância da peripuberdade para a maturação do sistema genital feminino, esse estudo contribui para o entendimento dos efeitos tóxicos do malation sobre a fertilidade, e de forma tardia sobre a placentação e o desenvolvimento intrauterino da prole de mães expostas anteriormente à concepção.

3 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Visto a escassez de informações específicas na literatura e da relevância clínica, social e política do assunto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a exposição pré-concepcional a baixas doses de malation durante os períodos juvenil e peripuberal pode causar prejuízos a fertilidade, placentação e desenvolvimento intrauterino em ratas *Wistar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência do malation na instalação da puberdade dos animais através da observação das datas da abertura vaginal e primeiro estro;
- Verificar a influência do malation sobre o potencial de fertilidade por meio da contagem de corpos lúteos nos ovários, pontos de implantação e placentas nas fêmeas adultas;
- Avaliar a toxicidade renal e hepática da exposição ao malation, por meio de dosagens bioquímicas de ureia, creatinina, ALT e AST no soro das fêmeas;
- Verificar a influência da exposição pré-concepcional durante os períodos juvenil e peripuberal ao malation sobre a função placentária na vida adulta, por meio de parâmetros biométricos dos fetos, e morfométricos das placentas;
- Avaliar a fisiologia ovariana e placentária, através da dosagem de estradiol e progesterona;
- Verificar a influência do malation sobre parâmetros morfométricos nos úteros da fêmeas prenhes expostas ao malation;
- Analisar a qualidade do líquido amniótico da prole de fêmeas expostas de forma pré-concepcional ao malation, por dosagens bioquímicas de enzimas e metabólitos e de estresse oxidativo neste;
- Contribuir com dados sobre os efeitos e mecanismos tóxicos da exposição ao inseticida malation sobre a adaptação à gestação dos úteros e placentação através da avaliação dos marcadores de estresse oxidativo.

4 ARTIGO

Exposição pré-concepcional a baixas doses de malation ocasiona prejuízos reprodutivos em ratas Wistar: repercussões na fertilidade, placentação e desenvolvimento fetal

Artigo será submetido à revista – “Environmental Science & Pollution Research”
ISSN: 1614-7499
F.I. 2022: 5,8
Qualis CAPES 2017-2020 (Medicina II): A2

**Exposição peripuberal a baixas doses de malation ocasiona prejuízos reprodutivos na vida adulta:
repercussões na fertilidade, placentação e desenvolvimento fetal**

Giovanna Fachetti Frigoli¹, Ivana Regina da Costa¹, Julia Rodrigues Greggi², Milena Cremer de Souza¹, Pedro Rocha Tenorio³, Maria Isabel Mello Martins², Fábio Rodrigues Ferreira Seiva⁴, Fábio Goulart de Andrade⁵, Phelipe Oliveira Favaron⁶, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes^{6,*}

¹Departamento de Parasitologia, Imunologia e Patologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

²Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

⁴Departamento de Química e Bioquímica, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil;

⁵Departamento de Histologia Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil;

⁶Departamento de Biologia Geral Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

***Autor correspondente**

Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

Departamento de Biologia Geral

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, km 380, 86057-970

Londrina, PR, Brasil

+55 43 3371 4417

e-mail: glaura@uel.br

Resumo

O malation é um inseticida amplamente utilizado nas práticas agropecuárias desde a década de 1980. No Brasil, além do uso nas lavouras, foi intensamente utilizado na década de 2010 para combater o mosquito do gênero *Aedes*. Durante sua pulverização, toda a população, incluindo crianças e adolescentes, fica exposta a esse pesticida. Dada a importância da puberdade na maturação do sistema reprodutor feminino, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição pré-concepcional a baixas doses de malation durante os períodos juvenil e peripuberal prejudica a fertilidade, a placentação e o desenvolvimento intrauterino em ratas Wistar. Para isso, ratas foram expostas diariamente ao malation *via gavage* nas doses de 10 e 50 mg/kg, do DPN 22 ao 60. A partir do DPN 30, foi avaliada a instalação da puberdade nesses animais. Após o período de exposição, no primeiro proestro, as fêmeas foram acasaladas. As fêmeas prenhes foram mantidas até o DG 18, quando foram submetidas à eutanásia. A exposição ao malation adiantou a instalação da puberdade, porém não comprometeu a fertilidade ou a produção de estrógeno e progesterona pela placenta. Contudo, houve alterações metabólicas nas fêmeas expostas à maior dose, além de alterações na composição do líquido amniótico de sua prole. Além disso, a integridade uterina, a placentação e o desenvolvimento intrauterino foram prejudicados, com redução das reservas placentárias de glicogênio e aumento do estresse oxidativo nas placentas. Assim, concluímos que a exposição pré-concepcional a baixas doses de malation não prejudica a fertilidade, mas compromete a placentação e o desenvolvimento intrauterino.

Palavras-chave: pesticida, organofosforado, sistema genital feminino, placenta, DOHaD, reprogramação metabólica, líquido amniótico, estresse oxidativo

1. Introdução

O malation, um inseticida pertencente a classe dos organofosforados, está disponível no mercado desde a década de 1980, sendo atualmente um dos pesticidas mais utilizados no mundo, devido à sua menor toxicidade aguda em comparação com outros representantes de sua classe. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da enzima acetilcolinesterase, induzindo uma superativação colinérgica (Selmi et al. 2018). Em alguns países tropicais, o malation é utilizado para o controle da população de mosquitos vetores de doenças importantes para a saúde pública (Bhardwaj and Saraf 2014), como ocorre para o mosquito do gênero *Aedes* no Brasil, desde a década de 2010. O uso indiscriminado desse inseticida resulta em poluição ambiental, aumentando a exposição dos indivíduos a esse composto tóxico. Atualmente, estima-se que todos os indivíduos estejam expostos ao malation por diferentes vias (dos Santos et al. 2016; Navarrete-Meneses et al. 2017), sendo que metabólitos desse pesticida foram detectados na urina de mulheres que apresentavam dificuldade para engravidar (Streich et al. 2024). Para a Organização Mundial da Saúde, a ingestão diária aceitável desse inseticida em contaminações alimentares é de no máximo 0,02 mg/kg/dia, e a exposição prolongada, mesmo a baixas doses, pode acarretar efeitos tóxicos em diversos sistemas humanos (Zidan 2015; Badr 2020). Os mecanismos tóxicos do malation para os humanos envolvem indução de estresse oxidativo culminando em danos à integridade do DNA e ativação de vias pró-apoptóticas (dos Santos et al. 2016).

A infertilidade é uma condição que afeta o sistema reprodutor feminino ou masculino, caracterizada pela incapacidade de alcançar a gravidez após 12 meses de relações sexuais regulares sem uso de contraceptivos. Nas mulheres, a infertilidade resulta de alterações nos ovários, tubas uterinas, útero e/ou sistema endócrino (2023). Fatores como o aumento da idade materna, infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) e estresse emocional ou físico são reconhecidos como contribuintes para a infertilidade (Hart 2016). Além disso, escolhas de estilo de vida e a exposição a contaminantes ambientais podem impactar significativamente nesse processo (Vander Borgh and Wyns 2018).

A placenta é um órgão de origem materno-fetal que se desenvolve no útero durante a gestação, desempenhando funções cruciais para a manutenção da gravidez e o desenvolvimento fetal. Entre suas principais funções estão a troca de gases e nutrientes entre mãe e feto, a produção de hormônios essenciais para a manutenção da gestação, como estrógeno e progesterona, e a atuação como barreira imunológica, protegendo o feto de possíveis infecções e do próprio sistema imune materno, o qual poderia reconhecer o feto como um elemento estranho (non-self) (Carter 2012; Burton e Fowden 2015). Fatores como a receptividade uterina, a aposição do embrião, a invasão no estroma endometrial e a decidualização das células estromais são eventos críticos para a placentação (Hamid e Zakaria 2013; Furukawa et al. 2019). A desregulação desses processos durante a fase crítica do desenvolvimento placentário pode acarretar perda gestacional, prejuízos ao crescimento e desenvolvimento fetal (Rathbun e Hildebrand 2022), além de outras condições, como o desenvolvimento de pré-eclâmpsia (McMaster et al. 2004).

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram alterações morfofisiológicas nos sistemas reprodutores masculino (Erthal et al. 2020, 2022) e feminino (Erthal-Michelato e Frigoli et al. 2024), por meio de mudanças no perfil oxidativo, após a exposição a baixas doses de malation durante os períodos juvenil e peripuberal. No entanto, há uma escassez de pesquisas investigando o impacto da exposição ao malation em ratas durante fases cruciais do desenvolvimento pós-natal, especificamente nos períodos juvenil e peripuberal, sobre a fertilidade, placentação e desenvolvimento intrauterino. Modelos experimentais utilizando ratas adultas com exposição intraperitoneal de

33 mg/kg ao dia por 15 dias ou exposição *via gavagem* a 100 mg/kg demonstraram prejuízos aos ovários, associados à diminuição da atividade antioxidante desse tecido (Koç et al. 2009; Ozsoy et al. 2016).

Waldron Lechner e Abdel-Rahman (1984) demonstraram que a exposição de ratas adultas às doses de 1 e 50 mg/kg de malation via oral por 3 meses não alterou a fertilidade das fêmeas. No entanto, na maior dose, observou-se um potencial teratogênico da exposição pré-concepcional a esse pesticida. Outro estudo, em ratas expostas via gavagem à dose de 200 mg/kg de malation por dia nos 13 últimos dias de gestação, não demonstrou potencial teratogênico desse inseticida (Souza 2017). Um estudo prévio do nosso grupo, com exposição ao malation nas doses de 10 e 50 mg/kg por 38 dias durante a peripuberdade, comprometeu a integridade de folículos ovarianos e do endométrio uterino, juntamente com alterações no perfil oxidativo, expressão de genes envolvidos com a proliferação celular e vias anti-apoptóticas nesses órgãos (Erthal-Michelato e Frigoli et al. 2024). Assim, embora existam estudos na literatura descrevendo o potencial tóxico do malation para o sistema reprodutor feminino e seus possíveis impactos na fertilidade, ainda há uma lacuna sobre o potencial fértil de fêmeas expostas ao malation durante a janela crítica do desenvolvimento pós-natal, a peripuberdade.

O conceito DOHaD preconiza que condições ambientais e nutricionais às quais um indivíduo está exposto durante janelas críticas do desenvolvimento podem influenciar de forma significativa e duradoura na saúde e desenvolvimento de doenças ao longo da vida (Gluckman e Hanson 2022). Nesse contexto, ressaltamos que a reserva folicular ovariana é estabelecida ao nascimento (Bruxel et al. 2023), assim, os gametas femininos são expostos às condições ambientais e nutricionais durante todas as janelas críticas do desenvolvimento, desde a infância até sua ovocitação, após a puberdade. Além disso, é na puberdade que ocorre o estabelecimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, que contribui diretamente para a maturação e fisiologia do sistema genital feminino (Ojeda et al. 1980). Em ratas, a puberdade normalmente ocorre entre os dias pós-natais DPN 30 e 37 (Laffan et al. 2018). Além disso, distúrbios nessas janelas importantes do desenvolvimento, como a peripuberdade, podem acarretar alterações reprodutivas com diversos efeitos adversos na vida adulta (Sánchez-Garrido et al. 2022), que podem ser inclusive transmitidos através de gerações por meio de modulações epigenéticas. Assim, o objetivo do presente estudo é elucidar essa escassez de dados na literatura, investigando se a exposição pré-concepcional durante os períodos juvenil e puberal a baixas doses de malation prejudica a fertilidade, placentação e o desenvolvimento intrauterino da prole.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais e Condições Experimentais

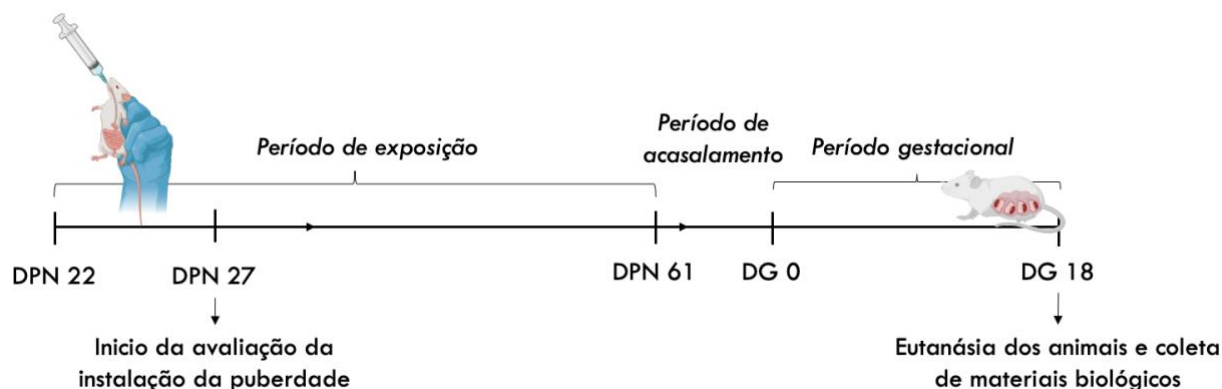
Trinta e seis ratas Wistar fêmeas (DPN 21) provenientes de ninhadas diferentes foram retiradas do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (CCB-UEL) e foram aclimatadas ao Biotério do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução (LT&DMR) por um dia antes do início do período experimental. Dezoito ratos Wistar machos (DPN 80) também provenientes de ninhadas diferentes também foram retirados e aclimatados no biotério do LT&DMR por três dias antes do início dos acasalamentos. Os animais foram mantidos em condições controladas (23°C; fotoperíodo com 12h claro e 12h escuro, com luzes apagadas às 19h), alocados em caixas de polipropileno (43x30x15 cm; 3 animais/caixa) e receberam água e ração *ad libitum*. O cuidado com os animais e procedimentos de manipulação seguiram as recomendações do Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório e o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina – OF. CIRC. CEUA. nº 17/2023 (Anexo A).

2.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: Controle (C, n=12), malation 10 mg/kg de peso corpóreo (M10, n=12), e malation 50 mg/kg de peso corpóreo (M50, n=12). O malation foi utilizado em doses inferiores à NOAEL (maior dose de uma substância que não produz efeitos adversos observáveis) para o sistema reprodutivo de ratos (130 mg/kg de peso corpóreo). A média das doses utilizadas nesse estudo representa o ajuste da dose de 0,03 mg/kg de peso corpóreo/dia em humanos (FOUREMAN; KENYON, 2006; Comissão Europeia). Considerando a variabilidade intraespécie, adicionamos um fator de segurança igual a 10 (Nielsen et al. 2008). As doses são consideradas baixas e relativamente seguras aos parâmetros reprodutivos (Welshons et al., 2006) e já foram utilizadas em estudos prévios de nosso grupo utilizando ratos Wistar machos (Erthal et al. 2020, 2022) e fêmeas (Erthal-Michelato, Frigoli et al., 2024).

As doses de malation foram administradas de acordo com Geng et al. (2015), que reportou alterações reprodutivas em ratos Wistar expostos a 54 mg/kg de peso corpóreo de malation durante a vida adulta. Neste estudo e nos anteriores de nosso grupo, o período de exposição foi ajustado para o DPN 22 ao 60, englobando os períodos juvenil e peripuberal, estabelecidos por Ojeda et al. (1980). Os animais foram expostos *via gavagem* a 10 ou 50 mg/kg de peso corpóreo. Todos os grupos experimentais foram tratados diariamente durante o período experimental e os animais no grupo controle receberam apenas o veículo (salina 0,9%). O delineamento experimental se encontra esquematizado na Figura 1.

Fig 1 Esquematização do delineamento experimental



2.3 Preparo da solução de malation

O malation (dietil-dimetoxitiofosfoíltio; CAS n. 121-75-5; Cheminova) foi adquirido da Dominus Química (Jandaia do Sul, Brasil). O composto foi diluído diariamente em solução salina (0,9%).

2.4 Determinação da instalação da puberdade

O dia médio de abertura vaginal completa foi determinado. A partir desse dia lavados vaginais foram realizados diariamente de acordo com Marcondes et al., 2002, para a determinação do dia do primeiro estro, caracterizado pelo predomínio de células epiteliais cornificadas no lavado. Os dias do primeiro estro e da abertura vaginal são indicativos da instalação da puberdade em ratas Wistar. O início das observações se deu no DPN 27.

2.5 Acasalamento dos animais

No primeiro proestro após o período de exposição, as fêmeas foram alocadas com machos sexualmente experientes na proporção 1:1, e deixadas overnight para acasalamento. Na manhã seguinte, realizou-se lavados vaginais dessas fêmeas, e, havendo espermatozoides no lavado constatou-se a prenhez desses animais. Esse dia foi considerado o dia gestacional (DG) 0. Durante a prenhez as fêmeas tiveram acesso à água e ração *ad libitum*, o seu consumo e o peso corpóreo dos animais foi aferido a cada 3 dias.

2.6 Coleta dos materiais

No DG 18, as fêmeas prenhes foram anestesiadas com associação de cetamina 100 mg/kg de peso corpóreo (Sedomin® 10%, Avelaneda, Argentina) e xilazina 10 mg/kg de peso corpóreo (Anasedan®, Paulínia, Brasil), pesadas e sua eutanásia foi realizada por punção cardíaca. Amostras de sangue foram coletadas em tubos soro gel (BD, Plymouth, Reino Unido) para dosagens hormonais e bioquímicas. Os fígados e rins foram retirados, pesados e descartados. Os ovários foram retirados, pesados em balança analítica e o número de corpos lúteos foi determinado. O útero gravídico foi exposto, e líquido amniótico foi coletado dos sacos amnióticos. Então, esse órgão foi retirado, pesado, e o número de implantações, placentas e fetos foi determinado. As placentas e seus respectivos fetos foram pesados, medidos com o paquímetro, e em seguida fixados em solução de paraformaldeído (PFA) 4%. Secções entre os pontos de implantação do corno direito do útero gravídico foram coletados e fixadas em PFA 4%. As secções do útero e 3 placentas por fêmea foram embebidas em Parafina Histológica (Synth®, Diadema, Brasil). Dos úteros, dezoito secções não consecutivas de 5 µm, separadas a cada 30 µm, foram obtidas, colocadas em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Das placentas, 8 secções não consecutivas de 5 µm espaçadas a cada 40 µm foram obtidas, colocadas em lâminas histológicas e coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). Outras porções do útero, entre os pontos de implantação e do corno esquerdo, e 3 placentas por fêmea foram retiradas e congeladas a -80 °C e destinadas para avaliação do perfil oxidativo. Outras 3 placentas por fêmea foram congeladas em -20 °C para posterior dosagem de glicogênio no tecido.

2.7 Teste de fertilidade

A partir do número de corpos lúteos nos ovários, e de implantações, placentas e fetos no útero, realizou-se o cálculo das taxas de perdas pré e pós implantacionais e o potencial de fertilidade das fêmeas e a taxa gestacional dos grupos experimentais de acordo com as fórmulas abaixo.

$$\text{Taxa de perda pré – implantação} = \frac{n^{\circ} \text{ corpos lúteos} - n^{\circ} \text{ implantações}}{n^{\circ} \text{ corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de perda pós – impantação} = \frac{n^{\circ} \text{ implantações} - n^{\circ} \text{ fetos vivos}}{n^{\circ} \text{ implantações}} \times 100$$

$$\text{Potencial de fertilidade} = \frac{n^{\circ} \text{ implantações}}{n^{\circ} \text{ corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Taxa gestacional} = \frac{n^{\circ} \text{ de fêmeas prenhes}}{n^{\circ} \text{ de fêmeas inseminadas}} \times 100$$

2.8 Dosagens hormonais e bioquímicas no soro

O soro foi obtido após centrifugação do sangue a 2400 rpm em 3,5 °C e armazenado a -20 °C até a realização dos ensaios. A dosagem de estradiol foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada do Hospital da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL), por quimioluminescência em um mesmo ensaio, para evitar erros interensaio. A dosagem de progesterona foi realizada por radioimunoensaio em empresa privada, também em ensaio único.

As dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose, triglicérides (TG), ureia, creatinina, colesterol total (CT) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram realizadas de acordo com as instruções dos kits comerciais (Gold Analisa®, Belo Horizonte, Brasil). As análises cinéticas foram realizadas em leitor de microplaca (MultiSkan Skyhigh, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). As dosagens de íons sódio, potássio e cloreto foram realizadas com o auxílio de um Analisador de *Gasometria RAPIDPoint® 500* (Siemens AG, Munique, Alemanha).

2.9 Análise morfológica dos úteros e placentas

Fotomicrografias dos úteros foram tiradas com o fotomicroscópio Opton (aumento de 100x) e com o software Motic (versão 3.1 para MacOS). Cinco medidas transversais do endométrio e do miométrio foram feitas em cada secção uterina fotografada, com o uso do software Image J (versão 2.14.0 para MacOS), totalizando 30 medidas de cada compartimento.

Fotomicrografias das secções placentárias coradas em PAS foram tiradas com o aumento de 400x. Dessas imagens, avaliou-se a área ocupada pelos capilares fetais, pelas lacunas maternas e pelos septos trofoblásticos na região labiríntica, também com o uso do software Image J. Na região da decídua, também em coloração de PAS, verificou-se qualitativamente a presença e extensão de grânulos de glicogênio.

No momento da eutanásia, mediu-se os comprimentos dos eixos maior e menor das placentas e a sua profundidade. A partir dessas medidas calculou-se a excentricidade placentária, e a área ocupada por esse órgão de acordo com os seguintes cálculos, de acordo com :

$$Excêntrica placentária = \sqrt{1 - \left(\frac{eixo\ maior}{eixo\ menor}\right)^2}$$

$$Volume\ placentário = \frac{eixo\ maior \times eixo\ menor \times profundidade \times \pi}{45}$$

2.10 Dosagens bioquímicas no líquido amniótico e na placenta

Uma alíquota das amostras de líquido amniótico foi congelada em freezer -20 °C, onde permaneceram até o momento da análise. As dosagens de proteínas totais, ureia, fosfatase alcalina, lactato, glicose total e cálcio total foram realizadas por quimioluminescência em aparelho automatizado (Sistema de Bioquímica Integrada Dimension® EXL 200™, Siemens, Munique, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens de íons sódio, potássio e cloreto foram realizadas com o auxílio de um Analisador de *Gasometria RAPIDPoint® 500* (Siemens AG, Munique, Alemanha).

Para avaliação da reserva placentária de glicogênico foi utilizado o método descrito por Schaubroeck e colaboradores (2022) com adaptações. Amostras teciduais, armazenadas em -20 °C, foram homogeneizadas com hidróxido de sódio 20% a 100 °C, em seguida, adicionou-se etanol na proporção de 2:1, para precipitação do

glicogênio. Os microtubos foram então centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em H₂O deionizada. Em microplaca, adicionou-se a amostra, ácido sulfúrico e fenol 5%, resultando em produto de coloração amarelada lido em 498 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido.

2.11 Avaliação do perfil oxidativo nos úteros, placentas e líquido amniótico

Os fragmentos armazenados em freezer -80 °C foram homogeneizados com um homogeneizador Ultraturrax (Marconi, Piracicaba, Brasil) em tampão fosfato-salina (pH 7.2) e normalizados a 1 mg de proteínas/mL de acordo com o método de Bradford (Bradford 1976). Deste homogenato, determinou-se a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carbonílicas (PCO), glutatona reduzida (GSH), glutatonas totais (GT), glutatona S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

Lipoperoxidação

A concentração de TBARS foi utilizada para quantificar a peroxidação lipídica, de acordo com o método descrito por Federici e colaboradores (2007). Os níveis de TBARS foram determinados pela diferença nas absorvâncias em 535 e 572 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Os resultados foram expressos em nanomols de TBARS/mg de proteína.

Proteínas carbonílicas

Para a quantificação de proteínas carboniladas utilizou-se o método de Reznick e Packer (1994) com adaptações. Para tal, utilizou-se de homogenatos proteicos normalizados a 1mg/mL. Foram adicionados 300uL de amostra homogeneizada em dois tubos, o branco, no qual foram adicionados 500uL de HCl 2M, e o reação, ao qual foram adicionados meio de reação contendo 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB; 0,1982%) diluído em HCl 2M. As reações foram incubadas por 1h com agitação vigorosa a cada 15 min. Após esse tempo, adicionou-se 500uL de ácido tricloroacético (TCA; 28%) em todos os tubos e aguardou-se 10 minutos para formação de precipitado. Em seguida, todos os tubos foram centrifugados a 9.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi ressuspensionado com 1 mL de solução de etanol e acetato de etila (1:1), em seguida os tubos foram centrifugados e tiveram seu sobrenadante descartado. Esse processo de lavagem do pellet foi repetido por mais 2 vezes. Então, adicionou-se 350 mL de solução aquosa de hidrocloreto de guanidina (57,31%) nos tubos, que foram agitados e a reação foi incubada por 10 minutos. Por fim, pipetou-se 150uL da solução final em microplaca e a absorvância foi medida em 380 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Glutatonas

As concentrações de GSH e GT foram realizadas de acordo com o proposto por RAHMAN e colaboradores, 2007. O método baseia-se na reação entre o ácido 5,5-ditiobis 20-nitrobenzóico (DTNB) e a GSH, resultando em um produto de coloração amarelada, cuja absorvância é medida em 412 nm. Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína.

Para a GT, o método baseia-se na redução da glutatona oxidada (GSSG) na amostra pela adição de NADPH, numa reação catalizada pela glutatona redutase (GR), que também é acrescida ao meio. Posteriormente,

a glutatona total, agora reduzida, é quantificada também por reação com DTNB com absorbância medida em 412 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

A concentração de (GSSG) foi calculado de acordo com o proposto por Carrara e colaboradores (2019), levando em consideração a estequiometria da reação. Os valores de GSSG foram calculados seguindo a equação:

$$GSSG (\mu\text{mol}) = [GT] - [GSH]/2$$

Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

A atividade da enzima GST foi avaliada conforme proposto por Keen e colaboradores (1976), espectrofotometricamente por meio da redução de GSH e lise de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), com formação tioésteres. A absorbância da reação foi medida a 340 nm durante 5 min em intervalos de 40 s. Os resultados foram expressos como μM de tioéter formados por minuto por mg de proteína.

Atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada por meio da degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A absorbância da reação foi medida em 240 nm por 1 min, em intervalos de 15 s (Aebi 1984). Os resultados foram expressos em $\text{mM}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína.

Atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima SOD foi determinada de acordo com o proposto por Senthikulmar com adaptações de Erthal et al. (2020). O método baseia-se na quantificação de complexos formados pelos ânions superóxido com o nitroblue tetrazolium (NBT) e com o hidrocloreto de sódio de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$), de coloração azulada, cuja absorbância foi medida em 560 nm por 2 min em intervalos de 15 s. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína.

2.12 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Brown-Forsythe e ao teste de Shapiro-Wilk, para análise da variância e de homoscedasticidade, respectivamente. Quando os pressupostos dos testes foram atendidos, foi realizado o teste de ANOVA one-way para avaliação da diferença entre os tratamentos. Quando os pressupostos não foram atendidos, os dados foram classificados como não-paramétricos e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Neste caso, realizou-se os pós testes de Tukey, quando utilizado ANOVA one-way, ou Dunn, após o teste de Kruskal-Wallis. Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M, quando paramétricos, ou mediana [q1 – q3], quando não paramétricos.

3. Resultados

A exposição a baixas doses de malation durante a peripuberdade adianta a instalação da puberdade, porém não altera a fertilidade, o peso corpóreo, dos órgãos reprodutivos, fígados e rins em ratas Wistar

Devido à ocorrência de falsos-positivos na identificação da gestação, em 1 fêmea do grupo controle e 2 do grupo M50, o número amostral do experimento foi ajustado e apenas as fêmeas realmente prenhes foram consideradas. Portanto, o grupo controle foi composto por 11 animais; M10 por 12 animais e M50 por 10 animais.

Observamos um adiantamento de um dia na abertura vaginal das fêmeas M50 em relação ao controle. Já a ocorrência do primeiro estro não foi alterada pela exposição ao malation. Os dados de instalação da puberdade se encontram dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros biométricos e bioquímicos de fêmeas expostas a baixas doses de malation durante a peripuberdade

Parâmetros	Grupos experimentais		
	Controle (n=11 animais)	M10 (n=12 animais)	M50 (n=10 animais)
Peso corpóreo DPN60 (g)	185,80 ± 5,02	195,60 ± 5,03	188,50 ± 4,54
Peso corpóreo DG18 (g)	302,00 ± 7,65	314,90 ± 8,55	308,90 ± 8,57
Instalação da puberdade			
Abertura vaginal (DPN)	30,64 ± 0,24	29,50 ± 0,38	29,17 ± 0,41 *
Primeiro estro (DPN)	33,00 [32,00 – 38,25]	36,00 [33,25 – 38,75]	36,00 [35,00 – 40,00]
Peso dos órgãos (g)			
Ovário direito	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,01
Ovário esquerdo	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Útero + fetos	38,39 [30,24 – 42,90]	40,80 [33,04 – 45,14]	42,52 ± [40,51 – 50,44]
Fígado	14,77 ± 0,57	15,19 ± 0,71	14,95 ± 0,60
Rins	1,03 [0,93 – 1,16]	1,13 [1,03 – 1,22]	1,08 [0,91 – 1,18]

Dados expressos como média ± E.P.M. ou mediana [q1 – q3]. ANOVA unidirecional ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelos testes de Tukey ou Dunn, respectivamente. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

O peso corpóreo, dos órgãos reprodutivos, fígados e rins, também dispostos na Tabela 1, não foi alterado pela exposição peripuberal ao malation.

Os parâmetros de perdas pré e pós implantação, potencial de fertilidade e taxa gestacional, apresentados na Tabela 2, não foram alterados pela exposição ao malation.

Tabela 2 Avaliação da fertilidade de fêmeas expostas a baixas doses de malation durante a peripuberdade

Fertilidade	Grupos experimentais		
	Controle (n=11 animais)	M10 (n=12 animais)	M50 (n=10 animais)
Número de corpos lúteos	14,09 ± 0,63	14,67 ± 0,43	15,10 ± 0,60
Número de fetos	11,45 ± 0,62	12,42 ± 0,66	13,60 ± 0,43
Número de placentas	11,82 ± 0,64	12,50 ± 0,66	13,60 ± 0,43
Número de implantações	12,36 ± 0,61	13,50 ± 0,60	14,10 ± 0,43
Taxa de perda pré-implantação (%)	6,67 [0,00 – 21,43]	6,11 [0,00 – 7,56]	6,46 [0,00 – 7,94]
Taxa de perda pós-implantação (%)	7,69 [0,00 – 12,50]	7,18 [1,47 – 15,11]	0,00 [0,00 – 8,69]
Potencial de fertilidade (%)	93,33 [78,57 – 100,00]	93,89 [92,45 – 100,00]	93,54 [92,06 – 100,00]
Taxa gestacional do grupo (%)	91,67	100	83,34

Dados expressos como média ± E.P.M. ou mediana [q1 – q3]. ANOVA unidirecional ou teste de Kruskal-Wallis.

A exposição pré-concepcional a baixas doses de malation não afeta a produção de hormônios placentários, mas aumenta os níveis séricos de ureia em ratas prenhes e os níveis de Na⁺ no líquido amniótico

A concentração sérica dos hormônios estrógeno e progesterona não foi alterada pela exposição pré concepcional ao malation. Observou-se um aumento de aproximadamente 100x nos níveis séricos de ureia no grupo M50, em comparação ao controle. Em relação aos demais parâmetros bioquímicos avaliados, não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais. Esses dados se encontram dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros bioquímicos e dosagem hormonal e de eletrólitos no soro de fêmeas expostas a baixas doses de malation durante a peripuberdade

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle (n=11 animais)	M10 (n=12 animais)	M50 (n=10 animais)
Bioquímicos			
Coolesterol total (mg/dL)	82,26 [78,40 - 99,51]	83,46 [80,23 - 102,80]	83,85 [74,00 - 87,36]
Coolesterol HDL (mg/dL)	44,93 ± 3,21	46,91 ± 3,62	40,57 ± 2,20
Glicose (mg/dL)	114,90 ± 3,32	109,10 ± 5,00	107,00 ± 3,37
Triglicérides (mg/dL)	280,00 ± 17,90	268,30 ± 14,78	279,90 ± 11,16
ALT (U/L)	25,75 [24,09 - 29,95]	28,77 [26,49 - 31,63]	28,64 [24,49 - 30,88]
AST (U/L)	27,85 [23,40 - 28,29]	25,36 [22,72 - 31,75]	25,93 [23,97 - 28,92]
Creatinina (mg/dL)	0,75 ± 0,11	0,81 ± 0,06	0,65 ± 0,06
Ureia (mg/dL)	10,81 [5,41 - 23,68]	65,88 [27,54 - 196,90]	1127,00 [808,10 - 1303,00]****
Eletrólitos			
Na ⁺ (mmol/L)	128,80 [116,60 - 130,4]	129,20 [127,70 - 134,70]	131,20 [123,00 - 137,8]
K ⁺ (mmol/L)	4,49 ± 0,24	4,14 ± 0,38	4,14 ± 0,23
Cl ⁻ (mmol/L)	95,00 ± 1,44	96,11 ± 0,96	96,50 ± 1,68
Hormônios			
Estradiol (pg/mL)	30,56 ± 1,20	29,75 ± 1,40	32,13 ± 2,26
Progesterona (ng/mL)	75,95 ± 9,05	77,73 ± 11,03	91,51 ± 12,15

Dados expressos como média ± E.P.M. ou mediana [q1 - q3]. ANOVA unidirecional ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelos testes de Tukey ou Dunn, respectivamente. ****p<0,0001.

A exposição ao malation aumentou a concentração de íon sódio no líquido amniótico da prole na maior dose, em comparação ao controle. Os demais parâmetros avaliados: proteínas totais, ureia, fosfatase alcalina, lactato, glicose total, cálcio total, potássio e cloreto não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais. Esses dados estão dispostos na Tabela 4. Em relação ao perfil oxidativo, disposto na Fig 1, a exposição pré-concepcional ao malation não alterou os parâmetros de dano oxidativo e antioxidantes avaliados no líquido amniótico.

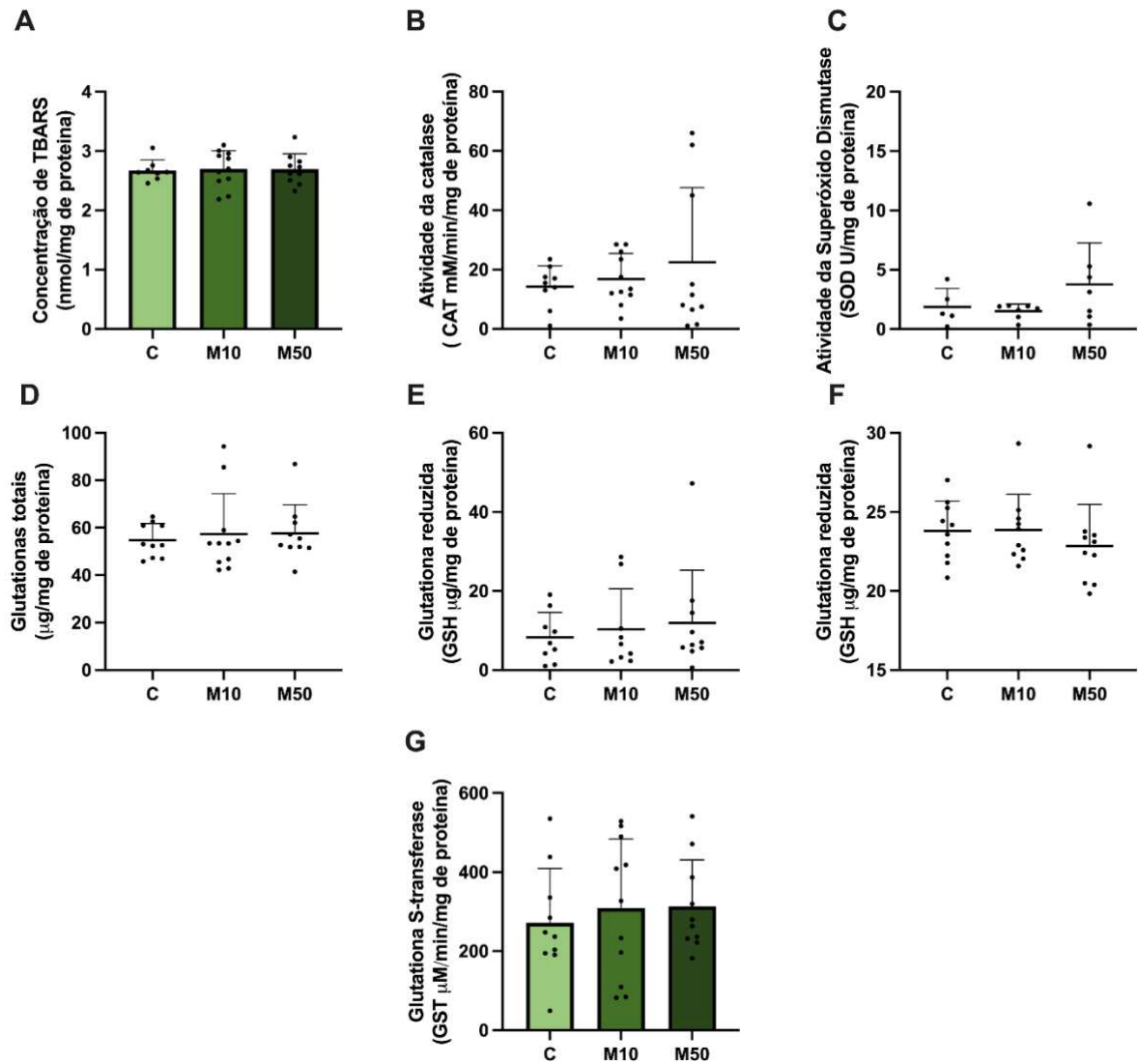
Tabela 4 Parâmetros bioquímicos e concentração de eletrólitos no líquido amniótico de fetos de mães expostas de forma pré-concepcional a baixas doses de malation durante a peripuberdade, no GD18

Fluido amniótico	Grupos Experimentais		
	Controle (n=11 animais)	M10 (n=12 animais)	M50 (n=10 animais)
Parâmetros bioquímicos			
Proteínas totais (g/dL)	0,20 [0,10 - 0,40]	0,35 [0,20 - 0,58]	0,30 [0,15 - 0,45]
Lactato (mmol/L)	3,80 ± 0,12	4,10 ± 0,07	3,92 ± 0,15
Fosfatase alcalina (U/L)	14,55 ± 2,40	17,58 ± 2,18	17,00 ± 2,82
Glicose (mg/dL)	56,09 ± 2,03	57,92 ± 1,47	56,50 ± 2,02
Ureia (mg/dL)	49,00 [45,00 - 52,00]	48,50 [44,25 - 52,00]	49,00 [47,25 - 53,25]
Cálcio total (mg/dL)	7,70 [7,70 - 8,60]	8,20 [7,33 - 8,55]	9,00 [7,13 - 9,43]
Eletrólitos			

Na ⁺ (mmol/L)	124,3 ± 0,88	125,7 ± 0,57	128,4 ± 0,57***
K ⁺ (mmol/L)	5,62 [5,31 – 5,79]	5,43 [5,29 – 5,93]	5,71 [5,44 – 5,80]
Cl ⁻ (mmol/L)	108,00 [108,00 – 109,00]	107,00 [106,30 – 109,80]	110,00 [109,00 – 111,00]

Dados expressos como média ± E.P.M. ou mediana [q1 – q3]. ANOVA unidirecional ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelos testes de Tukey ou Dunn, respectivamente. ***p<0,001.

Fig 2 Perfil oxidativo do líquido amniótico de fetos cujas mães foram expostas ao malation de forma pré-concepcional durante a peripuberdade à baixas doses de malation



A e G Dados expressos como média ± E.P.M. ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey. **B, C, D, E e F** Dados expressos como mediana [q1 – q3]. Teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. C n=10 animais; M10 n=12 animais; M50 n=11 animais.

A exposição pré-concepcional durante a peripuberdade a baixas doses de malation compromete a integridade uterina em ratas Wistar prenhes

A exposição ao malation causou redução no miométrio dos animais expostos à ambas as doses. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais em relação à espessura do endométrio. Os dados da morfometria uterina estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 Avaliação morfométrica do útero de fêmeas expostas a baixas doses de malation durante a peripuberdade

Compartimentos uterinos	Grupos experimentais		
	Controle (n=4 animais)	M10 (n=4 animais)	M50 (n=4 animais)
Miométrio (µm)	207.60 [143.50 – 359.70]	153.70 [121.70 – 180.30]****	177.20 [128.10 – 214.70]*
Endométrio (µm)	227.40 [115.00 – 295.00]	209.30 [142.30 – 321.20]	228.70 [160.40 – 300.80]

Dados expressos como mediana [q1 – q3]. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, respectivamente.

*p<0.05; ****p<0.0001.

Em relação ao perfil oxidativo uterino, cujos dados estão dispostos na Figura 3, a exposição ao malation causou aumento na atividade da enzima CAT nos úteros das fêmeas em M10. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais nos demais parâmetros avaliados neste órgão.

A exposição pré-concepcional a baixas doses de malation compromete a placentação e o desenvolvimento intrauterino em ratas Wistar, por meio de comprometimento da reserva de glicogênio e estresse oxidativo nas placentas

Os dados biométricos dos fetos se encontram dispostos na Tabela 6. Apesar do peso fetal não ter sido afetado, há uma redução no comprimento de crown-rump (CRL) dos fetos em ambas as doses de malation em comparação ao grupo controle.

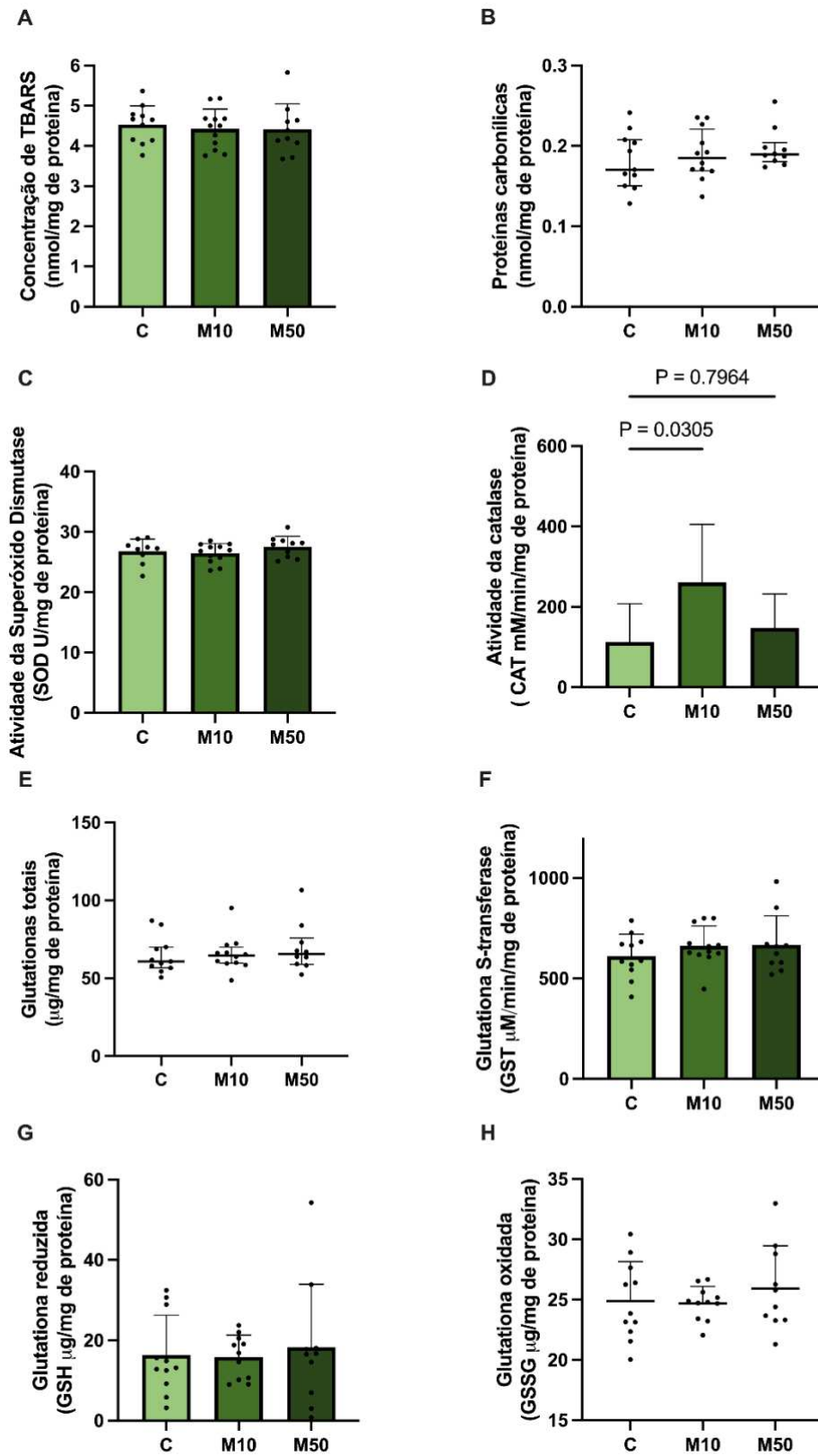
Tabela 6 Dados biométricos dos fetos e morfométricos das placentas de mães expostas a baixas doses de malation durante a peripuberdade, antes da gravidez, no DG18

	Grupos experimentais		
	Controle (n=11 animais)	M10 (n=12 animais)	M50 (n=10 animais)
Parâmetros fetais			
Peso (g)	1,72 [1,61 – 1,83]	1,72 [1,59 – 1,83]	1,69 [1,62 – 1,83]
Comprimento de crown-rump (cm)	2,30 [2,20 – 2,40]	2,20 [2,10 – 2,40]***	2,20 [2,15 – 2,40]***
Razão de peso feto/placentário (g)	3,58 [3,26 – 3,90]	3,79 [3,38 – 4,21]*	3,58 [3,35 – 3,94]
Morfometria placentária			
Peso (g)	0,49 [0,44 – 0,53]	0,45 [0,42 – 0,52]**	0,47 [0,43 – 0,52]
Excentricidade	0,53 [0,40 – 0,60]	0,53 [0,41 – 0,58]	0,56 [0,42 – 0,63]
Volume (cm ³)	0,033 [0,028 – 0,044]	0,025 [0,018 – 0,037]***	0,022 [0,014 – 0,036]****
Profundidade (cm)	0,40 [0,30 – 0,40]	0,30 [0,25 – 0,40]****	0,30 [0,25 – 0,40]****
Lacunas maternas (%)	22,49 ± 2,32	24,99 ± 1,04	22,41 ± 1,19
Capilares fetais (%)	5,74 ± 0,60	7,36 ± 0,87	3,89 ± 0,79
Septos trofoblásticos (%)	71,77 ± 1,48	67,65 ± 1,48	73,69 ± 1,69

Dados expressos como média ± E.P.M. ou mediana [q1 – q3]. ANOVA unidirecional ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelos testes de Tukey ou Dunn, respectivamente.*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

O peso das placentas estava diminuído apenas no grupo M10, e o volume e profundidade deste órgão estavam diminuídos em ambos os grupos que receberam malation, em comparação ao grupo controle. Contudo, a proporção da área ocupada pelas lacunas maternas, capilares fetais e septos trofoblásticos não foi afetada pela

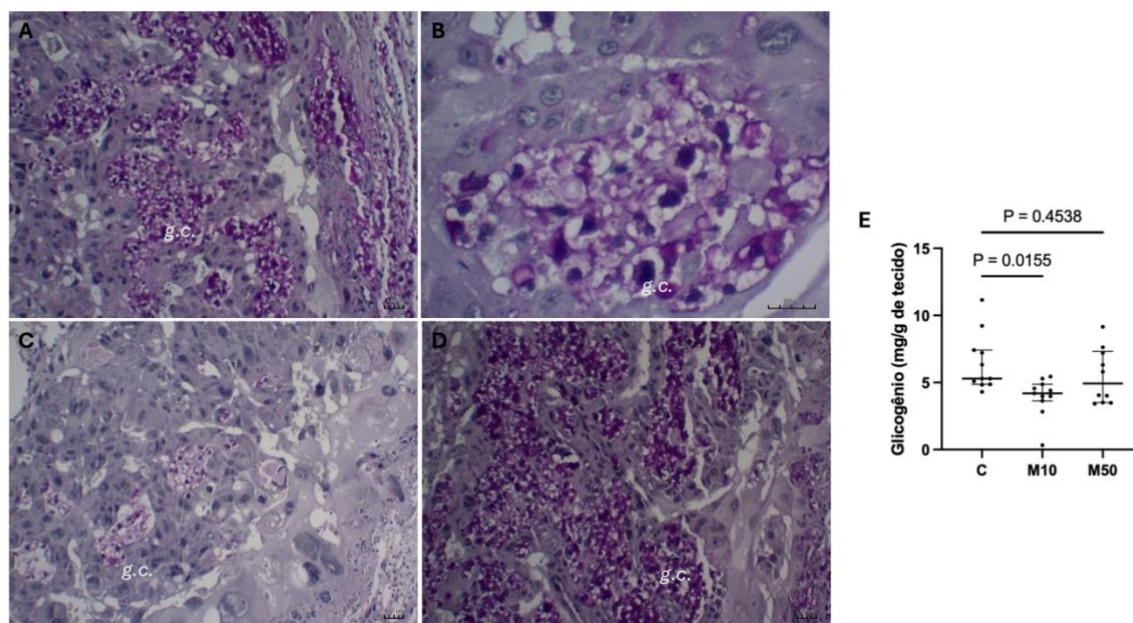
Fig 3 Perfil oxidativo do útero gravídico de fêmeas expostas a baixas doses de malation durante a peripuerdade



A, C, D, F e G Dados expressos como média ± E.P.M. ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey. **B, E e H** Dados expressos como mediana [q1 - q3]. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. C n=10 animais; M10 n=12 animais; M50 n=11 animais.

exposição ao malation. A exposição ao malation, na menor dose, aumentou a razão de peso feto-placentário, em relação ao grupo controle. Esses dados se encontram dispostos na Tabela 6. Além disso, verificamos redução da reserva de glicogênio nas placentas em M10 (Figura 4).

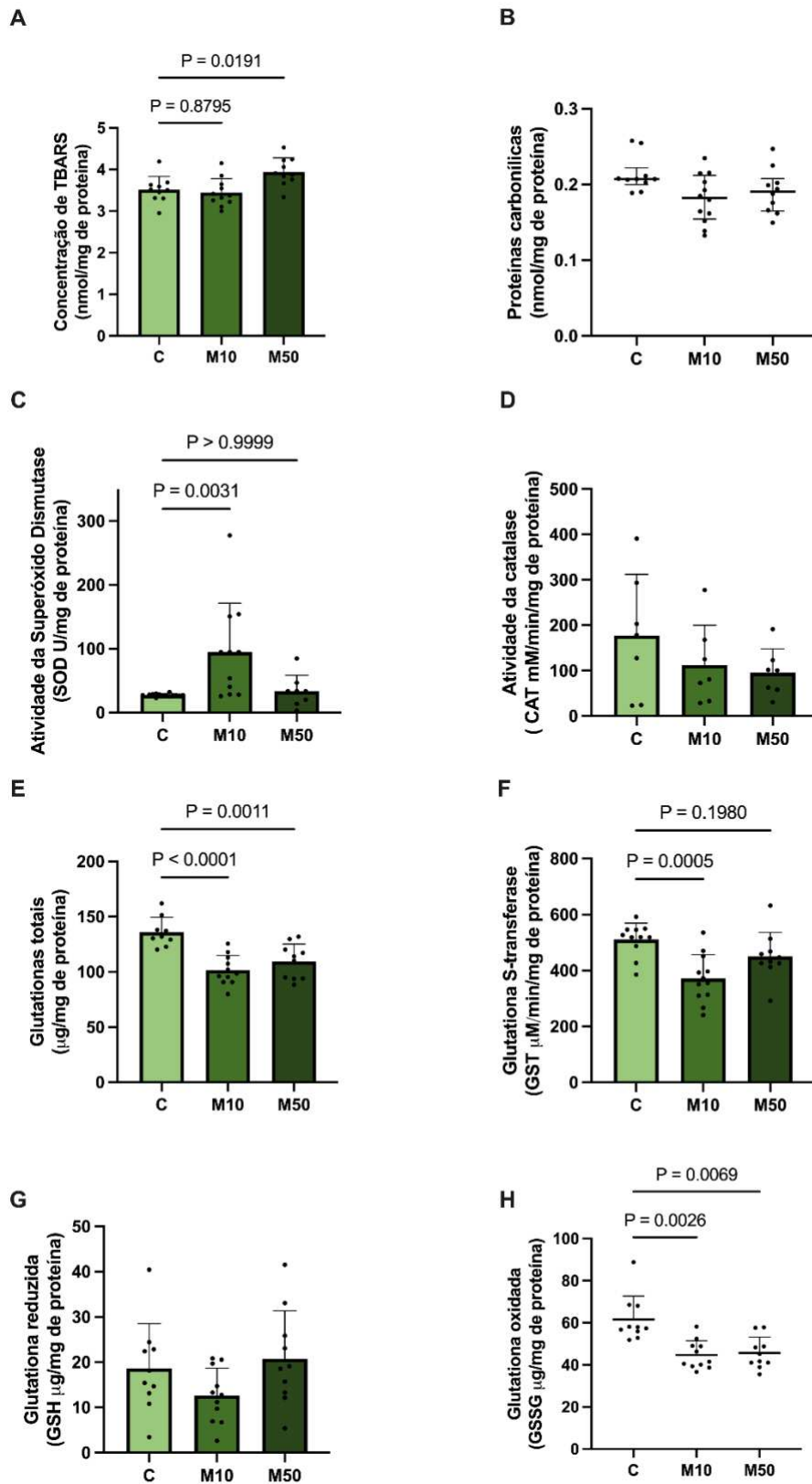
Fig 4 Redução na reserva placentária de glicogênio em fêmeas após exposição pré-concepcional a 10 mg/kg de malation



A e B Reservas de glicogênio preservada nos indivíduos do grupo controle; **B** Ilha de células glicogênicas em maior aumento, evidencia a presença de grânulos citoplasmáticos com glicogênio marcados com PAS; **C** Prejuízo na reserva placentária de glicogênio após exposição pré-concepcional a 10 mg/kg de malation; **D** Reserva placentária de glicogênio preservada após exposição pré-concepcional a 50 mg/kg de malation; **E** Dosagem bioquímica de glicogênio nas placentas. Dados expressos como mediana [q1 - q3]. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn; C n=10 animais; M10 n=12 animais; M50 n=11 animais.

Em relação perfil oxidativo, nas placentas, verificou-se aumento nos níveis de TBARS no grupo M50, diminuição na atividade de GST e aumento na atividade de SOD em M10 e diminuição na quantidade de GT e GSSG nos animais expostos a ambas as doses de malation, em comparação ao grupo controle. Contudo, não há diferenças significativas nos níveis de PCO e GSH e atividade da enzima CAT entre os grupos experimentais. O perfil oxidativo das placentas se encontra disposto na Figura 5.

Fig 5 Perfil oxidativo das placentas após exposição pré-concepcional a baixas doses de malation durante a peripuberdade



A, C, D, E, F e G Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey. **B e H** Dados expressos como mediana [q1 – q3]. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. C n=10 animais; M10 n=12 animais; M50 n=11 animais.

4. Discussão

Neste estudo, demonstramos que a exposição pré-concepcional durante a peripuberdade à baixas doses de malation causa prejuízos à placentação e ao desenvolvimento intrauterino, apesar de não alterar a fertilidade de ratas Wistar.

A placenta é o órgão materno-fetal responsável pelo aporte nutricional ao embrião/feto em desenvolvimento. O tamanho da placenta tem sido utilizado como um indicativo da influência materna e da toxicidade no crescimento e desenvolvimento fetal, uma vez que seu funcionamento afeta diretamente o peso, o tamanho e a circulação fetal (A. Wallace and Tetyana 2023). Portanto, alterações no tamanho placentário podem ser preditivos de alterações morfofuncionais nesse órgão. Assim, a redução no volume e profundidade placentária observada neste estudo indica prejuízos à placentação após a exposição pré-concepcional à baixas doses de malation durante a peripuberdade. Expos

O CRL é uma medida comumente utilizada para estimar a idade fetal e avaliar o crescimento e desenvolvimento intrauterino, portanto alterações no tamanho fetal podem indicar anormalidades de crescimento e desenvolvimento. Neste estudo, a redução do CRL em fetos cujas mães foram expostas a ambas as doses de malation, demonstra que a exposição pré-concepcional a baixas doses deste pesticida prejudica o crescimento intrauterino. Souza (2017) não observou alteração no desenvolvimento intrauterino de fetos Wistar expostos diariamente durante a gestação (DG 6-14) à 200 mg/kg de malation. Contudo, Durom et al. (2024) observaram redução no CRL de fetos de roedores expostos durante a gestação ao ethion, outro inseticida da classe dos organofosforados, na dose de 3,43 mg/kg, sem alteração no peso fetal. Assim, com base nos resultados deste estudo e em dados anteriores, pode-se inferir que o potencial tóxico do malation e de outros organofosforados é ampliado em doses menores, refletindo em repercussões tardias.

Baseando-nos no conceito DOHaD, acreditamos que a redução do CRL e o aumento de íons Na^+ no líquido amniótico dos fetos são indicativos de uma reprogramação metabólica nesses animais. A reprogramação metabólica refere-se ao processo pelo qual períodos críticos do desenvolvimento podem programar a função do organismo de forma duradoura. Nesse contexto, ressaltamos que os gametas femininos já estão todos formados ao nascimento (Bruxel et al. 2023), assim, as células que originaram esses fetos estiveram expostas ao malation, e seus efeitos tóxicos, durante seu período de quiescência e maturação nos ovários, previamente à concepção. Alterações no metabolismo da glicose, como na diabetes, tem sido relacionadas com aumento nos níveis plasmáticos de sódio (BRAUN et al. 2015). Bruxel e colaboradores (2023), num modelo de exposição pré-concepcional ao malation nas doses de 14 e 140 mg/kg por 21 a 25 dias, verificou desbalanço no metabolismo de glicose em ratas prenhes e em sua prole. Contudo, os níveis plasmáticos de glicose das fêmeas expostas ao pesticida 120 minutos após o início do teste de intolerância a glicose eram comparáveis ao dos animais controle. Desta forma, o aumento sutil de Na^+ observada no líquido amniótico da prole em M50 pode estar relacionado à intolerância à glicose, mesmo que os níveis de glicose séricos maternos e no líquido amniótico não estejam alterados neste estudo, devido ao modo de análise.

Em relação aos níveis exacerbados de ureia nas fêmeas prenhes em M50, num primeiro momento hipotetizamos a ocorrência de rabdomiólise nesses animais, visto que a exposição à organofosforados é uma das principais causas para o desenvolvimento desta condição (Guis et al. 2005). Contudo, ao verificarmos a atividade da enzima creatinina quinase, padrão ouro para diagnóstico desta condição (Almeida et al. 2022), essa hipótese foi descartada. Outras causas para o aumento de ureia são: desidratação, alto consumo de proteínas, desbalanços no

metabolismo proteico e redução no fluxo sanguíneo aos rins (Rodwell 2018). Como não houve alteração no consumo hídrico ou na ingesta alimentar das fêmeas expostas ao malation em relação ao grupo controle (Figura Suplementar 1), descartamos a desidratação e o consumo exacerbado de proteína nesses animais. Outra hipótese é de que o malation cause um estado de catabolismo proteico, evidenciado pelo aumento de ureia plasmático nas mães que foram expostas a maior dose de malation e pela hipernatremia no âmnio de sua prole. Uma vez que esses parâmetros têm sido relacionados à hipermetabolismo proteico, com e sem alterações na homeostase de glicose (Anderson and Barrett 2013; Rugg et al. 2020).

O estresse oxidativo é uma condição em que há um desbalanço entre moléculas oxidantes e antioxidantes no organismo, conhecida por causar danos às membranas lipídicas, às proteínas e ao DNA celular, podendo levar à morte celular (Melchiorri et al. 1996; Ruder et al. 2009). Neste estudo, danos por estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica aumentada nas placentas em M50, e desbalanços em vias antioxidantes, como os observados pela redução na quantidade total de glutathionas nas placentas de ratas expostas à ambas as doses de malation e aumento na atividade da enzima SOD em M10, podem ser um dos mecanismos de danos atrelados às alterações placentárias que visualizamos. Corroborando com nossos resultados, Durom et al. (2024) também observaram desbalanço no perfil oxidativo nas placentas de ratas expostas durante os 13 últimos dias da gestação ao ethion na dose de 3,43 mg/kg, evidenciado por aumento na peroxidação lipídica e redução na atividade da CAT. El-Baz e colaboradores (2023), num estudo caso-controle, correlacionaram a presença de organofosforados no plasma à ocorrência de abortos espontâneos mediados por estresse oxidativo nas placentas de mulheres antes da 24ª semana gestacional.

As células glicogênicas na placenta são responsáveis por armazenar energia na forma de glicogênio. Sua função metabólica ainda é desconhecida, mas a hipótese mais aceita é que esse órgão armazena energia que será disponibilizada ao feto em situações adversas para garantir seu desenvolvimento normal (Coan et al. 2010). No decorrer da gestação, a reserva placentária de glicogênio aumenta, atingindo seu ápice no DG 16 e a partir desse dia, as reservas são exponencialmente degradadas (Akison et al. 2017). Concomitantemente à degradação do glicogênio placentário, ocorre o período de maior crescimento fetal (Tunster et al. 2020). Waldron Lechner, Abdel-Rahman e Klein (1984), num estudo com ratas Sprague Dawley adultas e exposição pré-concepcional por 3 meses, demonstraram que a exposição ao malation nas doses de 1 e 50 mg/kg não alterou o peso das placentas ou fetos. Contudo, dados mais recentes têm relacionado a exposição ao inseticida malation ao favorecimento de glicogenólise tanto no fígado (Rezg et al. 2007) quanto no músculo esquelético (Pournourmohammadi et al. 2005). Assim, a degeneração precoce nas reservas de glicogênio, observadas em M10, sugere também uma reprogramação para o favorecimento de glicogenólise na placenta, podendo afetar diretamente o suprimento de nutrientes ao feto. Além disso, uma das modificações que ocorrem durante a reação de decidualização é o aumento do armazenamento de glicogênio nestas células (Dean 2019). Desta forma, a redução observada pode também ser um indicativo de falhas na decidualização do endométrio nas fêmeas em M10. Modelos experimentais com roedores têm apontado uma relação direta de alterações nas reservas de glicogênio placentárias com o desenvolvimento de diabetes gestacional e pré-eclâmpsia (Tunster et al. 2020). Nesse mesmo contexto, a razão de peso feto-placentário é um dado utilizado para avaliar a eficiência da placenta, permitindo um melhor entendimento do crescimento e desenvolvimento fetal. Alterações nesse parâmetro podem ser indicativos de deficiências na função placentária, acarretando insuficiência de nutrientes ao feto em desenvolvimento. Nos animais em M10, o aumento na razão

feto-placentária indica prejuízos ao desenvolvimento fetal devido à redução precoce da reserva placentária de glicogênio.

No presente estudo, o aumento da atividade da enzima CAT no útero das fêmeas prenhes em M10, não acompanhado de dano oxidativo (TBARS ou PCO) e de recrutamento no sistema antioxidante de segunda linha (sistema glutationa), nos leva a hipotetizar que houve um excesso na produção de espécies reativas de oxigênio. Todavia, o aumento desta enzima antioxidante de primeira linha foi capaz de manter a homeostase oxidativa, evitando lesões oxidativas neste órgão. Corroborando com nossos resultados, o estudo prévio publicado pelo nosso grupo de pesquisa com o mesmo período e doses de exposição ao malation, que demonstrou, numa avaliação imediata, aumento da defesa antioxidante uterina, principalmente com mobilização dos antioxidantes de primeira linha (Erthal-Michelato, Frigoli et al. 2024).

Nesse mesmo estudo prévio, contudo, obtivemos resultados conflitantes em relação à avaliação morfométrica dos úteros de fêmeas expostas. Na avaliação imediata, visualizamos um aumento no miométrio em M10. No presente estudo, controversamente, verificamos um afinamento dessa camada nas ratas prenhes em ambos os grupos experimentais expostos ao malation. Esses resultados sugerem que a adaptação à gestação ocorre de forma diferente nos animais expostos ao malation. Devido ao mecanismo de ação do malation, por meio da inibição da enzima acetilcolinesterase, ocorre superestímulo dos tecidos musculares em animais expostos (Selmi et al. 2018), assim, supomos que houve hipertrofia desta camada muscular devido ao aumento em sua atividade. Portanto é plausível sugerir que, uma vez findada a exposição ao inseticida, essa camada uterina, lesionada pela ação colinérgica, sofre prejuízos durante a adaptação à gestação. Desta forma, a redução observada nesta camada uterina pode acarretar prejuízos para a contração muscular, que é de suma importância para o parto (Shynlova et al. 2009).

A instalação da puberdade em ratas Wistar ocorre normalmente entre os DPN 30 e 37 (Laffan et al. 2018). Controversamente, no estudo prévio de nosso grupo, não verificamos alteração na instalação da puberdade nas fêmeas durante a exposição ao malation (Erthal-Michelato, Frigoli et al. 2024). Contudo, neste estudo, com um número amostral maior por grupo experimental, verificamos um adiantamento de 1 dia na abertura vaginal em M50, em relação ao grupo controle, no DPN 29. O avanço na instalação da puberdade pode ser indicativo de desbalanços no eixo HHG durante seu estabelecimento (Qiu et al. 2020). Nesse contexto, um estudo coorte demonstrou a relação positiva entre o desenvolvimento precoce de características sexuais secundárias em meninas com a presença de um metabólito dos inseticidas da classe dos OFs no plasma destes indivíduos (Castiello et al. 2023). De acordo com Badr (2020), o malation é um conhecido disruptor endócrino, incluindo distúrbios no eixo HHG. Apesar disso, não verificamos alterações na produção de estrógeno e progesterona pela placenta após a exposição a baixas doses de malation.

No presente estudo, investigamos os efeitos da exposição pré-concepcional a baixas doses de malation em ratas Wistar, demonstrando suas consequências no desenvolvimento fetal e na fisiologia materna. A exposição ao malation resultou em redução no CRL dos fetos, indicando distúrbios no crescimento intrauterino, provavelmente por danos ocorridos à placentação, evidenciado por alterações no perfil oxidativo e reserva de glicogênio. As fêmeas expostas apresentaram adaptações morfométricas distintas no miométrio durante a gestação, apesar de apresentarem um início de puberdade normal. Ainda, demonstramos que a exposição ao malation levou a alterações metabólicas nas fêmeas prenhes em M50, refletido em níveis de ureia elevados e aumento na

concentração de sódio no líquido amniótico. Nossas descobertas reforçam a ideia de que a exposição a organofosforados pode ter efeitos duradouros e multifacetados na saúde reprodutiva e desenvolvimento fetal.

5. Conclusão

A partir desse modelo experimental, podemos concluir que a exposição a baixas doses do inseticida malation durante os períodos juvenil e peripuberal não prejudica a fertilidade, apesar de adiantar a instalação da puberdade em ratas Wistar. Além disso, a exposição pré-concepcional prejudicou a placentação, por meio de estresse oxidativo e degradação das reservas de glicogênio placentárias, com repercussões no crescimento intrauterino, sugerindo uma reprogramação metabólica nesses animais. Esses resultados indicam que o malation compromete a saúde reprodutiva de fêmeas expostas durante a janela crítica do desenvolvimento pós-natal desse sistema: a puberdade.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de uma bolsa de mestrado para G. F. Frigoli e pelo financiamento parcial (Código de Financiamento 001) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) processo 313704/2021-0. Agradecemos também ao Governo do Estado do Paraná, ao Conselho Paranaense de Ciência e Tecnologia, e à Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (dotação orçamentária #4560.19.571.06.6153; e-protocolo 21.234.745-0). Os autores não possuem interesses financeiros ou proprietários em quaisquer dados e materiais discutidos neste artigo. Todos os materiais de dados do trabalho estão disponíveis neste artigo.

Contribuição dos autores

Conceitualização: Giovanna Fachetti Frigoli e Glaura Scantamburlo Alves Fernandes. Metodologia: Giovanna Fachetti Frigoli e Glaura Scantamburlo Alves Fernandes. Análise formal e investigação: Giovanna Fachetti Frigoli, Julia Rodrigues Gregghi, Milena Cremer de Souza, Pedro Rocha Tenorio. Redação – preparação do rascunho original: Giovanna Fachetti Frigoli. Aquisição de financiamento: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, Fábio Goulart de Andrade, Fábio Rodrigues Ferreira Seiva, Phelipe Oliveira Favaron, Maria Isabel Mello Martins. Recursos: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, Fábio Goulart de Andrade, Fábio Rodrigues Ferreira Seiva, Phelipe Oliveira Favaron, Maria Isabel Mello Martins. Supervisão: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes e Phelipe Oliveira Favaron.

Financiamento

Os autores não receberam fundos, subsídios ou apoio de nenhuma organização para o trabalho submetido.

Declarações

Aprovação ética: Os procedimentos de cuidado e manejo de animais estavam de acordo com o Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH Publications No. 8023, revisado em 1978) e com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (protocolo CEUA/UEL número OF. CIRC. CEUA 019/2023).

Consentimento para participar: Este estudo não envolveu a coleta de amostras ou dados de pacientes; portanto, esta seção não é aplicável.

Consentimento para publicação: Este estudo não envolveu a coleta de amostras ou dados de pacientes; portanto, esta seção não é aplicável.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências bibliográficas

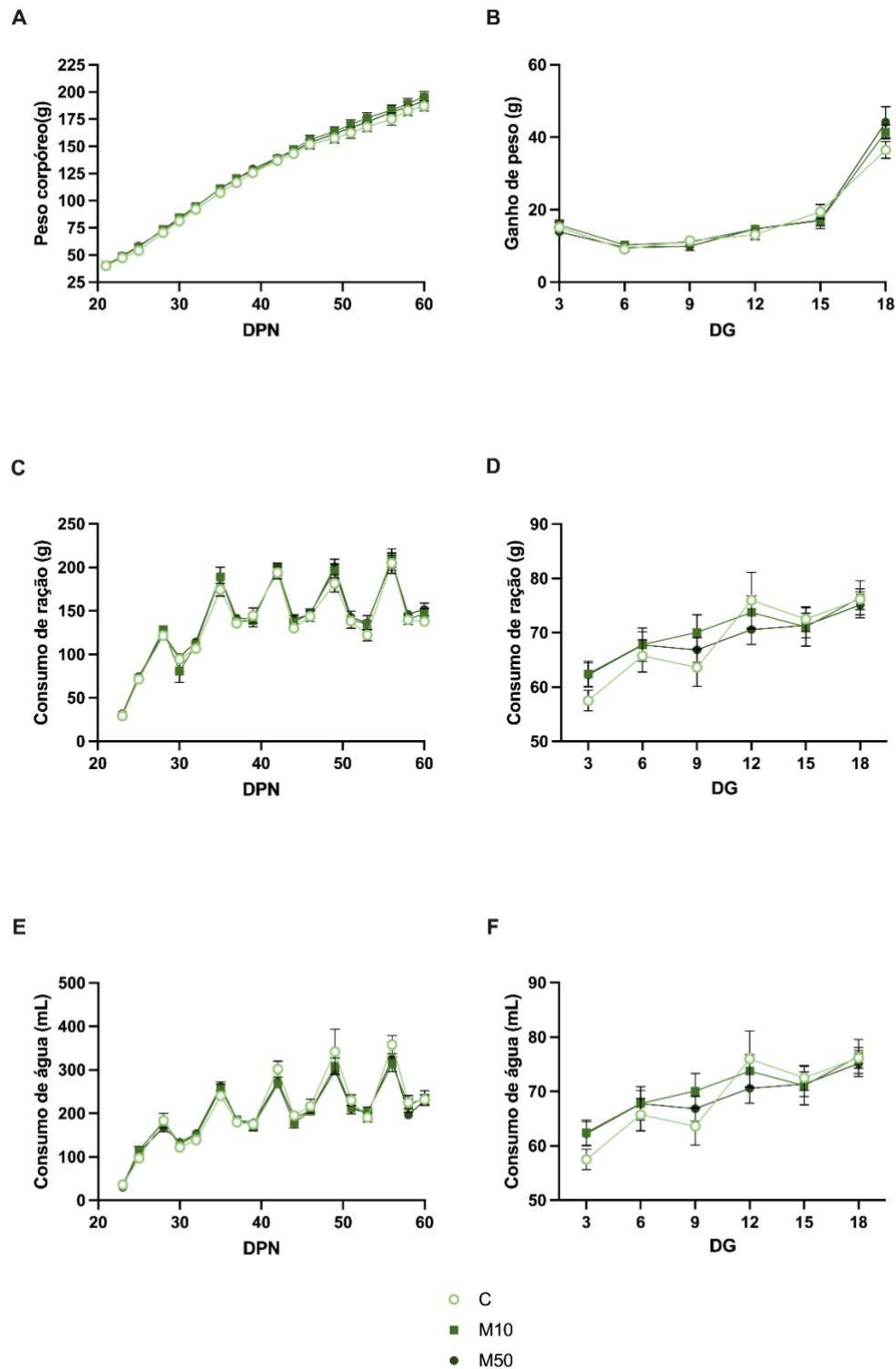
- A. Wallace H, Tetyana K (2023) Use of Toxicology in the Regulatory Process. In: Hayes' Principles and Methods of Toxicology. CRC Press, Boca Raton, p Vol1:41-Vol1:94
- Aebi H (1984) [13] Catalase in vitro. pp 121–126
- Akison LK, Nitert MD, Clifton VL, et al (2017) Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta* 54:52–58. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2017.01.114>
- Anderson A, Barrett EJ (2013) Severe Hyponatremia From a Urea-Induced Diuresis due to Body Protein Wasting in an Insulin-Resistant Type 2 Diabetic Patient. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1800–1802. <https://doi.org/10.1210/JC.2012-3225>
- Badr AM (2020) Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. *Environmental Science and Pollution Research* 2020 27:21 27:26036–26057. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-08937-4>
- Bhardwaj JK, Saraf P (2014) Malathion-Induced Granulosa Cell Apoptosis in Caprine Antral Follicles: An Ultrastructural and Flow Cytometric Analysis. *Microsc Microanal* 20:1861–1868. <https://doi.org/10.1017/S1431927614013452>
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:284–254
- BRAUN MM, BARSTOW CH, PYZOGA NJ (2015) Diagnosis and Management of Sodium Disorders: Hyponatremia and Hypernatremia. *Am Fam Physician* 91:299–307
- Bruxel MA, da Silva FN, da Silva RA, et al (2023) Preconception exposure to malathion and glucose homeostasis in rats: Effects on dams during pregnancy and post-term periods, and on their progeny. *Environmental Pollution* 316:120633. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.120633>
- Burton GJ, Fowden AL (2015) The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370:20140066. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0066>
- Carrara IM, Melo GP, Bernardes SS, et al (2019) Looking beyond the skin: Cutaneous and systemic oxidative stress in UVB-induced squamous cell carcinoma in hairless mice. *J Photochem Photobiol B* 195:17–26. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2019.04.007>
- Carter AM (2012) Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol Rev* 92:1543–1576. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00040.2011>
- Castiello F, Suárez B, Beneito A, et al (2023) Childhood exposure to non-persistent pesticides and pubertal development in Spanish girls and boys: Evidence from the INMA (Environment and Childhood) cohort. *Environmental Pollution* 316:120571. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.120571>
- Coan PM, Vaughan OR, Sekita Y, et al (2010) Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J Physiol* 588:527–538. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2009.181214>
- Dean M (2019) Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy. *Biol Reprod* 101:297–305. <https://doi.org/10.1093/BIORE/IOZ102>
- dos Santos AA, Naime AA, de Oliveira J, et al (2016) Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. *Arch Toxicol* 90:647–660. <https://doi.org/10.1007/S00204-015-1466-0>
- Durom EG, Aneesha VA, Kumar NVP, et al (2024) Prenatal exposure to ethion caused maternal and foetal toxicity in rats. *Reproductive Toxicology* 126:108607. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2024.108607>
- Eduarda Gomes Walkoff de Almeida M, Losi Francisco A, Gamel Sallum B, et al (2022) Manejo e conduta da rabdomiólise: uma revisão de literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde* 15:e11396–e11396. <https://doi.org/10.25248/REAS.E11396.2022>
- El-Baz MAH, Amin AF, Mohany KM (2023) Exposure to pesticide components causes recurrent pregnancy loss by increasing placental oxidative stress and apoptosis: a case–control study. *Sci Rep* 13
- Erthal RP, Siervo GEM de L, Frigoli GF, et al (2022) Malathion exposure during juvenile and peripubertal periods downregulate androgen receptor and 17- β -HSD testicular gene expression and compromised sperm quality in rats. *J Dev Orig Health Dis* 1–8. <https://doi.org/10.1017/S2040174422000599>
- Erthal RP, Staurengo-Ferrari L, Fattori V, et al (2020) Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal periods impairs testicular and sperm parameters in rats: Role of oxidative stress and testosterone. *Reproductive Toxicology* 96:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.05.013>
- Erthal-Michelato RP, Frigoli GF, de Aquino AM, et al (2024) Low doses of malathion impair ovarian, uterine, and follicular integrity by altering oxidative profile and gene expression of rats exposed during the peripubertal period. *Environmental Science and Pollution Research* 31:21721–21736. <https://doi.org/10.1007/S11356-024-32494-9/FIGURES/3>

- Federici G, Shaw BJ, Handy RD (2007) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 84:415–430. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2007.07.009>
- Foureman GL, Kenyon EM (2006) Harmonization in interspecies extrapolation: use of BW^{3/4} as default method in derivation of the oral RfD. Washington
- Furukawa S, Tsuji N, Sugiyama A (2019) Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. *J Toxicol Pathol* 32:1–17
- Geng X, Shao H, Zhang Z, et al (2015) Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in male Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 39:659–667. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2015.01.010>
- Gluckman PD, Hanson MA (2022) DOHaD: Engaging with New Global Issues to Inform Policy. *Developmental Origins of Health and Disease* 213–220. <https://doi.org/10.1017/9781009272254.021>
- Guis S, Mattei JP, Cozzone PJ, Bendahan D (2005) Pathophysiology and clinical presentations of rhabdomyolysis. *Joint Bone Spine* 72:382–391. <https://doi.org/10.1016/J.JBSPIN.2004.04.010>
- Hamid HY, Zakaria MZAB (2013) Reproductive characteristics of the female laboratory rat. *Afr J Biotechnol* 12:2510–2514
- Hart RJ (2016) Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol Rev* 96:873–909. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00023.2015>
- Keen J, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* 251:6153–6188
- Koç ND, Kayhan FE, Sesal C, Muşlu MN (2009) Dose-dependent effects of endosulfan and malathion on adult Wistar albino rat ovaries. *Pak J Biol Sci* 12:498–503. <https://doi.org/10.3923/PJBS.2009.498.503>
- Laffan SB, Posobiec LM, Uhl JE, Vidal JD (2018) Species Comparison of Postnatal Development of the Female Reproductive System. *Birth Defects Res* 110:163–189. <https://doi.org/10.1002/BDR2.1132>
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP, Marcondes FK (2002) DETERMINATION OF THE ESTROUS CYCLE PHASES OF RATS: SOME HELPFUL CONSIDERATIONS. *Braz J Biol* 62:609–614
- McMaster MT, Zhou Y, Fisher SJ (2004) Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. *Semin Nephrol* 24:540–547. <https://doi.org/10.1016/J.SEMNEPHROL.2004.07.002>
- Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, et al (1996) Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol* 51:1095–1099. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00055-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00055-X)
- Navarrete-Meneses MP, Salas-Labadía C, Sanabrais-Jiménez M, et al (2017) “Exposure to the insecticides permethrin and malathion induces leukemia and lymphoma-associated gene aberrations in vitro.” *Toxicol In Vitro* 44:17–26. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2017.06.013>
- Nielsen E, Ostergaard G, Larsen JC (2008) Toxicological risk assessment of chemicals: A practical guide., 1st edn. CRC Press, Boca Raton
- Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP, White SS (1980) Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr Rev* 1:228–257. <https://doi.org/10.1210/EDRV-1-3-228>
- Ozsoy AZ, Nursal AF, Karsli MF, et al (2016) Protective effect of intravenous lipid emulsion treatment on malathion-induced ovarian toxicity in female rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20:2425–34
- Pournourmohammadi S, Farzami B, Ostad SN, et al (2005) Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. *Environ Toxicol Pharmacol* 19:191–196. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2004.07.002>
- Qiu J, Sun Y, Sun W, et al (2020) Neonatal exposure to bisphenol A advances pubertal development in female rats. *Mol Reprod Dev* 87:503–511. <https://doi.org/10.1002/MRD.23329>
- Rahman I, Kode A, Biswas SK (2007) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 2007 1:6 1:3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Rathbun KM, Hildebrand JP (2022) Placenta Abnormalities. *StatPearls*
- Rezg R, Mornagui B, Kamoun A, et al (2007) Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat. *C R Biol* 330:143–147. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2006.11.002/>
- Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357–363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)
- Rodwell VW (2018) Catabolism of Proteins & of Amino Acid Nitrogen. In: Harper’s Illustrated Biochemistry, 31st edn. McGraw-Hill Education
- Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB (2009) Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21:219. <https://doi.org/10.1097/GCO.0B013E32832924BA>
- Rugg C, Ströhle M, Schmid S, Kreutziger J (2020) The Link between Hypermetabolism and Hypernatremia in Severely Burned Patients. *Nutrients* 2020, Vol 12, Page 774 12:774. <https://doi.org/10.3390/NU12030774>

- Sánchez-Garrido MA, García-Galiano D, Tena-Sempere M (2022) Early programming of reproductive health and fertility: novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. *Hum Reprod Update* 28:346–375. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMAC005>
- Schaubroeck KJ, Leitner BP, Perry RJ (2022) An optimized method for tissue glycogen quantification. *Physiol Rep* 10:. <https://doi.org/10.14814/phy2.15195>
- Selmi S, Rtibi K, Grami D, et al (2018) Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. *Toxicol Rep* 5:189–195. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2017.12.021>
- Shynlova O, Ming R, Kwong W, Lye SJ (2009) Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0260>
- Souza DA de (2017) Efeitos da exposição pré e pós-natal de MALATHION sobre o neurodesenvolvimento: possível associação causal com o comportamento autista
- Streich SR, Beltran TA, Pier BD (2024) Malathion exposure may increase infertility risk among US Adults: Results from the 2015–2016 NHANES. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 298:49–52. <https://doi.org/10.1016/J.EJOGRB.2024.03.016>
- Tunster SJ, Watson ED, Fowden AL, Burton GJ (2020) Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. *Reproduction* 159:R213–R235. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0007>
- Vander Borgh M, Wyns C (2018) Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 62:2–10. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2018.03.012>
- Waldron Lechner DM, Abdel-Rahman MS (1984) A teratology study of carbaryl and malathion mixtures in rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 14:267–278. <https://doi.org/10.1080/15287398409530579>
- Zidan NEHA (2015) Hepato- and nephrotoxicity in male albino rats exposed to malathion and spinosad in stored wheat grains. *Acta Biol Hung* 66:133–148. <https://doi.org/10.1556/018.66.2015.2.1>
- (2023) Infertility Prevalence Estimates, 1990-2021. Geneva

Dados suplementares

Figura suplementar 1 Peso corpóreo, consumo de água e ração das fêmeas ao longo dos períodos de exposição ao malation e durante a gestação



A. Peso corpóreo das fêmeas durante o período de exposição ao malation; **B.** Ganho de peso das fêmeas prenhes; **C.** Consumo de ração das fêmeas durante o período de exposição ao malation; **D.** Consumo de ração das fêmeas durante a gestação; **E.** Ingesta hídrica das fêmeas durante o período de exposição ao malation; **F.** Ingesta hídrica das fêmeas durante a gestação. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. ANOVA de duas vias.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo abordou um delineamento experimental pouco utilizado em avaliações de contaminantes ambientais que reflete a exposição de adolescentes à esses compostos, em particular o malation. A partir desse modelo experimental concluímos que a exposição ao malation, em ambas as doses utilizadas, e durante os períodos juvenil e peripuberal, prejudicou o sistema genital feminino, demonstrado pelas alterações nos parâmetros avaliados.

6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA REVISÃO DE LITERATURA

- ABBASABAD ARAB, S. et al. Evaluation of oxidative stress indices after exposure to malathion and protective effects of ascorbic acid in ovarian tissue of adult female rats. **Electronic physician**, v. 10, n. 5, p. 6789–6795, 25 maio 2018.
- ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 10, n. 6, p. RA141-7, jun. 2004.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2012 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–31, 29 jun. 2012.
- AIN, R.; CANHAM, L. N.; SOARES, M. J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: Novel endocrine phenotype and regulation. **Developmental Biology**, v. 260, n. 1, p. 176–190, 1 ago. 2003.
- ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. Praguicidas. Em: ALONZO, G. A.; CORRÊA, C. L. (Eds.). **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 324.
- ALVES, B. G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)—Uberlândia: Universidade Estadual de Uberlândia, 2010.
- ANVISA. **Monografia Autorizada: Malationa**.
- ATSDR, **Agent for toxic substances and disease registry**. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp154-c6.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2024.
- BADR, A. M. Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. **Environmental Science and Pollution Research** 2020 27:21, v. 27, n. 21, p. 26036–26057, 13 maio 2020.
- BAIOMY, A. A. et al. Protective effect of ginger and zinc chloride mixture on the liver and kidney alterations induced by malathion toxicity. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 122–128, 1 mar. 2015.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 SUPPL., 2005.
- BEHRMAN, H. R. et al. Oxidative stress and the ovary. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, n. 1 Suppl Proceedings, 2001.
- BEZERRA, M. B. et al. Potencial do cultivo in vitro e do xenotransplante na sobrevivência e no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais em matrizes de ruminantes domésticos em risco de morte: revisão de literatura. **Rev. bras. reprod. anim**, p. 483–489, 2011.
- BOGEN, K. T.; SINGHAL, A. Malathion dermal permeability in relation to dermal load: Assessment by physiologically based pharmacokinetic modeling of *in vivo* human data. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 2, p. 138–146, 1 fev. 2017.
- BOLON, B. Pathology analysis of the placenta. Em: CROY, B. A. et al. (Eds.). **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 175–188.
- BORGEEST, C. et al. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 473–478, ago. 2002.
- BOWEN, J. A.; BURGHARDT, R. C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 11, n. 2, p. 93–104, 2000.
- BRASIL, M. D. S. **Declara Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN) por alteração do padrão de ocorrência de microcefalias no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt1813_11_11_2015.html. Acesso em: 18 dez. 2017.

BRASIL, M. D. S. **Diretriz geral SNCC: sistema de coordenação e controle para intensificar as ações de mobilização e combate ao mosquito**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: http://combateaedes.saude.gov.br/images/Diretriz_Geral_SNCC_2015.pdf. Acesso em: 18 dez. 2017.

BROCARD, P. S. et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. **Toxicology**, v. 207, n. 2, p. 283–291, 14 fev. 2005.

BRUXEL, M. A. et al. Preconception exposure to malathion and glucose homeostasis in rats: Effects on dams during pregnancy and post-term periods, and on their progeny.

Environmental Pollution, v. 316, p. 120633, 1 jan. 2023.

BURATTI, F. M. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 33, n. 3, p. 295–302, mar. 2005.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ.

Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 370, n. 1663, p. 20140066, 3 mar. 2015.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, jun. 2011.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Placental Oxidative Stress: From Miscarriage to Preeclampsia. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 342–352, 28 set. 2004.

CARTER, A. M. Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. **Physiological reviews**, v. 92, n. 4, p. 1543–1576, 1 out. 2012.

CHEN, L. et al. Absorption and excretion of organophosphorous insecticide biomarkers of malathion in the rat: Implications for overestimation bias and exposure misclassification from environmental biomonitoring. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 287–293, abr. 2013.

CHOI, P. T. L. et al. The use of glycopyrrolate in a case of intermediate syndrome following acute organophosphate poisoning. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 45, n. 4, p. 337–340, abr. 1998.

COSTA, M. A. The endocrine function of human placenta: an overview. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 1, p. 14–43, 1 jan. 2016.

CROSS, J. C. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review. **Placenta**, v. 26 Suppl A, n. SUPPL., 2005.

CROSS, J. Trophoblast cell fate specification. Em: MOFFETT, A.; LOKE, C.; MCLAREN, A. (Eds.). **Biology and pathology of trophoblast, Functions and Evolution**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. p. 3–14.

DAI, D.; MOULTON, B. C.; OGLE, T. F. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 1, p. 188–195, 2000.

DAUFENBACK, V. et al. Pesticides, health outcomes and agroecology in Brazil: a scope review. **Saúde em Debate**, v. 46, n. spe2, p. 482–500, 2022.

DAVIES, J.; GLASSER, S. R. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. **Acta anatomica**, v. 69, n. 4, p. 542–608, 1968.

DE RIJK, E. P. C. T.; VAN ESCH, E.; FLIK, G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. **Toxicologic pathology**, v. 30, n. 2, p. 271–282, 2002.

- DEY, S. K.; LIM, H. Implantation. Em: NEILL, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. Amsterdam: Academic Press, 2006. p. 147–188.
- DHOUB, I. E.-B. et al. A comparative study on toxicity induced by carbosulfan and malathion in Wistar rat liver and spleen. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 21–28, 1 out. 2015.
- DIVE, A. et al. Unusual Manifestations after Malathion Poisoning. **Human & Experimental Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 271–274, 2 abr. 1994.
- DIXON, D. et al. Oviduct, Uterus, and Vagina. **Boorman's Pathology of the Rat: Reference and Atlas**, p. 537–559, 1 jan. 2017.
- EJIRI, N. et al. Expression of cytochrome P450 (CYP) isozymes in rat placenta through pregnancy. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie**, v. 53, n. 5, p. 387–391, 2001.
- ENDERS, A. C. A COMPARATIVE STUDY OF THE FINE STRUCTURE OF THE TROPHOBLAST IN SEVERAL HEMOCHORIAL PLACENTAS. **The American journal of anatomy**, v. 116, n. 1, p. 29–67, 1965.
- ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. **American Journal of Anatomy**, v. 120, n. 2, p. 185–225, 1 mar. 1967.
- ERTHAL-MICHELATO, R. P. et al. Low doses of malathion impair ovarian, uterine, and follicular integrity by altering oxidative profile and gene expression of rats exposed during the peripubertal period. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 14, p. 21721–21736, 1 mar. 2024.
- FIGUEIREDO, T. H. et al. Acute and long-term consequences of exposure to organophosphate nerve agents in humans. **Epilepsia**, v. 59, n. Suppl 2, p. 92, 1 out. 2018.
- FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 248–253, abr. 1998.
- FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6–16, 2010.
- FORTUNATO, J. J. et al. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. **Neurotoxicity research**, v. 9, n. 1, p. 23–28, 2006.
- FURUKAWA, S. et al. Histomorphological comparison of rat placentas by different timing of chlorpromazine-administration. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie**, v. 67, n. 9, p. 443–452, 1 set. 2015.
- FURUKAWA, S.; TSUJI, N.; SUGIYAMA, A. **Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation**. **Journal of Toxicologic Pathology** Japanese Society of Toxicologic Pathology, , 2019.
- GEORGIADIS, P.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. **Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae**. **Placenta** W.B. Saunders Ltd, , 2002.
- GOLUB, M. S. et al. Public health implications of altered puberty timing. **Pediatrics**, v. 121 Suppl 3, n. SUPPL.3, fev. 2008.
- Governo Bolsonaro tem recorde de mortes e de agrotóxicos – Opinião – CartaCapital**. Disponível em: <<https://www.cartacapital.com.br/opiniaio/governo-bolsonaro-tem-recorde-de-mortes-e-de-agrotoxicos/>>. Acesso em: 9 jun. 2024.
- GRAZIOTTIN, A.; GAMBINI, D. Anatomy and physiology of genital organs - women. **Handbook of clinical neurology**, v. 130, p. 39–60, 2015.
- HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.
- HAMID, H. Y.; ZAKARIA, M. Z. A. B. Reproductive characteristics of the female laboratory rat. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 19, p. 2510–2514, 2013.

- HEMBERGER, M.; HANNA, C. W.; DEAN, W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. **Nature Reviews Genetics** 2019 21:1, v. 21, n. 1, p. 27–43, 18 set. 2019.
- HEMPSTOCK, J. et al. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. **Human Pathology**, v. 34, n. 12, p. 1265–1275, dez. 2003.
- HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, G. et al. Estrous Cycle Classification through Automatic Feature Extraction. **Computación y Sistemas**, v. 23, n. 4, 30 dez. 2019.
- HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in hematology**, v. 26, n. 4, p. 277–85, out. 1989.
- IBGE, I. B. de G. e E. **Relatório de área plantada por município no Mato Grosso, 2008-2012**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2013.
- JOHNSON, L. G.; MUELLER, B. A.; DALING, J. R. The relationship of placenta previa and history of induced abortion. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 81, n. 2, p. 191–198, 1 maio 2003.
- JOLLIE, W. P. FINE STRUCTURAL CHANGES IN THE JUNCTIONAL ZONE OF THE RAT PLACENTA WITH INCREASING GESTATIONAL AGE. **Journal of ultrastructure research**, v. 12, n. 3, p. 420–438, 1965.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KAUFMANN, M. H. Origin, properties and fate of trophoblast in the mouse. Em: LOKE, C.; WHYTE, A. (Eds.). **Biology of Trophoblast**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 23–70.
- KAUFMANN, P.; BURTON, G. Anatomy and genesis of the placenta. Em: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**. 1. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 441–448.
- KOÇ, N. D. et al. Dose-dependent effects of endosulfan and malathion on adult Wistar albino rat ovaries. **Pakistan journal of biological sciences : PJBS**, v. 12, n. 6, p. 498–503, 2009.
- KOVACIC, P. Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stress. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 24, p. 2705–2709, 23 mar. 2003.
- LAFFAN, S. B. et al. Species Comparison of Postnatal Development of the Female Reproductive System. **Birth defects research**, v. 110, n. 3, p. 163–189, 15 fev. 2018.
- LARINI, L. Praguicidas. Em: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 473–496.
- LEAZER, T. M.; KLAASSEN, C. D. The presence of xenobiotic transporters in rat placenta. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 31, n. 2, p. 153–167, 1 fev. 2003.
- LEE, K. Y.; DEMAYO, F. J. Animal models of implantation. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 128, n. 6, p. 679–695, dez. 2004.
- LEME, T. S. et al. Avaliação da vestimenta utilizada como equipamento de proteção individual pelos aplicadores de malathion no controle da dengue em São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 567–576, mar. 2014.
- LEVARIO-CARRILLO, M. et al. Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 55, n. 6, p. 489–496, 2004.
- LOHMILLER, J. J.; SWING, H. J. Reproduction and breeding. Em: SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. (Eds.). **The Laboratory Rat**. 2. ed. Boston: Elsevier, 2005. p. 147–164.
- LOMNICZI, A.; WRIGHT, H.; OJEDA, S. R. Epigenetic regulation of female puberty. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 36, p. 90–107, 1 jan. 2015.

- MAEDA, K.-I.; OKURA, S.; TSUKAMURA, H. Physiology of Reproduction. Em: KRINKE, G. J. (Ed.). **The Laboratory Rat**. 1. ed. Nova Iorque: Academic Press, 2000. p. 145–176.
- MATO GROSSO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente Superintendência de monitoramento de indicadores ambientais. **Relatório de monitoramento de qualidade das Águas da Sub-bacia do Rio Cuiabá, MT**. Cuiabá: SEMA/MT; MIA, 2006: [s. n.], 2005
- MATT, D. W.; MACDONALD, G. J. Placental steroid production by the basal and labyrinth zones during the latter third of gestation in the rat. **Biology of reproduction**, v. 32, n. 4, p. 969–977, 1985.
- MELCHIORRI, D. et al. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. **Biochemical pharmacology**, v. 51, n. 8, p. 1095–1099, 26 abr. 1996.
- MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, n. 1, p. 273–275, 15 fev. 1984.
- MIER-CABRERA, J. et al. Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 118, n. 1, p. 6–16, jan. 2011.
- MILESON, B. E. et al. Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides. **Toxicological Sciences**, v. 41, n. 1, p. 8–20, 1 jan. 1998.
- MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299–311, 2002.
- NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- Nota técnica nº 13.146, de 6 de setembro de 2011. **Institui a recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretróides no controle do *Aedes aegypti* no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA. Disponível em: https://www.ioc.fiocruz.br/sites/default/files/notatecnica_2_ioc_v1_dengue_6_set_2011_0.pdf
- OJEDA, S. R. et al. Recent advances in the endocrinology of puberty. **Endocrine reviews**, v. 1, n. 3, p. 228–257, 1980.
- OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Physiology of Reproduction. Em: KNOBIL, E.; NEILL, J. (Eds.). **Puberty in the rat**. 2. ed. Boston: Elsevier, 1994. p. 2061–2126.
- OKTEM, O.; URMAN, B. Understanding follicle growth in vivo. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 25, n. 12, p. 2944–2954, 2010.
- OZMEN, G.; AKAY, M. T. The effects of malathion on some hormone levels and tissues secreting these hormones in rats. **Veterinary and human toxicology**, v. 35, n. 1, p. 22–4, fev. 1993.
- OZSOY, A. Z. et al. Protective effect of intravenous lipid emulsion treatment on malathion-induced ovarian toxicity in female rats. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 20, n. 11, p. 2425–34, jun. 2016a.
- OZSOY, A. Z. et al. Protective effect of intravenous lipid emulsion treatment on malathion-induced ovarian toxicity in female rats. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 20, n. 11, p. 2425–34, jun. 2016b.
- PALACIO, J. R. et al. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 144, n. 2, p. 217–222, 27 mar. 2006.
- PARR, M. B.; PARR, E. I. The implantation reaction. Em: WYNN, R. M.; JOLLIE, W. P. (Eds.). **Biology of the Uterus**. 1. ed. New York: Plenum Press, 1989. p. 233–277.

- PESSOA, J. P. DE M. et al. Controle da dengue: os consensos produzidos por Agentes de Combate às Endemias e Agentes Comunitários de Saúde sobre as ações integradas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 8, p. 2329–2338, ago. 2016.
- PETERS, H.; BYSKOV, A. G.; GRINSTED, J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 7, n. 3, p. 469–485, 1 nov. 1978.
- POSSAVATZ, J. et al. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 1, 26 mar. 2014.
- REYNOLDS, L. P.; KILLILEA, S. D.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive system. **The FASEB Journal**, v. 1, n. 6, p. 886–892, 1992.
- RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 14, n. 10, p. 149–158, 2009.
- RIVETT, K.; POTGIETER, P. D. Diaphragmatic paralysis after organophosphate poisoning. A case report. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 72, n. 12, p. 881–2, 19 dez. 1987.
- ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, fev. 2001.
- RUDER, E. H.; HARTMAN, T. J.; GOLDMAN, M. B. Impact of oxidative stress on female fertility. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 21, n. 3, p. 219, jun. 2009.
- RUMBOLD, A. et al. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 23 jan. 2008.
- SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biology of reproduction**, v. 12, n. 1, p. 41–65, 1975.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. DE. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, ago. 2004.
- SELMÍ, S. et al. Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 189–195, 2018.
- SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Csf2 null mutation alters placental gene expression and trophoblast glycogen cell and giant cell abundance in mice. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 1, p. 207–221, jul. 2009.
- SHIOTA, K. et al. Molecular diversity of rat placental lactogens: A review. **Placenta**, v. 18, p. 1–11, 1 jan. 1997.
- SILVA, E. J. R. et al. Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: insights into the adrenal control of male reproduction. **Andrology**, v. 2, n. 6, p. 835–846, 1 nov. 2014.
- SILVA, L. O. T. DA; DE CARLI, B. P. Efeitos do malathion no sistema nervoso central: uma revisão breve. **Journal of Health Sciences Institute**, v. 1, n. 39, p. 29–32, 2021.
- SOARES, M. J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, 5 jul. 2004.
- SOUZA, D. A. DE. **Efeitos da exposição pré e pós-natal de MALATHION sobre o neurodesenvolvimento: possível associação causal com o comportamento autista**. , 2017. Disponível em: <<https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/3056>>. Acesso em: 23 maio. 2024

- SUGINO, N. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. **Placenta**, v. 28 Suppl A, n. SUPPL., abr. 2007.
- SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free radical biology & medicine**, v. 8, n. 6, p. 583–599, 1990.
- TCHOUNWOU, P. B. et al. Environmental Exposure and Health Effects Associated with Malathion . Em: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Toxicity and Hazard of Agrochemicals**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2015. p. 71–91.
- TSAI, Y. H.; LEIN, P. J. Mechanisms of organophosphate neurotoxicity. **Current opinion in toxicology**, v. 26, p. 49–60, 1 jun. 2021.
- TYGEL, A. et al. **Atlas dos Agrotóxicos: Fatos e dados do uso dessas substâncias na agricultura**. 2. ed. Rio de Janeiro: Fundação Henrique Böll, 2024.
- URBANSKI, H. F.; OJEDA, S. R. Gonadal-independent activation of enhanced afternoon luteinizing hormone release during pubertal development in the female rat. **Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 907–913, 1 set. 1987.
- VASSEGHIAN, Y. et al. Decontamination of toxic Malathion pesticide in aqueous solutions by Fenton-based processes: Degradation pathway, toxicity assessment and health risk assessment. **Journal of hazardous materials**, v. 423, n. Pt A, 5 fev. 2022.
- VELMURUGAN, G. et al. Gut microbial degradation of organophosphate insecticides induces glucose intolerance via gluconeogenesis. [s.d.].
- VERCRUYSE, L. et al. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. **Placenta**, v. 27, n. 1, p. 22–33, jan. 2006.
- WALDRON LECHNER, D. M.; ABDEL-RAHMAN, M. S. A teratology study of carbaryl and malathion mixtures in rat. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 14, n. 2–3, p. 267–278, 1 jan. 1984.
- WANG, H.; DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nature Reviews Genetics** 2006 7:3, v. 7, n. 3, p. 185–199, mar. 2006.
- WEBSTER, R. P.; ROBERTS, V. H. J.; MYATT, L. Protein Nitration in Placenta – Functional Significance. **Placenta**, v. 29, n. 12, p. 985–994, 1 dez. 2008.
- WELSH, A. O.; ENDERS, A. C. Occlusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy. **The American journal of anatomy**, v. 167, n. 4, p. 463–477, 1983.
- WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 3, p. 375–384, 2008.
- WOODING, P.; BURTON, G. Implantation, maternofetal ex- change and vascular relationships. Em: WOODING, P.; BURTON, G. (Eds.). **Comparative Placentalation. Structures, Functions and Evolution**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. p. 1–81.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. Em: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 89–317.
- YONG, W. et al. Resveratrol ameliorates malathion-induced estrus cycle disorder through attenuating the ovarian tissue oxidative stress, autophagy and apoptosis. **Reproductive Toxicology**, v. 104, p. 8–15, 1 set. 2021.
- ZARA, A. L. DE S. A. et al. Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, jun. 2016.
- ZELEZNIK, A. J. The physiology of follicle selection. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, 16 jun. 2004.

ANEXO A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 019/2023

Londrina, 24 de março de 2023.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: “**Avaliação dos efeitos da exposição de ratas Wistar a baixas doses de malation sobre parâmetros de comportamento sexual, fertilidade, placentação e teratogenicidade**” protocolo CEUA n° **008.2023** sob a responsabilidade de **Glaura Scantamburlo Alves Fernandes** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) no dia **13/03/2023**.

Este projeto tem por objetivo avaliar se a exposição ao malation durante os períodos peripuberal e gestacional poderá trazer prejuízos sobre a morfofisiologia de útero e placenta e sobre o comportamento sexual de ratas Wistar. **Grau de invasividade: GI2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/05/2023 a 31/05/2026
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogêneo/Wistar
N° de animais	468, sendo: Machos – 180 Fêmeas – 288
Peso/ Idade	Machos – 80 dias Fêmeas – 21 e 70 dias Fetos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, ovários, útero, fetos, placentas

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Prof^ª Dr^ª Patrícia Chiffelin Perandini
Coordenadora da CEUA/Uel

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Biologia Geral/CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB

C/C para o Biotério Central/CCB

ANEXO B

Guide for authors

Environmental Science & Pollution Research:

<https://link.springer.com/journal/11356/submission-guidelines>