



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências – Campus de Botucatu

*Avaliação da Exposição ao Propionato de Testosterona
em ratas fêmeas *in utero* e lactação.*

Raquel Frenedoso da Silva

Botucatu – SP

2001

Raquel Frenedoso da Silva

*Avaliação da Exposição ao Propionato de Testosterona
em ratas fêmeas *in utero* e lactação.*

Monografia apresentada ao Departamento de
Morfologia do Instituto de Biociências –
UNESP , Campus de Botucatu, para a obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Wilma De Grava Kempinas

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Silva, Raquel Frenedoso.

Avaliação da exposição ao propionato de testosterona em ratas fêmeas *in utero* e lactação / Raquel Frenedoso da Silva. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wilma De Grava Kempinas

Capes: 20303025

1. Reprodução humana. 2. Toxicologia. 3. Andrógenos. 4. Testosterona.

Palavras chave: Andrógenos; Propionato de testosterona; Reprodução;
Toxicidade.

Esse trabalho é dedicado à minha mãe, Maria, a única pessoa que acreditou de verdade que eu conseguiria, e que sempre me deu todo o apoio que eu precisei.
Muito obrigada mãe, por me ajudar a realizar o meu sonho.

Agradecimientos

À Deus, que me deu forças para atravessar cada obstáculo que surgiu em minha vida.

À Professora Wílma, que me abriu as portas do seu laboratório e me deu a oportunidade de confirmar o meu amor pela Biologia da Reprodução.

À Marina, a quem eu serei eternamente grata, por ter me recebido de braços abertos, me ajudando e me ensinando sempre com muita paciência.

Ao meu noivo, Junior, que desde o começo me apoiou e me ajudou em tudo o que precisei. Ele foi meu alicerce nessa jornada.

À minha avó, Jandira, por ter me dado o suporte necessário para que eu concluísse a minha tão sonhada graduação.

Ao meu irmão, Ricardo, cujas críticas só me impulsionaram ainda mais a seguir em frente.

À CNPq e à FAPESP, pela bolsa de Iniciação Científica durante a realização deste trabalho.

As minhas companheiras de Iniciação Científica: Heloíse, Mirella, Alessandra, Gabriela, Mariana e Caroline, pela companhia e por todos os momentos agradáveis que passamos no laboratório.

As pós-graduandas do ReproTox: Juliana, Thaís, Cibele e Marci, sempre tão dispostas a ajudar quando precisei.

Ao Técnico do laboratório ReproTox, José Eduardo, e à secretária do Departamento, Luciana, por todo o apoio necessário.

As minhas amigas, Bruna (Judás) e Elka (Elkís), que foram fundamentais na minha vida. Obrigada por estarem ao meu lado todo o tempo. Vocês são as irmãs que eu escolhi.

Aos meus amigos Paulo (Whata), Danilo (Dhalsin), Juliana (Kathy), Luíza (NX) e Warlen (Fanfarrão) por todos os momentos que passamos juntos. Vocês tornaram a minha graduação muito mais divertida.

*‘ Nunca deixe que lhe digam que não vale à pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém. ’*

(Renato Russo)

Sumário

<i>Resumo.....</i>	<i>1</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>3</i>
<i>Introdução</i>	<i>5</i>
<i>Objetivo</i>	<i>11</i>
<i>Material e métodos</i>	<i>13</i>
<i>Resultados</i>	<i>21</i>
<i>Discussão</i>	<i>41</i>
<i>Conclusão</i>	<i>48</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>50</i>
<i>Anexos</i>	<i>65</i>

Resumo

Sabe-se que a exposição a substâncias presentes no ambiente pode contribuir para vários distúrbios reprodutivos, especialmente se esta exposição ocorrer em períodos críticos de desenvolvimento, como período intra-uterino e pós-natal. O sistema reprodutor feminino pode ser alvo de andrógenos, tanto como resultado da exposição a químicos ambientais, quanto por condições patológicas (síndrome do ovário policístico ou hiperplasia congênita da adrenal). Usualmente, pouca atenção é despendida em relação ao estudo de efeitos androgênicos no eixo reprodutivo feminino. Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da exposição a andrógenos sobre o desenvolvimento, estrutura e a função reprodutiva de ratas cujas mães foram expostas ao Propionato de Testosterona do dia gestacional 12 (DG12) ao fim do desmame - dia pós-natal 21 (DPN21). Para tanto, ratas prenhez foram divididas em quatro grupos experimentais: um grupo controle, que recebeu óleo de milho (veículo) e outros três grupos que receberam Propionato de Testosterona nas doses de 0,05 mg/kg/dia, 0,1mg/kg/dia e 0,2mg/kg/dia, todos nas mesmas condições experimentais. Os possíveis efeitos da exposição foram avaliados através de parâmetros reprodutivos, tais como medida da distância ano-genital, contagem de aréolas/mamilos, idade de abertura vaginal e primeiro estro (indicativos de instalação da puberdade), peso e avaliação histológica dos órgãos reprodutores (útero e ovários), peso dos rins, fígado e hipófise, dosagens hormonais, regularidade do ciclo estral, comportamento sexual e fertilidade. Tais análises são importantes na compreensão dos efeitos da exposição de andrógenos sobre o sistema genital feminino, principalmente sobre o potencial fértil, e em processos que possam envolver alterações morfofuncionais. Nestas condições experimentais, concluiu-se que o tratamento com PT ocasionou redução no peso corpóreo e masculinização inicial nos filhotes fêmeas sem, entretanto, comprometer o desenvolvimento sexual posterior.

Abstract

It is known that exposure to substances in the environment can contribute to various reproductive disorders, especially if such exposure occurs during critical periods of development such as the intra-uterine and postnatal. The female reproductive system may be the target of androgens, both as a result of exposure to environmental chemicals, or by pathological conditions (polycystic ovary syndrome or congenital adrenal hyperplasia). Usually, little attention is given off in relation to the study of androgenic effects in the female reproductive axis. This study aims to evaluate the effects of exposure to androgens on the development, structure and reproductive function in rats whose mothers were exposed to testosterone propionate from gestational day 12 (DG12) after weaning - postnatal day 21 (DPN21). For this purpose, pregnancy rats were divided into four groups: a control group that received corn oil (vehicle) and three groups receiving testosterone propionate in doses of 0.05 mg / kg / day, 0.1 mg / kg / day and 0.2 mg / kg / day, all under the same experimental conditions. The possible effects of exposure were assessed using reproductive parameters, such as a measure of anogenital distance, count areolas / nipples, age at vaginal opening and first estrus (puberty indicative installation), weight and histological evaluation of the reproductive organs (uterus and ovaries), weight of the kidneys, liver and pituitary hormone levels, regularity of the estrous cycle, sexual behavior and fertility. Such analysis is important in understanding the effects of androgen exposure on the female genital system, especially on the reproductive potential, and processes that may involve morphofunctional changes. In these experimental conditions, it is concluded that treatment with PT caused reduction in body weight and initial masculinization in females without cubs, however, commit further sexual development.

Introdução

Diversos estudos realizados em diferentes partes do mundo têm relatado uma forte associação entre a exposição *in utero* ou durante as fases iniciais da vida extra-uterina a um agente ambiental e o aparecimento de doenças crônicas ao longo da vida de um indivíduo (Lucas, 1991). Este tipo de associação tem sido conhecida como “Developmental Origins of Health and Disease – DOHaD” (Gluckman et al., 2006; Silveira et al., 2007; Newnham, 2007; Barker, 2007). Esta teoria parte do princípio de que o feto é capaz de se adaptar ao ambiente intra-uterino adverso, favorecendo o funcionamento de alguns órgãos em detrimento de outros, causando assim, alterações em longo prazo no crescimento e função dos tecidos (Hales et al., 1992). Em muitas espécies animais, os contaminantes ambientais atingem o feto via mãe/placenta ou os filhotes via lactação (Silveira et al., 2007). O processo de adaptação sofrido pelo feto no ambiente intra-uterino pode afetar a programação das funções teciduais que ocorrem durante o desenvolvimento, causando alterações permanentes na expressão gênica regulada por fatores epigenéticos como metilação de DNA e metilação/acetilação de histonas (Gluckman & Hanson, 2006; Silveira et al., 2007; Crain et al., 2008). Durante o período de desenvolvimento, os fetos apresentam um mecanismo de reparo de DNA incompleto, falta de enzimas de detoxificação, metabolismo hepático primitivo e grande sensibilidade a mudanças epigenéticas (mudanças da expressão gênica sem alteração da sequência de DNA) (Jones et al, 2001; Chong et al., 2004). Estes fatores contribuem para uma maior susceptibilidade dos fetos a ação de agentes ambientais. O período de sensibilidade ocorre durante o desenvolvimento dos tecidos, que em vários casos estende-se até a vida neonatal e os efeitos podem ser transmitidos para gerações futuras através da linhagem germinativa (Heindel, 2007). Existem vários indícios de que os distúrbios reprodutivos femininos vêm aumentando nos últimos anos. Este fato é atribuído a mudanças culturais (como uso de anticoncepcionais), mas a exposição a

substâncias presentes no ambiente também podem contribuir para efeitos negativos no desenvolvimento e função do trato reprodutivo feminino (Crain et al., 2008; Caserta et al., 2008). Seres humanos são expostos a uma variedade de químicos ambientais durante o período intra-uterino, nas concentrações similares àsquelas que apresentam aumento na incidência de disfunções em animais de laboratório (Mori et al., 2002; Youglai et al., 2002; Needam et al., 2000). Desde o início dos anos 90, grande atenção tem sido dada aos agentes químicos que apresentam potencial para alterar o sistema endócrino de animais, incluindo o homem. O campo de estudo destes compostos, chamados de desreguladores endócrinos, tem crescido rapidamente e engloba diversas áreas, como imunologia, toxicologia, fisiologia da reprodução, comportamento e ecologia (Hotchkiss et al., 2002). Estes compostos pertencem a diferentes categorias e origens, incluindo praguicidas, químicos industriais, produtos farmacêuticos e fitoquímicos (Gray et al., 2001). A desregulação endócrina causada por compostos químicos pode mimetizar ou antagonizar os efeitos de hormônios esteróides como estrógenos e andrógenos no organismo. Embora pesquisas iniciais tenham demonstrado estrógenos e anti-androgênicos ambientais, compostos com atividade androgênica têm sido encontrados como contaminantes de rios e em animais destinados a alimentação humana nos Estados Unidos e Europa (Parks et al., 2001; Orlando et al., 2004). Embora houvesse suspeitas desde 1970, a presença de andrógenos de origem antropogênica no ambiente só foi confirmada nos últimos anos (Gray et al., 2006). Usualmente, pouca atenção é desprendida em relação ao estudo de efeitos androgênicos no eixo reprodutivo feminino. Estes efeitos podem ter significado fisiológico, importância clínica e relevância para o estudo de diferenças sexuais na função neuroendócrina. Os efeitos dos andrógenos são importantes para o entendimento da fisiologia normal, pato-fisiologia e desenvolvimento do sistema reprodutor feminino. Em ratas, níveis séricos de

testosterona e dihidrotestosterona variam durante o ciclo estral e estas variações são importantes na regulação de expressão gênica relacionada a hormônios reprodutivos; as concentrações endógenas destes hormônios são geralmente inferiores a 30% das concentrações em machos (Foecking et al., 2008). Dada a delicada interação de hormônios gonadais e desenvolvimento cerebral, um desbalanço nos níveis hormonais durante o período de sensibilidade altera significativamente o comportamento na puberdade e da vida adulta (Sato et al., 2008). A exposição de animais experimentais a altas doses de andrógenos durante a vida fetal ou pré-púbere pode reprogramar múltiplos tecidos e causar alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais permanentes em vários órgãos ou sistemas (Schwartz et al., 1986; Carter et al., 1988), como por exemplo mudanças no desenvolvimento normal da genitália fetal, síndrome de ovário policístico (Polycystic Ovary Syndrome - PCOS), alterações uterinas, modificações no ciclo estral, no comportamento sexual e até esterilidade (Greene et al., 1939; Huffman and Hendricks, 1981; Slob et al., 1983; Mena et al., 1992; Rhees et al., 1997; Ryan and Vandenberg, 2002). O tratamento com andrógenos exógenos exerce efeitos negativos na fertilidade em fêmeas de mamíferos, dependendo da dose, via de administração e tempo de exposição. O tratamento com andrógenos pode gerar mudanças na secreção de GnRH, LH e esteróides, que diferem na magnitude, direção e duração, dependendo do período de tratamento (pré-natal, perinatal, pré-púbere ou período adulto) (Foecking et al., 2008). As células germinativas do ovário iniciam o processo de diferenciação e formação de folículos durante a vida intra-uterina, mas a formação e desenvolvimento folicular continuam após o nascimento e se estende até a menopausa, quando o ovário perde sua capacidade de liberar gametas. A formação folicular durante o desenvolvimento fetal e a ativação de folículos durante o período pós-natal são potenciais alvos para alterações hormonais (Crain et al., 2008), deste

modo a exposição pré-natal a andrógenos pode ter impacto direto na foliculogênese (Forsdike et al., 2007). Síndrome do ovário policístico (PCOS) é uma desordem metabólica e endócrina complexa, que atinge de 5 a 10% de mulheres em idade reprodutiva (Knochenhauer et al., 1998; Diamanti-Kandarakis et al., 1999; Asuncion et al., 2000; Azziz et al., 2004) e está associada com disfunção ovulatória, hiperandrogenismo, irregularidade menstrual e infertilidade (Singh, 1981; Gilling-Smith et al., 1994; Nelson et al., 2001; Tsilchorozidou et al., 2004). As características bioquímicas típicas da PCOS são concentrações séricas elevadas de testosterona e hormônio luteinizante (LH) (Franks et al., 2006). Exposição a excesso de andrógenos durante a vida fetal ou pré-púbere pode reprogramar múltiplos tecidos a manifestar a síndrome no período de puberdade ou na vida adulta (Abbott et al., 2002, 2005; Xita & Tsatsoulis, 2006). Desreguladores endócrinos podem reduzir a fecundidade por interferir com a regulação hormonal do ciclo menstrual (Jensen et al., 1999; Bretveld et al., 2006). Existem dados restritos sobre a exposição fetal e neonatal a desreguladores endócrinos em humanos e alteração da ciclicidade (Yang et al., 2005; Chao et al., 2007), mas dados obtidos por experimentação animal confirmam esta hipótese (Crain et al., 2008). Ao nascimento, o útero da rata é composto pela camada epitelial luminal do endométrio e mesênquima uterino aleatoriamente ordenado e indiferenciado. Do nascimento até a instalação da puberdade, o mesênquima uterino segue um padrão de diferenciação, que resulta na formação do miométrio uterino e glândulas e estroma endometrial. O principal período de diferenciação e maturação de útero de roedores ocorre após o nascimento (Brody et al., 1989) e a exposição a hormônios esteróides neste período pode comprometer a adenogênese endometrial (Crain et al., 2008). Sabendo-se que a exposição a substâncias presentes no ambiente pode contribuir para várias disfunções reprodutivas, especialmente se ocorrer em períodos críticos de

desenvolvimento, como período intra-uterino e pós-natal e que, usualmente, pouca atenção é despendida em relação ao estudo de efeitos androgênicos no eixo reprodutivo feminino, justifica-se a realização de um estudo que avalie os efeitos da exposição a andrógenos (situação que pode ocorrer em consequência à exposição a químicos ambientais e industriais com propriedades androgênicas e em condições médicas como síndrome do ovário policístico ou hiperplasia congênita da adrenal) sobre a estrutura do trato genital e a função reprodutiva feminina.

Objetivo

O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos sobre a estrutura e função reprodutiva feminina, em ratas cujas mães foram expostas ao Propionato de Testosterona durante a prenhez e lactação. Para tanto, foram investigados os seguintes parâmetros: peso corpóreo, distância ano-genital relativa, contagem de aréolas/mamilos, idade de abertura vaginal e primeiro estro (indicadores da instalação da puberdade), peso de rins, fígado, hipófise e órgãos reprodutores após 30 e 75 dias de idade sendo que nessa idade realizou-se a análise histológica. Investigaram-se, ainda, dosagens hormonais, regularidade do ciclo estral, comportamento sexual e fertilidade após acasalamentos naturais.

Material e métodos

Obtenção de Fêmeas Prenhes

Machos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e fêmeas adultas (60 dias de idade, pesando aproximadamente 200g), da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UNESP foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C) e receberam água e ração para roedores à vontade. Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (dia gestacional - DG 0) foi determinado pela presença de espermatozóides em esfregaços vaginais da fêmeas em estro. As ratas prenhes ou lactentes foram mantidas em gaiolas individuais e pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume de Propionato de Testosterona a ser administrado e a investigação de sinais clínicos de toxicidade. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, visando sempre manter os filhotes do sexo feminino. As fêmeas prenhes foram divididas em quatro grupos experimentais: um grupo controle ($n = 8$ ratas), que recebeu óleo de milho (veículo) e três grupos tratados que receberam Propionato de Testosterona (PT) nas concentrações de 0,05mg/kg ($n=7$), 0,1mg/kg ($n=9$) e 0,2mg/kg ($n=10$) por dia, respectivamente. O tratamento foi realizado via subcutânea (s.c.), do DG 12 ao final da lactação (dia pós-natal - DPN 21), coincidente com o período crítico de desenvolvimento e diferenciação sexual do sistema reprodutor da prole (Wolf et al., 2000; McIntyre et al., 2002). Após o desmame, apenas fêmeas foram mantidas e utilizadas para a avaliação dos efeitos tóxicos no sistema reprodutor.

Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Biociências de Botucatu, sob protocolo 104/2009.

Evolução do Peso Corpóreo das Ratas Prenhes e Lactentes

As ratas prenhes ou lactentes foram pesadas em dias alternados, desde o dia gestacional 0 até o desmame dos filhotes (DPN21) para cálculo do volume da droga a ser administrado e a investigação da toxicidade materna, que poderia interferir com o desenvolvimento da prole.

Distância Anogenital e Contagem de Mamilos/Aréolas

A distância anogenital (DAG) e o número de mamilos/aréolas são considerados biomarcadores para exposição a andrógenos. Distância anogenital é definida como a distância entre a papila genital e o ânus; roedores machos apresentam a DAG aproximadamente duas vezes maior que as fêmeas (Vandenbergh and Huggett, 1995; Gray et al., 1999). Aréolas são áreas escuras envolvendo o broto do mamilo e são indicativos de mamilos adultos. Ratas apresentam tipicamente 12 mamilos, enquanto machos não possuem nenhum. Ambos os marcadores variam com a exposição pré-natal a andrógenos (Gray et al., 1999). A medida da DAG foi realizada no DPN 1 e a contagem do número de mamilos/aréolas, no DPN 13.

Abertura Vaginal e Primeiro estro

Nos filhotes do sexo feminino, foi determinado o dia médio, por ninhada, em que ocorreu a abertura vaginal, que juntamente com a ocorrência do primeiro estro, compõe o indicativo externo da instalação da puberdade. As observações se iniciaram no DPN 30 e a avaliação do primeiro estro se deu a partir da data de abertura vaginal.

Regularidade do Ciclo Estral

Para se investigar a regularidade do ciclo estral, que na rata dura em média 4 a 5 dias, foram colhidos lavados vaginais de todos os filhotes do sexo feminino. Para tanto, e sempre no mesmo horário, uma ponteira contendo 10 microlitros de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) acoplada a um pipetador automático foi introduzida na vagina das ratas, o líquido foi transferido e logo depois aspirado (Marcondes et al., 2002). Em seguida, os lavados vaginais foram espalhados sobre lâminas histológicas limpas e previamente identificadas com o número do animal. Os lavados vaginais foram analisados com o auxílio de um microscópio de luz, e a classificação da fase do ciclo foi baseada nos parâmetros descritos a seguir:

- **Proestro:** predomínio de células epiteliais e, em menor quantidade à medida que se aproxima o final dessa fase, leucócitos e muco.
- **Estro:** predomínio de células queratinizadas anucleadas, isoladas ou em grupos e, ausência de leucócitos e muco.
- **Metaestro:** encontram-se todos os tipos celulares, anteriormente citados, mas com decréscimo do número de células queratinizadas e aumento de muco e dos outros tipos celulares.
- **Diestro:** encontram-se células epiteliais de vários tipos, muitos leucócitos e muito muco.

A análise da regularidade do ciclo estral, que durou 15 dias consecutivos, iniciou-se a partir do DPN60.

Coleta e análise de órgãos

Sacrifício Puberdade

Logo após a instalação da puberdade, uma rata por ninhada de todos os grupos experimentais foi sacrificada para coleta de fígado, rins, hipófise, ovários e útero para pesagem, além da coleta de sangue para a dosagem hormonal.

Sacrifício após 75 dias

Após o término da avaliação da regularidade estral, ou seja, no dia DPN75, uma rata (em estro) por ninhada de todos os grupos experimentais foi sacrificada para coleta de fígado, rins, hipófise, ovários e útero, e também para coleta de sangue. Os órgãos reprodutores foram pré-fixados durante 4 horas na solução fixadora de Alfac (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial). A seguir os órgãos foram aparados e retornaram ao fixador, até completarem 24 horas de fixação. Após processamento para inclusão em parafina, foram obtidos 3 cortes de 5 micrômetros de espessura por animal (intervalo de 10 cortes no ovários e 15 no útero), corados pela Hematoxilina e Eosina, para avaliação histológica e morfométrica. Nos ovários, foi realizada a contagem de corpos lúteos, assim como a classificação e contagem dos folículos. A classificação foi baseada nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular, na morfologia dos folículos e no número de camadas de células da granulosa (Borgeest et al., 2002; Talsness et al, 2005). A classificação folicular foi baseada nos parâmetros de acordo com o descrito abaixo:

- **Folículo primordial e primário** (contados juntos): apresenta uma única camada de células planas ou cubóides da granulosa;
- **Folículo pré-antral**: apresenta duas a quatro camadas de células cubóides da granulosa sem presença de espaço antral;

- **Folículo antral:** apresenta várias camadas de células da granulosa e um espaço antral claramente definido;
- **Folículo atrésico:** apresenta desorganização das células da granulosa, núcleos picnóticos nas células da granulosa, descolamento da membrana basal e degeneração do oócito.

No útero, a medida da altura do endométrio foi realizada, em 3 cortes por animal, com o auxílio de um microscópio de luz. Para tanto, um microscópio Leica DMLB (100X) acoplado a uma câmera digital e a um computador com o software Leica Q-win (versão 3 para Windows™) foi utilizado. Em cada corte, cinco diferentes regiões foram analisadas, resultando no total de 15 medidas por animal.

Dosagens hormonais

O sangue colhido a partir do rompimento dos vasos cervicais foi coletado em tubo cônico e posteriormente centrifugado por 20 minutos a 2400 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C, para separação do soro, que foi utilizado para dosagens de FSH (hormônio folículo estimulante), LH (hormônio luteinizante), estrógeno, progesterona e testosterona, realizadas pela técnica de radioimunoensaio.

Comportamento sexual

Os estudos de comportamento sexual foram realizados em 2 ratas por ninhada de cada grupo experimental no primeiro estro após os 100 dias de idade, numa sala com ciclo invertido, durante a fase escura do ciclo, com o auxílio de 2 lâmpadas vermelhas de 40 Watts. Os animais foram colocados individualmente em caixa de polipropileno

medindo 56x35x31 cm, com tampa móvel de ferro galvanizada, e em seu assoalho, tela quadriculada, que permite perfeita visualização dos animais. Dois observadores colocados em posições diferentes em relação à caixa de observação anotaram simultaneamente o comportamento dos animais em estudo. Essas observações serão comparadas após cada observação, sendo desprezadas as discordantes. Antes do início da avaliação propriamente dita, um macho sexualmente ativo foi introduzido na referida caixa por 5 minutos, para se adaptar ao novo ambiente. Logo em seguida, foi introduzida na caixa a rata em teste, permitindo-se a realização de dez montas do macho, anotando-se, em cada uma delas, a presença ou não de lordose na fêmea. Define-se lordose como o ato da fêmea curvar o dorso para baixo, ao mesmo tempo em que a cauda se ergue expondo, assim, a genitália. A partir desses resultados foi calculado o coeficiente de lordose (CL) para cada rata, como especificado abaixo:

$$CL = \frac{\text{número de lordoses} \times 100}{\text{número de montas}}$$

Teste de Fertilidade

Após o estudo do comportamento sexual, 62 ratas foram avaliadas quanto à sua fertilidade, sendo 16 do grupo controle, 13 do grupo 0,05mg/kg, 17 do grupo 0,1mg/kg e 16 do grupo 0,2mg/kg, uma ou duas por ninhada. Elas foram pareadas com machos comprovadamente férteis, até no máximo três ciclos sexuais (estros), colocadas em suas caixas (uma fêmea por macho), no início da manhã (sala com ciclo invertido). No final da tarde foram colhidos os esfregaços vaginais, conforme descrito anteriormente, sendo que o dia em que foi determinada a presença de espermatozóides foi considerado o dia zero de prenhez. As fêmeas esperma-positivo foram mortas na manhã do 20º dia de prenhez, para a coleta do útero e ovários e registro dos números de corpos lúteos e sítios de implantação (implantes) para posterior determinação do potencial de fertilidade

(eficiência de implantação): $\text{implantes} / \text{corpos lúteos} \times 100$; taxa de prenhez: $n.^{\circ} \text{ de fêmeas prenhes} / n.^{\circ} \text{ de fêmeas inseminadas} \times 100$; taxa de perdas pré-implantação: $n.^{\circ} \text{ de corpos lúteos} - n.^{\circ} \text{ de implantes} / n.^{\circ} \text{ de corpos lúteos} \times 100$; taxa de perdas pós-implantação: $n.^{\circ} \text{ de implantes} - n.^{\circ} \text{ de fetos vivos} / n.^{\circ} \text{ de implantes} \times 100$; razão sexual: $n.^{\circ} \text{ de ratos machos} / n.^{\circ} \text{ ratas fêmeas} \times 100$.

Análise estatística

Para comparação dos dados obtidos foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância – ANOVA, com teste ‘a posteriori’ de Dunnet, ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste ‘a posteriori’ de Dunn, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos com os valores de média $\pm$ erro padrão da média e mediana $\pm$ desvio interquartilico, para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente.

Resultados

Evolução do Peso Corpóreo das Progenitoras

As mães que receberam doses diárias de PT, nas três diferentes doses, apresentaram evolução do peso corpóreo normal, semelhantes às ratas do grupo controle. O peso corpóreo foi acompanhado do DG12 até o DPN21 (início e fim do tratamento) (Figura 1).

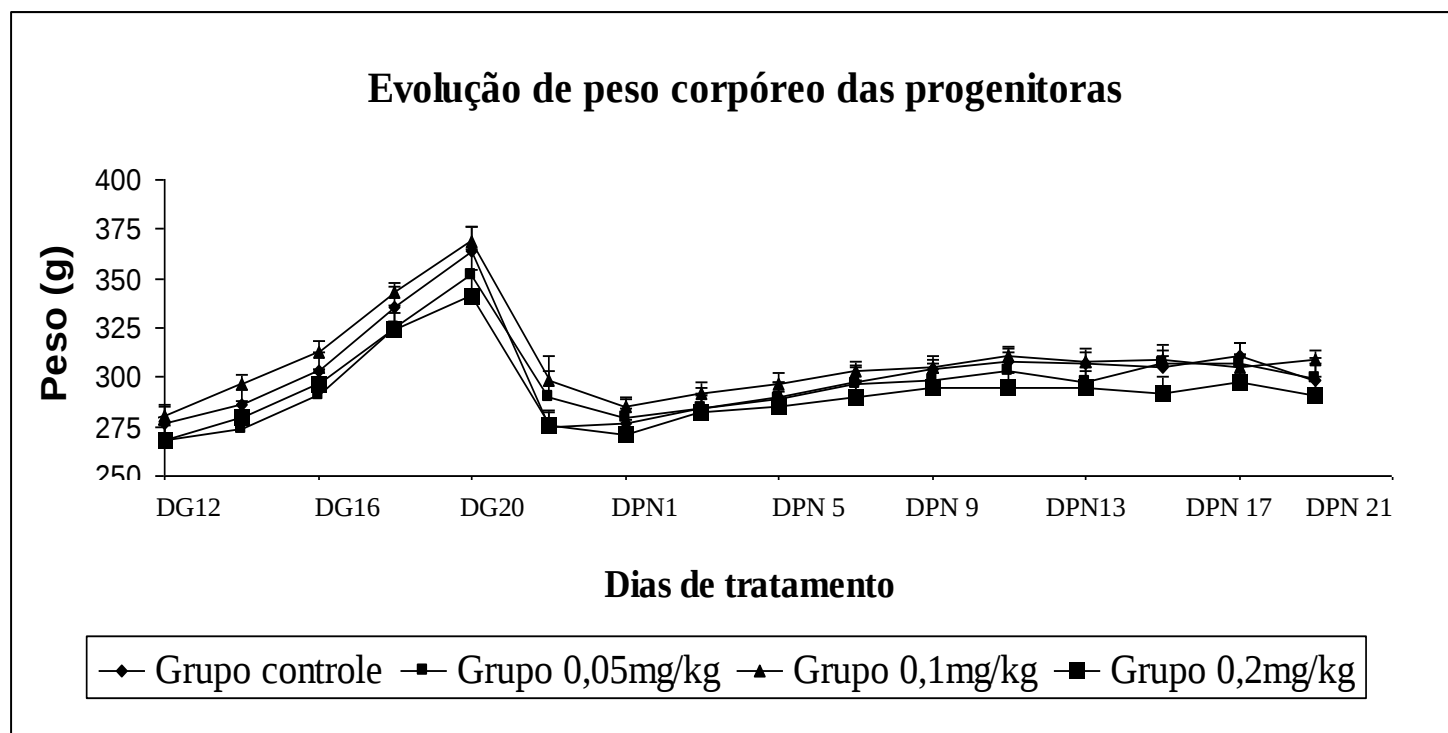


Figura 1. Evolução de peso corpóreo médio, em gramas, das ratas prenhes do grupo controle (n = 8 animais), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 7 animais), 0,1mg/kg (n = 9 animais) e 0,2mg/kg (n = 10 animais) de Propionato de Testosterona do DG 12 ao DPN 21. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

Peso Corpóreo dos Filhotes

Não houve diferença estatisticamente significativa no peso corpóreo dos filhotes fêmeas nos DPN 1, DPN 13 e após a abertura vaginal. Entretanto, no desmame (DG22) encontramos uma redução significativa deste parâmetro no grupo 0,2mg/kg, em relação ao grupo controle (Figura 2).

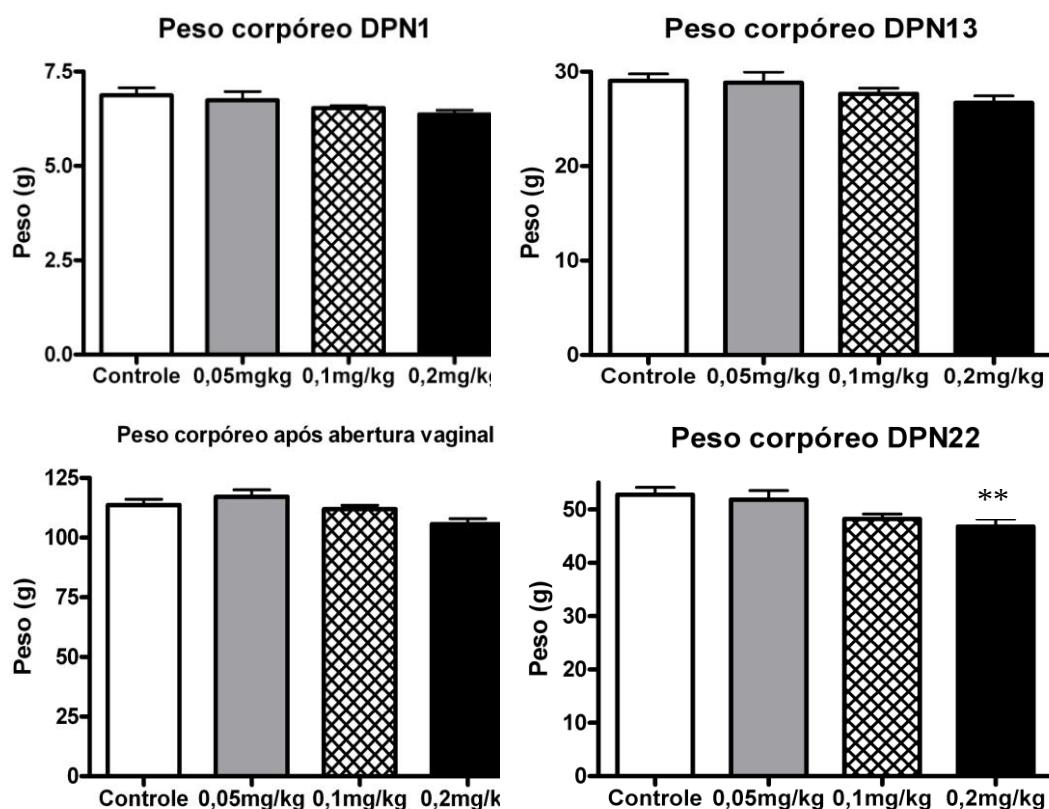


Figura 2. Peso corpóreo médio (g) dos filhotes fêmeas no DPN1, 13, DPN 22 e após a abertura vaginal, pertencentes ao grupo controle (n = 8 ninhadas), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 7 ninhadas), 0,1mg/kg (n = 9 ninhadas) e 0,2mg/kg (n = 10 ninhadas) de Propionato de Testosterona do DG12 ao DPN21. Valores expressos em média±E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet. **p<0,01.

Distância Anogenital e Contagem de Mamilos/Aréolas

Os filhotes do grupo 0,2 mg/kg apresentaram um aumento significativo na distância anogenital relativa ($DAG/\sqrt[3]{\text{peso corpóreo}}$) no DPN 1 (Figura 3). Valores expressos em $\text{média} \pm \text{E.P.M.}$ Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

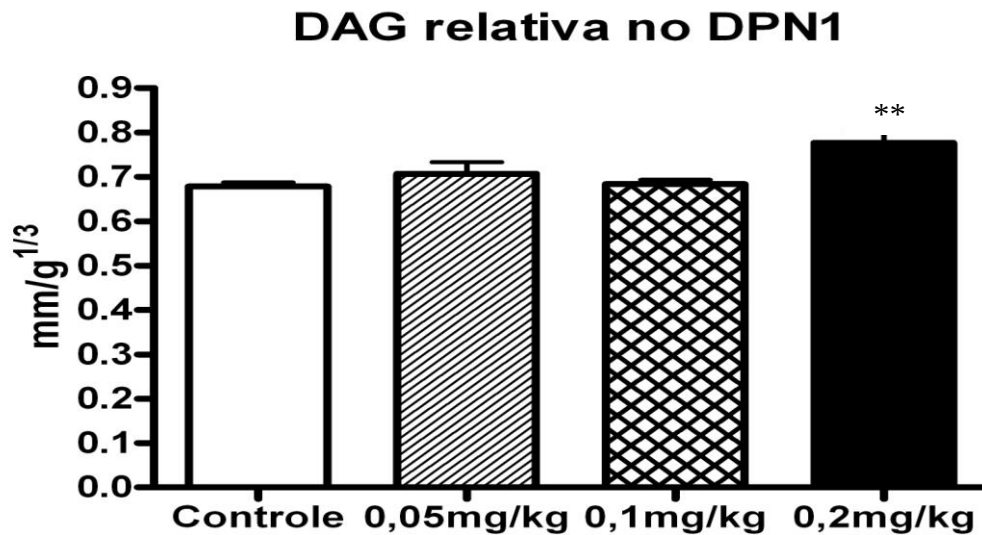


Figura 3. Distância ano-genital relativa ($DAG/\sqrt[3]{\text{peso corpóreo}}$), em $\text{mm/g}^{1/3}$, do grupo controle ($n = 8$ ninhadas), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg ($n = 7$ ninhadas), 0,1mg/kg ($n = 9$ ninhadas) e 0,2mg/kg ($n = 10$ ninhadas) de Propionato de Testosterona do DG12 ao DPN21. Valores expressos em $\text{média} \pm \text{E.P.M.}$ Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet. ** $p < 0,01$.

Contagem de Mamilos/Aréolas

Quanto à contagem de mamilos/aréolas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 4). Valores expressos em média±E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

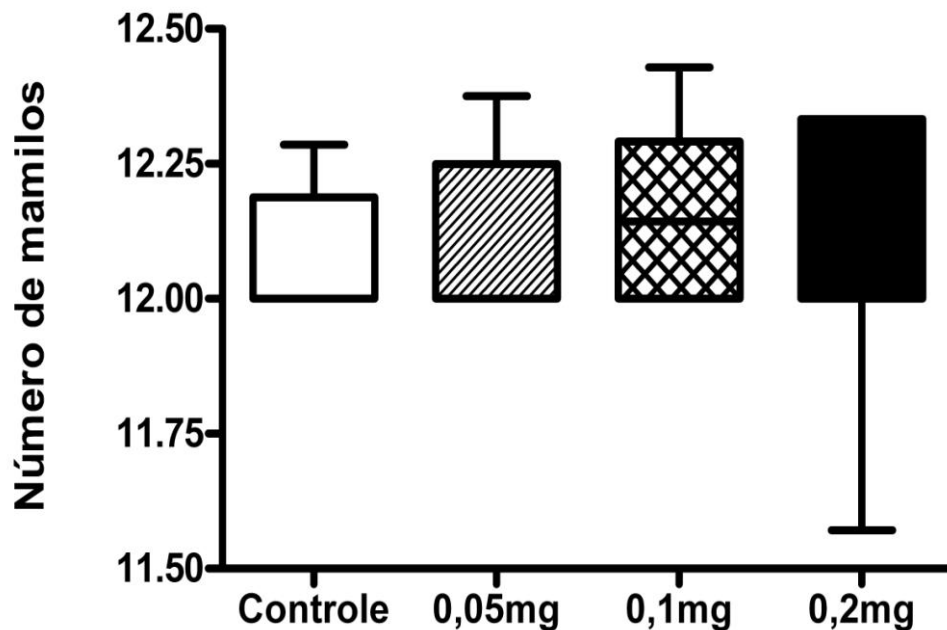


Figura 4. Número de mamilos das fêmeas no DPN 13 do grupo controle (n = 8 ninhadas), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 7 ninhadas), 0,1mg/kg (n = 9 ninhadas) e 0,2mg/kg (n = 10 ninhadas) de Propionato de Testosterona do DG12 ao DPN21. Valores expressos em mediana (Q1-Q3). Teste Kruskal Wallis com teste a posteriori de Dunn **p<0,01.

Idade de Abertura Vaginal

Não houve diferença estatisticamente significativa na idade média (em dias) em que ocorreu a abertura vaginal entre os grupos experimentais (Figura 5).

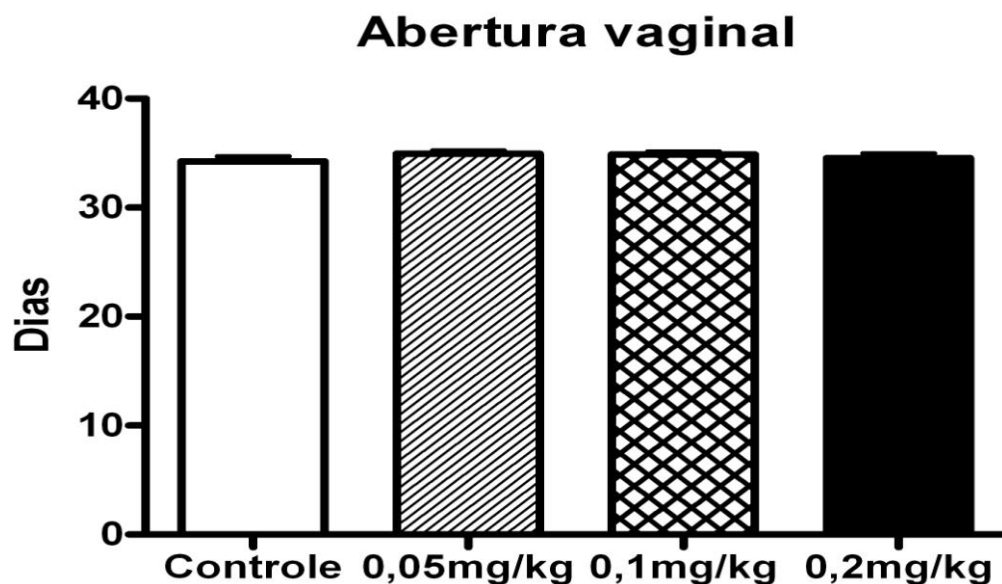


Figura 5. Idade média (em dias) da abertura vaginal de ratas do grupo controle ($n = 8$ ninhadas), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg ($n = 7$ ninhadas), 0,1mg/kg ($n = 9$ ninhadas) e 0,2mg/kg ($n = 10$ ninhadas) de Propionato de Testosterona do DG12 ao DPN21. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

Primeiro Estro e Regularidade do Ciclo Estral

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais no dia médio em que ocorreu o primeiro estro (Figura 6), bem como na regularidade do ciclo estral (Tabela 1).

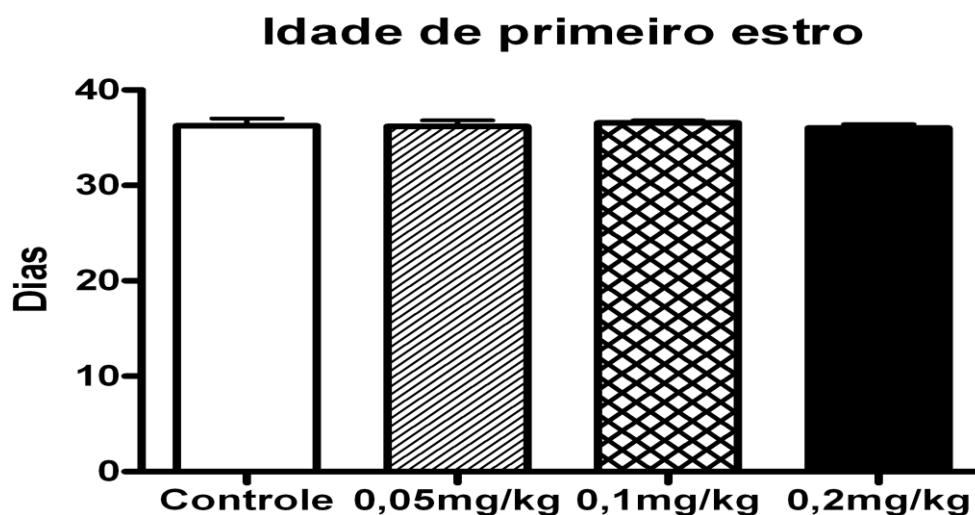


Figura 6. Idade, em dias, do primeiro estro de ratas do grupo controle (n = 8 ninhadas), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 7 ninhadas), 0,1mg/kg (n = 9 ninhadas) e 0,2mg/kg (n = 10 ninhadas) de Propionato de Testosterona do DG12 ao DPN21. Valores expressos em média±E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

Tabela 1. Análise da regularidade do ciclo estral de ratas cujas mães foram expostas ao Propionato de Testosterona nas doses de 0,05mg/kg (n = 7 ninhadas), 0,1mg/kg (n = 9 ninhadas) e 0,2mg/kg (n = 10 ninhadas) ou ao óleo de milho (veículo) no grupo controle (n=10 ninhadas) do DG12 ao DPN21. Valores expressos em média+E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

Parâmetros (dias)	Controle n = 8	0,05mg/kg n = 7	0,1mg/kg n = 9	0,2mg/kg n = 10
Frequência da fase de Diestro	4,2+0,5	4,1+0,5	4,1+0,4	3,4+0,4
Frequência da fase de Proestro	2,7+0,2	2,5+0,1	2,2+0,3	2,8+0,3
Frequência da fase de Estro	4,4+0,1	4,2+0,3	4,3+0,1	4,0+0,1
Frequência da fase de Metaestro	3,5+0,4	4,0+0,3	4,3+0,6	4,6+0,4

Coleta e análise de órgãos

Sacrifício Puberdade

Não foi observada alteração em relação ao peso dos rins, fígado, hipófise e órgãos reprodutivos de ratas púberes, sacrificadas em estro, após instalação da puberdade nos grupos experimentais, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Peso absoluto do fígado, rins, hipófise e órgãos reprodutores de ratas em estro logo após a instalação da puberdade (um animal por ninhada), do grupo controle (n = 8 animais), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 7 animais), 0,1mg/kg (n = 9 animais) e 0,2mg/kg (n = 10 animais) de Propionato de Testosterona. Valores expressos em média±E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

Órgão	Controle <i>n=8</i>	0,05mg/kg <i>n=7</i>	0,1mg/kg <i>n=9</i>	0,2mg/kg <i>n=10</i>
Fígado (g)	5,69±0,26	5,45±0,14	5,37±0,31	4,81±0,15
Rins (g)	1,21±0,04	1,15±0,02	1,15±0,04	1,11±0,04
Hipófise (mg)	6,58±0,36	5,65±0,27	5,77±0,30	5,58±0,17
Útero (mg)	211,88±12,65	214,14±19,83	231,40±26,83	175,11±5,51
Ovários (mg)	37,13±3,07	33,40±1,76	38,75±5,18	35,38±2,20

Sacrifício após 75 dias

No sacrifício do primeiro estro após a análise do ciclo estral, ou seja, após os 75 dias de idade, também não foi encontrada diferença significativa no peso do fígado, dos rins, hipófise e órgãos reprodutivos entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Peso absoluto do fígado, rins, hipófise e órgãos reprodutores de ratas, sacrificadas em estro após DPN75, do grupo controle (n = 8 ninhadas), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 7 ninhadas), 0,1mg/kg (n = 9 ninhadas) e 0,2mg/kg (n = 10 ninhadas) de Propionato de Testosterona. Valores expressos em média+E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

Órgão	<u>Controle</u> n=8	0,05mg/kg n=7	0,1mg/kg n=9	0,2mg/kg n=10
Fígado (g)	8,55±0,22	8,47±0,35	8,47±0,27	8,09±0,20
Rins (g)	1,87±0,04	1,73±0,06	1,66±0,05	1,55±0,04
Hipófise (mg)	11,80±0,51	11,19±0,62	10,67±0,56	11,21±0,29
Útero (mg)	417,93±14,15	529,23±92,63	392,24±22,73	415,00±43,03
Ovários (mg)	71,50±3,66	69,87±3,34	66,72±3,42	69,01±2,25

Dosagens hormonais

Os níveis séricos de estradiol e progesterona mostraram-se semelhantes entre o grupo controle e os grupos tratados com 0,05mg/kg, 0,1mg/kg e 0,2mg/kg de Propionato de Testosterona, não apresentando diferenças estatísticas tanto na puberdade quanto na idade adulta (Figura 7).

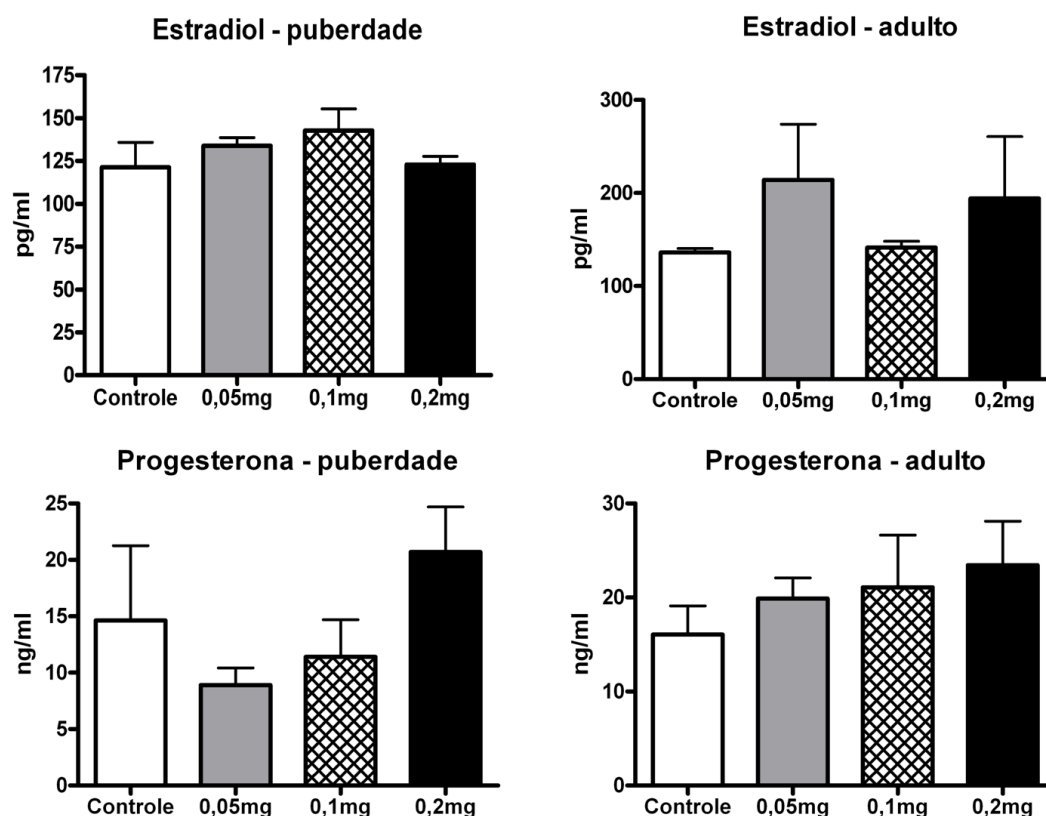


Figura 7. Níveis hormonais de estradiol e progesterona na puberdade (Controle n= 8; 0,05mg/kg n= 7; 0,1mg/kg n= 9; 0,2mg/kg n= 10) e na idade adulta (Controle n= 14; 0,05mg/kg n= 8; 0,1mg/kg n= 9; 0,2mg/kg n= 10) das fêmeas sacrificadas em estro, tratadas com Propionato de Testosterona *in utero* e durante a lactação. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

Níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) não mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais, em relação ao grupo controle (Figura 8). Níveis de testosterona não puderam ser detectados.

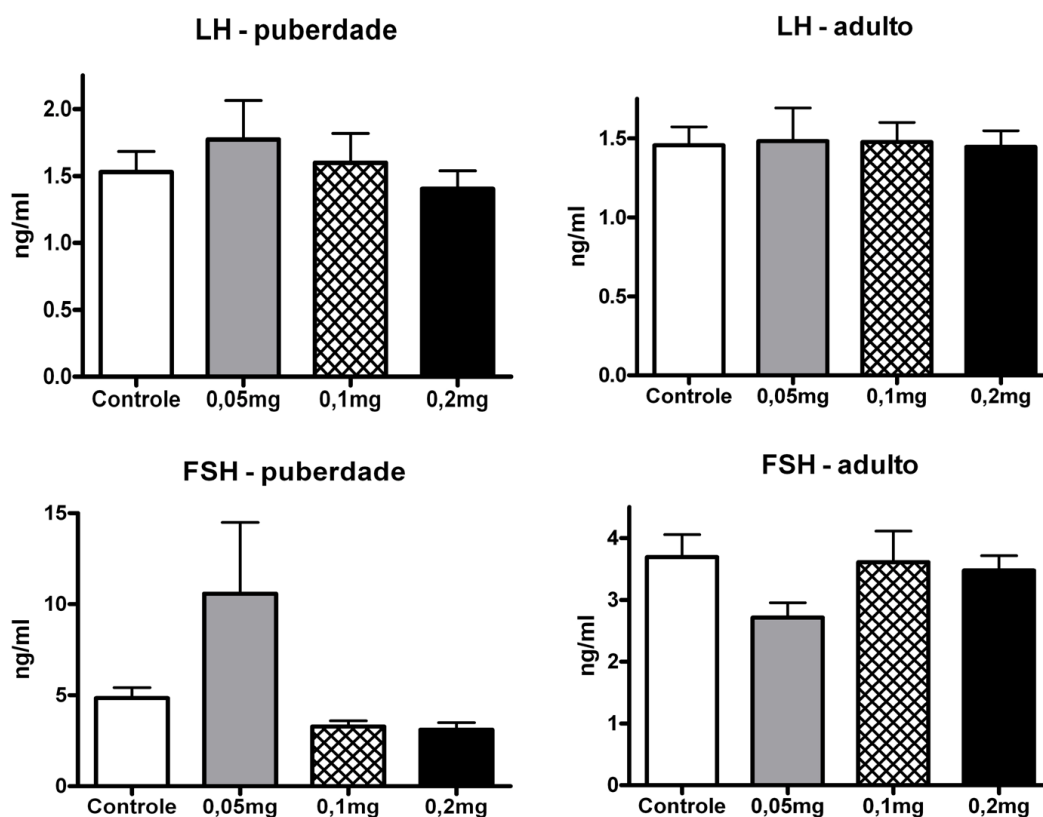


Figura 8. Níveis hormonais de LH e FSH na puberdade (Controle n= 8; 0,05mg/kg n= 7; 0,1mg/kg n= 9; 0,2mg/kg n= 10) e na idade adulta (Controle n= 14; 0,05mg/kg n= 8; 0,1mg/kg n= 9; 0,2mg/kg n= 10) das fêmeas sacrificadas em estro, tratadas com Propionato de Testosterona *in utero* e durante a lactação.

Avaliação histológica

Contagem folicular

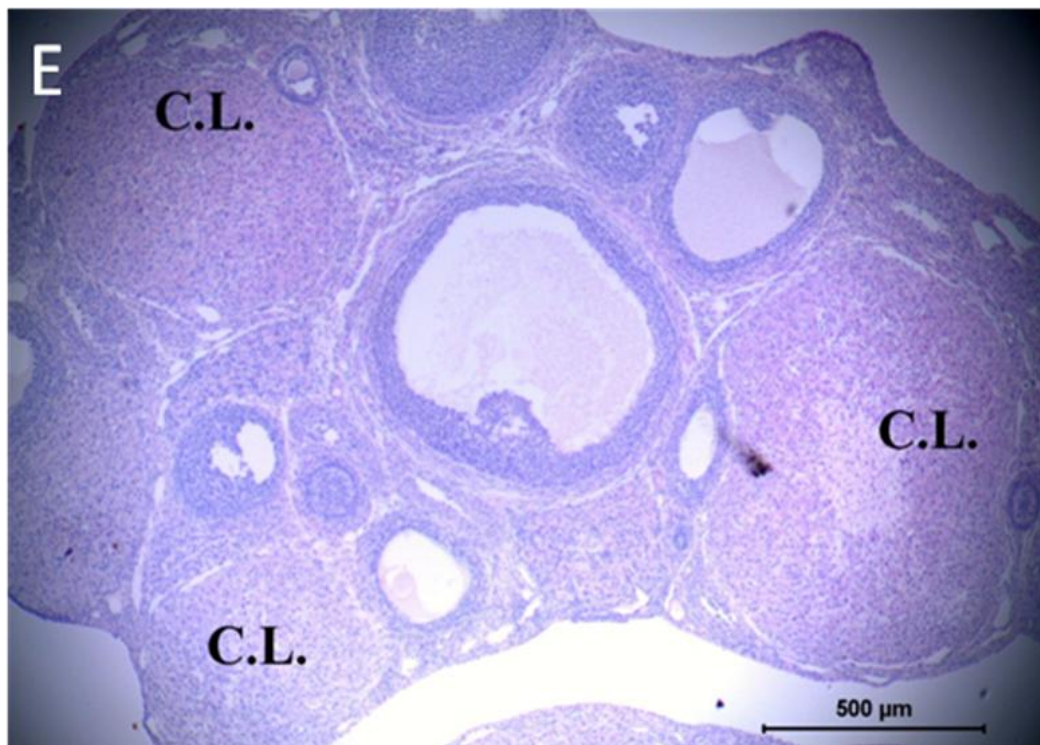
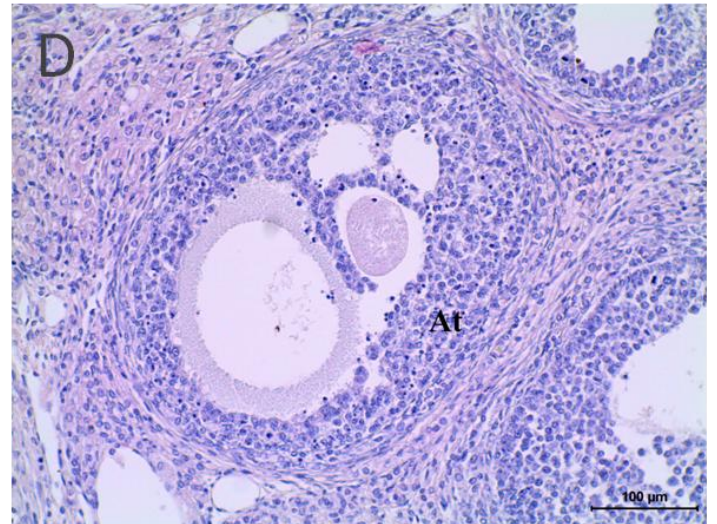
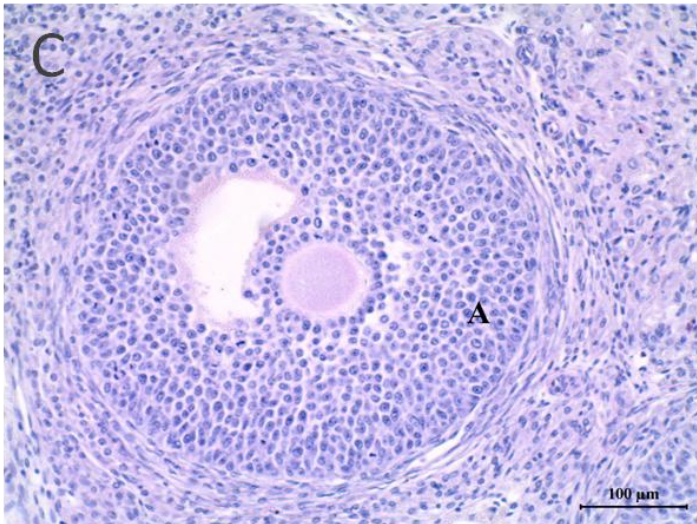
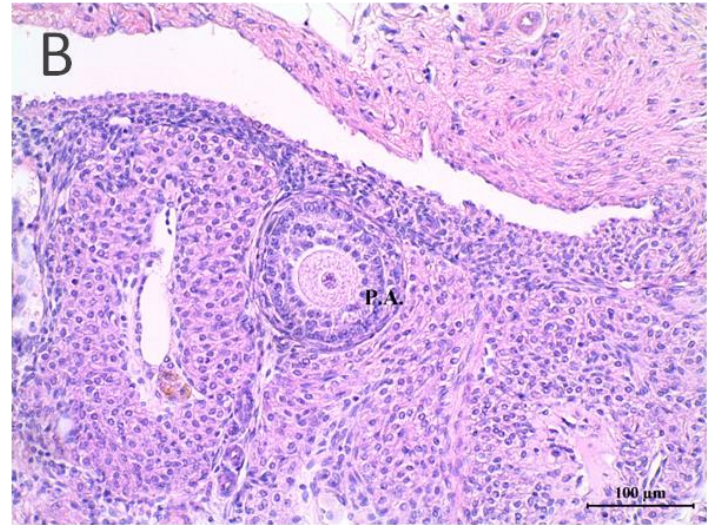
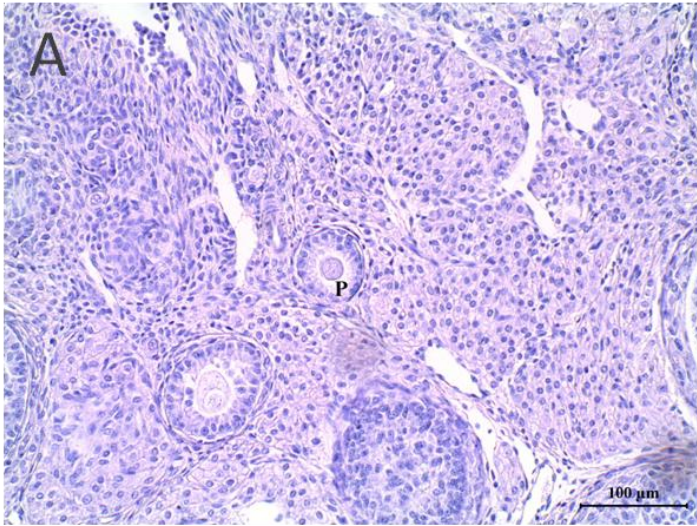
O grupo tratado com 0,2mg/kg apresentou diferença significativa em relação ao número de folículos primordial e primário. Os outros grupos tratados apresentaram aspectos histológicos semelhantes ao grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa em relação ao número de folículos e de corpos lúteos, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Classificação e contagem das estruturas ovarianas do grupo controle (n = 8 animais), e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 7 animais), 0,1mg/kg (n = 9 animais) e 0,2mg/kg (n = 10 animais) de Propionato de Testosterona, no estro após os 75 dias de idade. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet. **p<0,01.

Classificação	Contagem			
	<i>Controle</i>	<i>0,05mg/kg</i>	<i>0,1mg/kg</i>	<i>0,2mg/kg</i>
<i>Primordial e Primário</i>	1,40 $\pm$ 0,49	0,71 $\pm$ 0,26	2,33 $\pm$ 0,34	1,64 $\pm$ 0,2**
<i>Pré-Antral</i>	6,91 $\pm$ 1,17	3,86 $\pm$ 0,83	5,56 $\pm$ 0,91	4,67 $\pm$ 0,81
<i>Antral</i>	7,29 $\pm$ 0,93	6,90 $\pm$ 0,90	9,30 $\pm$ 1,13	7,03 $\pm$ 1,10
<i>Atrésico</i>	2,01 $\pm$ 0,86	1,81 $\pm$ 0,24	1,93 $\pm$ 0,42	1,37 $\pm$ 1,28
<i>Corpo lúteo</i>	4,50 $\pm$ 0,32	4,52 $\pm$ 0,54	5,70 $\pm$ 0,53	4,17 $\pm$ 0,33

Figura 7. Fotomicrografias ilustrativas de corte longitudinal de ovários de ratas em estro. P: folículo primordial; PA: folículo pré-antral; A: folículo antral; At: folículo atrésico, aumento de 200x. CL: corpo lúteo, aumento de 40x. Hematoxilina-Eosina.

A – grupo 0,1mg; B – grupo 0,05mg; C – grupo controle; D – grupo 0,2mg; E - grupo controle.



Morfometria uterina

No útero, a medida média da altura do endométrio não se mostrou significativa entre os grupos experimentais (Figura 5). Em cada corte, cinco diferentes regiões foram analisadas, resultando no total de 15 medidas por animal.

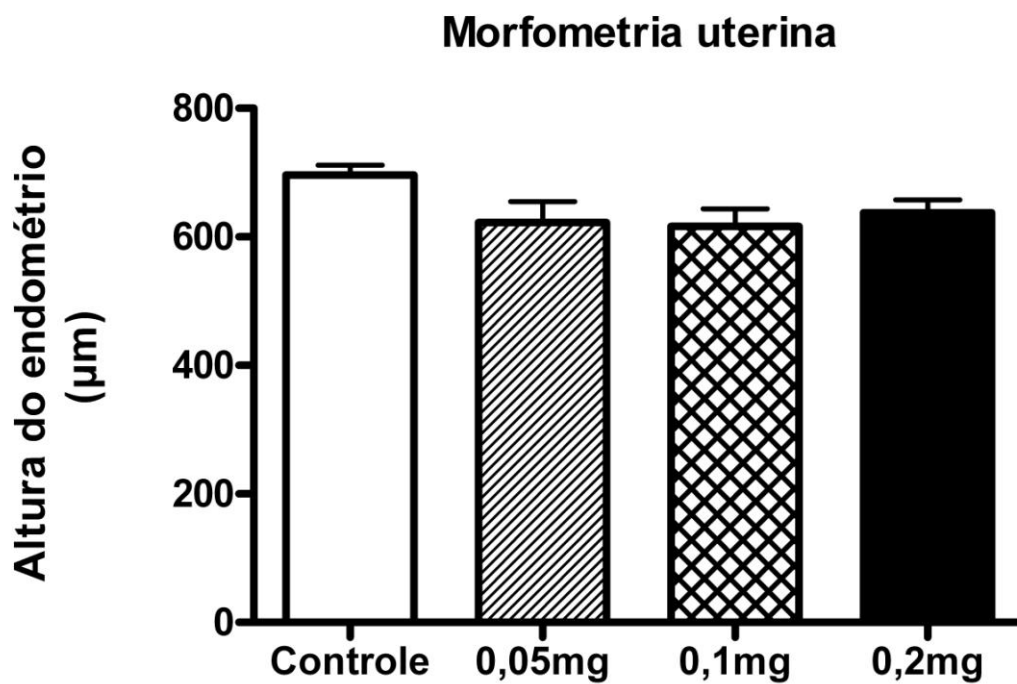
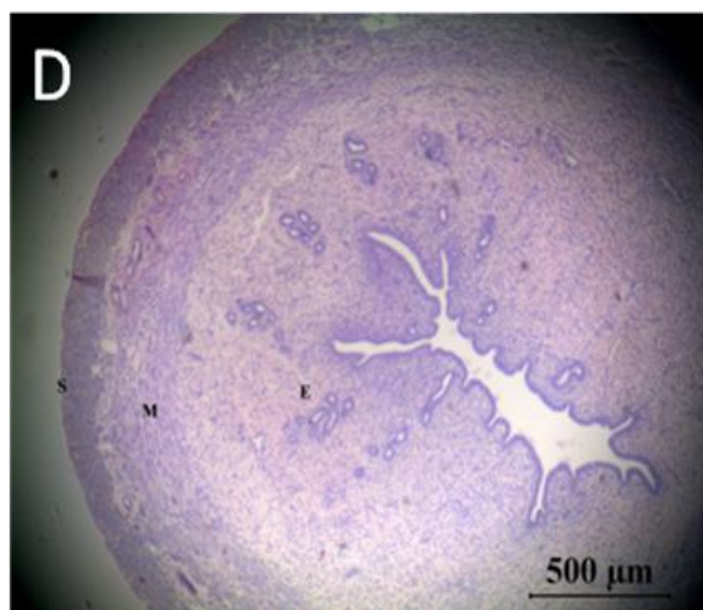


Figura 5. Média da altura do endométrio, em μm , de ratas tratadas com Propionato de Testosterona, no estro após os 75 dias de idade. Grupo controle ($n = 8$ ninhadas) e grupos tratados com 0,05mg/kg ($n = 7$ ninhadas), 0,1mg/kg ($n = 9$ ninhadas) e 0,2mg/kg ($n = 10$ ninhadas). Valores expressos em média+E.P.M. Teste de ANOVA com teste a posteriori de Dunnet.

Figura 8. Fotomicrografia ilustrativa de corte transversal de cornos uterinos de ratas em estro. E = endométrio, M = camada muscular, S = serosa. Aumento de 40x, Hematoxilina-Eosina. A – grupo controle; B – grupo 0,05mg; C – grupo 0,1mg; D- grupo 0,2mg.



Comportamento sexual

As ratas dos grupos tratados com Propionato de Testosterona *in utero* e lactação não apresentaram alteração em seu comportamento sexual, caracterizado pela presença de lordose das fêmeas em estro. A diferença entre os grupos, calculada pelo coeficiente de lordose (CL), não se mostrou estatisticamente significativa.

Tabela 6. Teste de comportamento sexual realizado com fêmeas aos 100 dias de idade, tratadas com Propionato de Testosterona nas doses de 0,05mg/kg (n=13), 0,1mg/kg (n=17) e 0,2mg/kg (n= 16) ou óleo de milho (n= 16), *in utero* e durante a lactação. Teste Kruskal Wallis com teste a posteriori de Dunn.

Grupo	Controle <i>n= 16</i>	0,05mg <i>n= 17</i>	0,1mg <i>n= 16</i>	0,2mg <i>n= 16</i>
Coeficiente de lordose (%)	96,25 (100-100)	95,39 (90-100)	91,18 (90-100)	86,25 (85-100)

Teste de Fertilidade

O teste de fertilidade mostrou que não houve diferença significativa no desempenho reprodutivo das ratas tratadas com Propionato de Testosterona (Tabela 7).

Tabela 7. Teste de fertilidade realizado em fêmeas adultas do grupo controle (n = 16) e dos grupos tratados com 0,05mg/kg (n = 14), 0,1mg/kg (n = 18) e 0,2mg/kg (n = 20) com Propionato de Testosterona do DG12 ao final da lactação.

Parâmetros	Controle	0,05mg/kg	0,1mg/kg	0,2mg/kg
Nº de fêmeas prenhes	16	13	17	16
² Peso final da rata (g)	385,61 $\pm$ 7,24	402,74 $\pm$ 5,98	382,28 $\pm$ 4,86	371,37 $\pm$ 7,21
² Peso útero + fetos (g) (U+F)	64,33 $\pm$ 2,56	66,11 $\pm$ 1,61	63,35 $\pm$ 1,78	61,34 $\pm$ 3,08
² Peso rata - peso (U+F) (g)	321,21 $\pm$ 5,82	336,64 $\pm$ 5,57	322,66 $\pm$ 5,87	310,03 $\pm$ 5,14
² Peso dos fetos (g)	3,27 $\pm$ 0,06	3,19 $\pm$ 0,07	3,25 $\pm$ 0,05	2,23 $\pm$ 0,04
² Número de corpos lúteos	14,75 $\pm$ 0,88	14,54 $\pm$ 0,55	14,59 $\pm$ 0,43	14,44 $\pm$ 0,77
² Número de implantes	14,19 $\pm$ 0,92	14,38 $\pm$ 0,51	13,41 $\pm$ 0,35	13,12 $\pm$ 0,59
² Número de fetos	12,43 $\pm$ 0,53	13,15 $\pm$ 0,43	12,59 $\pm$ 0,34	12,06 $\pm$ 0,58
¹ Potencial de fertilidade (%)	100 (98,68-100)	100 (100-100)	93,33 (92,85-100)	97,05 (86,15-100)
¹ Perdas pré-implantação (%)	0 (0-1,31)	0 (0-0)	6,66 (0-7,14)	2,94 (0-13,84)
¹ Perdas pós-implantação (%)	7,18 (0-17,19)	7,69 (6,25-13,33)	7,14 (0-8,33)	7,69 (6,07-9,09)
¹ Razão sexual (%)	64,58 (48,61-165)	116,67 (83,33-200)	120 (85,71-180)	94,44 (71,42-135)

¹ Valores expressos em mediana (1º quartil – 3º quartil). Teste de Kruskal-wallis.

² Valores expressos em média $\pm$ EPM. Teste ANOVA (p<0,05).

Discussão

Recentemente, grande atenção tem sido dada ao estudo de compostos químicos com potencial em causar desregulação endócrina em animais, principalmente no homem (Hotchkiss et al., 2002). Esses desreguladores possuem a capacidade de mimetizar ou antagonizar os efeitos de hormônios esteróides no organismo, podendo alterar todo o sistema endócrino. Essa alteração pode ser profunda, visto que os hormônios desempenham papel crucial no controle do desenvolvimento (Gray et al., 2001)

Um exemplo são os compostos com atividade androgênica, que têm sido encontrados como contaminantes de rios e em animais destinados à alimentação humana nos Estados Unidos e Europa (Parks et al., 2001; Orlando et al., 2004). Esses andrógenos exógenos exercem efeitos negativos na fertilidade em fêmeas de mamíferos, dependendo da dose, via de administração e tempo de exposição (Foecking et al., 2008). A exposição de fêmeas a andrógenos no período pré-natal pode causar masculinização psicológica e alterações comportamentais, desregulando o desenvolvimento normal do fenótipo feminino. (Greene et al., 1939; Huffmand and Hendricks, 1981; Wolf et al., 2002; Hotchkiss et al., 2007).

A literatura mostra que a maior parte dos estudos são realizados em doses relativamente altas e períodos curtos de tratamento (Hoepfner and Ward, 1988; Wolf et al., 2002, 2004; Hotchkiss et al., 2007; Welsh et al., 2009). O presente estudo, por outro lado, visa mimetizar a exposição de ratas fêmeas prenhes e lactantes a contaminantes ambientais com ação androgênica (encontrados em baixas doses) e estudar os possíveis efeitos tóxicos na prole feminina. O propionato de testosterona foi escolhido como o agente de ação androgênica e a janela de exposição para as ratas prenhes (DG12 ao DPN 21) coincide com o período crítico de diferenciação sexual da prole (Wolf et al., 2000; McIntyre et al., 2002).

O monitoramento do peso corpóreo materno durante o tratamento fornece um índice do estado de saúde geral dos animais, e essa informação pode ser importante para a interpretação de possíveis efeitos reprodutivos (US EPA, 1996). A testosterona tem mostrado potencial para reduzir o peso gestacional de ratas tratadas com altas doses. Doses acima de 2mg/kg/dia reduzem o ganho de peso gestacional em 20g (aproximadamente 8% do peso materno) (Greene et al., 1939; Fritz et al., 1984; DeHaan, et al., 1987; Wolf et al., 2002). Em um tratamento com 1mg/kg/dia de PT, Wolf et al (2004) encontraram uma redução do peso corpóreo materno de 53g no grupo controle para 35g no grupo tratado. No nosso estudo, o peso das mães durante o período de exposição ao PT se mostrou uniforme entre os grupos, indicando ausência de efeitos tóxicos maternos no tratamento com a droga.

Os resultados mostraram ausência de efeitos do tratamento com o PT sobre o peso corpóreo dos filhotes no DPN 1 e no DPN13. No DPN 22, houve uma diminuição do peso corpóreo no grupo 0,2mg/kg, mas essa alteração não se manteve; após a abertura vaginal este parâmetro retornou a valores semelhantes ao grupo controle. Wolf et al, 2004, em um tratamento com 1mg/kg/dia de Propionato de Testosterona, encontraram redução significativa de peso corpóreo da ninhada ao desmame (DPN24). Hotchkiss et al (2007) realizaram um tratamento com PT nas doses de 1,5mg/kg/dia e 2,5mg/kg/dia do 14º DG ao 18º DG, e mostraram redução de peso corpóreo dos filhotes no DPN 2 em ambas as doses. Wolf et al (2002) em um tratamento com 0,5; 1; 2; 5; e 10mg/kg/dia do DG14 ao DG19 também observaram uma redução de peso corpóreo dos filhotes no DPN2 em todas as doses, entretanto este se mostrou um efeito transitório.

Biomarcadores externos da exposição pré-natal a andrógenos têm sido descritos em roedores, e incluem a distância anogenital (DAG) e número de aréolas/mamilos (Hotchkiss et al., 2007). A DAG é definida como a distância entre a papila genital e o

ânus; roedores machos apresentam a DAG aproximadamente duas vezes maior que as fêmeas (Vandenbergh and Huggett, 1995; Gray et al., 1999). É uma medida que pode variar com o peso corpóreo. Portanto, agentes sem atividade endócrina podem induzir aparente alteração neste parâmetro se eles afetarem o tamanho dos filhotes. Do mesmo modo, agentes com efeitos hormonais podem não ser detectados se induzirem uma mudança compensatória no peso corpóreo. Estudos revelam que a DAG aumenta aproximadamente 0,13 mm para cada 1 g, no caso do peso corpóreo de filhotes fêmeas. (Gallavan et al., 1999). Agentes com atividade endócrina, como a testosterona e a androstenediona, podem causar alterações na DAG da progênie de ratas tratadas (Greene et. al., 1939). Com base no fato de que o animal cresce rapidamente, e este crescimento ocorre em três dimensões, o peso corpóreo deve ser visto como uma medida cúbica (Wise et al., 1991; Clark, 1999). Aréolas são áreas escuras envolvendo o broto do mamilo e são indicativos de mamilos adultos. Ratas apresentam tipicamente 12 mamilos, enquanto machos não possuem nenhum. A formação de aréolas/mamilos durante a diferenciação sexual em ratos é prevenida pela presença de DTH (dihidrotestosterona) (Goldman et al., 1976, Imagawa et al., 1994). Ambos os marcadores variam com a exposição pré-natal a andrógenos (Gray et al., 1999).

No presente estudo, houve aumento da DAG relativa no grupo 0,2mg/kg no DPN 1. Quanto ao número de aréolas/mamilos, não houve alteração significativa, ou seja, fêmeas mantiveram média de 12 mamilos. Wolf et al (2002), em um estudo com 1, 5 e 10 mg/kg/dia de PT encontraram aumento na DAG nas fêmeas no DPN 2 e nenhuma alteração no número de aréolas/mamilos, corroborando nossos resultados.

A puberdade é determinada por um aumento gradual da secreção dos hormônios gonadotróficos pela hipófise, levando ao aumento de estradiol no sangue, sendo que em ratas, a idade de abertura vaginal e do primeiro estro são indicativos externos deste

acontecimento (US EPA, 1996; Guyton & Hall, 2002). Hotchkiss et al. (2007), em um tratamento com PT, encontraram atraso na data da abertura vaginal, agênese do orifício da vagina e hipospadia no grupo de ratas tratadas com 2,5 mg/kg/dia. Por outro lado, Wolf et al. (2002) relatam ausência de efeitos sobre a abertura vaginal, em ratas tratadas com PT, nas doses de 0,1 e 0,5 mg/dia. Nossos estudos mostraram ausência de alteração na abertura vaginal em todos os grupos experimentais, bem como na idade primeiro estro.

O ciclo estral é o ciclo reprodutivo de ratas, e é caracterizado por 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro. Do início da maturidade sexual até os 12 meses de idade, a duração média do ciclo estral é de quatro dias (Marcondes, 2002). Segundo Young et al. (1941) a ovulação ocorre do começo do proestro ao fim do estro. Tratamento pré-natal com testosterona inibe o desenvolvimento normal da ciclicidade, levando à um padrão acíclico na secreção de gonadotrofinas, manifestado pela ocorrência de corneificação vaginal (McDonald, 1971). No presente trabalho não houve alteração da regularidade do ciclo estral, analisado pela frequência de cada uma das fases do ciclo, bem como pela sua duração. Esses dados demonstram ausência de efeitos tóxicos do Propionato de Testosterona sobre o ciclo reprodutivo das ratas fêmeas nas concentrações de 0,05mg/kg, 0,1mg/kg e 0,2mg/kg em exposição do DG 12 ao final da lactação.

Durante o ciclo estral há grande variação dos níveis de hormônios gonadotróficos. Níveis de prolactina, LH e FSH estão baixos durante o ciclo estral e só aumentam no final do proestro. Níveis de estradiol aumentam no metaestro e retorna a níveis basais no estro, com pico no proestro. Níveis de progesterona aumentam durante o metaestro e diestro e em seguida apresenta diminuição (Smith et al., 1975; Sportnitz et al., 1999). Essa oscilação faz com que o peso do útero sofra mudanças ao longo do

ciclo, sendo que o maior peso é atingido em proestro devido à secreção de estrógenos (US EPA, 1996). A variação da idade da instalação da puberdade também pode alterar o peso dos órgãos reprodutivos, especialmente os ovários (McDonald, 1971). Os ovários exercem funções importantes na reprodução feminina como desenvolvimento e maturação dos gametas e secreção de esteróides para regulação do ciclo estral (Richards, 1980; Hedge, 1987).

Neste trabalho não houve alteração no padrão de secreção de hormônio luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH), estrógeno e progesterona e consequentemente, no peso absoluto e relativo dos órgãos reprodutivos, demonstrando que em baixas doses o PT não desregula a secreção hormonal.

Fêmeas nascem com um número finito de folículos ovarianos, dentro dos quais ocorre a maturação dos oócitos, que ficam parados em meiose até um período imediatamente antes da ovulação. Durante cada ciclo estral, folículos primordiais são recrutados para o desenvolvimento, passando por estágio pré-antral e antral antes de se tornar maduro para ser fertilizado (Richards, 1980; Hirshfield, 1991).

Agentes químicos com capacidade de afetar diretamente o ovário ou o eixo reprodutivo (hipotálamo-hipófise-ovário) podem desregular a função ovariana, resultando em infertilidade, especialmente se a toxicidade ocorrer em folículos primordiais, que uma vez destruídos não conseguem se restabelecer. Entretanto, o ovário apresenta enzimas capazes de biotransformar xenobióticos, detoxificando-o. Em ratos, enzimas como epóxi-hidrolase e citocromo P450 realizam essa função (Mukhtar, 1978; Mattison, 1979; Heinrichs, 1980; Bengtsson, 1983;; Bengtsson, 1992).

No presente trabalho, o tratamento com PT diminuiu o número de folículos primordiais na dose de 0,2mg/kg em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diminuição de folículos pré-antrais e antrais nos grupo experimentais. É possível que

esses folículos não tenham sofrido ação do tóxico devido à existência de enzimas ovarianas.

Segundo Rhees (1997), a diferenciação sexual das estruturas cerebrais e suas funções são dependentes de níveis de testosterona ou seus metabólitos durante certo período “sensitivo” do desenvolvimento. Se a testosterona estiver presente durante último período da gestação, ocorre masculinização ou desfeminização do comportamento sexual de fêmeas, bem como alteração da morfologia e funcionamento do sistema nervoso central e da fisiologia reprodutiva. (Gerall et al., 1966; Kawashima et al., 1997). Realizando um estudo com testosterona diluída em óleo de gergelim em dose única de 5mg no DG 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, Rhees (1977) encontrou diminuição do comportamento de lordose das fêmeas que receberam a droga no DG 18 ou mais, mostrando que a sensibilidade do comportamento sexual ocorre a partir desse período. Entretanto, nossos resultados não demonstraram ausência ou diminuição do comportamento sexual nas fêmeas dos diversos grupos tratados, indicando que a testosterona, nas doses de 0,05; 0,1 e 0,2 mg/kg, não interfere com a organização do cérebro feminino.

Alguns estudos relatam que a testosterona não provoca danos ao DNA de animais tratados (Ho, 1994); entretanto, quando o tratamento é combinado com exposição à estrógenos, a testosterona é capaz de provocar danos dramáticos, como quebra na fita de DNA (Ragnotti, 1987). O teste de fertilidade realizado neste estudo não mostrou alteração no número de perdas pré e pós-implantação, sugerindo que a dose de testosterona ministrada não causou dano cromossômico. O potencial fértil e taxa de prenhez dos animais tratados também não se alterou, mostrando que as fêmeas mantiveram a capacidade de gerar prole viável.

Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que nestas condições experimentais o PT, em baixas doses, é tóxico ao desenvolvimento inicial das fêmeas, uma vez que houve redução no peso corpóreo no 22º dia pós-natal, masculinização dos filhotes fêmeas, caracterizada pelo aumento da DAG relativa. Houve ainda diminuição no número de folículos primordiais do grupo tratado com maior dose. Entretanto essas alterações não comprometeram o desenvolvimento sexual posterior, como instalação da puberdade, ciclicidade e secreção hormonal, comportamento sexual, fertilidade.

Referências

Abbott, D.H.; Dumesic, D.A.; Fanks, S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome – a hypothesis. **Journal of Endocrinology**, v.174, p.1-5, 2002.

Azziz, R.; Woods, K.S.; Reyna, R.; Key, T.J.; Knochenhauer, E.S.; Yildiz, B.O. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, p.2745-2749, 2004.

Asuncion, M.; Calvo, R.M.; San Millan, J.L.; Sancho, J.; Avila, S.; Escobar- Morreale, H.F. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, p.2434-2438, 2000.

Barker, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v.261, p.412-417, 2007.

Bengtsson, M.; Rydstron, J. Regulation of carcionogen metabolism in the rat ovary by the estrous cycle and gonadotropin. **Science**, v.219, p.1437-1438, 1983.

Borgeest C.; Symonds D.; Mayer L.P.; Hoyer P.B.; Flaws J.A; Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. **Toxicol Sci**, v. 68, p.473-478, 2002.

Bretveld, R.W.; Thomas, C.M.; Scheepers, P.T.; Zielhuis, G.A.; Roeleveld, N. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 04, p.30, 2006.

Brody, J.R.; Cunha, G.R. Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: II. Effects of DES on development. **American Journal of Anatomy**, v.186, p.21-42, 1989.

Carter, D.A.; Saridaki, E.; Lightman, S.L. Sexual differentiation of oxytocin stress responsiveness: effect of neonatal androgenization, castration and luteinizing hormonereleasing hormone antagonist. **Acta Endocrinology**, v.117, p.525-530, 1988.

Caserta, D.; Maranghi, L.; Mantovani, A.; Marci, R.; Maranghi, F.; Moscarini, M. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. **Human Reproductive Update**, v.14, p.59-72, 2008.

Chao, H.R.; Wang, S.L.; Lin, L.Y.; Lee, W.J.; Papke, O. Placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in Taiwanese mothers in relation to menstrual cycle characteristics. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.259-265, 2007.

Chong, S.Y.; Whitelaw, E. Epigenetic germline inheritance. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.14(6), p.692-696, 2004.

Crain, A.D.; Janssen, S.J.; Edwards, T.M.; Heindel, J.; Ho, S.; Hunt, P.; Iguchi, T.; Juul, A.; et al. Female reproductive disorders: the roles of endocrinedisrupting compounds and developmental timing. **Fertility and Sterility**, v.90, n.04, p.911-940, 2008.

DeHaan, K.C.; Berger, L.L.; Kesler, D.J.; McKeith, F.K.; Thomas, D.L Effect of prenatal trenbolone acetate treatment on lamb performance and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, v.68, p.3041-3045, 1990).

Diamanti-Kandarakis, E.; Kouli, C.R.; Bergiele, A.T.; Filandra, F.A.; Tsianateli, T.C.; Spina, G.G.; Zapanti, E.D.; Bartzis, M.I. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, p.4006-4011, 1999.

Foecking, E.M.; McDevitt, M.A.; Acosta-Martínez, M.; Horton, T.H.; Levine, J.E. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. **Hormones and Behavior**, v.53, p.673-692, 2008.

Forsdike, R.A.; Hardy, K.; Bull, L.; Stark, J.; Webber, L.J.; Stubbs, S., et al. Disordered follicle development in ovaries of prenatally androgenized ewes. **Journal of Endocrinology**, v.192, p.421-428, 2007.

Franks, S.; McCarthy, M.I.; Hardy, K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. **International Journal of Andrology**, v.29, p.278-285, 2006.

Fritz, H.; Giese, K.; Suter, H.P. Prenatal and postnatal development of rats following the maternal treatment with testosterone during the late period of embryogenesis. **Arzneimittelforschung**, v.34, p.780-782.

Gallavan Jr, R.H.; Holson, J.F.; Stump, D.G.; Knapp, J.F.; Reynolds, V.L. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v.13, p.383-390, 1999.

Gerall, A.; Ward, I.L. Effects of prenatal exogenous androgen on the sexual behavior of female albino rat. *Psychologic*, v. 62, p.370-375, 1966.

Gilling-Smith, C.; Willis, D.S.; Beard, R.W.; Franks, S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 79, p. 1158-1165, 1994.

Goldman, A.S.; Shapiro, B.; Neumann, F. Role of testosterone and its metabolites in the differentiation of the mammary gland in rats. **Endocrinology**, v. 99, p.1490-1495, 1976.

Gluckman, P.D.; Hanson, M.A.; Beedle, A.S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **American Journal of Human Biology**, v.19, p.119, 2006.

Gray, L. E., Jr; Wolf, C.; Lambright, C.; Mann, P.; Price, M.; Cooper, R. L.; Ostby, J. Administration of potentially antiandrogenic pesticide (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. **Toxicology Industrial Health**, v.15, p.94-118, 1999.

Gray, L.E. Jr.; Ostby, J.; Furr, J.; Wolf, C.J.; Lambrigh, C.; Parks, L., et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals.

Human Reproduction Update, v.07, p. 248-264, 2001.

Gray, L.E., Jr.; Wilson, V.S.; Stoker, T.; Lambricht, C.; Furr, J.; Noriega, N.; Howdeshell, K.; Ankley, G.T.; Guillette, L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. **International Journal of Andrology**, v.29, p.96-104, 2006.

Greene, R.; Burrill, M.; Ivy, A. The effect of antenatal androgens on sexual development in female rats. **Journal of Anatomy**, v.65, p.415-469, 1939.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. Fisiologia Feminina antes da Gravidez e os Hormônios Femininos. Guyton AC, Hall JE, ed. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.869-882, 2002.

Hales, C.N.; Barker, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v.35, p.595-601, 1992.

Hedge, G.A., Colby, H.D., Goldman, R.L. Clinical Endocrine Physiology. Philadelphia: Saunders, 1st ed. p.189-222, 1987.

Heindel, J.J. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. **Reproductive Toxicology**, v.23, p.257-259, 2007.

Hirshfield, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 101, p. 124-143, 1991.

Ho, S.M.; Roy, D. Sex hormones induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation in the dorsolateral prostates of Noble rats. **Cancer Letters**, v.84, p.155-162, 1994.

Hoepfner, B.A.; Ward, I.L. Prenatal and neonatal androgen exposure Interact to affect sexual differentiation in female rats. **Behavioral Neuroscience**, v.102, p.61-65, 1988.

Hotchkiss, A.K.; Ostby, J.S.; Vandenberg, J.G.; Gray, Jr. Androgens and environmental antiandrogens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 110 (suppl 3), p.435-439, 2002.

Hotchkiss, A.K.; Lambright, C.S.; Ostby, J.S.; Parks-Saldutti, L.; Vandenberg, J.G.; Gray Jr, L.E. Prenatal Testosterone Exposure Permanently Masculinizes Anogenital Distance, Nipple Development, and Reproductive Tract Morphology in Female Sprague-Dawley Rats. **Toxicological Sciences**, v96(2), p.335-345, 2007.

Huffman, L.; Hendricks, S.E. Prenatally injected testosterone propionate and sexual behavior of female rats. **Physiologic Behavior**, v. 26, p. 773-778, 1981.

Imagawa, W.; Yang, J.; Guzman, R.; Nandi, S. Control of mammary gland development. In: Knobil, E; Neill, J.D., eds. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press ; 1994: 1033-1063.

Jensen, T.K.; Scheike, T.; Keiding, N.; Schaumburg, I.; Grandjean, P. Fecundability in relation to body mass and menstrual cycle patterns. **Epidemiology**, v.10, p.422-428, 1999.

Jones, P.A.; Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v.293(5532), p.1068-1070, 2001.

Kawashima, K.S.; Nakaura, S.; Nagao, S.; Tanaka, T.; Kuwamura, T.; Omori, Y.; Differentiation of urovagina septum and its critica period of abridgement by testosterone in female fetuses. **Endocrine**, v.24, p.67-70, v. 1977.

Knochenhauer, E.S.; Key, T.J.; Kahsar-Miller, M.; Waggoner, W.; Boots, L.R.; Azziz, R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the south eastern United States: a prospective study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.83, p.3078-3082, 1998.

Lucas, A. Proramming by early nutrition in man. In: The childhood environment and adult disease. Bock, G.R.; Whelan, J., editors. **CIBA Foundation Symposium 156**. Chichester, UK: Wiley; 1991, p.38-55.

Marcondes, F.K.; Bianchi, F.J.; Tanno, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v.62 4A, p.609-614, 2002.

Mattison, D.R.; Thorgeirsson, S.S. Ovarian aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primordial oocyte toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in mice. **Cancer Research**, v. 39, p. 3471-3475, 1979.

McDonald, P.G.; Doughty, C. Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. **Journal of Reproductive Fertility**, v. 30, p.55-62, 1972.

McIntyre B.S.; Barlow, N.J.; Foster, P.M. Male rats exposed to linuron in utero exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retention, and epididymal malformations that results in subsequent testicular atrophy. **Toxicological Sciences**, v.65, p.62-70, 2002.

Mena, M.A.; Arriaza, C.A.; Tchernitchin, A.N. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1080- 1085, 1992.

Mori, C.; Komiyama, M.; Adachi, T.; Sakurai, T.; Nishimura, D.; Takashima, K., et al. Application of toxicogenomic analysis to risk assessment of delayed olongterm effects of multiple chemicals including endocrine disruptors in human fetuses. **Environmental Health Perspectives**, v.111, p. 803-809, 2002.

Mukhtar, H.; Philpot, R.M.; Bend, J.B. The postnatal development of microsomal epoxide hydrase, cytosolic glutathione S-transferase, and mitochondrial and microsomal cytochrome P-450 in adrenals and ovaries of female rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 6, p. 577-583, 1978.

Needam, L.L.; Sexton, K. Assessing children's exposure to hazardous environmental chemicals: an overview of selected research challenges and complexities. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v.10, p. 611-629, 2000.

Nelson, V.L.; Qin, K-N; Rosenfield, R.L.; Wood, J.R.; Penning, T.M.; Legro, R.S.; Strauss III, J.F.; McAllister, J.M. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.5925–5933, 2001.

Newnham, J.P. The developmental origins of health and disease (DOHaD) - why it is so important to those who work in fetal medicine. **Ultrasound in Obstetrics Gynecology**, v.29, p.121- 123, 2007.

Orlando, E.F.; Kolok, A.S.; Binzcik, G.A.; Gates, J.L.; Horton, M.K.; Lambrigh, C.S.; Gray, L.E.,Jr; Soto, A.M.; Guillette, L.J.,Jr. Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel sensitive species, the fathead minnow. **Environmental Health Perspectives**, v.112, p.353-358, 2004.

Parks, L.G.; Lambrigh, C.S.; Orlando, E.F.; Guillette, L.J.,Jr; Ankley, G.T.; Gray, L.E.,Jr. Masculinization of female mosquitofish in Kraft mill effluentcontaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. **Toxicological Sciences**, v.62, p.257-267, 2001.

Ragnotti, G.; Presta, M.; Maier, J.A.M.; Rusnati, M.; Mazzoleni, G.; Fegati, F.; Chiesa, R.; Braga, M.; Calovini, D. Critical role of gonadal hormones of the genotoxic activity of the hepatocarcinogen. **Cancer Letters**, v.36, p. 253-261, 1987.

Rhees, R.W.; Kirk, B.A.; Sephton, S.; Lephart, E.D. Effects of prenatal testosterone on sexual behavior, reproductive morphology and LH secretion in the female rat. **Developmental Neuroscience**, v.19, p.430-437, 1997.

Richards, J.S. Maturation of ovarian follicles: action and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological**, v.60, p.51-89, 1980

Ryan, B.C.; Vandenberg, J.G. Intrauterine position effects. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v.26, p.665-678, 2002.

Sato, S.M.; Schulz, K.M.; Sisk, C.L.; Wood, R.I. Adolescents and androgens, receptors and rewards. **Hormones and Behavior**, v.53, p.647-658, 2008.

Schwartz, Z.; Guest, J.F.; Elder, M.G.; White, J.O. Enzyme activities in the androgenized rat uterus refractory to oestrogenic stimulation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p.491-496, 1986.

Silveira, P.P.; Portella, A.K.; Goldani, M.Z.; Barbieri, M.A. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **Journal of Pediatrics**, v.83, n.06, p. 494-504, 2007.

Singh, K.B. Menstrual disorders in college students. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.140, p.299-302, 1981.

Slob, A.K.; den Hamer, R.; Woutersen, P.J.; van der Werff ten Bosch, J.J. Prenatal testosterone propionate and postnatal ovarian activity in the rat. **Acta Endocrinology**, v.103, p.420-427, 1983.

Smith, M.S.; Freman, M.E.; Neil, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin, and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v.96, p.219-226, 1975.

Spornitz, U.M.; Socin, C.D.; David, A.A; Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **The Anatomical Record**, v.254, p.116-126, 1999.

Tsilchorozidou, T.; Overton, C.; Conway, G.S. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. **Clinical Endocrinology**, v.60, p. 1-17, 2004.

US EPA. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, U.S. Environmental Protection Agency. **Federal Register**, v.61, n.212, 1996.

Vandenbergh, J. G.; Huggett, C. L. The anogenital distance index, a predictor of the intrauterine position effects on reproduction in female house mice. **Laboratory Animals SeL**, v.45,p.567-573, 1995.

Wise, L.D.; Vetter C.M.; Anderson, J.M.; Clark, R.L. Reversible effects of triamcinolone and lack effects with aspirin or L-656,224 on external genitalia of male Sprague Dawley rats exposed in utero. **Teratology**, v.44, p.507-520, 1991.

Wolf, C.J.; Hotchkiss, A; Ostby, J.S.; LeBlanc, G.A; Gray, L.E., Jr. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: A dose - response study. **Toxicol SeL**, v.65, p.71-86, 2000.

Wolf, C.J.; Hotchkiss, A.K.; Ostby, J.S.; LeBlanc, G.A.; Gray Jr., L.E. Effects of Prenatal Testosterone Propionate on the Sexual Development of Male and Female Rats: A Dose-Response Study. **Toxicological Sciences**, v.65, p.71-86, 2002.

Wolf, C.J.; LeBlanc, G.A.; Gray Jr., L.E. Interactive effects of Vinclozolin and Testosterone Propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. **Toxicological Science**, v.78, p.135-143, 2004.

Xita, N.; Tsatsoulis, A Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, p.1660-1666, 2006.

Yang, C.Y.; Yu, M.L.; Guo, H.R.; Lai, T.J.; Hsu, C.C.; Lambert, G., et al. The endocrine and reproductive function of the female Yucheng adolescents prenatally exposed to PCBs/PCDFs. **Chemosphere**, v.61, p.355-360, 2005.

Youglai, EV.; Foster, W.G.; Hughes, E.G.; Trim, K.; Frel, J.F. Levels of environmental contaminants in human follicular fluid serum and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 43, p. 121-126, 2002.

Young, W.C.; Boling, J.L; Blandau, R. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. **The Anatomical Record**, v.80, p37-45, 1941.

Anexos

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **104/2009-CEEA**, sobre "Estrutura do trato genital e função reprodutiva de ratas expostas a propionato de testosterona in útero e durante a lactação", sob a responsabilidade de **WILMA DE GRAVA KEMPINAS**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de **06/03/2009**.

Botucatu, 6 de março de 2009.

Prof. Dra. **PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO**
Presidente - CEEA

SÉRGIO PRIMO VICENTINI
Secretário - CEEA