

**EXPOSIÇÃO DE RATOS MACHOS PRÉ-PÚBERES AO ANTI-
INFLAMATÓRIO IBUPROFENO:**

Aspectos reprodutivos na prole feminina

Dayana Agnes Santos Ferreira

Botucatu – SP

2019

Dayana Agnes Santos Ferreira

**“ EXPOSIÇÃO DE RATOS MACHOS PRÉ-PÚBERES AO ANTI-
INFLAMATÓRIO IBUPROFENO:
Aspectos Reprodutivos Na Prole Feminina”**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu (IBB- UNESP)
para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

Orientadora: Arielle Cristina Arena

Botucatu – SP

2019

Dayana Agnes Santos Ferreira

“Exposição de ratos machos pré-púberes ao anti-inflamatório ibuprofeno:

Aspectos reprodutivos na prole feminina”

Trabalho de conclusão de curso apresentado

ao Instituto de Biociências de Botucatu,

Universidade Estadual Paulista

Júlio de Mesquita Filho, para a obtenção do

título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Comissão examinadora:

Prof^{ca} Dra. Arielle Cristina Arena

Prof. Dra. Valéria Cristina Sandrim

Botucatu, 18 de novembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as benções que concedeu em minha vida.

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp pelo ensino de qualidade que recebi nesses quatro anos do curso de Ciências Biomédicas e por toda a infraestrutura, atividades proporcionadas e novos horizontes apresentados.

Agradeço a professora Ariele por ter me dado a oportunidade de realizar minha iniciação científica e estágio em seu laboratório. Agradeço a Mariana por ter me confiado parte de seu mestrado e por toda essa jornada juntas, e a todos os demais colegas do Laboratório de Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos meus pais, Anísia e Domingos, pela educação, amor e incentivo e sacrifícios que fizeram pelas filhas e que na minha ausência me fizeram entender que o futuro é feito a partir da dedicação no presente. Agradeço minha irmã, Duany, pelo apoio incondicional. Agradeço a meus padrinhos e tios e tias por todo o suporte. Agradeço ao meu namorado, Renato, por tornar a vida mais leve e me fazer querer ser sempre uma pessoa melhor.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e realização deste trabalho.

RESUMO

O ibuprofeno é um dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) mais prescritos na prática pediátrica. Este fármaco reduz a síntese de prostaglandinas (PGs) via inibição da enzima Ciclo-oxygenase (COX-1 e COX-2). Estudos recentes vêm reportando uma infinidade de funções das PGs na gônada masculina, e fármacos inibidores da COX podem impactar negativamente o sistema reprodutor masculino. Além disso, analgésicos da classe dos AINEs podem ser considerados desreguladores endócrinos com efeitos antiandrogênicos, sendo capazes de alterar a função reprodutiva de homens e animais, desde a vida fetal até a idade adulta, em ambos os sexos. Estudos têm revelado que exposições durante a peripuberdade pode afetar a saúde de gerações subsequentes, através de mudanças epigenéticas nas células germinativas. Visto que tal fármaco está comprovadamente disseminado no meio ambiente devido a seu uso amplo e indiscriminado, a exposição ambiental a este fármaco como um desregulador endócrino pode se revelar um problema de saúde pública. Assim, esse projeto visa avaliar os efeitos da exposição de ratos machos ao ibuprofeno da fase juvenil a peripuberdade, sobre sua prole feminina. Para tanto, foram utilizados ratos machos Wistar (n=40; 23 dias de idade) distribuídos em 4 grupos: Controle (óleo mineral) e três grupos que receberam três diferentes doses de ibuprofeno: 2,4; 7,2 ou 14,3 mg/kg/dia. O tratamento ocorreu durante a puberdade dos machos durante 31 dias consecutivos, por via oral (gavage). Os ratos foram mantidos até a maturidade sexual e acasalaram com fêmeas nulíparas e não tratadas para obtenção das descendentes fêmeas (geração F1). Foram investigados os possíveis impactos na geração F1 feminina, avaliando o desenvolvimento físico, sexual e acompanhamento histológico do ovário em diferentes fases de desenvolvimento desses filhotes. Os resultados obtidos mostram alterações significativas como a maior duração do ciclo estral das descendentes do grupo de maior dose, diminuição do potencial de fertilidade das ratas cujos pais foram expostos a maior dose e atresia folicular na idade adulta também nesse grupo, entre outros importantes resultados. Com isso, fica evidente a ação do fármaco como desregulador endócrino e conclui-se que o ibuprofeno pode provocar efeitos multigeracionais na prole feminina, prejudicando a sua fertilidade, possivelmente através de mudanças epigenéticas que podem ser perpetuadas de geração em geração.

Palavras-chaves: ibuprofeno, puberdade, desregulador endócrino, descendentes, fêmeas, geração F1

SUMÁRIO:

1.0	Introdução.....	07
1.1	Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos do Ibuprofeno.....	07
1.2	As prostaglandinas (PGs)	07
1.3	Uso e meio ambiente: implicações ecotóxicas e a peripuberdade.....	08
2.0	Objetivos	10
3.0	Materiais e métodos.....	10
3.1	Obtenção da geração F1.....	10
3.2	Parâmetros avaliados na geração F1.....	11
3.2.1	Avaliação do desenvolvimento inicial e instalação da puberdade da prole.....	11
3.2.2	Ciclo estral.....	11
3.2.3	Coleta e Análise de Órgãos.....	12
3.2.4	Avaliação Histológica.....	12
3.2.5	Teste de fertilidade.....	12
3.3	Análise Estatística.....	13
4.0	Resultados.....	13
5.0	Discussão.....	22
6.0	Conclusão.....	24
7.0	Referências Bibliográficas.....	25

1. INTRODUÇÃO

O ibuprofeno é um dos medicamentos com ação anti-inflamatória, antitérmica e analgésica mais utilizados no mundo (Kristensen et al., 2018). É encontrado na lista atual de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2019) e tido como medicamento de escolha no tratamento de dores crônicas como artrite reumatoide e osteoartrite (Moore et al., 2015), bem como dor de dente, dismenorrea, cefaleia e dor muscular (Drugbank, 2019). Foi o primeiro anti-inflamatório disponível para a venda sem prescrição médica. (Halford et al., 2011)

1.1 Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos do Ibuprofeno

É um fármaco pertencente à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), derivado do ácido propiônico, inibidor não seletivo das enzimas ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), reduzindo assim, a produção de prostaglandinas (PGs) (Skomsvoll, 2004). A dose terapêutica é relativamente alta (600 a 1200 mg/d). Sua absorção é rápida e tem meia vida de 2h. Sua metabolização e biotransformação ocorrem no fígado, onde é hidroxilado e carboxilado pela atividade das isoformas do citocromo P450. Quando o ibuprofeno é administrado em doses terapêuticas a cada 6-8 h, os possíveis efeitos adversos são relacionados a inibição das COX e vias de prostaglandina (PG), sangramento gastrointestinal, insuficiência renal, asma, toxicidade hepática, entre outros (Kanabar, 2017). A eliminação completa ocorre dentro de 24 horas e mais de 90% da dose administrada é eliminada na forma de metabólitos ou seus conjugados na urina e 1% da droga tem excreção biliar na forma inalterada (Drugbank, 2019).

1.2 As prostaglandinas (PGs)

As PGs são compostos eicosanoides que atuam não somente como mediadores e moduladores inflamatórios, mas também estão implicados em diversos processos fisiológicos do organismo (Smyth et al., 2012), incluindo aqueles que estão envolvidos no controle da função testicular (Rossito et al., 2014).

Estudos vêm reportando uma infinidade de funções das PGs na gônada masculina. Há evidências que algumas PGs modulam a produção de andrógenos em células de Leydig, enquanto outras regulam o transporte de glicose em células de Sertoli e, consequentemente, a eficiência espermatogênica (Frungeri et al., 2015). Como o Ibuprofeno inibe a atividade da ciclo-oxigenase, seu uso pode impactar negativamente a função testicular, comprometendo o sistema reprodutor masculino.

Estudos sugerem que analgésicos fracos como o paracetamol e o ácido acetilsalicílico (substâncias da classe dos AINEs), podem ser considerados desreguladores endócrinos com efeitos antiandrogênicos, sendo capazes de alterar a função reprodutiva de homens e animais, desde a vida fetal até a idade adulta, em ambos os sexos (Kristensen et al., 2011). Experimentos utilizando modelos in vivo e ex vivo tem demonstrado que esses fármacos têm habilidade em inibir a expressão de vários genes que codificam diferentes enzimas esteroidogênicas, inibindo a síntese de andrógenos (Kristensen et al., 2011).

1.3 Uso e meio ambiente: implicações ecotóxicas e peripuberdade

O fato do ibuprofeno, ao lado do paracetamol e da dipirona, ser um dos agentes antipiréticos mais utilizados na faixa pediátrica (Kanabar, 2017) e também por ocupar a 3ª posição entre os fármacos mais populares do mundo (Drugbank, 2019), sendo usado indiscriminadamente pela população em geral para diversas finalidades por não exigir prescrição é preocupante. A alta taxa de excreção desse medicamento e a incapacidade das estações de tratamento de água de remover completamente esse composto farmacêutico devido as suas propriedades físico-químicas (Fortunato et al, 2014). Estudos relataram a presença deste medicamento em águas superficiais e efluentes ao redor do mundo (Alemanha, Reino Unido, Finlândia, França, Suíça e EUA). No Brasil, uma revisão de Silva (2017) compilou vários estudos de todo o país e que utilizaram diferentes métodos analíticos de detecção em estações de tratamento de esgoto (ETE) e apontou que as concentrações encontradas nas regiões estudadas variam entre cerca de 2 µg/L(Paraná) a 42mg/L(São Paulo). Além disso, fármacos também podem chegar a ETE através do descarte inadequado de medicamentos, feito pela maioria da população em pias e vasos sanitários, contribuindo para a contaminação do meio ambiente (Hopper e Araújo, 2012).

Assim, esse fármaco pode atingir a água de consumo (Mompelat et al., 2009), sendo esta outra importante via de exposição. Estudos já foram realizados e comprovam a inibição do crescimento e reprodução e outros efeitos tóxicos em diversas espécies de invertebrados, algas e peixes expostos de forma aguda e/ou crônica a esse fármaco presente na água (Fortunato, 2014). Dessa forma, pelos efeitos que o ibuprofeno pode desempenhar também em humanos e causar um possível problema de saúde pública, principalmente por seu papel como desregulador endócrino, torna-se preocupante a exposição a esse anti-inflamatório no período crítico da peripuberdade.

Sabe-se que a peripuberdade (12-16 anos) merece atenção especial, pois indivíduos nessa fase de transição entre a infância e a vida adulta podem ser mais susceptíveis a qualquer substância que altere o sistema endócrino do que pessoas mais velhas. Esse período de desenvolvimento inclui mudanças endócrinas intensas, que influenciam a forma e a composição corporal, bem como o metabolismo e o comportamento. Nesse período ocorre o pico de testosterona, um hormônio sensível a desreguladores endócrinos como o ibuprofeno. A exposição a possíveis desreguladores endócrinos em fases críticas como essa podem interferir na programação do desenvolvimento e, desse modo, podem resultar em consequências adversas, imediatas (p. ex. efeitos no crescimento e na composição corporal) ou (p. ex. efeitos comportamentais e aumento no risco de câncer) (Mantovani & Fucic, 2014) e possivelmente sua fertilidade. Em estudo prévio realizado, foi confirmado o prejuízo na fertilidade em ratos machos adultos expostos ao ibuprofeno na peripuberdade (Gazoli, 2019)

Além disso, recentes estudos têm revelado que exposições a desreguladores endócrinos nesta janela de susceptibilidade podem afetar a saúde de gerações subsequentes. Efeitos multigeracionais e transgeracionais podem ser provocados por mecanismos epigenéticos nas células germinativas, como por exemplo a metilação de DNA, que podem determinar maior susceptibilidade a doenças como câncer, diabetes, obesidade e infertilidade (Xin et al., 2015). A maioria das exposições analisadas são *in utero* e neonatais com já consagrados desreguladores endócrinos, como o bisfenol A, ftalatos, parabenos, pesticidas além da cigarro, radiação e poluição (Xin et al, 2015).

É interessante apontar que heranças multigeracionais e transgeracionais provocadas por exposições maternas diferem de exposições paternas pois há indícios que as células germinativas femininas e masculinas respondem de forma distinta a mudanças no ambiente. As proles femininas e masculinas também podem se adaptar de forma diferente a um estímulo *in utero*, fato que sugere uma programação fetal dimórfica e, conseqüentemente, diferentes susceptibilidades a doenças (Xin et al, 2015).

Exposições paternas são poucos exploradas na investigação da origem de doenças desenvolvimentais e as evidências dessa relação entre as alterações provocadas nos pais e doenças na geração seguinte foram reconhecidas recentemente (Anderson et al, 2014)

Quanto aos AINEs, dados epidemiológicos indicam uma relação entre a ingestão materna de analgésicos e o aparecimento de anormalidades reprodutivas congênitas (Kristensen et al., 2011). Corroborando com esses achados, um estudo anterior realizado em nosso laboratório mostrou que a exposição *in utero* e lactacional ao ibuprofeno foi capaz de

desencadear efeitos adversos sobre o desenvolvimento sexual inicial, parâmetros reprodutivos e comportamentais da prole masculina, indicando que o ibuprofeno pode promover programação fetal se for utilizado durante o período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica (Balin, 2018).

Visto que os estudos em geral buscam avaliar a exposição materna a substâncias (Arruda et al, 2016), existe a necessidade de estudos que investiguem os efeitos de uma exposição ambiental subcrônica paterna no desenvolvimento de seus descendentes. Com a escassez de estudos com essa droga durante essas importantes janelas de alta susceptibilidade (juvenil e peripuberdade), torna-se de extrema importância investigar a influência do ibuprofeno, potencial desregulador endócrino disseminado no meio ambiente no desenvolvimento e saúde reprodutiva de futuras gerações após exposição de seus pais nesta fase da vida.

2 OBJETIVOS

Avaliar o desenvolvimento e parâmetros reprodutivos em filhotes fêmeas cujos pais foram expostos ao ibuprofeno desde a fase juvenil até a peripuberdade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da geração F1

Em estudo prévio, os animais da geração parental foram divididos em quatro grupos experimentais para que o tratamento fosse realizado. O grupo controle recebeu o veículo (óleo mineral) e três grupos tratados com ibuprofeno ((RS) -2- (4- (2-metilpropil) fenil) propanóico, Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd. China, 99,65% de pureza) nas doses de 2,4; 7,2 ou 14,3 mg de ibuprofeno por kg de peso corporal. O ibuprofeno foi dissolvido em óleo mineral (veículo). As doses escolhidas foram baseadas em doses ambientalmente encontradas de um desregulador endócrino como o ibuprofeno, que podem mimetizar uma exposição ambiental a tal fármaco presente no meio ambiente. A equivalência das doses para ratos foi calculada com base no peso e a área de superfície corporal (Reagan-Shaw et al 2007). O tratamento foi realizado via oral (gavage), diariamente, por 31 dias consecutivos, seguindo o protocolo de ensaio para ratos machos, abrangendo de 23-53 dias de vida do animal (US EPA, 2011). Essa idade foi escolhida por abranger a fase juvenil do rato (21-32 dias no rato e 2-11 anos em humanos) e a peripuberdade (33-55 dias no rato e 12-16 anos em humanos) (Picut et al., 2014), uma fase crítica do desenvolvimento como explicitado acima. Esses animais tiveram seu

desenvolvimento e parâmetros reprodutivos avaliados (Gazoli, 2019) até a idade adulta. Quando sexualmente maduros, os ratos da geração parental (F0) foram acasalados com fêmeas nulíparas e não tratadas para a obtenção descendentes (geração F1), a fim de investigar possíveis impactos na prole feminina, avaliando o desenvolvimento físico, sexual e reprodutivo destes animais em diferentes fases do desenvolvimento. Foi realizada a redução de ninhada (n= 4 fêmeas/ninhada) e todas foram avaliadas até a instalação da puberdade (n=25 fêmeas/grupo).

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas sob condições controladas (23° C, Ciclo 12/12 h de claro/escuro), recebendo ração comercial e água ad libitum. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e só foram executados após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal no Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP (protocolo nº 1072-CEUA).

3.2 Parâmetros avaliados na geração F1

3.2.1 Avaliação do desenvolvimento inicial e instalação da puberdade da prole

Filhotes fêmeas dos pais expostos ao ibuprofeno na puberdade foram avaliadas com relação ao desenvolvimento físico e sexual. Para avaliação do desenvolvimento físico, acompanhou-se o peso corporal nos dias pós-natais (DPN) 1, 13 e 22. Já no desenvolvimento sexual, foram avaliados: distância anogenital (com auxílio de um paquímetro mediu-se a distância entre o tubérculo genital e o ânus nos DPN 1 e 22), número de auréolas (observa-se a partir do DPN 13 a presença ou ausência de mamilo ou de uma descoloração da pele em torno do mamilo) e a abertura total do orifício vaginal (evento que é um marcador externo da puberdade, segundo Kinsey- Jones (2010), a partir do DPN 30). As ratas foram pesadas no dia desse último evento e o fluido vaginal foi coletado diariamente até ser detectada a ocorrência do primeiro estro, fase caracterizada pela predominância de células epiteliais cornificadas de acordo com Goldman et al (2007) e que representa a receptividade sexual das fêmeas.

3.2.2 Ciclo estral

A ciclicidade das ratas foi avaliada durante um período de 15 dias, entre os dias pós-natais 65 e 80. Todas as manhãs, 20 µL de solução salina (0,9% NaCl) foram introduzidos na vagina das ratas dos quatro grupos experimentais (n=14/grupo) com auxílio de uma pipeta automática e o fluido aspirado foi colocado em lâminas para análises em microscópio de luz

(20X). A classificação da fase do ciclo estral ocorre de acordo com a proporção das células presentes no lavado vaginal (Goldman et al, 2007): proestro (maioria de células epiteliais nucleadas), estro (predomínio de células cornificadas anucleadas), metaestro (mesma proporção de células epiteliais, nucleadas e leucócitos) e diestro (predominância de leucócitos). A partir dos dados obtidos foram calculados, o número total de ciclos, a duração do ciclo completo e a frequência de cada fase.

3.2.3 Coleta e Análise de Órgãos

No DPN 45 (puberdade) e 120 (maturidade sexual), uma fêmea de cada ninhada foi pesada e eutanaziada por inalação de CO₂ seguida de decapitação na fase do estro, para a coleta e determinação dos pesos absolutos e relativos dos órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, rim, baço e tireoide, adrenal) e reprodutivos (útero e ovários) em balança analítica de precisão. O útero e ovário foram imersos em uma solução fixadora de Bouin (75% ácido pícrico, 25 % formaldeído, 5%ácido acético) por 24 horas, lavados continuamente com álcool, incluídos em Paraplast, seccionados a 5µm de espessura com auxílio de um micrótomo rotativo e corados com hematoxilina e eosina. Após a confecção das lâminas, estas foram analisadas em teste cego em microscópio de luz para observação histológica geral.

3.2.4 Avaliação histológica

No ovário, os folículos foram contados e classificados em: primordial/primário, pré-antral, antral, corpo lúteo e atrésico, de acordo com Borgeest (2002). Os aspectos morfológicos (área e volume) também foram medidos para identificar possíveis alterações nos grupos tratados.

3.2.5 Teste de fertilidade

As fêmeas da geração F1 em estro, ou seja, sexualmente receptivas, foram acasaladas overnight com machos não tratados sexualmente maduros e experientes. Após ser confirmada pela manhã seguinte a presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerado o dia 0 de prenhez. As fêmeas esperma-positivo foram mortas no 20º dia de prenhez, por decapitação, seguiu-se o procedimento de laparotomia de acordo com Nassr et al (2010). Foi realizada a coleta do útero e ovários (para o registro do número de corpos lúteos, sítios de implantação e

reabsorções). Os fetos foram pesados e suas distâncias anogenitais foram tomadas e os seguintes parâmetros foram determinados: determinação do potencial de fertilidade (eficiência de implantação): sítios de implantação/corpos lúteos x100; taxa de perdas pré-implantação: nº de corpos lúteos – nº de implantações/nº de corpos lúteos x100; taxa de perdas pós implantação: nº de implantações – nº de fetos vivos/ nº de implantações x100; sex ratio (razão sexual): nº de fetos fêmeas/nº de fetos machos.

3.3 Análise Estatística

Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ou mediana (Q1–Q3). Para a comparação dos resultados entre os grupos experimentais foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância – ANOVA, seguidos do teste a posteriori de Dunnet, ou por análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida do teste a posteriori de Dunn, quando necessário. Para análise da curva de distribuição do peso dos fetos no teste de fertilidade, foi utilizado o teste de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$, realizadas no GraphPad InStat (versão 3.02)

4 RESULTADOS

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos da investigação da prole cujo pais foram tratados com o anti-inflamatório ibuprofeno obtida após acasalamento entre machos expostos ao ibuprofeno e fêmeas nulíparas não tratadas.

A tabela 1 começa pela razão sexual (proporção entre machos e fêmeas obtidos na prole dos ratos tratados), todos os grupos foram estatisticamente iguais. Os parâmetros de desenvolvimento inicial das fêmeas (massa corporal, distância anogenital e número de mamilos) durante os dias de vida 1, 13 e 22 não diferiram entre os grupos.

Tabela 1 – Razão sexual, massa corporal e distância anogenital absoluta e relativa nos dias pós-natal 1, 13 e 22 e nº de mamilos da prole feminina dos ratos machos controle e expostos a ibuprofeno no período juvenil até a peripuberdade.

Parâmetros de desenvolvimento	Grupos experimentais			
	Controle	2,4 mg/kg	7,2 mg/kg	14,3 mg/kg
<i>Razão sexual (M:F)</i>	1,10±0,32	0,96±0,12	1,22±0,22	0,74±0,25
<i>(#) Massa corporal (g)</i>				
DPN 1	6,47 (4,24 – 8,20)	6,71 (5,04 – 8,96)	6,50 (4,56 – 9,02)	6,91 (3,99 – 12,88)
DPN 13	23,99 (17,64 – 28,34)	25,19 (20,18 – 29,01)	26,21 (17,66 – 31,64)	25,39 (15,20 – 29,92)
DPN 22	46,70 (39,59 – 52,80)	45,46 (38,75 – 56,50)	44,70 (29,90 – 59,20)	45,69 (13,78 – 54,60)
<i>Distância anogenital absoluta (mm)</i>				
DPN 1	2,88 ± 0,06	2,91 ± 0,06	2,94 ± 0,11	2,82 ± 0,06
DPN 13	7,45 ± 0,16	7,30 ± 0,21	7,84 ± 0,16	7,60 ± 0,20
DPN 22	12,63 ± 0,20	12,73 ± 0,22	12,92 ± 0,22	12,97 ± 0,34
<i>Distância anogenital relativa (mm/g)</i>				
DPN 1	1,54 ± 0,03	1,54 ± 0,33	1,56 ± 0,06	1,48 ± 0,03
DPN 13	2,60 ± 0,05	2,50 ± 0,07	2,67 ± 0,04	2,60 ± 0,65
DPN 22	3,52 ± 0,05	3,57 ± 0,05	3,62 ± 0,06	3,68 ± 0,11
<i>(#) N° de mamilos</i>	12 (12 – 13)	12 (12 – 14)	12 (12 – 14)	12 (12 - 14)

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 7 ninhadas por grupo. Análise de variância – ANOVA com teste posterior de Dunett. # Valores expressos em mediana - (Q1-Q3). Kruskal- Wallis com teste posterior de Dunn. DPN: dia pós-natal.

Com relação a instalação da puberdade (tabela 2), todas as fêmeas tiveram abertura completa do orifício vaginal em torno do 36º ao 37º DPN, pesando cerca de 117g, tendo seu primeiro estro nos DPNs 37 e 38.

Tabela 2- Abertura vaginal, massa no dia desse evento e 1º estro da prole feminina dos ratos machos controle e expostos a ibuprofeno no período juvenil até a peripuberdade

Parâmetros de Instalação da puberdade	Grupos experimentais			
	Controle	2,4mg/kg	7,2mg/kg	14,3mg/kg
Massa (kg)	114,71±2,63	119,41±2,71	121,07±2,90	120,90±3,13
Abertura vaginal (DPN)	36,56±0,68	36,97±0,49	37±0,47	37,07±0,52
1º estro (DPN)	37,84±0,71	38,67±0,63	38,59±0,59	38,26±0,59

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 22 animais por grupo. Análise de variância – ANOVA com teste posterior de Dunett.

Na avaliação do ciclo estral (tabela 3), o grupo descendente dos machos expostos a 14,3 mg/kg teve maior duração dos ciclos e menor frequência de diestros quando comparadas ao grupo controle.

Tabela 3 – Ciclicidade estral da prole feminina acompanhada durante 15 dias (DPN 65 a 80).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Controle	2,4 mg/kg	7,2 mg/kg	14,3 mg/kg
Número de ciclos estrais	1,86 ± 0,23	2,36 ± 0,17	1,93 ± 0,22	1,79 ± 0,15
Duração dos ciclos (dias)	4,12 ± 0,13	4,98 ± 0,38	5,07 ± 0,75	6,79 ± 0,49*
Estro (dias)	2,93 ± 0,25	3,57 ± 0,23	3,58 ± 0,23	3,29 ± 0,30
Metaestro (dias)	3,93 ± 0,50	3,14 ± 0,51	3,57 ± 0,41	4,36 ± 0,44
Diestro (dias)	4,57 ± 0,51	5,07 ± 0,47	4,57 ± 0,40	2,93 ± 0,40*
Proestro (dias)	3,57 ± 0,34	3,21 ± 0,21	3,50 ± 0,34	4,42 ± 0,28

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 14 animais por grupo. Análise de variância – ANOVA com teste posterior de Dunett. *p<0,05 comparado ao controle.

Aos 45 dias de vida, as ratas descendentes do grupo de dose intermediária apresentaram menor peso pulmonar relativo em relação ao grupo controle e as descendentes do grupo de 14,3 mg/kg tinham maior peso renal relativo na idade adulta (Tabela 4). Quanto aos demais órgãos, todos os grupos foram semelhantes ao grupo controle.

Tabela 4 – Massa corporal e pesos relativo dos órgãos dos animais da prole feminina (DPN 45 e DPN 120) dos ratos machos controle e expostos a ibuprofeno no período juvenil até a peripuberdade.

Parâmetros	DPN 45				DPN 120			
	Controle	2,4mg/kg	7,2mg/kg	14,3 mg/kg	Controle	2,4mg/kg	7,2mg/kg	14,3 mg/kg
Massa corporal final (g)	145,78±3,49	147,46±5,98	153,39±3,96	142,65±4,08	269,53±11,14	274,82±14,96	267,65±12,77	252,51±9,37
Ovário (E) (mg/100g)	25,56 ± 2,11	22,016±2,54	24,90±1,19	29,12±2,94	18,80±0,41	19,45±2,01	24,16±1,60	19,65±2,29
Ovário total (mg/100g)	50,00±3,62	49,16±5,93	48,84±3,32	55,61±5,84	38,79±1,76	42,86±5,03	44,38±3,16	42,07±5,44
Útero (g/100g)	0,25±0,03	0,21±0,02	0,22±0,03	0,20±0,02	0,19±0,01	0,20±0,02	0,26±0,04	0,22±0,02
Rim (E) (g/100g)	0,60±0,01	0,58±0,02	0,57±0,02	0,58±0,02	0,39±0,02	0,43±0,01	0,43±0,01	0,44±0,01 *
Adrenal (E) (mg/100g)	17,94±1,44	14,05±2,38	20,89±1,82	16,83±1,16	20,12±0,76	16,14±2,85	18,41±0,70	16,88±0,44
Fígado (g/100g)	5,42±0,09	5,60±0,11	5,49±0,09	5,49±0,18	4,03±0,16	3,85±0,21	3,92±0,12	4,39±0,23
Pulmão (g/100g)	0,76±0,04	0,67±0,02	0,66±0,02 *	0,73±0,01	0,59±0,03	0,59±0,02	0,58±0,3	0,58±0,04
Coração (g/100g)	0,49±0,02	0,46±0,01	0,46±0,01	0,49±0,01	0,35±0,02	0,36±0,02	0,36±0,01	0,36±0,01
Tireoide (mg/100g)	5,61±0,75	5,29±0,44	6,48±0,97	4,62±0,43	6,61±0,18	5,37±0,69	5,80±1,08	5,58±0,37
Baço (g/100g)	0,33±0,01	0,33±0,02	0,29±0,02	0,33±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01	0,21±0,02	0,23±0,01

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 7-10 animais por grupo. Análise de variância – ANOVA com teste posterior de Dunett. *p<0,05 comparado ao controle.

O teste de fertilidade realizado por laparotomia exploratória (Tabela 5) revelou diminuição significativa, em relação ao grupo controle, no potencial fértil das ratas cujos pais foram expostos a 7,2 mg/kg de ibuprofeno.

Tabela 5 – Teste de fertilidade de ratas descendentes de machos adultos dos grupos controle e expostos ao Ibuprofeno no período juvenil até a peripuberdade acasaladas de forma natural com ratos machos não tratados.

Parâmetros de fertilidade	Grupos experimentais			
	Controle	2,4 mg/kg	7,2 mg/kg	14,3 mg/kg
Potencial de fertilidade #	100 (100 – 100)	100 (93 – 100)	85,5 (68 – 100)*	96,5 (92 – 100)
Massa materna final (g)	393,43 ± 19,35	382,59 ± 11,23	393,23 ± 16,39	379,57 ± 10,46
Ganho de massa	127,36 ± 9,83	123,67 ± 5,37	142,33 ± 4,62	132,79 ± 4,29
Peso de útero + fetos (g)	77,63 ± 5,02	74,64 ± 3,71	77,16 ± 6,60	76,96 ± 3,103
Massa total dos fetos (g)	4,09 ± 0,33	4,17 ± 0,13	4,22 ± 0,08	4,32 ± 0,20
Massa das placentas (g)	0,59 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,61 ± 0,03
Número de fetos vivos	13,00 ± 0,97	12,80 ± 0,58	12,80 ± 1,02	12,29 ± 0,29
Número total de implantações	13,33 ± 1,09	13,40 ± 0,68	14,00 ± 1,05	12,86 ± 0,40
Número de corpos lúteos	13,83 ± 1,17	14,60 ± 0,81	14,20 ± 1,07	14,14 ± 0,77
Número de reabsorções #	0,00 (0,00 - 1,00)	1,00 (0,00 - 1,00)	1,00 (0,00 - 2,00)	1,00 (0,00 – 1,00)
Taxa de perda pré-implantação (%) #	3 (0 - 9)	8 (0 – 14)	0 (0 – 7)	7 (0 – 19)
Taxa de perda pós-implantação (%) #	0 (0 – 7)	7 (0 - 8)	8 (0 – 17)	7 (0 – 8)
Sex ratio (M:F)	2,65 ± 1,32	1,29 ± 0,37	1,44 ± 0,28	1,66 ± 0,34

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 5 animais por grupo. Análise de variância – ANOVA com teste posterior de Dunett. % - # Valores expressos em mediana - (Q1-Q3). Kruskal- Wallis com teste posterior de Dunn. *p<0,05 comparado ao controle.

Em relação a distribuição dos pesos dos fetos obtidos no teste de fertilidade (Figura A), esta foi alterada no grupo advindo da geração F0 que recebeu menor dose (2,4 mg/kg), com um aumento na porcentagem de fetos grandes para idade gestacional quando comparados ao grupo controle (17,19% versus 1,56 %). Os demais grupos foram similares nesses parâmetros.

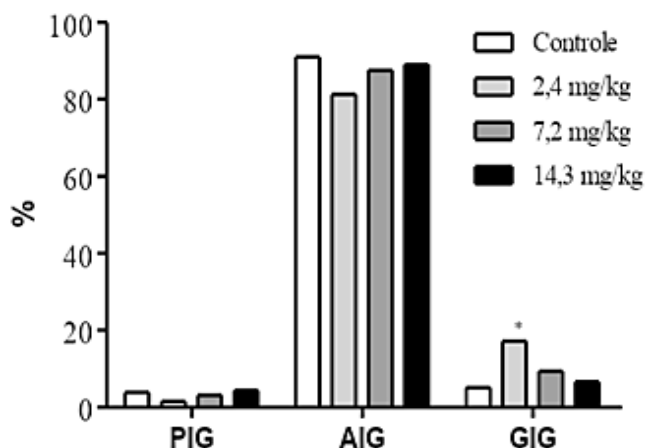


Figura 1 - Distribuição dos pesos dos fetos no teste de fertilidade realizado em ratas descendentes de machos dos grupos controle e expostos ao ibuprofeno. PIG – pequeno para idade gestacional, AIG – adequado para idade gestacional, GIG – grande para idade gestacional. Teste de Fisher. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle.

As tabelas seguintes contêm os dados obtidos nas análises histológicas do ovário. A contagem de folículos ovarianos (Tabela 6) revelou maior quantidade de folículos primordiais/ primários no grupo 14,3 mg/kg aos 45 dias e maior número de atresicos no grupo descendente de 7,2 mg/kg aos 120 dias em relação ao grupo controle.

Os parâmetros morfométricos de área e volume aos 45 dias (Tabela 7), em comparação ao grupo controle, são diminutos nos folículos atresicos do grupo 14,3 mg/kg e aumentados nos folículos primários/primordiais das ratas descendentes do grupo 2,4 mg/kg e no corpo lúteo das ratas da dose 7,2 mg/kg. A área e volume dos folículos em crescimento e atresicos foram significativamente menores nos grupos 2,4 e 14,3 mg/kg, respectivamente, aos 120 dias (Tabela 8).

Tabela 6 – Contagem e classificação folicular da prole feminina (DPN 45 e 120) dos ratos machos controle e expostos a ibuprofeno no período juvenil até a peripuberdade.

	Parâmetros	Grupos experimentais			
		Controle	2,4 mg/kg	7,2 mg/kg	14,3 mg/kg
DPN 45	Folículos primordiais/primários	6,2 ± 1,21	10,7 ± 1,2	14,67 ± 1,69	18,6 ± 1,80**
	Folículos em crescimento	5,4 ± 0,48	6,5 ± 0,45	4 ± 0,20	7,9 ± 0,29
	Folículo de Graaf	4,8 ± 0,78	4,5 ± 0,47	4 ± 0,46	4,5 ± 0,27
	Folículos atrésicos	1,7 ± 0,41	2,7 ± 0,43	1,25 ± 0,25	1,9 ± 0,43
	Corpo lúteo	4,1 ± 0,78	3,9 ± 0,51	6,25 ± 1,25	5,8 ± 0,68
DPN 120	Folículos primordiais/primários	20,27 ± 6,37	16,80 ± 2,56	30,83 ± 6,63	24,47 ± 8,29
	Folículos em crescimento	16,80 ± 2,56	10,27 ± 1,42	13,17 ± 4,48	11,43 ± 3,44
	Folículo de Graaf	4,20 ± 1,84	6,27 ± 0,19	8,83 ± 2,64	8,57 ± 2,59
	Folículos atrésicos	1,40 ± 0,45	2,87 ± 0,23	3,42 ± 0,71 *	2,20 ± 0,39
	Corpo lúteo	7,67 ± 1,86	7,87 ± 0,65	12,77 ± 0,22	7,66 ± 1,94

Valores expressos em média ± erro padrão da média de 05 animais por grupo. Análise de variância – ANOVA e teste de Dunnet. * p<0,05 comparado ao grupo

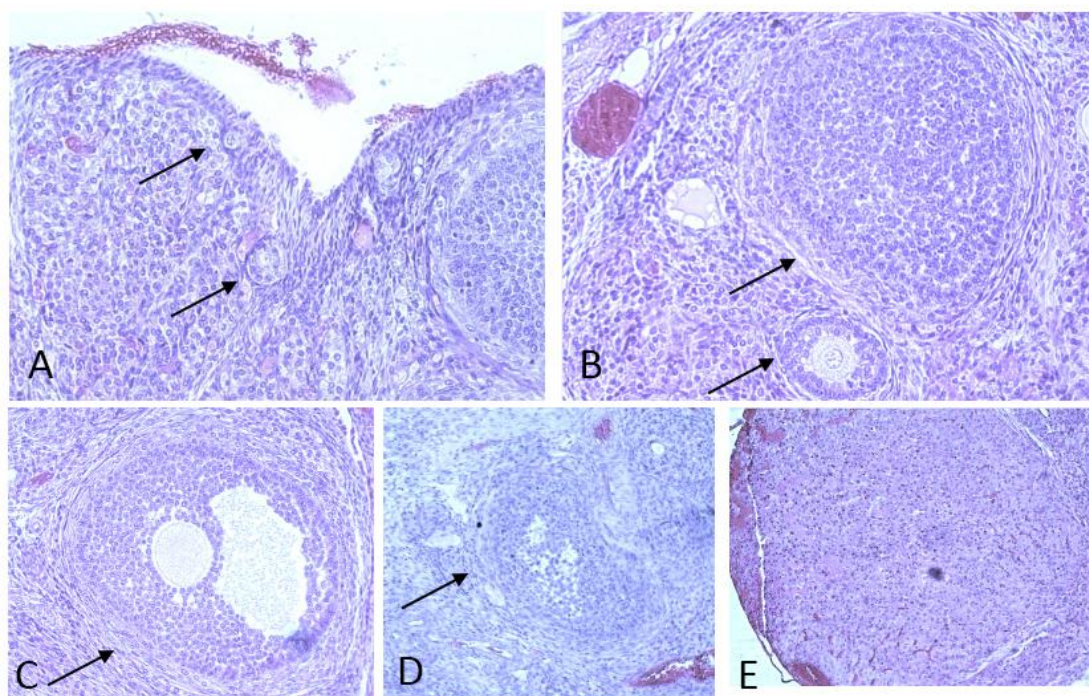


Figura 2 – Fotomicrografias das análises histológicas do ovário . As setas indicam os folículos: A- primordiais e primários(40X); B- em crescimento (20X) ; C de Graaf (20X); D- atrésico (20X) e E- corpo lúteo (10X)

Tabela 7– Aspectos morfométricos (área e volume) dos folículos ovarianos dos animais da prole feminina (DPN 45) dos ratos machos controle e expostos a ibuprofeno no período juvenil até a peripuberdade.

	Folículos	Grupos experimentais			
		Controle	2,4 mg/kg	7,2 mg/kg	14,3 mg/kg
ÁREA	Primordiais/primários (mm ²)	0,56 (0,17 – 1,18)	1,09 (0,48 – 2,29) **	0,60 (0,24 – 1,65)	0,61 (0,21 – 1,38)
	Em crescimento (mm ²)	27,68 (11,46 – 62,79)	28,3(11,97 – 69,03)	27,69 (11,46 – 62,8)	26,37 (10,2 – 60,63)
	de Graaf (mm ²)	98,89(13,39 – 207,58)	177,59 (33,54– 478,02)	230,67 (40,31 – 1662,58)	184,73 (33,91 –360,2)
	Atrésicos (mm ²)	17,91 (9,03 – 109,0)	37,12 (8,45 – 107,7)	31,85 (4,07 – 225,98)	14,18 (3,04 –57,6)*
	Corpo lúteo (mm ²)	499,14 (142,67 – 1639,6)	533,00 (154,24 – 1515,6	837,44 (162,89 – 1876,5) *	714,46 (274,52 – 1639,9)
VOLUME	Primordiais/primários(mm ³)	1,25 (0,21 – 3,82)	3,34 (1,0 – 19,55)**	1,4 (0,35 – 5,87)	1,44 (0,28 – 3,85)
	Em crescimento (mm ³)	0,43 (0,11 – 1,48)	0,44 (0,12 – 1,7)	0,43 (0,12 – 1,49)	0,4 (0,1 – 1,4)
	de Graaf (mm ³)	1,70 (0,15 – 8,89)	6,73 (0,58 – 25,2)	9,41 (0,7 – 41,63)	7,4 (0,58 – 20,33)
	Atrésicos (mm ³)	0,48 (0,08 – 1,30)	0,67 (0,03 – 3,32)	0,52 (0,02 – 2,42)	0,15 (0,01 – 0,39) *
	Corpo lúteo (mm ³)	33,17 (5,07 –197,47)	39,37 (5,70 – 186,54)	69,71 (6,18 – 208,92)*	56,8 (13,53– 250,43)

Valores expressos em mediana - (Q1-Q3). Kruskal- Wallis com teste posterior de Dunn, n=5 animais por grupo. *p<0,05 e **p<0,01 comparado ao controle

Tabela 8 – Aspectos morfométrico (área e volume) dos folículos ovarianos dos animais da prole feminina (DPN 120) dos ratos machos controle e expostos a ibuprofeno no período juvenil até a peripuberdade.

	Foliculos	Grupos experimentais			
		Controle	2,4 mg/kg	7,2 mg/kg	14,3 mg/kg
Á R E A	Primordiais/primários (mm ²)	1,63 (0,69 – 5,61)	1,68 (0,56 – 7,08)	1,61 (0,61 – 5,12)	1,9 (0,84 – 11,56)
	Em crescimento (mm ²)	115,02 (13,26 – 443,77)	51,52(17,81 – 405,87) **	62,28 (15,34 – 285,09)	70,18 (17,77 – 332,50)
	de Graaf (mm ²)	315,15 (80,73 – 711,16)	341,16 (116,80 – 1561,7)	318,83 (65,22 – 1236,5)	260,35 (80,030 – 1196,5)
	Atrésicos (mm ²)	102 (2,97 – 1593,4)	67,47 (8,45 – 1755,9)	88,01 (5,23 – 1207,0)	38,04 (5,43 – 612,33)*
	Corpo lúteo (mm ²)	1047 (124,43 – 3796,4)	1081,9 (202,68 – 3126,5)	1008 (96,09 – 3126,5)	1233,4 (308,13 – 2983,4)
V O L U M E	Primordiais/primários(mm ³)	6,19 (1,72 – 39,61)	6,47 (1,26 – 56,05)	6,07 (1,42 – 34,41)	7,78 (2,30 – 116,96)
	Em crescimento (mm ³)	3,79(0,14 – 27,81)	1,1 (0,22 – 24,32) **	1,46 (0,18 – 14,32)	1,75 (0,22 – 18,03)
	de Graaf (mm ³)	16,64 (2,16 – 56,41)	18,74 (7,76 – 146,81)	16,93 (1,57 – 129,33)	12,5 (2,13 – 123,10)
	Atrésicos (mm ³)	3,41 (0,02 – 193,45)	1,65 (0,07 – 218,84)	2,46 (0,04 – 124,72)	0,7 (0,04 – 45,07) *
	Corpo lúteo (mm ³)	99,19 (4,13 – 682,56)	103,23 (8,58 – 484,09)	93,66 (2,80 – 452,81)	128,84 (16,09 – 484,68)

Valores expressos em mediana - (Q1-Q3). Kruskal- Wallis com teste posterior de Dunn., n=5 animais por grupo. *p<0,05 e **p<0,01 comparado ao controle

5 DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou analisar os parâmetros reprodutivos de ratas fêmeas cujos pais, que foram avaliados previamente, foram expostos a diferentes doses de ibuprofeno ambientalmente relevantes da fase juvenil (22-32 dias) à peripuberdade (33-55 dias).

A puberdade é a fase de transição entre a infância e a adulta. Esse período é altamente dependente de andrógenos e uma substância com potencial de desregulação endócrina como o Ibuprofeno pode causar impactos negativos na saúde reprodutiva do animal na vida adulta, prejudicando a fertilidade. Os mecanismos envolvem a supressão da expressão de genes envolvidos na esteroidogênese e no transporte de colesterol para a mitocôndria das células de Leydig (Kristensen et al., 2018). Além disso, a prole subsequente pode sofrer efeitos multigeracionais através de mudanças epigenéticas nas células germinativas (Xin et al., 2015; Anderson, et al, 2014).

Vários estudos demonstram a importância de se investigar a exposição aos DEs durante a gestação, visto que o embrião/feto é submetido a exposição direta a essas substâncias via intrauterina e, posteriormente, as possíveis repercussões desta exposição no desenvolvimento da prole (Arruda et al., 2016). Somente nos últimos anos aumentou-se a conscientização e a pesquisa sobre os efeitos adversos mediados pelos ratos machos sobre a sua prole (Anderson et al., 2014), porém os estudos ainda são limitados. A retenção e a modificação de histonas, a incorporação de protamina na cromatina, a metilação do DNA e transcritos de RNA de espermatozoides parecem desempenhar papéis importantes nos processos epigenéticos do espermatozoide maduro (Jenkins & Carrell, 2012). Sendo assim, torna-se relevante investigar a contribuição paterna para o desenvolvimento físico e sexual da prole. Em estudo prévio, os machos expostos diretamente ao ibuprofeno em estudo prévio foram acasalados com fêmeas não tratadas e já foram reconhecidos diversos parâmetros reprodutivos alterados pelo ibuprofeno na prole masculina, inferindo na diminuição da fertilidade (Gazoli, 2019). Assim, é imprescindível a verificação dos efeitos do fármaco também no desenvolvimento da geração F1 feminina.

O acompanhamento do peso na fase inicial da vida é importante pois o maior ou menor peso nesse período pode indicar maior probabilidade de desenvolvimento na vida adulta de um conjunto de doenças como a síndrome metabólicas - que envolve hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, etc. - mesmo que haja normalização do peso corporal em um curto período de tempo (Salve, 2006; Tavares, 2010; Pescador et al 2001). No presente

estudo, a exposição subcrônica dos pais ao ibuprofeno como um desregulador endócrino não perturbou esse fator. A distância anogenital e o número de mamilos são biomarcadores de exposição androgênica (Guerra et al, 2014). As fêmeas também não se mostraram afetadas nesse aspecto devido a exposição paterna.

A instalação da puberdade é resultado de uma cascata de eventos que define o padrão de liberação de LH e leva a maturação do ovário. Como consequência, há aumento nos níveis séricos de estradiol e a puberdade tem início. O sinal externo desse evento é a abertura vaginal e o primeiro estro (Guerra et al, 2014). Este parâmetro não sofreu alterações provocadas pelo ibuprofeno.

Quanto a ciclicidade estral, um possível desbalanço no eixo hipotálamo-hipófise-ovário pode ter provocado as mudanças detectadas na duração do ciclo, que remetem a infertilidade (Gore et al, 2016). O denominado “estro” representa o período no qual as fêmeas estão sexualmente receptivas aos machos. Seu início é caracterizado pelo aumento no estradiol circulante e a presença de células cornificadas na citologia vaginal (Goldman, Murr and Cooper, 2007).

Ainda na idade púbere, foi detectado menor peso pulmonar nas ratas cujos pais foram expostos a 7,2 mg/kg de ibuprofeno, o que pode levar a alguma diminuição da capacidade respiratória devido a menor área de troca gasosa. Apesar de tal fato ser normalizado na vida adulta das fêmeas, é interessante destacar que os pais dessa prole também apresentaram menor peso pulmonar em estudo prévio (Gazoli, 2019). Também foi afetado o peso do rim, que pode significar alguma anormalidade glomerular (Nilsson, 2008). Contudo, como o foco do trabalho são os aspectos reprodutivos, essas alterações não foram investigadas a fundo.

O teste de fertilidade foi realizado por meio de laparotomia exploratória no penúltimo dia gestacional das ratas nulíparas não tratadas acasaladas com os machos expostos ao fármaco. O objetivo é avaliar os efeitos tóxicos de uma substância na maturação de gametas masculinos e femininos, desempenho copulatório, fertilização, desenvolvimento de zigotos e a implantação (Xie et al, 2018). O potencial de fertilidade determina a capacidade materna de manter os fetos saudáveis com a menor taxa de perda possível (Almeida et al, 2000). Nesse estudo, a prole do grupo exposto a dose intermediária de ibuprofeno (7,2 mg/kg) teve uma redução significativa em seu potencial fértil, mostrando que a gravidez foi comprometida pela exposição paterna. É interessante apontar que no teste de fertilidade realizado em estudo prévio com a geração parental desse mesmo grupo (Gazoli, 2019) também apresentou declínio muito similar nesse parâmetro, indicando uma possível herança multigeracional deste distúrbio reprodutivo.

A morbidade, mortalidade e a expectativa de vida dos fetos têm como fatores críticos o crescimento fetal e tamanho ao nascimento, tanto imediatamente após o nascimento como na vida tardia desses indivíduos (Fowden et al, 2009). Fetos que não estejam adequados para idade gestacional, ou seja, estejam pequenos ou grandes, tem menor probabilidade de sobreviver ao nascimento e tem maior risco de desenvolver doenças degenerativas na vida adulta (como intolerância à glicose e diabetes tipo 2) (Fowden et al, 2009). Neste estudo, a distribuição normal dos pesos dos fetos apresentou-se alterada, com mais fetos gigantes para a idade gestacional no grupo em que os pais foram expostos a dose de 2,4 mg/kg de ibuprofeno do período juvenil até a peripuberdade, indicando que a prole (geração F2) pode ser prejudicada. No estudo prévio realizado, foi identificada a mesma alteração no peso dos fetos obtidos na geração F1, mais um indicativo de herança multigeracional provocada por possíveis alterações epigenéticas.

O crescimento folicular requer muitos fatores e a comunicação entre células foliculares e oócito é fundamental. Alterações nesses processos podem causar dano reprodutivo. A atresia folicular encontrada pode ocorrer devido a baixos níveis de FSH, refletindo o possível desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-ovário supracitado. A diminuição na área e volume de folículos em crescimento (pré-antral) pode impactar na produção de estrogênio, já que estes possuem uma camada produtora desse hormônio (Hirshfield, 1997).

Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam a importância do estudo da contribuição paterna, e não apenas materna, na repercussão tardia na saúde de seus filhos, especialmente quando as células germinativas são expostas numa fase susceptível a mudanças. A ideia de que tóxicos ambientais podem ser a etiologia de diversos distúrbios que se estendem por múltiplas gerações é endossada, como já comprovado em experimentos que se aprofundam em mecanismos epigenéticos de desreguladores endócrinos, entre eles fármacos como vinclozolina, dexametasona, dietilestilbestrol, além de poluentes ambientais como o cigarro e a poluição e os compostos químicos neles presentes (Nilsson, 2008; Xin 2015 e Gore, 2015).

6 CONCLUSÃO

O ibuprofeno foi capaz de alterar importantes parâmetros reprodutivos na prole feminina de machos expostos a doses que mimetizam a exposição ambiental a este fármaco. Possivelmente, a herança multigeracional dos fatores observados foram desencadeadas por

mecanismo epigenéticos nas células germinativas dos pais, as quais sofreram alterações durante a exposição em um período muito susceptível a mudanças. Novos estudos devem ser conduzidos para investigar os mecanismos de ação que provocam os efeitos observados nas fêmeas da geração F1.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. A.; KEMPINAS, W. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 9, p. 1105-1109, 2000.

ANDERSON, Diana; SCHMID, Thomas E.; BAUMGARTNER, Adolf. Male-mediated developmental toxicity. **Asian journal of andrology**, v. 16, n. 1, p. 81, 2014.

ARRUDA A, CARDOSO C, VIEIRA M, ARENA A. 2016. "Safety Assessment of Hibiscus Sabdariffa after Maternal Exposure on Male Reproductive Parameters in Rats." **Drug and Chemical Toxicology** 39 (1): 22–27.

BALIN, Paola da Silva. **Influência da exposição in utero e lactacional ao anti-inflamatório ibuprofeno: repercussão tardia em parâmetros reprodutivos masculinos, em ratos.** 2018.Dissertação de Mestrado

BORGEEST, C. et al. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. **Toxicological sciences**, v. 68, n. 2, p. 473-478, 2002.

DRUGBANK, **Ibuprofen**. Disponível em :<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>. Acesso em 2019

FORTUNATO, Ana Isabel Costa. **Ocorrência de Diclofenac, Ibuprofeno e Paracetamol em águas residuais em Portugal.** 2014. Dissertação de Mestrado.

FOWDEN, A. L.; SFERRUZZI-PERRI, A. N.; COAN, P. M.; et al. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 14, p. 3459–3472, 2009.

FRUNGIERI, Mónica B.; CALANDRA, Ricardo S.; MAYERHOFER, Artur; et al. Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 149, n. 4, p. R169-180, 2015.

GAZOLI, Mariana Barbosa. “Exposição ao anti-inflamatório ibuprofeno da fase juvenil à peripuberdade em ratos: repercussão imediata e tardia em parâmetros reprodutivos masculinos” 2019. Dissertação de Mestrado

GOLDMAN, Jerome M.; MURR, Ashley S.; COOPER, Ralph L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GORE, Andrea C. et al. EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. **Endocrine reviews**, v. 36, n. 6, p. E1-E150, 2015.

GUERRA, Marina T. et al. Perinatal androgenic exposure and reproductive health effects female rat offspring. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 7, p. 375-389, 2014.

HALFORD, Gayle M.; LORDKIPANIDZÉ, Marie; WATSON, Steve P. 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: an interview with Dr Stewart Adams. **Platelets**, v. 23, n. 6, p. 415-422, 2012.

HIRSHFIELD, Anne N. Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 29, n. 1, p. 10-15, 1997.

HOPPE, Taíse Raquel Grings. Contaminação do meio ambiente pelo descarte inadequado de medicamentos vencidos ou não utilizados. 2011.

JENKINS, Timothy G.; CARRELL, Douglas T. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. **Reproduction**, v. 143, n. 6, p. 727-734, 2012.

KANABAR, D. J. A clinical and safety review of paracetamol and ibuprofen in children. **Inflammopharmacology**, 2017

KINSEY-JONES, J. S. et al. Corticotrophin-releasing factor alters the timing of puberty in the female rat. **Journal of neuroendocrinology**, v. 22, n. 2, p. 102-109, 2010.

KRISTENSEN, David M.; SKALKAM, Maria L.; AUDOUZE, Karine; et al. Many putative endocrine disruptors inhibit prostaglandin synthesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 4, p. 534–541, 2011.

KRISTENSEN, David Møbjerg; DESDOITS-LETHIMONIER, Christèle; MACKEY, Abigail L.; et al. Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 4, p. E715–E724, 2018.

MANTOVANI, A.; FUCIC, A. Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action. **Reproductive Toxicology**, 44, 15–22.,2014

MOMPELAT, S., LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, 35(5), 803–814, 2009

MOORE, R. A., DERRY, S., WIFFEN, P. J., STRAUBE, S., & ALDINGTON, D. J. Overviewreview: Comparative efficacy of oral ibuprofen and paracetamol (acetaminophen) across acute and chronic pain conditions. **European Journal of Pain** (UnitedKingdom), 19(9), 1213–1223, 2015

NASSR, Azize CC et al. Effects of gestational and lactational fenvalerate exposure on immune and reproductive systems of male rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 13-14, p. 952-964, 2010.

NILSSON, Eric E. et al. Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 713-721, 2008.

PESCADOR, Marise V.B. et al . Aspectos endocrinológicos das crianças e adultos nascidos pequenos para a idade gestacional. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 15-23, Feb. 2001.

PICUT, C. A., REMICK, A. K., DE RIJK, E. P. C. T., SIMONS, M. L., STUMP, D. G., & PARKER, G. A. (2015). Postnatal Development of the Testis in the Rat. **Toxicologic Pathology**, 43(3), 326–342.

REAGAN-SHAW, Shannon; NIHAL, Minakshi; AHMAD, Nihal. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB journal**, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008.

ROSSITTO, M., UJJAN, S., POULAT, F., Multiple roles of the prostaglandin D2 signaling pathway in reproduction. **Reproduction**, 2014 149(1), R49–R58

SALVE, Mariângela Gagliardi Caro et al. Obesidade e peso corporal: riscos e consequências. **Movimento & Percepção**, v. 6, n. 8, p. 29-48, 2006.

SILVA, Marina Góis Pereira Leite. Contaminação de águas por diclofenaco e ibuprofeno: impacto ambiental e implicações ecotoxicológicas. 2017.

SKOMSVOLL, J. F. What are endocrine disruptors? *Pharmacotherapy During*, 571–580. **US Environmental Protection Agency** (US EPA), 2004

Smyth EM, Grosser T, Fritz Gerald GA. Autacoides derivados dos lipídios: eicosanoides e fator ativador plaquetário. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman*. 12ed. Porto Alegre: AMGH. 2012

TAVARES, Letícia Ferreira et al. Síndrome metabólica em crianças e adolescentes brasileiros: revisão sistemática. **Cad Saude Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 469-76, 2010.

USEnvironmental Protection Agency (US EPA). Pubertal Development and Thyroid Function in Intact Juvenile/Peripubertal Male Rats Assay. **OCSSP Guidelines** 890,1500. Standard Evaluation Procedure. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019**. World Health Organization, 2019.

XIE, Jianxun; FUNK, Juergen; BOPST, Martin; et al. An innovative investigative approach to characterize the effects observed in a combined fertility study in male and female rats. **Regulatory toxicology and pharmacology**: RTP, v. 95, p. 339–347, 2018.

XIN, F., SUSIARJO, M., & BARTOLOMEI, M. S. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 43, 66–75. 2015