



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (CIAGRA) PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

DANIELE CAMARGO DA SILVA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETINILESTRADIOL
E AO ÓLEO DE PEQUI SOBRE O OVÁRIO DO
GERBILO DA MONGÓLIA**

JATAÍ – GO
2022

UFJ
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES
ELETRÔNICAS DE TESES**

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFJ

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Jataí (UFJ) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFJ), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFJ é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [] Tese

2. Nome completo do autora: DANIELE CAMARGO DA SILVA

3. Título do trabalho: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETINILESTRADIOL E AO ÓLEO DE PEQUI SOBRE O OVÁRIO DO GERBILO DA MONGÓLIA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **ANA PAULA DA SILVA PEREZ, Orientadora**, em 14/04/2022, às 07:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



~~Documento assinado eletronicamente por **DANIELE CAMARGO DA SILVA, Discente**, em 19/04/2022, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).~~



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufj.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0016282** e o código CRC **40F4A192**.

DANIELE CAMARGO DA SILVA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETINILESTRADIOL
E AO ÓLEO DE PEQUI SOBRE O OVÁRIO DO
GERBILO DA MONGÓLIA**

Defesa apresentada ao Programa de Biociência
Animal da Universidade Federal de Jataí (UFJ),
como requisito para obtenção do grau de Mestre
em Biociência Animal.

Área de concentração: Saúde e Produção Animal

Linha de Pesquisa 02: Morfologia, Clínica e
Cirurgia Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula da Silva Perez

JATAÍ – GO
2022

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

SILVA, DANIELE CAMARGO DA
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETINILESTRADIOL E
AO ÓLEO DE PEQUI SOBRE O OVÁRIO DO GERBILO DA
MONGÓLIA / DANIELE CAMARGO DA SILVA. - 2022.
53 f.

Orientadora: Profa. Dra. ANA PAULA DA SILVA PEREZ.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Jataí, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Jataí, Programa de
Pós-Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2022.

Inclui siglas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Caryocar brasiliense . 2. Desregulador endócrino. 3. Ovários.
4. Roedor. 5. 17 β -etinilestradiol. I. PEREZ, ANA PAULA DA SILVA,
orient. II. Título.

CDU 61+57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **004/2022-PPGBA** da sessão de Defesa de Dissertação de **DANIELE CAMARGO DA SILVA**, que confere o título de Mestra no Programa de Pós-Graduação em **BIOCIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração em Saúde e Produção Animal.

Ao oitavo dia, do mês de abril do ano de dois mil e vinte e dois, a partir das 14:00 horas, realizou-se por meio de videoconferência a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **"EXPOSIÇÃO AO ETINILESTRADIOL E AO ÓLEO DE PEQUI DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL E SEUS EFEITOS SOBRE O TECIDO OVARIANO DO GERBILO DA MONGÓLIA NA SENESCÊNCIA"**. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Ana Paula da Silva Perez (UACISAU/UFJ - Universidade Federal de Jataí/GO) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Lara Silvia Corradi Olhe Blanck (Escola de Medicina veterinária e Zootecnia da UFT, Campus Araguaína) - membro externo e Professora Doutora Patrícia Simone Leite Vilamaior (Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto - IBILCE/UNESP) - membro externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora se reuniu em sessão secreta, a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutor Ana Paula da Silva Perez, Presidenta da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao oitavo dia, do mês de abril do ano de dois mil e vinte e dois.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETINILESTRADIOL E AO ÓLEO DE PEQUI SOBRE O OVÁRIO DO GERBILO DA MONGÓLIA



Documento assinado eletronicamente por **ANA PAULA DA SILVA PEREZ, Orientadora**, em 08/04/2022, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lara Silvia Corradi Olhe Blanck, Usuário Externo**, em 08/04/2022, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **PATRICIA SIMONE LEITE VILAMAIOR, Usuário Externo**, em 08/04/2022, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufj.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0013775** e o código CRC **A28ECF32**.

https://sei.ufj.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=16088&infra_sistema=... 1/2

FOLHA DE MENÇÃO

Os Programas de Pós-Graduação stricto sensu, ora em Funcionamento na Universidade Federal de Jataí (UFJ), em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, continuam provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás (UFG), no entanto, todos os elementos pré-textuais do trabalho apresentado estão identificados como Universidade Federal de Jataí, em função da migração da BDTD ter ocorrido a partir de 16 de agosto de 2021, e pelo fato das pesquisas e produções estarem sendo realizadas na UFJ.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus por toda sabedoria e serenidade para conduzir na realização desse projeto.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de nível pessoal-CAPES pelo apoio financeiro. Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela oportunidade.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Paula Silva Perez pela oportunidade, paciência, toda ajuda em todos os momentos e pela confiança depositada em mim para finalização do mestrado.

A minha família pelo todo o apoio, principalmente ao meu noivo Eugenio Moreira pelos conselhos e por sempre se dedicar e me incentivar em momentos difíceis.

RESUMO

O ovário está relacionado com a síntese de hormônios sexuais, como o estrógeno e a progesterona e o desenvolvimento dos folículos. A exposição aos estrógenos sintéticos, como o 17 α -etinilestradiol (EE₂), importante componente do contraceptivo oral, durante o período perinatal ou pré-puberal, alteram o desenvolvimento do ovário em roedores, podendo afetar negativamente na fertilidade feminina. Em contrapartida, o óleo de pequi apresenta ação antioxidante e anticancerígena. Sendo assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a ação da exposição ao EE₂ e ao óleo de pequi durante o período pré-natal sobre os aspectos morfofisiológicos do ovário de gerbilo fêmea senil. Para isso, as fêmeas foram divididas em cinco grupos experimentais. No grupo controle, as fêmeas não foram expostas aos compostos. As fêmeas do grupo Ve foram expostas a 0,1 ml/dia do veículo (óleo mineral) do EE₂ do 18º ao 22º dia do período pré-natal. No grupo EE, as fêmeas progenitoras receberam por gavagem 15µg/kg/dia de EE₂ do 18º ao 22º dia do período pré-natal. No grupo EE/Pe, as fêmeas foram expostas ao EE₂ (15µg/kg/dia) durante o período mencionado anteriormente e a 300 mg/Kg de óleo de pequi do 18º ao 26º dia (nascimento dos filhotes) do período pré-natal. No grupo Pe, as fêmeas foram expostas a 300 mg/Kg de óleo de pequi do 18º ao 26º dia do período pré-natal. Os animais foram eutanasiados quando completaram 12 meses de vida. Em seguida, as fêmeas foram pesadas e os ovários foram retirados, pesados e submetidos ao processamento histológico e incluídos em parafina. Os blocos histológicos com os ovários foram submetidos à microtomia e em seguida, os cortes foram corados em Hematoxilina Eosina, Tricrômio de

Gömori e Reativo de Schiff (PAS). A partir dos resultados observou-se que a exposição ao desregulador endócrino e ao óleo de pequi, não alteraram o peso corpóreo, peso do ovário e o peso absoluto, mas impôs alterações na população folicular ovariana. Com isso as etapas seguintes serão fundamentais para entender os efeitos que foram causados do EE₂ e o óleo de pequi no tecido ovariano.

Palavras-Chaves: *Caryocar brasiliense*, Desregulador endócrino, Ovários, Roedor, 17 α -etinilestradiol.

ABSTRACT

The ovary is involved in the synthesis of sex hormones such as estrogen and progesterone and the development of follicles. Exposure to synthetic estrogens, such as 17 α -ethinylestradiol (EE2), an important component of oral contraceptives, during the perinatal or prepubertal period, alters the development of the ovary in rodents, which can negatively affect female fertility. On the other hand, pequi oil has antioxidant and anticancer action. Therefore, the objective of our study was to evaluate the action of exposure to EE2 and pequi oil during the prenatal period on the morphophysiological aspects of the ovary of a senile female gerbil. For this, the females were divided into five experimental groups. In the control group, females were not exposed to the compounds. Females in the Ve group were exposed to 0.1 ml/day of the vehicle (mineral oil) of EE2 from the 18th to the 22nd day of the prenatal period. In the EE group, the parent females received 15 μ g/kg/day of EE2 by gavage from the 18th to the 22nd day of the prenatal period. In the EE/Pe group, the females were exposed to EE2 (15 μ g/kg/day) during the period mentioned above and to 300 mg/kg of pequi oil from the 18th to the 26th day (birth of the offspring) of the prenatal period. In the Pe group, females were exposed to 300 mg/kg of pequi oil from the 18th to the 26th day of the prenatal period. The animals were euthanized when they reached 12 months of age. Then, the females were weighed and the ovaries were removed, weighed and submitted to histological processing and embedded in paraffin. The histological blocks with the ovaries were submitted to microtomy and then the sections were stained with Hematoxylin Eosin, Trichrome Gömöri and Reactive Schiff (PAS). From the results it was observed that exposure to endocrine disruptor and pequi oil did not change body weight, ovarian weight and absolute weight, but imposed changes in the ovarian follicular population. With this, the following steps will be fundamental to understand the effects that were caused by EE₂ and pequi oil on the ovarian tissue.

Keywords: *Caryocar brasiliense*, Endocrine disruptor, gonad, rodent, 17 α -ethinylestradiol.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquematização de um oócito pós-natal e desenvolvimento folicular.....	11
Figura 2. Etapas do ciclo estral em roedor	13
Figura 3. Síntese de estrogênio no ovário	15
Figura 4. Esquema ilustrando o estrógeno sintético.....	16
Figura 5. Gesbilo da môngolia	18
Figura 6. Aspectos morfológicos do fruto do pequi (Caryocar brasiliense).....	20
Figura 7. Bioterio da UFJ.....	22
Figura 8. Esquema do delineamento experimental.....	23
Figura 9. Dados biométricos.....	27
Figura 10. Cortes histológicos do ovário	29
Figura 11. Altura epitelial ovariana.....	31
Figura 12. Espessura da túnica.....	32
Figura 13. Cortes histológicos da glândula.....	33
Tabela 1. Composição da polpa do pequi	19
Tabela 2. Quantificação dos folículos	28

LISTA DE SIGLAS

AR: Receptor androgênico

BPA: Bisfenol-A

DES: Desreguladores endócrinos

E₁: Estrona

E₂: Estradiol

E₃: Estriol

E₄: Estretol

EE₂: 17 α -etinilestradiol

ER: Receptor de estrógeno

ER α : Receptor de estrogênio do tipo alfa

ER β : Receptor de estrogênio do tipo beta

Fig: Figura

FSH: Hormônio folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina hipotalâmica

HE: Hematoxilina-Eosina

LH: Hormônio luteinizante

PAS: Reativo de Schiff

SOP: Síndrome do ovário policístico

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

ZP: Zona pelúcida

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	8
1.0 INTRODUÇÃO	9
1.1 Morfofisiologia do ovário	9
1.2 Regulação do processo reprodutivo	12
1.3 Estradiol e receptor estrogênico	14
1.4 Desregulador endócrino	16
1.5 Gerbilo da mongólia	18
1.6 Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>)	19
2.0 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Animais e delineamento experimental	21
3.2 Preparo do óleo de pequi	24
3.3 Biometria	24
3.4 Microtomia e técnicas de coloração	24
3.5 Análises morfológicas e morfométricas	25
3.6 Análise estatística	26
4.0 RESULTADOS	26
4.1 Exposição não altera os parâmetros biométricos	26
4.2 Alteração na foliculogênese.....	27
4.3 Alteração na incidência de corpo lúteo.....	29
4.4 Aumento em corpos atresícos	29
4.5 Alteração na altura do epitélio ovariano.....	29
4.6 Aumento da túnica	31
5.0 DISCUSSÃO	34
6.0 CONCLUSÃO.....	38
7.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morfofisiologia do Ovário

O sistema reprodutor feminino da maioria dos mamíferos, incluindo os roedores, é constituído por dois ovários, duas tubas uterinas, um útero, uma vagina e a vulva, além das glândulas anexas e clitóris, totalizando sete órgãos desse sistema (RUGH, 1968). Os ovários são estruturas relacionadas com a produção de hormônios e com o desenvolvimento de células reprodutivas, caracterizados como glândulas mistas. Por esse motivo, representam as gônadas femininas, as quais sintetizam e secretam hormônios esteroides pela função endócrina, enquanto que, pela função exócrina ocorre a liberação do ovócito secundário.

Segundo Rugh (1968), os ovários são órgãos em pares, e em roedores estão localizados lateralmente aos rins conectados a parede dorsal da cavidade abdominal pelo mesovário, sendo está uma proteção do peritônio que, na maioria das vezes, estão cobertos por tecido adiposo. Silva et al. (1983) relatam que os camundongos apresentam ovários em formatos arredondados.

Nas fêmeas dos gerbilos, os ovários apresentam formato semelhante a grãos de feijão, sendo divididos em dois polos distintos, o cranial e o caudal. Assim como o útero e as tubas uterinas, os ovários estão em contato com a lâmina visceral do peritônio. Histologicamente, essa gônada é revestida por um epitélio germinativo, referindo-se a um epitélio simples cúbico a pavimentoso. A túnica albugínea corresponde a uma camada de tecido conjuntivo denso, subjacente ao epitélio germinativo. O estroma apresenta duas camadas, sendo a região cortical, abaixo da túnica albugínea e a região medular, formada por tecido fibroso, local onde se observam os vasos sanguíneos e nervos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ROSS; PAWLINA, 2016).

Os folículos ovarianos estão localizados na região cortical, de forma geral correspondem ao oócito, envolto por uma ou mais camadas de células foliculares, ou células granulosas, dependendo do estágio do desenvolvimento folicular (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013, RUGH 1968).

Três grupos de folículos podem ser identificados na estrutura ovariana: folículos primordiais, folículos em crescimento (que podem ser divididos em folículos primários e secundários) e folículos maduros (de Graaf) (PAN et al., 2012; ROSS; PAWLINA, 2016).

Os folículos primordiais são constituídos pelo oócito primário, circundado por uma única camada de células foliculares pavimentosas. Os folículos primários são encontrados em

duas etapas de desenvolvimento: unilaminar e multilaminar. A sua estrutura é caracterizada pelo desenvolvimento de um oócito primário maior, com um núcleo mais evidente; as células foliculares tornam-se cuboides, inicialmente, com uma única camada, caracterizando o folículo primário unilaminar. Quando ocorre a proliferação e estratificação das células foliculares, caracteriza-se o folículo primário multilaminar, nesse estágio, as células foliculares são conhecidas como células da granulosa. Com o crescimento dos folículos ovarianos vai ocorrer um aumento na secreção do fluido folicular das células da granulosa resultando no desenvolvimento da zona pelúcida (WASSARMAN, 2008).

O oócito em desenvolvimento é protegido por uma camada protetora denominada zona pelúcida (ZP). A ZP é uma matriz extracelular especializada que desempenham um papel importante durante a foliculogênese, fertilização (MARCO-JIMÈNEZ et al., 2012). Em alguns mamíferos a zona pelúcida é formada por quatro tipos de glicoproteínas a ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4 cada uma possui um papel diferente na fertilização (LAMAS-TORANZO et al., 2019). Já em camundongos a ZP é presente somente três tipos sendo a ZP1, ZP2 e ZP3 (MOROS-NICOLÁS et al., 2018).

O desenvolvimento folicular prossegue com o aumento do oócito e a proliferação das células da granulosa, através da influência do hormônio folículo estimulante (FSH), fatores de crescimento e íons de cálcio. O estrato granuloso atinge a espessura de 6 a 12 camadas celulares e cavidades preenchidas por líquido folicular aparecem entre as células granulosas, formando uma cavidade única, o antro folicular, caracterizando o desenvolvimento do folículo secundário. As células da granulosa formam um monte espesso, o cúmulo oóforo, que se projeta ao antro. As células do cúmulus que circundam imediatamente o oócito são denominadas corona radiata. (CHAKRAVARTHI et al., 2015; KIERSZENBAUM; TRES, 2016; ROSS; PAWLINA, 2016).

As células da granulosa persistem em proliferação e o líquido folicular continua a ser formado, resultando na constituição do folículo de Graaf (maduro). O cúmulo oóforo e as células da granulosas associadas separam-se de sua base e flutuam livremente no líquido folicular. Com a estimulação estrogênica e de outras substâncias hormonais, o ovário passa por alterações, como o desenvolvimento do oócito secundário no folículo de Graaf, e a perda do suprimento sanguíneo na superfície ovariana, ocorre a ovulação com a liberação do oócito secundário. Os remanescentes celulares do folículo de Graaf se desenvolvem no corpo hemorrágico que, sob ação hormonal, principalmente do hormônio luteinizante, forma o corpo lúteo. Este, na ausência da secreção de gonadotrofina coriônica humana, secretada em decorrência da implantação embrionária ausência da secreção de gonadotrofina coriônica

humana, secretada em decorrência da implantação embrionária, formando o corpo Albicans (Fig. 01) (FIGUEIREDO 2008; ROSS; PAWLINA, 2016). O envelhecimento reprodutivo é marcado pela redução e a aptidão dos folículos ovarianos o que leva a infertilidade (BROEKMANS et al., 2004; AUBUCHON et al., 2012).

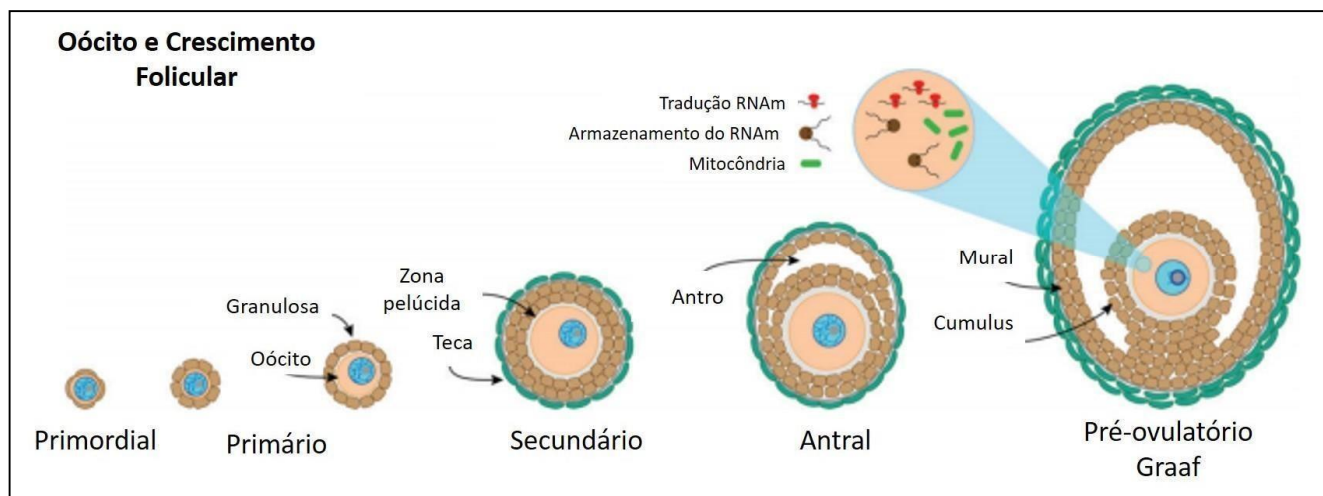


Figura 01. Esquematização do desenvolvimento folicular e oócitar pós-natal. Esta transição é acompanhada por parada transcricional e uma mudança no grau de condensação e arranjo espacial do DNA no núcleo do oócito, de um nucléolo não circunscrito a uma configuração de nucléolo circundado, como mostrado no oócito no folículo pré-ovulatório. O totalmente crescido oócito contém, além de mRNAs traduzidos ativamente, produtos incluindo mRNAs inativos da tradução armazenados e mitocôndrias que são necessárias durante a maturação meiótica ou embriogênese inicial. Adaptado de CLARKE, 2018.

1.2. Regulação do processo reprodutivo

O sistema reprodutivo dos mamíferos é controlado por meio dos sistemas endócrino e nervoso, sendo que estes funcionam de maneiras específicas e interagem entre si, proporcionando uma característica fundamental aos seres vivos, a reprodução (WILLIAM ENRIGHT, 2007).

O hipotálamo é uma região do diencefalo, localizado abaixo do tálamo e acima da glândula hipofisária, sendo dividido em duas partes: anterior e posterior, onde cada uma é responsável por desempenhar funções fisiológicas específicas. O controle reprodutivo é protagonizado pelo eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, elencando os sistemas nervoso e endócrino aos tecidos reprodutivos, por meio, de mensageiros proteicos sintetizados pelo organismo. O hormônio liberador de gonadotrofina hipotalâmica (GnRH) é um peptídeo dito como o mensageiro central que sinaliza de forma pulsátil e inicia a produção e secreção das

gonadotrofinas hipofisárias, responsáveis por regular a produção de esteroides sexuais e demais funções das gônadas (RODRIGUES, 2019; MAGGI, 2020).

O desenvolvimento puberal normal e a fertilidade dependem da ativação e ação conjunta do eixo hormonal. Nas fêmeas, a liberação do GnRH ocorre no período puberal, chegando até a hipófise anterior pela circulação sanguínea, por meio de uma rede de capilares que permitem essa comunicação. Esse hormônio exerce um importante papel na regulação do eixo neuroendócrino pelo estímulo da produção e liberação de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). A ovulação é uma sequência de acontecimentos que tem por finalidade atingir níveis elevados de estrógeno no organismo, que resulta no sistema nervoso um feedback positivo, elevando assim os níveis de LH e FSH (GUYTON, HALL, 2011; MARQUES, 2017).

Nas fêmeas, o FSH é responsável pelo desenvolvimento morfológico e funcional dos folículos ovarianos, resultando na formação do antro folicular e secreção da aromatase. O LH induz a síntese de andrógenos nas células da teca interna. O pico ovulatório do hormônio LH tem como principal função em uma maior maturação folicular induzir a ovulação. Por fim, na fase lútea o LH atua na formação do corpo lúteo e estimula a síntese de progesterona (MENEZES-FILHO et al., 2017).

Em roedores, o início da fase reprodutiva das fêmeas é marcado por várias mudanças e uma série de alterações ovarianas, endócrinas e comportamentais, conhecido como ciclo estral, com uma duração de quatro a cinco dias, sendo marcado por quatro fases divididas em: proestro, estro (fase folicular), metaestro e diestro (fase lútea) (figura 3). O proestro é a fase folicular ovariana, caracterizada pelo crescimento folicular, sob influência do FSH e altos níveis de estrógeno, devido ao desenvolvimento do folículo maduro. Na fase estro, ocorre a ovulação, correspondente ao pico de LH. Essa fase também é conhecida como cio, onde a fêmea realiza movimento de lordose e fica receptiva ao macho (RANGEL, 2018). Os picos de estrogênio são mais evidentes nas fases proestro e estro do ciclo estral do roedor (LV; SHI, 2010).

O metaestro e o diestro correspondem às fases luteínicas do ovário, sendo o metaestro um estágio intermediário, caracterizado pela queda dos níveis de estrógeno e aumento nos níveis de progesterona, devido ao início da atividade dos corpos lúteos. O diestro é a fase caracterizada por apresentar os mais altos níveis de progesterona da fase luteínica (COSTA, 2010; LOVICK, 2014).

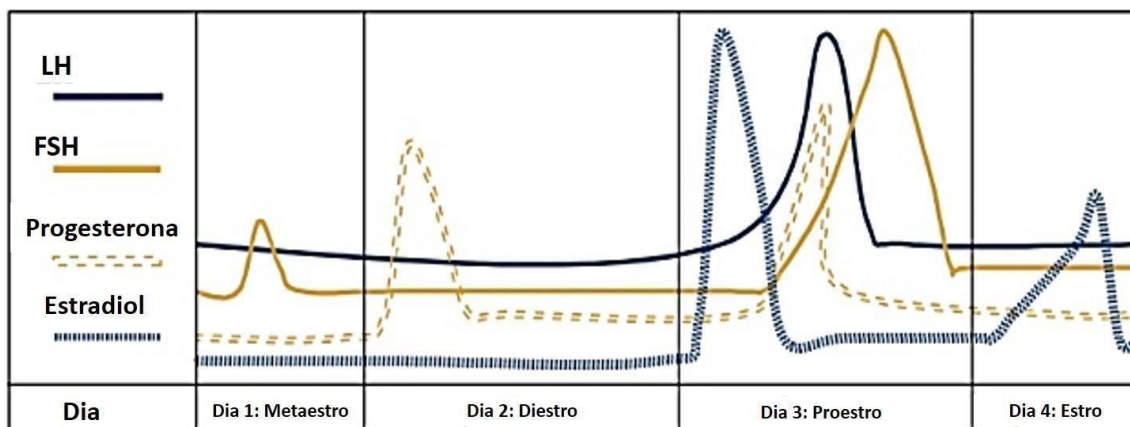


Figura 2: Etapas do ciclo estral em roedor. Adaptado de EMANUELE et al., 2002.

1.3. Estradiol e Receptor Estrogênico

O hormônio esteroide estradiol (E_2) possui um papel essencial na função sexual feminina, atuando na regulação do ciclo, sendo secretado pelos folículos em desenvolvimento, corpo lúteo e placenta. Uma destas etapas enzimáticas, seria a conversão da testosterona em estradiol, intermediada pela enzima aromatase.

A esteroidogênese no folículo ovariano ocorre durante a fase folicular, usando como precursor o colesterol circulante. A proteína reguladora aguda de esteroidogênese (StAR) realiza o deslocamento do colesterol para o interior da mitocôndria, na qual o complexo enzimático P450 participa da transformação do colesterol em pregnenolona. Em seguida com o colesterol captado e convertido em pregnenolona, e esta em progesterona por meio da enzima 3- β -hidroxidesidrogenase (fig. 5) (MIZRACHI e AUCHUS et al., 2009).

Posterior á sua produção, a progesterona servem como substrato para a formação da androstenediona que pode ser convertida em outro andrógeno a testosterona pela ação da enzima 17- β -HSD. Este hormônio pode atuar no organismo ou poderá penetrar nas células da granulosa e ser convertido em estradiol e estrona pela enzima aromatase, que tem sua atividade estimulada pelo FSH nas células da granulosa (STOCCO, 2008; LIMA-VERDE et al., 2012; CUI et al., 2013; BARAKAT et al., 2016). As altas concentrações séricas de estradiol próximas á ovulação vão inibem a ação do FSH nas células da granulosa, com isso ocorre ao estímulo de maior produção de progesterona devido o início da fase lútea (fig. 5) (LIMAVERDE et al., 2012). Estrogênio na mulher pode influenciar no desenvolvimento de carcinomas nas mamas, ovário, endométrio, tireóide e síndromes de ovário policístico (PEARCE et al., 2004; ASCENZI et al., 2006; KETHA et al., 2015). Esse hormônio vem

sendo muito estudado em ensaios clínicos de várias doenças relacionadas ao envelhecimento (CUI et al., 2013).

Os receptores estrogênicos (ERs) possuem um ou dois receptores nucleares conhecidos ER α ou ER β , são compostos com vários domínios funcionais e partilham regiões estruturais em comum (LORGA et al., 2017). Como qualquer outro hormônio esteroide, E₂ ou o 17 β -estradiol entra de forma passiva na célula e liga-se aos receptores de estrogênio.

O estrona (E₁) e o estriol (E₃) também se encontram no organismo e o estretrol (E₄). O E₂ pode ser produzido por outros tecidos, como tecido adiposo, cerebral e ósseo (BENNINK et al., 2017). Embora a ligação ao ERs cause uma variação na célula, o mecanismo de ação pode ser classificado de duas formas. A via genômica onde o estrogênio exerce seus efeitos, interagindo diretamente ao ERs do ER α ou ER β . E por meio da via não genômica, ela resulta em respostas celulares, onde o estrogênio exerce seus efeitos de forma indireta, por meio de uma cascata de sinalização intracelular com a interação ao receptor de estrogênio (HWANG et al., 2020).

O ER α no ovário é encontrado, principalmente, nas células intersticiais, onde a sua atividade está associada em promover a regulação da esteroidogênese nas células da teca. Em relação ao ER β , a sua ocorrência é predominante nas células da granulosa, sendo responsável pela maturação folicular e ovulação (POCAR et al., 2005). Por fim, os receptores androgênicos (AR) são basicamente encontrados nas células intersticiais e nas células da granulosa, onde ocorre a formação de estrogênios a partir da testosterona e nas células germinativas (DRUMMOND e FULLER, 2010).

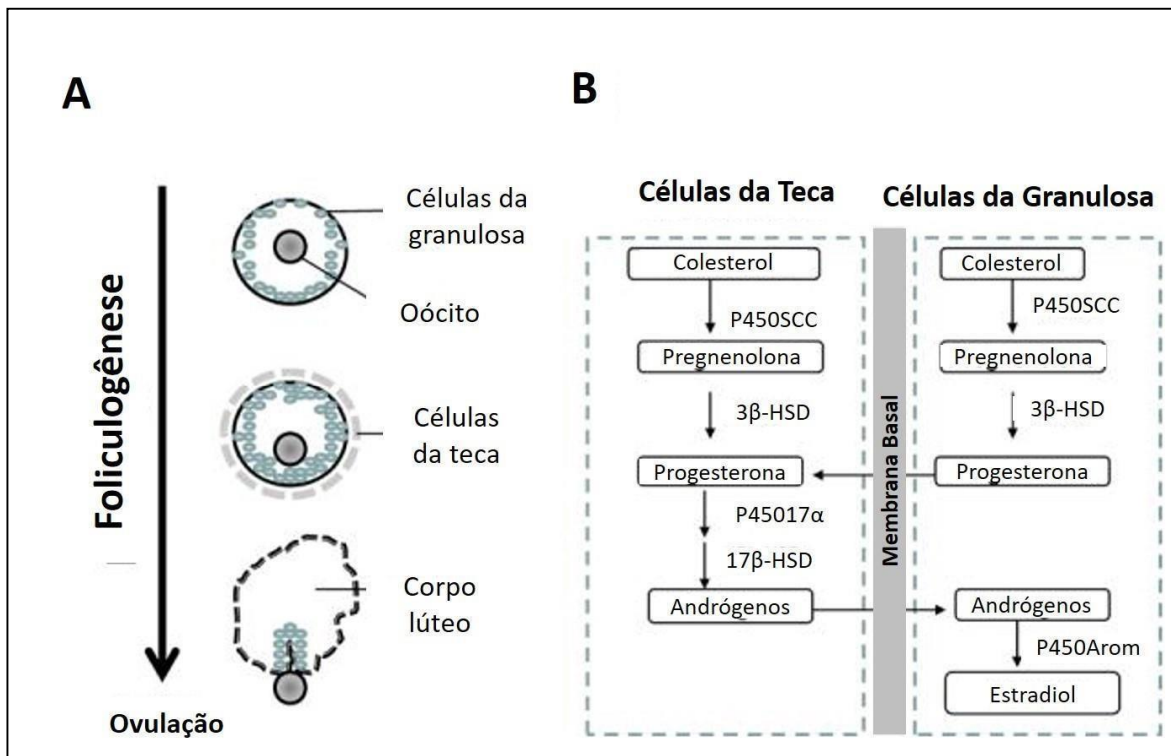


Figura 3: Síntese de estrogênio no ovário. (A) Foliculogênese. Um folículo primordial consiste em um oócito e uma camada de células da granulosa no início da foliculogênese. As células tecais formam uma camada ao redor das células da granulosa quando o folículo é ativado. No final da foliculogênese, as células tecais luteinizam para formar o corpo lúteo após a ovulação. (B) Síntese de estrogênio específico para células no ovário. A produção de estrogênios começa com a síntese de pregnenolona a partir do colesterol, catalisada pela enzima de clivagem da cadeia lateral do citocromo P450 (P450SCC). A pregnenolona é então convertida em progesterona pela 3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase (3β-HSD) nas células tecal e granulosa. A progesterona é convertida em andrógenos via citocromo P450 17α-hidroxilase (P45017α) e 17-betahidroxiesteróide desidrogenase (17β-HSD) nas células tecais durante a fase folicular. A conversão de E2 é catalisada pela aromatase (P450Arom) nas células da granulosa. Adaptado de CUI et al., 2013.

1.4. Desreguladores endócrinos

Dentre as substâncias consideradas desreguladores endócrinos, podem ser incluídas os hormônios sexuais, naturais e sintéticos, como os estrogênios (ARIS et al., 2014). O estrogênio sintético 17α-etinilestradiol (EE₂), pode ser encontrado nos contraceptivos orais, utilizados para evitar gravidez indesejável, para regular o ciclo menstrual e para alguns tratamentos (BRITO; NOBRE; VIEIRA, 2009; TORRES et al., 2015) (Fig. 3).

As substâncias químicas que podem alterar o funcionamento natural do sistema endócrino de diferentes tipos de organismos, incluindo o homem e roedores, promovendo efeitos adversos no organismo sendo denominados DE (SNYDER et al., 2003; GHISELLI, JARDIM, 2007; SCHWINDT et al., 2014).

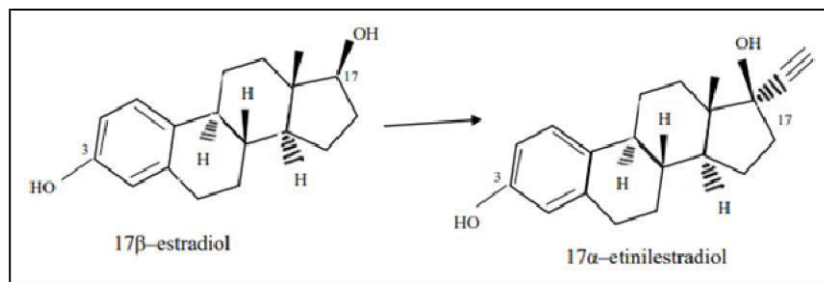


Figura 4. Esquema ilustrando o estrógeno sintético, 17 α -etinilestradiol derivado a partir do estrógeno natural 17 β -estradiol com a adição do grupo etinil no carbono 17 (Retirado de: Miguel, 2016).

Essa configuração faz com que o EE₂ seja mais resistente a degradação do que o hormônio natural, sendo assim o composto mais utilizado nos contraceptivos orais (CLOUZOT et al., 2008). Seu mecanismo de funcionamento baseia-se na inibição da ovulação, resultando em mudanças nas características do endométrio e do muco cervical (BRASIL, 2002). Em ademais, são produtos de uso frequente pela população feminina, sendo que muitas vezes o descarte ocorre inadequadamente no esgoto, causando a contaminação do meio ambiente (FOWLER et al., 2012).

Torres et al. (2015) relata que o EE₂ pode atuar como um DE, causando distúrbios no sistema reprodutivos de mamíferos. A exposição ao EE₂ durante períodos do desenvolvimento promove o aumento de neoplasias em glândulas prostáticas masculinas e femininas (glândula de Skene) de gerbilos em fases tardias, como a adulta (PEREZ et al., 2011; 2012) e senil (PEREZ et al., 2016; 2017). Ademais, a exposição a esse estrógeno sintético durante a puberdade também altera a morfologia da glândula adrenal de gerbilos machos e fêmeas senis, causando mudanças estruturais na região adrenocortical (FLEURY et al., 2021).

Estudos prévios corroboram a exposição ao EE₂ durante o período neonatal promove alterações genéticas relacionadas à função reprodutiva, no gene do receptor do LH, irregularidades no ciclo estral (NOZAWA et al., 2014), alterações no desenvolvimento dos folículos ovarianos (ZHANG et al., 2016) e no perfil hormonal de roedores (ZHANG et al., 2017).

Estudos mostraram que diversos compostos estrogênicos como EE₂ e Bisfenol A (BPA), desempenham determinada ação modulatória, mediante os mecanismos regulatórios epigenéticos, como os miRNA e a metilação do DNA, influenciando nas respostas celulares e na expressão gênica (DRAGIN et al., 2016; DAI et al., 2016).

A instabilidade entre os hormônios LH e FSH afeta diretamente o desenvolvimento folicular, podendo contribuir com o aparecimento e desenvolvimento da síndrome do ovário policístico (SOP) (DUMESIC et al., 2015; FEBRASCO, 2018). De Assis et al. (2012) relatam

que a exposição ao EE₂ causa o desenvolvimento de inúmeras implicações relacionadas ao câncer, como alterações comportamentais em mamíferos e o aumento de chances das proles desenvolverem células carcinogênicas. O epitélio germinativo e túnica albugínea também são afetados com essa exposição, aumentando a espessura dessas estruturas (SOUZA et al., 2021), e alteram a morfologia folicular, contribuindo para a formação de cistos (ZHANG et al., 2017).

O uso precoce de métodos contraceptivos que possuem em sua fórmula EE₂, antes do desenvolvimento embrionário, pode promover uma variedade de condições patológicas podendo ser uma causa importante no desenvolvimento de câncer do colo de útero (ALMEIDA et al., 2017). Mulheres que fazem o uso deste método por longos períodos aumentam o risco de desenvolvimento de adenocarcinomas no útero (UCHIMURA et al., 2005), além de aumento no risco de outras neoplasias (NOZAWA et al., 2014).

Nicolas et al. (2005) relatam que o EE₂ altera os padrões hormonais associados ao eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, resultando na mudança da produção hormonal da gônada.

1.5 Gerbilo da Mongólia: Modelo experimental

O gerbilo (*Meriones unguiculatus*) (Milne-Edwards, 1867) é um roedor de pequeno porte, também conhecido como gerbilo da Mongólia, que pertence à subfamília Gerbillinae e a família Muridae (Fig. 1). Nativo das regiões desérticas da Mongólia, nordeste da China, a maioria possui hábitos noturnos, e alimentam-se de sementes, raízes e frutos. A sua pelagem varia de marrom claro a marrom avermelhado.

Por se tratar de um animal de áreas desérticas, uma de suas características seria o baixo consumo de líquidos e micção escassa, tornando fácil seu manuseio em biotérios. Diante disso, desde a década de 60, o gerbilo é utilizado como modelo experimental, pois também apresentou respostas significativas quando submetido à várias condições de experimentos laboratoriais (WILLIAMS 1974; SANTOS et al., 2003; CAMPOS et al., 2010; PINTO et al., 2010; PEREZ et al., 2016; FACINA 2019). Além de ser considerado um bom modelo para estudos sobre envelhecimento (CHEAL, 1986).



Figura 5. Gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). Fonte: Arquivo pessoal

1.6. Pequi (*Caryocar brasiliense*)

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro apresentando uma grande variedade na biodiversidade da flora, mas com o avanço da agropecuária e urbanização cerca de mais da metade da vegetação nativa já foi desmatada (NOBREGA et al., 2018). Os frutos deste bioma são abundante e têm um grande interesse comercial, pelos aspectos de agrado ao paladar e por apresentar características nutricionais que trazem benefícios à saúde humana (GUEDES et al., 2017).

Dentre os frutos do cerrado com propriedades medicinais, destaca-se o *Caryocar brasiliense*, conhecido popularmente como pequi, devido a sua abrangência no cerrado essa espécie é muito utilizada na manutenção e recuperação de áreas degradadas.

O pequizeiro é uma planta que pode atingir até 10 m de altura. O fruto é dividido em polpa (mesocarpo externo) com alto teor de carotenoides, lipídios e vitaminas, amêndoa (mesocarpo interno) com espinhos finos de 2 a 5 mm de comprimento, apresenta uma boa quantidade de lipídeo servindo de reserva, proteínas e fibras, casca (exocarpo) cuja sua composição principal é a fibra e compostos fenólicos como mostrado na Tabela 1 (Fig. 6) (ROLL et al., 2018; SILVA-NASCIMENTO; NAVES, 2019).

Tabela 1. Composição centesimal da polpa e amêndoa do pequi em base úmida*.

Constituintes	Polpa	Amêndoa
Umidade(%)	41,50 ± 2,00	8,68 ± 0,08
Cinzas(g)	0,63 ± 0,01	4,01 ± 0,51
Proteína(g)	3,00 ± 0,13	25,27 ± 0,74
Lipídios(g)	33,40 ± 3,76	51,51 ± 0,35
Carboidratos(g)	11,45	8,33
Fibra alimentar total(g)	10,02 ± 0,2	2,20 ± 0,1
Valor Energético Total (Kcal)	358,4	598,3

*Valores expressos em média ± desvio padrão. Adaptado de DE LIMA et al., 2007.

O pequi apresenta altas concentrações de compostos antioxidantes, como ácidos fenólicos, flavonoides e carotenoides, apresentando alto potencial antioxidante. Além da ação antioxidante, o pequi é capaz de interferir na carcinogênese protegendo o DNA de danos oxidativos, além de combater os radicais livres (BASTOS et al., 2009; SILVA et al., 2019). Torres et al. (2018) relatam que o consumo de 100g da polpa do pequi é suficiente para atender quase 65% da recomendação diária de vitamina A. Segundo Baptista et al. (2018) e Guedes et al. (2017), foi avaliado o potencial antimicrobiano do pequi, onde as folhas, o fruto e o óleo apresentaram atividade antimicrobiana em diferentes concentrações, além da atividade antioxidante, por meio das mensurações do estresse oxidativo.

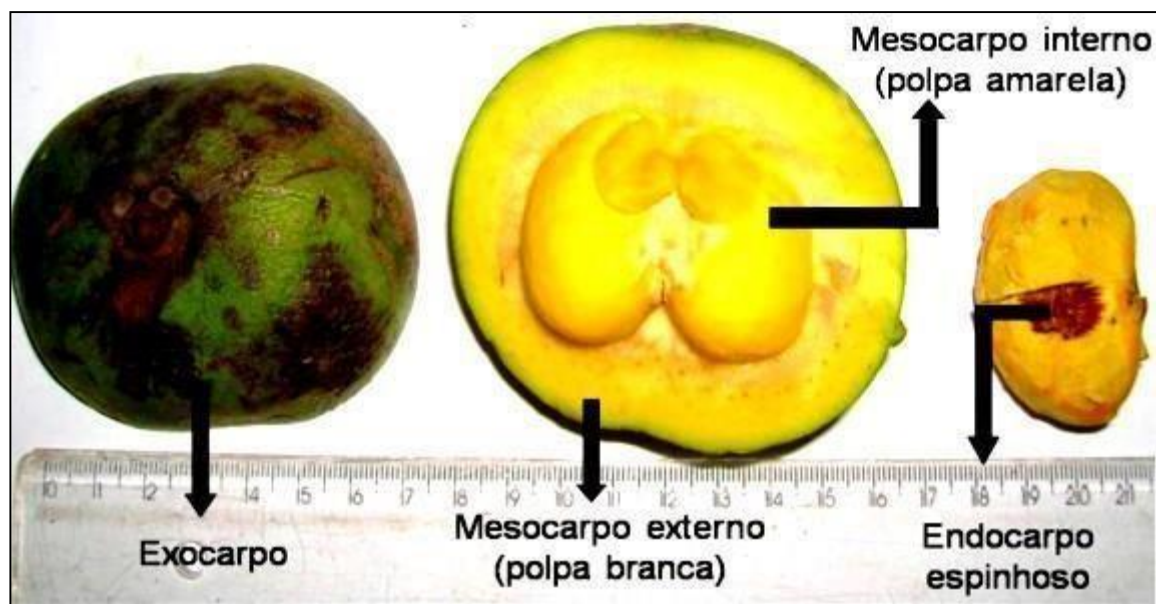


Figura 6: Aspectos morfológicos do fruto do pequizeiro-pequi (*Caryocar brasiliense*).

Adaptado de ALVES et al. 2012.

Armando et al. (2019) demonstraram efeitos anti-inflamatórios e analgésicos do óleo de pequi em camundongos machos suíços, avaliando os parâmetros de inflamação. A maioria dos trabalhos com o óleo de pequi enfatizam a ação antioxidante (ARMANDO et al., 2019), antifúngica (BREDA et al., 2016) e anticarcinogênica (NASCIMENTO-SILVA; NAVES, 2019). Entretanto, a maioria desses trabalhos relatam os efeitos dos componentes do fruto, principalmente sobre os tecidos nervoso (MIGUEL, 2011), hepático (VALE et al., 2019), dentre outros. Até o momento são escassos os estudos na literatura do uso desse fitoquímico na morfologia do sistema reprodutor e seus efeitos sobre a progenitora/prole, e a toxicidade sobre o endócrino, principalmente, associados a alterações promovidas pela exposição aos desreguladores endócrinos, como o etinilestradiol em uma fase crítica do desenvolvimento.

Portanto, levando-se em consideração que o 17 α -etinilestradiol é um estrógeno sintético, sendo um importante componente dos contraceptivos orais, e que causa diversos efeitos no sistema reprodutor, podendo estar relacionado ao desenvolvimento de câncer no ovário. Em contrapartida, o óleo de pequi apresenta ação antioxidante e anticancerígena, desta forma a análise desses efeitos pode contribuir para o entendimento e o enriquecimento da literatura, em relação se o óleo vai desenvolver efeitos protetivos na morfologia ovariana em indivíduos expostos ao etinil de gerbilo fêmeas senis durante o período pré-natal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo objetiva avaliar os efeitos da exposição ao óleo de Pequi sobre a morfofisiologia do tecido ovariano de gerbilos senis tanto em condições fisiológicas normais, quanto sob a exposição ao etinilestradiol durante o período pré-natal.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o peso corporal, o peso total e relativo do ovário das fêmeas senis que foram expostas ao etinilestradiol e ao óleo de pequi durante o período pré-natal.
2. Determinar se a exposição ao EE₂ e ao óleo de pequi altera a morfometria ovariana, a quantidade e o diâmetro dos folículos quanto ao estágio de maturação, além do número de corpos lúteos e atrésicos no tecido ovariano das fêmeas senis.

3. Avaliar a frequência dos receptores hormonais estrogênicos no ovário de todos os grupos experimentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Delineamento experimental

Para a realização desse estudo foram utilizadas 20 fêmeas de gerbilo (*Meriones unguiculatus*) virgens adultas (90 a 120 dias). Cada uma destas fêmeas foi mantida com um macho da mesma idade para a formação de diferentes famílias e separadas em quatro grupos diferentes. O acasalamento foi confirmado por meio do esfregaço vaginal onde constava espermatozoide (dia 0 da gestação). Os animais empregados neste experimento foram provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de São José do Rio Preto (SP).

Os gerbilos foram mantidos em gaiolas de polipropileno no biotério da UFG/Jataí no prédio da Ciências da Saúde com temperatura a 23°C e iluminação de luz fluorescente com ciclo claro/escuro de 12 horas. A esses animais fornecemos, *add libitum*, água filtrada em bebedouro de vidro e ração própria para roedores, os procedimentos de manipulação de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFJ/Jataí (protocolo 004/2018).



Figura 7: Biotério da UFJ. Fonte: Arquivo pessoal
grupos experimentais foram divididos da seguinte forma (Fig. 7):

Grupo Controle: as fêmeas gestantes (n=5) não receberam tratamento.

Grupo Veículo: as fêmeas gestantes (n=5) receberam por gavagem (administração oral), segundo a mesma metodologia do grupo anterior, 0,1 ml/dia apenas do veículo.

Grupo EE: as fêmeas gestantes (n=5) receberam por meio de gavagem 15µg/kg/dia de etinilestradiol (EE₂, 17α-ethinylestradiol; Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído em 100µl de óleo mineral (Nujol®) (CAS 8020-83-5; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), de acordo com a metodologia adotada de Thayer et al. (2001). A exposição ao EE₂ ocorreu do 18º ao 22º dia de gestação esse momento é marcado pela vulnerabilidade do desenvolvimento folicular. Tendo em consideração que o período gestacional do gerbilo é de 26 dias. Para redução do uso de animais os dados desse grupo originaram o estudo de Perez et al. (2016) (Protocolo nº020/09 - CEEA/UNESP), sendo assim esses dados e as amostras arquivadas serão utilizados nesse atual projeto, não sendo necessário utilizarmos novos animais.

Grupo EE/Pe: as fêmeas receberam por gavagem 15µg/kg/dia de etinilestradiol, utilizando-se a mesma metodologia do grupo EE. Essas fêmeas receberam também por

gavagem 400 mg/Kg de óleo de pequi, metodologia modificada de Vale et al. (2019) do 18º dia de gestação ao 26º dia, nascimento dos filhotes.

Grupo Pe: as fêmeas gestantes (n=5) receberam por gavagem 300 mg/Kg de óleo de Pequi do 18º ao 26º (dia do nascimento dos filhotes) dia de gestação.

Os filhotes fêmeas dos grupos experimentais foram expostos ao etinilestradiol durante o período pré-natal e foram eutanasiadas ao completarem 12 meses de idade. O procedimento da eutanásia foi realizado, por meio de administração de dose letal de isoflurano (Biochimico), anestésico administrado por inalação.

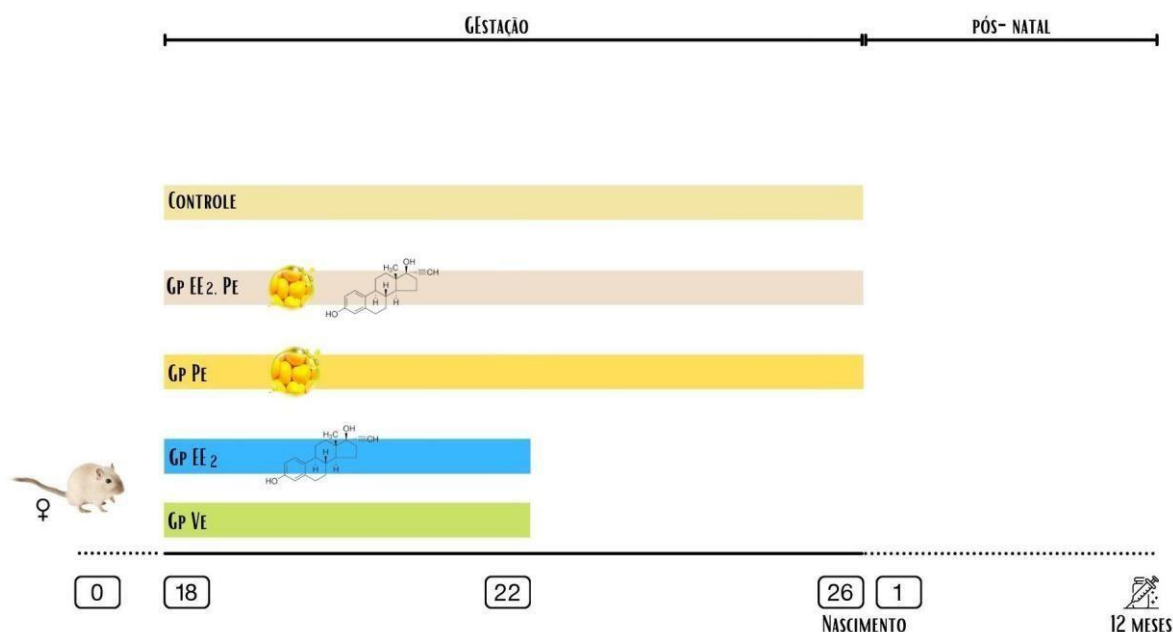


Figura 8. Esquema do delineamento experimental. As fêmeas do grupo EE/PRÉ receberam o etinilestradiol (EE₂) do 18 dia ao 22 dia do período pré-natal. Grupo Ve: as fêmeas receberam apenas o veículo em que o EE₂ foi diluído. Grupo EE/Pequi: as fêmeas receberam 15µg/kg/dia de EE₂ do 18 dia ao 22 dia do período prénatal, associado à exposição ao óleo de Pequi (18 dia ao 26 dia do período gestacional). Grupo Pe: as fêmeas receberam apenas o óleo de Pequi. No grupo controle, a prole não foi exposta a nenhum composto no período pré-natal. Os filhotes fêmeas dos grupos experimentais foram eutanasiadas com 12 meses de vida (senescência).

3.2 Preparo do óleo de Pequi

O Pequi foi obtido na região de Jataí, GO. Após a remoção da sua casca, a polpa foi retirada e submetida à maceração para a extração do óleo, usando o etanol como solvente. Esse óleo foi exposto a uma temperatura de 40°C para a evaporação do álcool e, a partir de

então, estocado no freezer, para as análises quantitativas, qualitativas e cromatográficas onde foram utilizados 10 uL do óleo comercial de Pequi e solubilizados em 10 mL de hexano. Uma alíquota de 1 uL esta solução foi inserida no cromatógrafo gasoso (coluna Optima-5) acoplado ao espectrômetro de massas, Perkin Elmer® Clarus S8, nas condições temperatura e injeção de 250°C; temperatura inicial 70°C; taxa de aquecimento 250°C; taxa do detector 7°C; tempo de corrida 250°C e gás de arraste, hélio (1mL/min).

3.3 Biometria

As fêmeas (12 meses) dos grupos experimentais foram pesadas e, posteriormente eutanasiadas de acordo com as normas do comitê de ética UFJ/Jataí (protocolo nº004/2018). Os ovários direito e esquerdo foram coletados e pesados. O peso relativo do ovário foi calculado a partir da razão entre o peso do ovário pela massa corporal do animal. Antes da eutanásia, foi verificado se todas as fêmeas estavam na primeira fase do ciclo estral, a proestro com base no esfregaço vaginal, com o intuito de reduzir várias irregularidades que podem ser encontradas nas fases tardio do ciclo (NISHINO; TOTSUKAWA, 1996). Os dados biométricos foram aferidos, analisados e discutidos.

3.4. Microtomia e Técnicas de Coloração

Os ovários das fêmeas dos grupos experimentais foram fixados em metacarn (na proporção 1: 3: 6, respectivamente, de solução de ácido acético, clorofórmio e metanol), submetidos às etapas do processamento histológico e incluídos em parafina. Posteriormente, as gônadas de cada animal (n = 5) foram seccionadas (5µm), utilizando-se micrótomo (Leica, semiautomático), os cortes seriados foram montados em lâmina de vidro e submetidas aos métodos de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômio de Gömöri e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (BEHMER et al., 1976), para as análises morfológicas, morfométrica e histológicas do tecido ovariano. As imagens foram capturadas em fotomicroscópio (Leica, DM750). As análises morfométricas da espessura do epitélio e da túnica albugínea foi realizada utilizando o Software Image-Pro Plus.

3.5. Análises morfológicas e morfométrica

Os cortes histológicos corados em HE tiveram os folículos ovarianos foram quantificados na área cortical de acordo com o estágio de maturação, podendo ser identificado como primordial, primário unilaminar, primário multilaminar, secundário (antral) e o maduro (de Graaf), usando os seguintes critérios os folículos primordiais continham o oócito e uma

camada de células pavimentosas, os primários unilaminar continham o oócito e uma única camada de células da granulosa cuboidais, primário multilaminar continham o oócito cercado por pelo menos duas camadas de células da granulosa e células da teca, folículos secundários continham oócito cercado por múltiplas camadas da células da granulosa com um espaço antral cheio de líquidos e células da teca. Para essas análises, segundo Shirota et al. (2015), foram considerados apenas os folículos que apresentaram os oócitos com núcleos evidentes. Ademais, também foram quantificados os números de corpos lúteos e de corpos atresícos, apartir das análises das lâminas corados em PAS (LUO et al., 2008). Nas colorações realizados em Tricrômio de Gömori foi para a estereologia da glândula intersticial e lipofucina. Todas essas análises foram realizadas em microscópio de luz (Leica) no aumento de 40x (20 cortes/animal, n=5 animais/grupo).

A glândula intersticial são células que podem ser encontradas isoladas ou em grupos no estroma cortical do tecido ovariano, sendo facilmente identificada, devido ao seu citoplasma claro e núcleo bem evidente, com intensa basofilia na coloração de HE.

A espessura do epitélio ovariano foi realizada a medição entre a região apical do epitélio e a membrana basal. A espessura da túnica albugínea foi feita a medição entre a extremidade do epitélio ovariano e a extremidade do tecido conjuntivo denso. Os campos de medição foram escolhidos de forma aleatória sendo 5 campos microscópicos (objetiva 40x) por animal totalizando 125 campos.

3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados biométricos e morfométricos da quantificação dos folículos, foram realizadas em planilhas e gráficos software GraphPad Prism 5.00. Primeiramente, os dados obtidos nesse estudo foram verificados quanto à normalidade, por meio do teste *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados que apresentaram distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste *Kruskal Wallis* e aqueles com distribuição paramétrica, à análise de variância (ANOVA), seguida pela comparação múltipla entre os grupos pelo teste *Tukey*. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) expressos em média e desvio padrão ($\pm$).

4. RESULTADOS

4.1 Exposição ao EE₂ e ao óleo de pequi não altera os parâmetros biométricos.

O peso corporal das fêmeas senis e seus respectivos grupos são apresentadas na fig. 9(A). O grupo EE, EE/Pe e Pe apresentaram peso similares comparado ao controle. Não foi observado diferenças significativas entre os grupos experimentais.

O peso dos ovários representada na figura 9(B), foi observado que o grupo Pe apresentou aumento no peso e os grupos Ve e EE foram os que apresentaram o menor peso, todos comparados ao grupo controle, entretanto não foram constatadas diferenças significativas. O grupo Pe exibiu o maior peso relativo e os grupos Ve e EE apresentaram um peso menor comparados com o controle, no entanto não foi encontrada diferenças significativas entre os grupos experimentais (Fig. 9C).

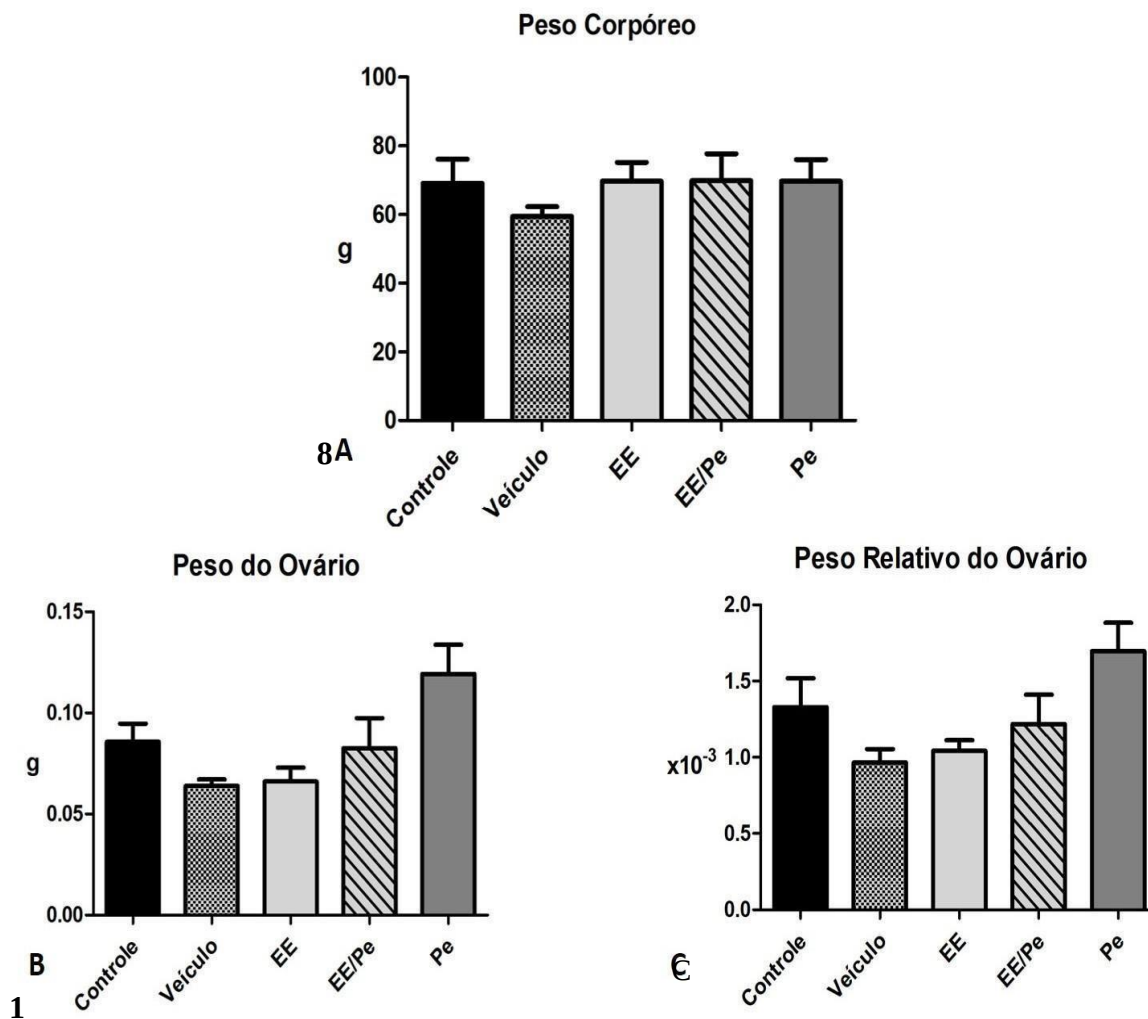


Figura 9. Dados biométricos das fêmeas de gerbilos senis dos grupos experimentais. A. Peso corpóreo dos animais. B. Peso absoluto (g) dos ovários. C. Peso relativo dos ovários ($\times 10^{-3}$), razão entre o peso absoluto dos ovários pelo peso corpóreo. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

4.2 Alteração na foliculogênese durante o envelhecimento no ovário de gerbilos expostos ao EE_2 e ao óleo de pequi no período pré-natal

Os dados da contagem dos folículos estão apresentados na Tabela 2. Em relação aos folículos primordiais, foi observado uma diminuição significativa entre todos os grupos experimentais comparados ao controle. Não houve diferença significativa na contagem dos folículos primários unilaminar entre os grupos experimentais (Fig. 10). Considerando a

contagem dos folículos primários multilaminar somente o grupo EE apresentou uma diferença significativa comparada com o controle.

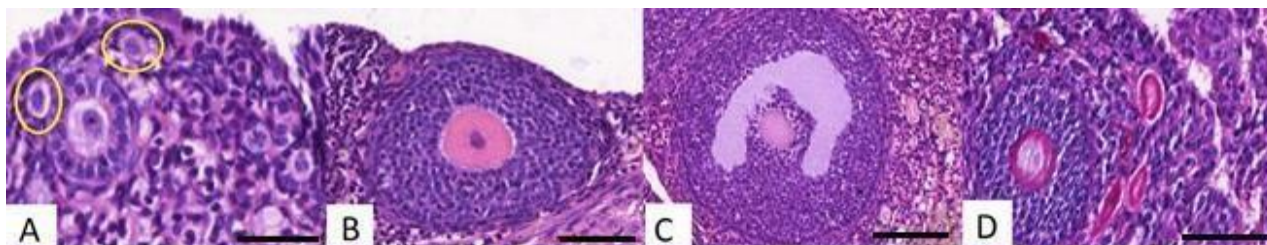
Em relação ao número de folículos secundários, o grupo EE/Pe apresentou um aumento significativo em relação aos grupos EE e Pe. No último estágio do desenvolvimento folicular, o folículo maduro (de Graaf), foi observado apenas no ovário do grupo Pe, mas não foi constatado diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 02. Quantificação (folículos totais por corte) dos tipos foliculares (nº de folículos), corpos lúteos e atresícos dos ovários de gerbilos senis dos grupos experimentais.

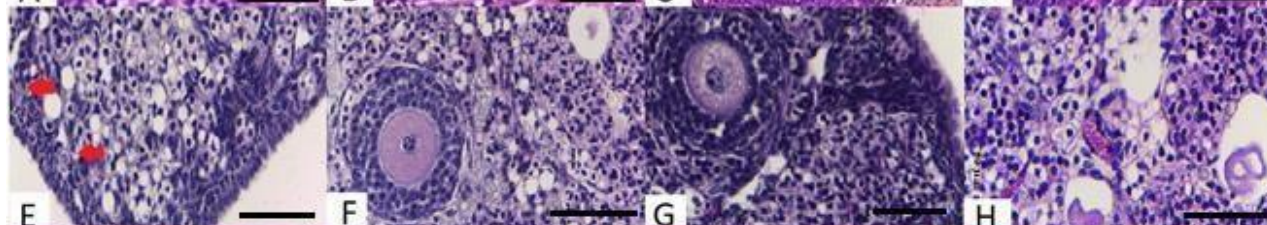
Parâmetros	Controle	Veículo	EE	EE/Pe	Pe
Folículo Primordial	36,44 ± 6,13 ^a	18,80 ± 3,96 ^{b,c}	24,73 ± 6,46 ^b	10,48 ± 6,88 ^{c,d}	9,84 ± 5,47 ^d
Folículo Primário Unilaminar	3,28 ± 1,67	2,20 ± 1,92	1,80 ± 1,75	2,00 ± 1,73	2,20 ± 2,34
Folículo Primário Multilaminar	1,04 ± 0,73 ^a	1,20 ± 0,45 ^a	0,48 ± 0,87 ^b	0,72 ± 0,54 ^{a,b}	1,04 ± 0,67 ^a
Folículo Secundário	0,20 ± 0,50 ^{a,b}	0,20 ± 0,50 ^{a,b}	0,12 ± 0,33 ^a	0,56 ± 0,65 ^b	0,12 ± 0,33 ^a
Folículo Maduro	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,02
Corpo Lúteo	1,80 ± 1,53 ^a	3,20 ± 1,09 ^{a,b}	1,60 ± 1,44 ^a	2,20 ± 1,66 ^{a,b}	3,36 ± 1,80 ^b
Corpo atresíco	3,40 ± 2,74 ^a	7,60 ± 1,81 ^{a,b,c}	8,08 ± 4,52 ^b	12,84 ± 4,83 ^c	12,92 ± 5,87 ^c

Os dados foram expressos em média ± desvio padrão (n=5). ^{a,b,c,d}Letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

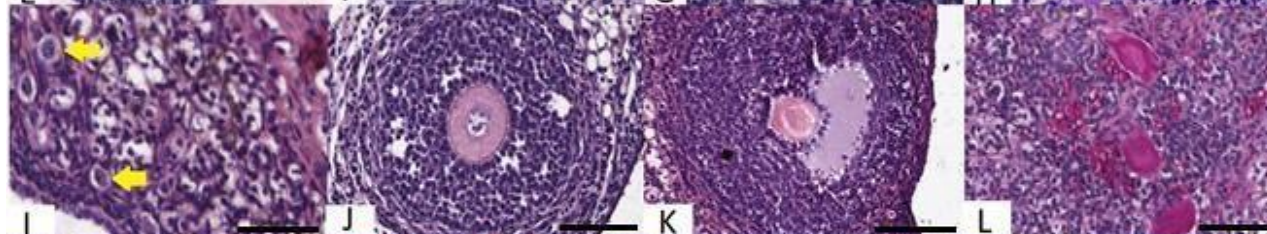
CON



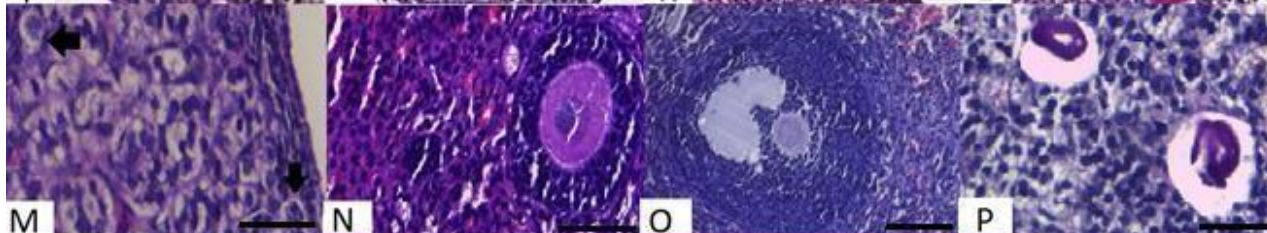
VE



EE



EE/PE



PE



Figura 10: Cortes histológicos de ovários de gerbilos corados em HE (A-G, I-K, M-O, Q- S) e PAS (D, H, L, P e T). As imagens evidenciam o aspecto folicular- Folículo primordial (círculo A, setas amarelas, vermelhas e pretas E, I, M e Q). Folículo primário multilaminar (B, F, G, J, N e R). Folículo secundário (C, K, O e S). Corpos atresicos (D, H, L, P e T). Barra 50µm.

4.3 Exposição pré-natal ao óleo de pequi aumenta o número de corpo lúteo no gerbilo senil.

Em relação ao desenvolvimento do corpo lúteo, observou-se um aumento significativo no grupo Pe, em número dessa estrutura no ovário de gerbilos senis expostas ao óleo de pequi durante o período pré-natal quando comparado ao grupo controle (Tabela 02).

4.4 Aumento de corpos atresícos no tecido ovariano de gerbilos senis expostos ao EE₂ e ao óleo de pequi durante o desenvolvimento.

A Tabela 2 apresenta a quantificação dos corpos atresícos do tecido ovariano dos grupos experimentais, sendo eles identificados na técnica de coloração de PAS (Fig. 10). Com base nesse dado, foi possível constatar o aumento estatisticamente significativo de corpos atresícos nos grupos EE, EE/Pe e Pe quando comparado ao grupo controle. Além do aumento nos grupos EE/Pe e Pe em relação aos animais expostos ao EE₂.

As células da glândula intersticial apresentaram citoplasma claro quando coradas em HE, PAS e TG (fig.13). Em todos os grupos as glândulas apresentaram um formato bem globular estando disposta uma sobre a outra, formando uma espécie de cordão. Nos grupos experimentais estas células estavam presentes abaixo do epitélio ovariano.

Todos os grupos experimentais apresentaram depósitos de lipofuscina na região citoplasmática das células intersticiais, conforme mostrado na fig. 13. O pigmento foi identificado pela coloração PAS e TG onde exibia uma coloração com um tom castanho.

4.5. Exposição ao EE₂ e ao óleo de pequi altera a altura do tecido epitelial ovariano.

A altura do tecido epitelial dos ovários dos grupos experimentais apresentou diferenças significativas. O epitélio germinativo dos ovários dos animais expostos ao EE apresentou uma diferença significativa quando comparada ao controle e demais grupos experimentais. Já os grupos tratados com EE/Pe e Pe não apresentaram diferenças significativas na altura epitelial quando comparado ao controle (Fig.11).

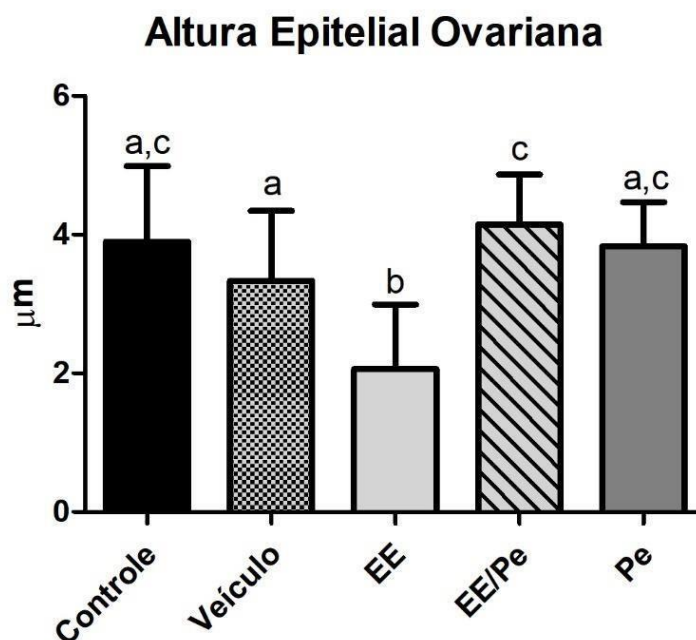


Fig. 11: Altura do epitélio do ovário dos gerbilos dos grupos experimentais. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=5). ^{a,b,c}Letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

4.6. O óleo de pequi promove aumento da túnica albugínea no ovário de gerbilos senis.

A análise da espessura da túnica albugínea do ovário do gerbilo dos grupos experimentais são mostrados na fig. 12. Foi observado uma diferença significativa na espessura da túnica somente no grupo Ve quando comparado ao controle, o grupo EE apresentaram uma espessura similar quando comparado com o Ve, no entanto não foi constatado uma diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

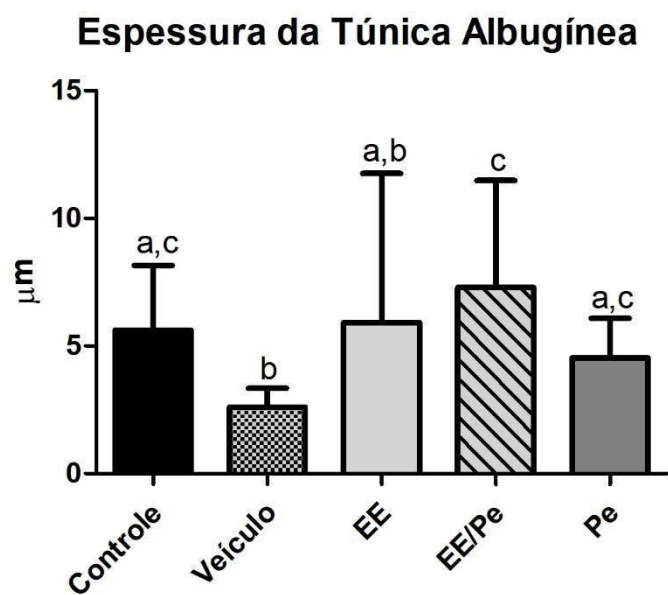


Fig. 12: Espessura da túnica albugínea do tecido ovariano do gerbilo. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). ^{a,b,c}Letras sobrescritas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p<0,05$).

CONTROLE

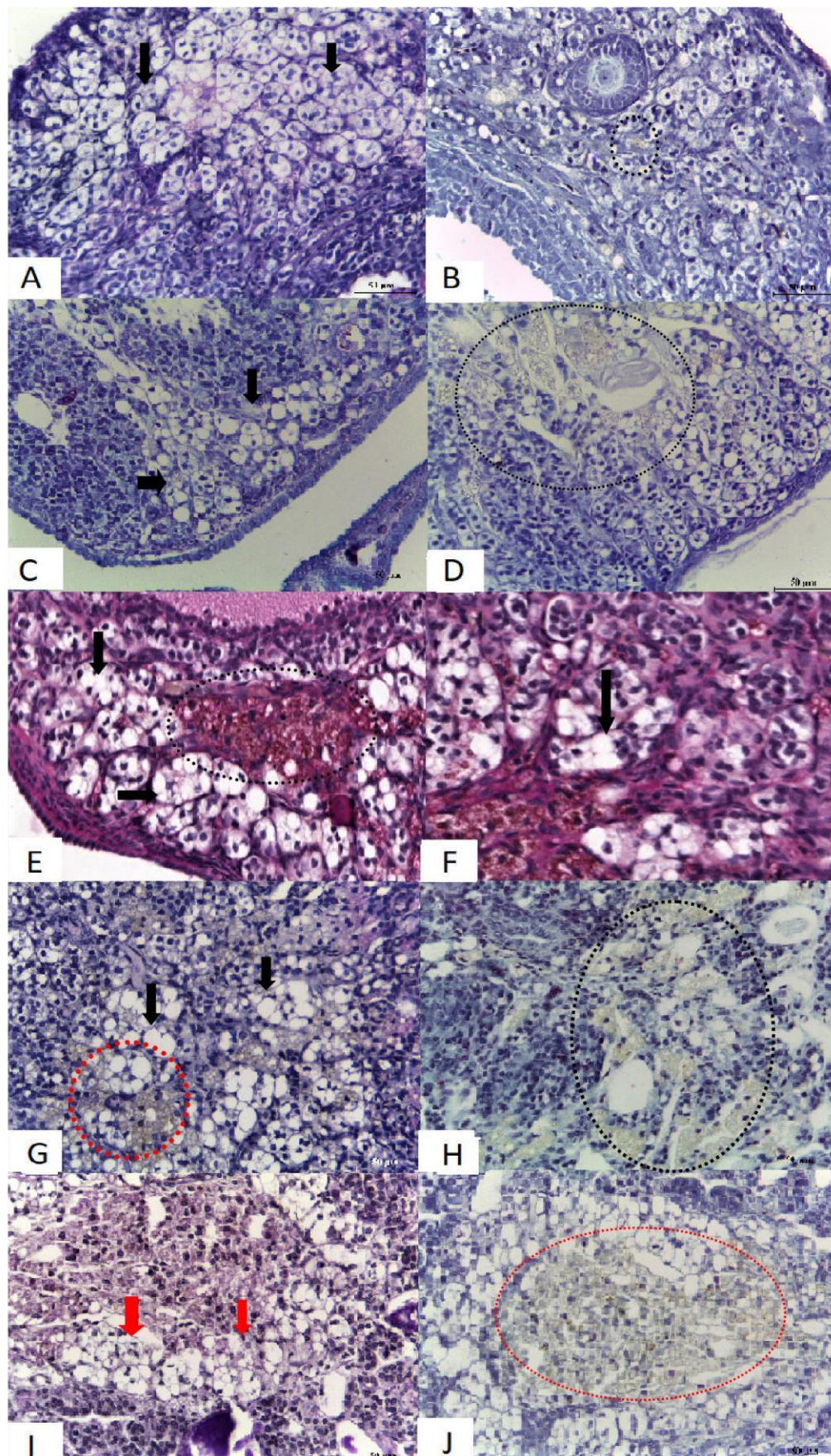


Figura 13: Cortes histológicos da glândula intersticial no ovário de gerbilos senis dos grupos experimentais. Glândula intersticial e lipofusцина corados em PAS (A, C, E, F, G e I) e Tricrômio de Gömöri (B, D, H e J). Nos cortes destacam-se a glândula intersticial com o citoplasma claro (setas). A lipofusцина apresenta reatividade nas colorações em PAS (círculo tracejado). Barra 50µm

5. DISCUSSÃO

O período pré-natal é um período crítico do desenvolvimento de várias glândulas que são ativadas e contribuem diretamente na fertilidade feminina. A exposição precoce a um desregulador endócrino como o EE₂ desencadeia várias alterações já descritas, como no ciclo estral e diretamente na regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, resultando na baixa produção da população folicular ovariana. Em contrapartida, o óleo de pequi se mostrou retardar algumas alterações morfológicas no tecido ovariano como na redução do epitélio desencadeadas pela exposição ao EE₂.

A exposição precoce ao EE₂, um estrógeno sintético, pode causar dimorfismo sexual como alterações irreversíveis nos órgãos reprodutivos (FRYE et al., 2012). Promove mudanças epigenéticas nas vias de sinalização (BREHM et al., 2018) e no receptor do hormônio luteinizante (NOZAWA et al., 2014).

Em contrapartida vários estudos relatam os benefícios do óleo do pequi a saúde associado ao seu uso. Mostram que este fitoquímico apresenta ação antioxidante, antifúngica, antibactericida e anticarcinogênica (ARMANDO-JUNIOR et al., 2019; SILVA et al., 2020). Traesel et al. (2017), descreve em seu trabalho que o óleo do pequi utilizado durante a gestação não causa alterações tanto para a progenitora quanto para a prole. O presente estudo revelou que a exposição ao EE₂ e ao óleo de pequi durante o período pré-natal não promoveu alteração na biometria do ovário do gerbilo na senescência.

Concordando com outros resultados já descritos por outros autores, onde não relataram alterações no peso dos ovários de gerbilos senis expostos ao EE₂ no período pré-natal (SOUZA et al., 2021). No presente estudo foi possível observar que os grupos tratados com Pe não apresentaram diferenças significativas na espessura do epitélio já os grupos tratados com EE apresentou uma redução na espessura do epitélio, no entanto os grupos que foram tratados com EE/Pe não apresentaram diferenças significativas comparadas ao controle nos revelando que o Pe está atuando com uma ação protetiva e retardando os efeitos que o EE causa no tecido epitelial ovariano.

A foliculogênese é marcada pela formação, desenvolvimento e maturação folicular ocorrendo uma relação entre as células da granulosa, teca e níveis hormonais (CUI et al., 2013). No presente estudo, os animais tratados receberam o mesmo estrógeno sintético utilizado pelas mulheres como método contraceptivo oral (REN et al., 2017).

O nosso estudo demonstra que a exposição ao desregulador endócrino e ao óleo de pequi promove alterações na população folicular ovariana. Notou-se que os grupos tratados deste trabalho tiveram uma redução em relação folículos ovarianos, principalmente em relação aos folículos primordiais. Esse dado também foi constatado em outros trabalhos que relatavam essa diminuição em relação aos folículos primordiais (ZHANG et al., 2016).

Souza et al. (2021) mostrou que baixas doses do EE₂ durante o período da puberdade causou uma diminuição no número de folículos ovarianos, especialmente nos folículos primordiais.

Por outro lado, os nossos dados mostraram que o número de folículos primários multilaminar apresentou-se reduzido nos grupos EE₂ e EE/Pe. Patel et al. (2017) descrevem em seu trabalho que baixas doses do EE₂ (0,5 µg/kg pc/d) expostos no período pré-natal resultou em um aumento na população folicular, principalmente em relação aos folículos primários. É provável que a diferença em nossos resultados em comparação ao Patel et al. (2017) decorrem das diferenças das doses de EE₂.

Em nosso estudo, foi constatado uma diminuição em relação ao folículo secundário, nos grupos que foram expostos ao EE₂ e nos grupos que foram expostos ao pequi, apresentaram aumento nos números de folículos. Assim sugere-se que, a exposição ao desregulador endócrino EE₂ no período pré-natal pode causar alterações na função ovariana e o óleo de pequi atua diminuindo essas alterações.

Estudos em ratas de Lombardi et al. (2012) sugerem que as células intersticiais podem se originar dos cistos ovarianos da síndrome do ovário policístico (SOP), em virtude da degeneração das células da granulosa e pela diferenciação das células da teca interna. Estudos mostram que altos níveis de estradiol pode atuar diretamente na morfologia do folículo, resultando em algumas alterações como a formação de cistos (ZHANG et al., 2017).

Nos estudos realizados por Talsness et al. (2015) e Delclos et al. (2014) relataram que a exposição ao EE₂ proporcionou a formação de cistos no tecido ovariano, no entanto em nosso estudo não foi constatado que o EE₂ provoca a formação de cistos semelhante aos descritos por Patel et al. (2017). Eventualmente essas dessemelhanças podem estar relacionadas as doses administradas ou as espécies de modelo experimental usadas.

A glândula intersticial são células que podem ser encontradas isoladas ou em grupos no estroma cortical do tecido ovariano, sendo facilmente identificada, devido ao seu citoplasma claro e núcleo bem evidente, com intensa basofilia. A glândula intersticial é constituída de células que se destacam da teca interna e ou mesmo dos corpos atresícos, sendo elas especializadas na produção de andrógenos (SOARES et al., 2003). Essas células podem ser encontradas de forma isolada ou em grupos no estroma cortical ovariano. Entretanto, com o envelhecimento a glândula aumenta de tamanho (DÍAZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). Neste estudo todos os grupos apresentaram a glândula intersticial em grupos com o formato de cordões com o citoplasma claro. Assim como os descritos por Souza et al. (2021).

A lipofuscina é um pigmento de composição que já foi oxidada rica em proteínas e lipídios. Esse pigmento diz muito sobre a idade celular, pois o mesmo serve de base para detecção do tempo de vida da célula (TERMAN; BRUNK, 2004). A lipofuscina pode ser facilmente visualizada em microscopia de fluorescência, em vários outros métodos histoquímicos (SALMONOWICZ e PASSOS, 2017), como na técnica de PAS realizada em nosso estudo, possível observar a presença de lipofuscina na região citoplasmática das células da glândula intersticial no tecido ovariano em todos os grupos experimentais. Sousa et al. (2021) sugere que os depósitos aumentados de lipofuscina esteja associado a exposição ao EE podendo desencadear a disfunção ovariana e até no desenvolvimento de patologias. Nosso estudo não quantificamos a quantidade desta substância. Outros estudos devem ser desenvolvidos para desvendar se o EE está impondo essas alterações e se o Pe esteja atuando de forma benéfica diante desta situação.

Nos ovários das fêmeas expostas ao EE/Pe foi observado um aparente aumento na vascularização folicular, algumas destas substancias talvez estejam influenciando e estimulado o aumento e a permeabilidade vascular conhecida como angiogênese. A angiogênese é caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos oriundos de uma teia de vasos já existentes (DE PALMA et al., 2017). Esta formação e recrutamento de novos vasos pode estar relacionado a algum desenvolvimento de uma patologia.

O VEGF é uma glicoproteína que inclui os fatores de crescimento placentário como o VEGF-A. O VEGF no folículo é responsável por desenvolver um efeito mitótico nas células da granulosa, resultando assim no crescimento folicular (OTANI et al., 1999). O estudo de Quintana et al. (2004) com ratas demonstrou que o VEGF está diretamente relacionado com o crescimento vascular, promovendo o desenvolvimento folicular e reduz a apoptose no folículo ovariano. Vários trabalhos retratam que o VEGF-A desempenha um papel importante na angiogênese e atua como uma proteção contra a apoptose celular (FERRARA et al., 1997;

BARBONI et al., 2000; ABRAMOVICH et al., 2006; VALIATTI et al., 2011). No entanto, novos estudos devem ser desenvolvidos para melhor esclarecer esta alteração encontrada.

O processo de desenvolvimento folicular carece de um certo equilíbrio entre os hormônios LH, FSH, fatores de crescimento e entre outras enzimas associados a esteroidogênese. Qualquer alteração associada a esses agentes poderá acarretar em algumas consequências negativas nos eventos da foliculogênese ovariana. Com isso, vários estudos já mencionam algumas alterações impostas pelo EE₂ sendo uma delas no gene receptor do hormônio luteinizante (NOZAWA et al., 2014). O óleo de pequi como já descrito possui um alto potencial antioxidante podendo atuar positivamente no envelhecimento (ROLL et al., 2018). No nosso presente estudo podemos concluir que o pequi atua de forma protetiva no tecido ovariano quando exposto a um desregulador endócrino como EE, em relação a aptidão dos folículos, espessura do epitélio e túnica albugínea.

Com isso necessita-se de estudos mais aprofundado a nível celular para explicar e entender quais são os efeitos do óleo do pequi sobre o tecido ovariano, e se a sua composição vai continuar atuando na diminuição dos danos causados pelo EE₂ durante o envelhecimento.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo revelou que exposição durante o período pré-natal ao desregulador endócrino de ação estrogênica causa alterações na morfologia e função ovariana. E que essa exposição quando combinado com o fitoquímico, como o óleo do pequi, o mesmo pode desempenhar uma ação benéfica no tecido ovariano, amenizando as alterações promovidas pelo etinilestradiol. No entanto, a exposição combinada causou aumento nos corpos atresícos e corpo lúteo.

Nossos resultados reforçam a necessidade de estudar a exposição ao etinilestradiol combinado com outros fitoquímico do cerrado durante diferentes estágios do

desenvolvimento, visando as alterações patológicas no ovário, assim como a realização de outras técnicas para o melhor entendimento desses dados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVICH, D.; PARBORELL, F.; TESONE, M. Efeito de um tratamento inibitório do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na foliculogênese e apoptose ovariana em ratos pré-púberes tratados com gonadotrofina. *Biologia da Reprodução*. 75, 434-441. 2006. doi:10.1095/biolreprod.106.051052.

ALMEIDA, A.P. F.; ASSIS, M. M. Efeitos colaterais e alterações fisiológicas relacionadas ao uso contínuo de anticoncepcionais. *Rev. Eletrôn. Atualiza Saúde*. Salvador, v. 5, n. 5, p. 85-93, jan./jun. 2017.

ALVES, A. M.; FERNANDES, D. C.; SOUSA, A. G. O.; NAVES, M. M. V. Caracterização física e química de frutos do pequizeiro oriondos de três estados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 2012.

DE ASSIS, S.; WARRI, A.; CRUZ, M. I.; LAJA, O.; TIAN, Y.; ZHANG, B. et al. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. *Nat Commun.* v.3, p. 1053. 2012.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Ocorrence of 17 α - ethynylestradiol (EE₂) in the environment and effect on exposed biota. *Environment International.* v. 69, p. 104-119. 2014.

ARMANDO, J.; LEITÃO, M. M.; BERNAL, L. P. T., DOS SANTOS, E et al. Analgesic and anti-Inflammatory effects of caryocar brasiliense: Antiinflam antiallergy agents. *Medicine Chemistry.* v.19, n.2. 2019.

ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; MARINO, M. Relação estrutura-função do receptor de estrogênio alfa e beta: Impacto na saúde humana. *Mol. Aspects Med.* v. 27, p. 299-402. 2006.

AUBUCHON, M.; BURNEY, R. O.; SCHUST, D. J.; YAO, M. W. Infertilidade e tecnologia de reprodução assistida. In: Berek JS, Berek DL, editores. *Ginecologia de Berek e Novak.* 15^a ed. Nova Deli: Wolters Kluwer India Pvt Ltd. p. 1133–188. 2012.

BAPTISTA, A.; GONÇALVES, R. V.; BRESSAN, J.; PELÚZIO, M. C. G. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale*), cajui (*Anacardium microcarpum*), and pequi (*Caryocar brasiliense*). A systematic review. *Oxidative Medicine Cellular Longevity.* p. 1-13, 2018.

BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; MATTIOLI, M. Produção de fator de crescimento endotelial vascular em crescimento antral de porco folículos. *Biol Reprod.* v. 63, p. 858-864. 2000.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no context de processos inflamatórios relacionados á obsidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo, v. 53, n. 5, p.646-656, 2009.

BEHMER, A. O.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. Manual de práticas para histologia normal e patológica. Edart-Edusp, São Paulo, p. 329, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Cadernos da juventude, saúde e desenvolvimento. *Contracepção na adolescência.* Centro de documentação do Ministério da Saúde, Brasília, p.61, 2002.

BREDA, C. A.; GASPERINI, A. M.; GARCIA, V. L. Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of brazilian savanna plants aiming its use as safe fungicides. *Natural Products and Bioprospecting.* v. 6, n. 4, p. 195– 204, 2016.

BRITO, M. B.; NOBRE, F.; VIEIRA, C. S. Contracepção hormonal e sistema cardiovascular. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, Ribeirão Preto, v.96, n. 4, p. 81-89, abr., 2009.

BROEKMANS, F. J.; FADDY, M. J.; SCHEFFER, G. VELDE, E. R. As contagens de folículos antrais estão relacionadas à idade na perda natural da fertilidade e à idade na menopausa. *Menopausa*. v. 11, p 607–14. 2004.

CAMPOS, S. G; GONÇALVES, B. F; SCARANO, W.R; CORRADI, L.S; SANTOS, F. C; CUSTODIO, A. M; VILAMAIOR, P. S; GÓES, R. M; TABOGA, S. R;. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. *International Journal Experimental Pathology*. v. 91, n.5, p :394-407. 2010.

CHAKRAVARTHI, V. P.; KON, S.S.R.; SIVA KUMAR, A.V.N.; BHASKAR, M.; RAO, V.H. Quantitative expression of antiapoptotic and proapoptotic genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. *Theriogenology*. v. 83, n. 4, p. 590–595, 2015.

CHEAL, M. The gerbil: A unique model for research on aging. *Experimental Aging Research*. v. 12, n. 1, p. 3-21, 1986.

CLOUZOT, L; MARROT, B; DOUMENQ, P; ROCHE, N. 17 α - Ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. *Environmental Progress*. v. 27, n. 3, p. 383-386. 2008.

COELINGH, B. H. J.T.; VERHOEVEN, C.; ZIMMERMAN, Y.; VISSER, M.; FOIDART, J. M.; GEMZELL-DANIELSSON, K. Efeitos farmacodinâmicos do estetrol de estrogênio fetal em mulheres na pós-menopausa: resultados de um estudo de dose múltipla crescente. *Menopausa*. v. 24 - Edição 6 – p. 677-685, 2017. Doi: 10.1097 / GME.0000000000000823

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med*. v.19, n.3, p. 197-209. 2013. Doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.007

DAI, R.; Lu, R.; Ahmed, S.A. The upregulation of genomic imprinted DLK1-Dio3 miRNAs in murine lupus is associated with global DNA hypomethylation. *PLoS One*. v.11, n. 4, 2016.

DE ASSIS, S.; WARRI, A.; CRUZ, M. I.; LAJA, O.; TIAN, Y.; ZHANG, B. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. *Nat Commun*. v. 13, p. 1053, 2012.

DE LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MAMCINIFILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (Caryocar brasiliense.). *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal - SP*, v. 29, n. 3, p. 695-698. 2007.

DELCLOS, K. B.; CAMACHO, L.; LEWIS, S. M.; VANLANDINGHAM, M. M.; LATENDRESSE, J. R.; OLSON, G. R.; DAVIS, K. J.; PATTON, R. E.; GAMBOA, C. G.; WOODLING, K. A.; BRYANT, M. S.; CHIDAMBARAM, M.; TROBOJEVICH, R.; JULIAR, B. E.; FELTON, R. P.; THORN, B. T. Toxicity evaluation of bisphenol A administered by gavage to Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90. *Toxicol Sci*. 2014;**139**(1):174–197.

DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T.V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2017;**17**(8):457–474. doi: 10.1038/nrc.2017.51

DÍAZ-HERNÁNDEZ, V.; CALDELAS, I.; MONTANO, L. M.; MERCHANT-LARIOS, H. Rearranjo morfológico da região cortical, no envelhecimento dos ovários. *Histol Histopathol.* v.34, n.7, p. 775–789, 2019. Doi: [10.14670 / HH-18-078](https://doi.org/10.14670/HH-18-078)

DRAGIN, N.; BISMUTH, J.; CIZERON-CLAIRAC, G.; BIFERI, M.G.; BERTHAULT, C.; SERRAF, A.; NOTTIN, R.; KLATZMANN, D.; CUMANO, A.; BARKATS, M.; LE PANSE, R.; BERRIH-AKMKIN, S. Estrogen-mediated downregulation of *aire* influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *Journal Clinical Investigation.* v. 126, n.4, p. 1525–1537, 2016.

DRUMMOND, A. E.; FULLER, P. J. The importance of ER β signalling in the ovary. *Journal of Endocrinology.* v. 205, n. 1, p. 15-23, 2010.

DUMESIC, D. A. et al. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic Ovary Syndrome. *Endocrine Reviews.* v. 36, n. 5, p. 487–525, Oct. 2015.

EMANUELE, M. A.; WEZEMAN, F.; EMANUELE, N. V. Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Res Health.* v.26, n. 4, p. 274-81. 2002.

FACINA, C. H. Associação entre a curcumina e o bisfenol A e seus efeitos sobre microambiente prostático do gerbilo da Mongólia. 2019. Tese de doutorado. Unesp- São Jose do Rio Preto, 2019.

FEBRASGO. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. n.4, p. 103, São Paulo, 2018.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FIGUEIREDO, J. R.; MOIFOPA, G.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.303-327.

FILIPA et al. Contextualizando a elevada prevalência de anemia na população portuguesa: percepção, caracterização e preditores: um sub-estudo do empire. *Medicina Interna [online].* v.23, n.4, p. 26-38. ISSN 0872-671X, 2017.

FOWLER, P. A.; BELLINGHAM, M.; SINCLAIR, K. D. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Mol Cell Endocrinol.* v. 355, n. 2, p. 231–239. 2012. Doi: [10.1016/j.mce.2011.10.021](https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.021)

FRYE, C. A. et al. Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol.* v. 24, n. 1, p. 144– 159, 2012. Doi: [10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x)

HWANG, W. J.; LEE, T. Y.; KIM, N. S.; KWON, J. S. O papel dos receptores de estrogênio e sua sinalização nos transtornos psiquiátricos. *Jornal internacional de ciências moleculares.* V.22, n. 1, p. 373, 2020. Doi: [10.3390/ijms22010373](https://doi.org/10.3390/ijms22010373)

GHISELLI, G; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. Química. Nova. v. 30, n. 3, p. 695-706. 2007.

GONZÁLEZ, F. H. D. Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. 2002. www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrad/.

GUEDES, A. M. M.; ANTONIASSI, R.; FARIA-MACHADO, A. F. Pequi: a brazilian fruit with potential uses for the fat industry. Oilseeds & Fats Crops and Lipids. v. 24, p. 01-04, 2017.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. ed. 12. Rio de janeiro. Guanabara Koogan, 2011. p. 1216

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. Histologia básica. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, ed.12 p.538, 2013.

KETHA, H.; GIRTMAN, A.; SINGH, R. J. Estradiol assays - The path ahead. Steroids, v. 99, n. Part A, p. 39–44, 2015. Doi: 10.1016/j.steroids.2014.08.009.

LAMAS-TORANZO, I.; FONSECA BALVÍS, N.; QUEREJETA-FERNÁNDEZ, A.; IZQUIERDO-RICO, M. J.; GONZÁLEZ-BRUSI, L.; LORENZO, P. L.; GARCÍAREBOLLAR, P.; AVILÉS, M.; BERMEJO-ÁLVAREZ, P. ZP4 confers structural properties to the zona pellucida essential for embryo development. Elife. 2019. doi: 10.7554/eLife.48904.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.35, n.4, p.472-482, out./dez. 2011. Disponível em www.cbpa.org.br

LOMBARDI, L. A.; SIMÕES, R. S.; MAGANHIN, C. C.; DA SILVA, C. F.; MACIEL, G. A.; BARACAT, E. C. Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study. Rev. Bras. Ginecol Obstet. v. 34, n. 7, p. 323-8, 2012. Doi:0.1590/S010072032012000700006.

IORGA, A.; CUNNINGHAM, C. M.; MOAZENI, S.; RUFFENACH, G.; UMAR, S.; EGHBALI, M. O papel protetor do estrogênio e dos receptores de estrogênio nas doenças cardiovasculares e o uso controverso da terapia com estrogênio. Biologia das diferenças sexuais. V.8, n. 1, p. 33, 2017. Doi:10.1186/s13293-017-0152-8.

LOVICK, T. D. Sex determinants of experimental panic attacks. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. v. 46, n. 3, p. 465-471, 2014.

LUO, L. L.; HUANG, J; FU, Y. C.; XU, J. J. et al. Effects of Tea Polyphenols on Ovarian Development in Rats. Journal Endocrinological Investigation. v. 31, n. 12, p. 1110-8, 2008. LV, X. H.; SHI, D. Z. Variations of serum estradiol and progesterone levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Experience Animal Beijing. v. 59, n. 2, p. 231-237, 2010.

MAGGI, R. The Hypothalamus-Pituitary-Ovary Axis. Springer Nature Switzerland AG. 2020.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; NATURIL-ALFONSO, C.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; LAVARA, R.; VICENTE, J. S. Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth. *Animal Reproduction Science*. v. 132, n. 1-2, p. 96–100, 2012.

Doi:10.1016/j.anireprosci.2012.04.

MARQUES, P.A.; KUROVANAGI, F.L.; FOSS, M. S.; DOBRE, N. R.; SOUZA, D. N.; LIMA, E. Principais Fatores da Baixa Adesão ao Uso do Ácido Fólico. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. v. 16, n. 2, p. 141-148, 2017.

MEDEIROS, S. F.; MEDEIROS, M. M. W. Y. Modificações dos níveis de gonadotrofinas durante a vida reprodutiva. *Revista Brasileira Ginecologia Obstetrícia*. Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, 2007.

MIGUEL, M. P. Ação do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. 2011. (Tese de Doutorado). Goiânia- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2011.

MIZRACHI, D.; AUCHUS, R. J. Androgens, estrogens and hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*. v. 301, p. 37-42, 2009.

MOROS-NICOLÁS, C.; LEZA, A.; CHEVRET, P.; GUILLÉN-MARTÍNEZ, A.; GONZÁLEZ-BRUSI, L.; BOUÉ, F.; LOPEZ-BEJAR, M.; BALLESTA, J.; AVILÉS, M.; IZQUIERDO-RICO, M. J. A análise do gene ZP1 revela diferenças na composição da zona pelúcida em carnívoros. *Reprodução, fertilidade e desenvolvimento*. v. 30, p. 272–285, 2018. Doi: 10.1071 / RD17022

NASCIMENTO-SILVA, N. R. R.; NAVES, M. M. V. Potential of Whole Pequi (*Caryocar Spp.*) Fruit-Pulp, Almond, Oil, and Shell-as a Medicinal Food. *Journal Medicinal Food*. v. 22, n. 9, p. 952-962, 2019.

NISHINO, N.; TOTSUKAWA, K. Study on the estrous cycle in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Experimental Animals*. v. 45, p. 283-288, 1996.

NÓBREGA, R. L. B. et al. Impacts of land-use and land-cover change on stream hydrochemistry in the Cerrado and Amazon biomes. *Science of The Total Environment*. v. 635, p. 259-274, 2018.

NOZAWA, K.; NAGAOKA, K.; ZHANG, H.; USUDA, K. Exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats. *Reproductive Toxicology*. v. 46, p. 77-84, 2014.

OTANI, N.; MINAMI, S.; YAMOTO, M.; SHIKONE, T.; OTANI, H.; NISHIYAMA, R.; OTANI, T.; NAKANO, R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in the human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. v. 84, p. 3845-3851, 1999.

PAN, Z.; ZHANG J.; LI, Q.; LI, Y.; SHI, F.; XIE, Z.; LIU, H. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *J Genet Genomics*. v. 39, n. 3, p. 111-23, 2012.

PATEL, S.; BREHM, E.; GAO, L.; RATTAN, S.; ZIV-GAL, A.; FLAWS, J. A. Bisphenol A exposure, ovarian follicle numbers, and female sex steroid hormone levels: results from a CLARITY-BPA study. *Endocrinology*. v. 158, n. 6, p. 1727–1738, 2017. Doi: 10.1210/em.2016-1887.

PEARCE, S. T.; JORDAN, V. C. O papel biológico dos receptores de estrogênio alfa e beta no câncer. *Crit Rev Oncol Hematol*. v. 50, p. 3-22, 2004.

PEREZ, A. P. S.; BIANCARDI, M. F.; CAIRES, C. R. S.; et al. Prenatal exposure to ethinylestradiol alters the morphologic patterns and increases the predisposition for prostatic lesions in male and female gerbils during ageing. *International Journal of Experimental Pathology*. v. 97, n. 1, p. 5–17, 2016.

PINTO, M. E; BOTTA, L. S; TABOGA, S. R; GÓES, R. M;. Neonatal gonocyte differentiation in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of transitional cell stage. *Anat Rec (Hoboken)*. v. 293, p. 310-419. 2010.

POCAR, P. et al. Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction*. v. 129, n. 4, p. 379-389, 2005. ISSN 1470-1626.

QUINTANA, R.; KOPCOW, L.; SUELDO, C.; MARCONI, G.; RUEDA ,N. G.; BARANAO, R. I. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril*. v. 82, n. 3, p.1101-1115, 2004.

RANGEL, L.; PORTA, L. R.; MEDRANO, J. H. H. Ciclo estral. *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. Cidade do México: FMVZ-UNAM, 2018.

REN, D.; HUANG, B.; YANG, B. Mitigating 17A-ethinylestradiol water contamination through binding and photosensitization by dissolved humic substances. *Journal of Hazardous Materials*. v. 327, p. 197–205, 2017.

RODRIGUES, C. M. Efeitos da restrição calórica intensa deste o nascimento sobre a função e estado redox do coração de ratas Wistar ovariectomizadas como modelo experimental de menopausa. 2019. p. 65. Dissertação (Mestrado)- Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

ROLL, M. M.; MIRANDA-VILELA, A. L.; LONGO, J. P. F. The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense*) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. *Genetics and Molecular Biology*. v. 41, n. 4, p. 858–869, 2018.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Ross Histologia: Texto e Atlas. Em correlação com Biologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. p. 1000.

RUGH, R. Reproduction and development. Minnecapolis: Burgueses publishing Company, 1968. p. 430.

SALMONOWICZ, H.; PASSOS, J. F. Detectando senescência: um novo método para um pigmento antigo. *Célula de envelhecimento*. v. 16, n. 3, p. 432-434, 2017. Doi: 10.1111 / acel.12580

SANCHES, B. D. et al. Budding process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in Mongolian gerbil. *Microsc Res Tech*. v. 77, n. 6, p. 458-66, 2014.

SANTOS, F. C. et al., Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell*. v. 35, p. 447-457, 2003.

SCHWINDT, M; WINKELMAM, D. L; KETELES, K et al. Environmental oestrogen disrupts fish population dynamics through direct and transgenerational effects on survival and fecundity. *Journal Applied Ecology*. v. 51, p. 582-591, 2014.

SHIROTA, M.; KAWASHIMA, J.; NAKAMURA, T.; KAMIIE et al. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Journal Toxicological Sciences*. v. 40, n. 6, p. 727-738, 2015.

SILVA, C. L.; PERDOMO, F. Algunos aspectos anatomicos e histologicos del sistema genital femenino del chiguire (*Hidrochoerus hidrochaeris*). *Revista da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Central da Venezuela*. v. 30, n. 1/8, p. 89-97, 1983.

SILVA, J. P. A.; RAMOS, J.G.; CAMPOS, M.S. Bisphenol-S promotes endocrine-disrupting effects similar to those promoted by bisphenol-A in the prostate of adult gerbils. *Reproductive Toxicology*. v. 85, p. 83-92, 2019.

SOARES, J. M. Jr.; SIMÕES, M. J.; OSHIMA, C. T.; MORA, O. A.; DE LIMA, G. R. BARACAT, E. C. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. *Gynecol Endocrinol*. v. 17, n. 2, p. 115-23, 2003.

SOUZA, V.G.; BANDEIRA, L. B.; SOUZA, N. C. S.; TABOCA, S.R.; MARTINS, T. M. M.; Perez, A. P. S. Prenatal and pubertal exposure to 17 α -ethynylestradiol disrupts folliculogenesis and promotes morphophysiological changes in ovaries of old gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2021. doi: 10.1017/S2040174421000040.

STOCCO, C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*. v.73, p. 473-487, 2008.

TALSNESS, C.; GROTE, K.; KURIYAMA, S.; PRESIBELLA, K.; STERNER-KOCK, A.; POCA, K.; CHAHOUD, I. Prenatal exposure to the phytoestrogen daidzein resulted in persistent changes in ovarian surface epithelial cell height, folliculogenesis, and estrus phase

- length in adult Sprague-Dawley rat offspring. *J Toxicol Environ Health A*. 2015; 78 (10): 635–644.
- TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Lipofuscin . *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 36, p. 1400-1404, 2004.
- THAYER, K. A. et al. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 α -ethinyl oestradiol. *Human Reproduction*. v. 16, n. 5, p. 988-996. 2001.
- TORRES, N. H.; AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; AMÉRICO, J. H. P; MACHADO, A. M.; CALVALCANTE, E. B.; TORNISIELO, V. L. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. *Environ. Monit. Assess.* vol. 187, n. 379, p.213, 2015.
- TORRES, L. R. O. et al. Bioactive compounds and functional potential of pequi (*Caryocar* spp.), a native Brazilian fruit: a review. *Grasas y Aceites*. v. 69, p. 1-16, 2018.
- TRAESEL, G. K. et al. Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. *Journal of Medicinal Food*. v. 20, n. 8, p. 804–811, 2017. Doi:10.1089/jmf.2017.0021
- UCHIMURA, N. S. et al. Influência do uso de anticoncepcionais hormonais orais sobre o número de células de langerhans em mulheres com captura híbrida negativa para papilomavírus. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. São Paulo, v. 27, n. 12, p. 726-730, 2005.
- VALE, A. F.; FERREIRA, H. H.; BENETTIA, E. J.; REBELO, A. C. S. et al. Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. *Brazilian Journal of Biology*. v. 79, n.2, p. 257-262, 2019.
- VALIATTI, F. B.; DAISY, C.; BENFICA, C.; VALIATTI, B. B.; KRAMER, C. K.; CANANI, L. H. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy. *Arq Bras Endocrinol Metab*. v. 55, p. 2, 2011.
- WASSARMAN, P. M. Zona Pellucida Glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. v. 283, n. 36, p. 24285–24289, 2008. Doi: 10.1074 / jbc.r800027200. 2008
- ZHANG, H. et al. Estrogenic compounds impair primordial follicle formation by inhibiting the expression of proapoptotic Hrk in neonatal rat ovary. *Biology Reproduction*. v. 95, n. 4, p. 78, 2016.
- ZHANG, H.; KAZUYOSHI, T.; NAGAOKA, K.; YOSHIDA, M.; WATANABE, G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol (EE) disrupts follicle development and reproductive hormone profiles in female rats. *Toxicology Letters*. v. 276, n. 5, p. 92-99, 2017. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.014

