



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RAISSA SOUZA LIMA BRUNO SILVEIRA

**IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA A UMA MISTURA
AMBIENTALMENTE RELEVANTE DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO
TESTÍCULO DE RATOS**

Presidente Prudente - SP
2025



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RAISSA SOUZA LIMA BRUNO SILVEIRA

**IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA A UMA MISTURA
AMBIENTALMENTE RELEVANTE DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO
TESTÍCULO DE RATOS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador:
Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Presidente Prudente - SP
2025

Catálogo Internacional de Publicação (CPI)

616.852 7 Silveira, Raissa Souza Lima Bruno
S587i Impactos da exposição prolongada a uma
mistura ambientalmente relevante de desreguladores
endócrinos no testículo de ratos \ Raissa Souza Lima
Bruno Silveira ; orientador Leonardo de Oliveira
Mendes. — Presidente Prudente, 2025.
47 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2025.
Bibliografia.

1. Desreguladores Endócrinos. 2. Exposição
Ambiental. 3. Testículo. 4. Ratos. I. Mendes,
Leonardo de, orient. II. Título.

Bibliotecária: Jakeline Margaret de Queiroz Ortega – CRB 8/6246

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA A UMA MISTURA AMBIENTALMENTE RELEVANTE DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO TESTÍCULO DE RATOS”.

AUTOR/A: RAISSA SOUZA LIMA BRUNO SILVEIRA

ORIENTADOR/A: Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Aprovado/a como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE/A em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Área de Concentração CIÊNCIAS DA SAÚDE, pela Comissão Examinadora:

Leonardo de Oliveira Mendes - Unoeste/Universidade do Oeste Paulista (orientador)

Lizziane Kretli Wilkelstroter Eller - Unoeste/Universidade do Oeste Paulista

Ana Beatriz Ratto Gorzoni – ETEC Tupã Prof. Massuyuki Kawano

Local e data da realização: Presidente Prudente, 12 de dezembro de 2025.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 19/12/2025 11:48
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 3
Solicitante: LUCIANA APARECIDA POLIDO BRAMBILLA (#6370566)

Signatários do documento

LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (PROFESSOR)

leonardo@unoeste.br
Recebido em 19/12/2025 11:48
Assinado em 19/12/2025 11:49
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.33.2
ID da assinatura: 6070751

LIZZIANE KRETLI WINKELSTROTTER ELLER (PROFESSOR)

lizziane@unoeste.br
Recebido em 19/12/2025 11:48
Assinado em 19/12/2025 12:01
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 2804:214:82de:d7ae:cca2:5567:b8b7:20aa
ID da assinatura: 6070752

ANA BEATRIZ RATTO GORZONI (SIGNATÁRIO EXTERNO)

anabeatrizgorzoni@gmail.com
Recebido em 19/12/2025 11:48
Assinado em 19/12/2025 12:09
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 45.70.86.74
ID da assinatura: 6070753

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/e6a7ab08>

Assinatura digital do documento: 69f28d19a9346d5726f626c96ea4919f43ee1a7a227d443104d35103c4a28e08

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela EPEC - Empresa Prudentina de Educação e Cultura SA

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pilares que sustentaram cada passo desta caminhada.

A Deus, em primeiro lugar, minha fonte inesgotável de força, sabedoria e proteção. Foi Ele quem iluminou meu caminho nos dias difíceis, renovou minha coragem e guiou meu coração para que eu chegasse até aqui. A Ele, toda honra e toda glória.

Ao meu pai, Edimilson, que não mediu esforços para que eu estudasse e chegasse onde estou hoje. Meu exemplo de integridade, coragem e perseverança, que me ensinou o valor dos sonhos construídos com esforço, honestidade e propósito. Sou eternamente grata por tudo o que fez por mim.

À minha mãe, Ivânia, sem quem eu nada seria. Mulher guerreira, minha força e meu equilíbrio, cujo amor, dedicação e coragem sustentam minha vida e minhas conquistas. É no carinho e na fé dela que encontro acolhimento, direção e inspiração todos os dias.

À minha irmã, Rafaella, minha melhor amiga e minha alma gêmea. Agradeço por sua presença constante, por nossa cumplicidade e pela conexão única e profunda que sempre dividimos. Sua amizade e apoio foram essenciais para que eu me mantivesse firme nesta jornada.

Ao meu marido, Danilo, meu companheiro de vida, meu amor e minha paz. Você é maravilhoso, e eu casaria com você todos os dias. Obrigada pela paciência, compreensão, incentivo e pela presença amorosa que tornou cada etapa deste mestrado mais leve e possível. Ter você ao meu lado é um presente diário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente ao meu orientador, Prof. Leonardo, pela orientação dedicada, competente e generosa. Sua confiança, disponibilidade e sabedoria acadêmica foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa e para meu crescimento como profissional e pesquisadora.

À Universidade do Oeste Paulista — UNOESTE, que me formou médica e agora me permite concluir meu mestrado, deixo meu respeito e gratidão. É uma honra construir minha trajetória em uma instituição que valoriza o conhecimento, a ética e o compromisso com a ciência.

À banca examinadora, agradeço pelo tempo dedicado, pela atenção e pelas contribuições valiosas que enriqueceram este trabalho e ampliaram minha visão científica.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta conquista — com palavras, gestos de apoio, incentivo ou confiança — deixo meu mais sincero agradecimento. Cada um de vocês compõe esta vitória.

Este mestrado é fruto de esforço, fé e amor. Compartilho esta conquista com todos vocês.

“Não devemos chamar o povo à escola para receber instruções, postulados, receitas, ameaças, repreensões e punições, mas para participar coletivamente da construção de um saber, que vai além do saber de pura experiência feita, que leve em conta as suas necessidades e o torne instrumento de luta, possibilitando-lhe ser sujeito de sua própria história”. (Paulo Freire)

RESUMO

Impactos da exposição prolongada a uma mistura ambientalmente relevante de desreguladores endócrinos no testículo de ratos

Desreguladores endócrinos (DEs) são contaminantes ambientais presentes em produtos de higiene pessoal, conservantes alimentares, pesticidas domésticos e agrícolas, materiais de construção, plásticos e produtos de limpeza. Esses compostos interferem em órgãos hormônio-dependentes, como os testículos, impactando negativamente a fertilidade masculina. Este estudo teve como objetivo avaliar a histoarquitetura testicular em ratos expostos cronicamente a uma mistura ambientalmente relevante de DEs desde a gestação até a idade adulta. Ratas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: Ctrl (óleo de milho, 2 ml/kg) e ED Mix (32,11 mg/kg/dia de uma mistura com 12 compostos, incluindo ftalatos, pesticidas, filtros UV, bisfenol A e butilparabeno, diluídos em óleo de milho, 2 ml/kg). As fêmeas prenhes foram tratadas por gavagem do 7º dia gestacional (DG7) até o 21º dia pós-natal (DPN21). Após o desmame (DPN22), os filhotes machos (geração F1) continuaram a receber a mistura de DEs até os DPN220. Os testículos foram coletados, fixados em metacarn e processados para análise histológica. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e picrossírius para avaliação morfológica e quantificação de colágeno. Houve um aumento significativo no percentual de túbulos seminíferos nos estágios I–VI de $53,17 \pm 1,98$ no grupo controle para $61,00 \pm 0,87$ no grupo exposto ($p = 0,002$), indicando acúmulo de túbulos em fases iniciais da espermatogênese. Os túbulos nos estágios VII–VIII diminuíram de $46,5 [38,25–48,0]$ no grupo controle para $37,0 [33,0–39,0]$ no grupo exposto ($p = 0,017$), sugerindo atraso no avanço da espermatogênese. A proporção de túbulos anormais aumentou de $0 [0–1]$ para $2 [1–3]$ no grupo exposto ($p = 0,002$), caracterizada principalmente por vacuolização e presença de células germinativas imaturas. A análise morfológica demonstrou redução do diâmetro tubular ($p = 0,018$) e queda da altura do epitélio germinativo ($p = 0,0004$) nos animais expostos, evidências de comprometimento estrutural. A contagem celular revelou uma diminuição significativa nas células de Sertoli ($p < 0,0001$) e nas células de Leydig ($p = 0,0035$) no grupo exposto, corroborando o prejuízo funcional observado nos parâmetros morfológicos. Em contrapartida, a quantificação do volume relativo de colágeno intersticial não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0603$), sugerindo que alterações fibróticas intersticiais não foram induzidas pela mistura de DEs sob as condições estudadas. Conclui-se que a exposição crônica à mistura de DEs, da fase pré-natal até a vida adulta, compromete a morfologia dos túbulos seminíferos, sem alterações no tecido conjuntivo intersticial.

Palavras-chave: Disruptores endócrinos, Túbulos seminíferos, fertilidade, espermatogênese.

ABSTRACT

Impacts of lifelong exposure to an environmentally relevant endocrine disruptor mixture on rat testicular morphology

Endocrine disruptors (EDs) are environmental contaminants commonly found in personal care products, food preservatives, domestic and agricultural pesticides, construction materials, plastics, and cleaning products. These compounds interfere with hormone-dependent organs such as the testes, negatively affecting male fertility. This study aimed to evaluate testicular histoarchitecture in rats chronically exposed to an environmentally relevant mixture of EDs from gestation through adulthood. Pregnant Sprague-Dawley rats were randomly assigned to two groups: Control (corn oil, 2 mL/kg) and ED Mix (32.11 mg/kg/day of a mixture of 12 compounds, including phthalates, pesticides, UV filters, bisphenol A, and butylparaben, in corn oil, 2 mL/kg). Dosing by oral gavage occurred from gestational day 7 (GD7) to postnatal day 21 (PND21). After weaning (PND22), male offspring (F1 generation) continued to receive the ED mixture until PND220. Testes were collected, fixed in Metacarn, and processed for histological analysis. Sections were stained with hematoxylin-eosin and picosirius red for morphometric assessment and collagen quantification. Chronic exposure to the ED mixture significantly reduced seminiferous tubule diameter and germinal epithelium height, and decreased the number of Sertoli and Leydig cells compared to control animals. Notably, the proportion of seminiferous tubules in early spermatogenic stages (I–VI) increased from 53.17 ± 1.98 in controls to 61.00 ± 0.87 in the exposed group ($p = 0.002$), while stages VII–VIII decreased from $46.5 [38.25–48.0]$ to $37.0 [33.0–39.0]$ ($p = 0.017$), indicating delayed spermatogenic progression. The incidence of abnormal tubules also increased significantly (from $0 [0–1]$ to $2 [1–3]$, $p = 0.002$), characterized primarily by vacuolization and the presence of immature germ cells. In contrast, no significant difference was observed in relative interstitial collagen volume between groups ($p = 0.0603$). These findings demonstrate that chronic ED exposure from prenatal life through adulthood induces substantial structural and functional alterations in the testis, consistent with evidence showing that endocrine-active compounds disrupt steroidogenesis and spermatogenesis in male reproductive systems.

Keywords: Endocrine disruptors, Seminiferous tubules, Fertility, Spermatogenesis.

LISTA DE SIGLAS

4- MBC	– 4- metil- benzidileno
BPA	– Bisfenol A
CEMIB	– Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	– Conselho Nacional de Experimentação Animal
DBP	– Dibutil ftalato
DDE	– Diclorodifenil- dicloroetileno
DDT	– Diclorodifeniltricloroetano
DE	– Desreguladores Endócrinos
DEHP	– Di-2- etilhexil ftalato
DG	– Dia Gestacional
DG0	– Dia Gestacional zero
DG7	– Dia Gestacional 7
DPN	– Dia Pós-Natal
DPN21	– Dia Pós-Natal 21
DPN22	– Dia Pós-Natal 22
HE	– Hematoxilina e Eosina
NOAEL	– No observed adverse effect levels
OMC	– Octila
RXFP2	– Relaxin Family Peptide Receptor 2
MEC	– Matriz Extracelular
LH	– Hormonio Luteinizante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do peso corpóreo durante a gestação, lactação e vida adulta de ratos expostos a uma mistura de DE baseada na exposição humana.....	21
Figura 2 – Secções histológicas e análises morfométricas no testículo de ratos expostos a uma mistura de DE durante a gestação, lactação e até a vida adulta.....	26
Figura 3 – Secções histológicas e análises morfométricas no testículo de ratos expostos durante a gestação, lactação e até a vida adulta a uma mistura de DE baseada na exposição humana.....	27
Figura 4 – Histologia testicular de ratos expostos durante a gestação, lactação e até a vida adulta a uma mistura de DE baseada na exposição humana do grupo.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da exposição crônica à uma mistura de DEs sobre a cinética e histopatologia testicular.....	25
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1	Animais e ambiente de experimentação	18
2.2	Mistura de DÊs	18
2.3	Delineamento experimental	19
2.4	Processamento histológico	21
2.5	Análise da estrutura testicular	22
2.5.2	Avaliação do processo espermatogênético (dinâmica da espermatogênese)	22
2.5.3	Diâmetro dos Túbulos Seminíferos e Altura do Epitélio Germinativo.....	22
2.5.4	Contagem do Número de Células de Sertoli e de Leydig.....	23
2.5.5	Quantificação do Volume Relativo de Colágeno.....	23
3	RESULTADOS	24
4	DISCUSSÃO	28
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	33

IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO PROLONGADA A UMA MISTURA AMBIENTALMENTE RELEVANTE DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO TESTÍCULO DE RATOS

Raissa Souza Bruno Lima Silveira¹, Emanuelle Jesus de Souza², Camila Tortola Rodrigues Pires², Anthony César de Souza Castilho^{1,3}, Leonardo de Oliveira Mendes^{1,3}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.
- ² Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.
- ³ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Leonardo de Oliveira Mendes

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro

CEP 19067-175 - Presidente Prudente – SP

Email: leobio85@gmail.com

Título curto: DEs afetam estrutura testicular em ratos

Tipo de artigo: Artigo de Pesquisa Básica

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Animal Reproduction, Highest Percetile: 65%

1. INTRODUÇÃO

Os desreguladores endócrinos (DEs) são agentes exógenos capazes de interferir no funcionamento do sistema endócrino de animais e seres humanos, que formam um grupo heterogêneo de substâncias, agrupadas em classes com base em suas propriedades químicas e usos industriais, e são amplamente distribuídos no ambiente e em produtos de consumo diário. Entre as principais classes reconhecidas estão: Per-epolifluoroalquil substâncias (PFAS): conhecidos como “*forever chemicals*”, usados em revestimentos, têxteis e embalagens; associados à interferência hormonal e impacto na função tiroideana e reprodutiva. Os ftalatos: plastificantes usados para conferir flexibilidade ao plástico, comumente detectados em embalagens de alimentos, produtos de higiene e brinquedos. Os bisfenóis (BPA, BPS, BPF): usados na fabricação de plásticos e resinas epóxi; evidências sugerem que mimetizam estrogênios e podem afetar a homeostase hormonal. Os pesticidas e organoclorados (por exemplo, DDT e seus metabólitos): historicamente associados a perturbações hormonais e efeitos adversos reprodutivos. Dentre outros compostos industriais: como retardantes de chama bromados, parabenos, metais e subprodutos de combustão, também observados como disruptores endócrinos em estudos toxicológicos¹.

Diversas populações estão expostas a um grande número dessas substâncias químicas por diferentes vias de contaminação. Esses compostos são encontrados nos alimentos e no meio ambiente, podendo estar presentes em uma ampla gama de materiais de uso cotidiano, como cosméticos, conservantes alimentares, pesticidas domésticos e agrícolas, materiais de construção, plásticos e produtos de limpeza².

Apesar da crescente atenção quanto aos seus efeitos, os DEs ainda são pouco estudados, e seus mecanismos de ação não estão totalmente compreendidos³. Estudos os

caracterizam como substâncias químicas capazes de perturbar a homeostase hormonal, desempenhando efeitos significativos sobre o eixo hipotálamohipófise-gonadal⁴. De acordo com Passos et al. (2019)³, esses compostos podem interferir na produção, secreção, metabolismo e transporte de hormônios endógenos, por meio da ligação a receptores hormonais. Tal interação pode resultar em efeitos agonistas, ao mimetizar as ações hormonais, ou antagonistas, ao bloquear a ligação do hormônio natural. Essas evidências contribuem para o entendimento dos mecanismos pelos quais os DEs alteram a regulação hormonal e favorecem o surgimento de diversas doenças.

Sabe-se que os DEs podem exercer ações estrogênicas e/ou antiandrogênicas, afetando diretamente órgãos hormônio-dependentes. O sistema reprodutor masculino é particularmente vulnerável, pois está exposto a uma ampla variedade desses compostos, que podem interferir na função reprodutiva e na regulação hormonal. Segundo Zouma et al. (2025)⁵, a exposição a desreguladores endócrinos está associada à diminuição da qualidade seminal, alterações hormonais e maior risco de anomalias do trato reprodutivo masculino, com múltiplas classes de químicos demonstrando efeitos adversos sobre a função testicular e parâmetros espermáticos em revisões sistemáticas atuais.

Um dos principais desafios nas pesquisas com DEs refere-se à abordagem fragmentada da exposição, uma vez que muitos estudos se concentram na análise isolada de cada composto. Maske et al. (2019)⁶ realizaram um estudo em que ratas prenhes foram submetidas a injeções subcutâneas de butilparabeno, do 6º dia gestacional (DG6) ao 21º dia pós-natal (DPN21), nas doses de 10, 100 e 1000 mg/kg/dia. Os resultados mostraram que os machos da geração F1 apresentaram atraso na descida testicular nas maiores doses, e atraso na separação prepucial na menor dose. Esses achados sugerem que o butilparabeno pode exercer ação estrogênica e/ou antiandrogênica, afetando a maturação

sexual e a competência reprodutiva na idade adulta, com prejuízos à função das células de Leydig e à diferenciação do epidídimo.

Além do tipo de DEs, o período de exposição também representa um fator crucial a ser considerado. Até o momento, a maioria dos estudos tem se concentrado em janelas curtas e específicas, como determinadas fases da morfogênese prostática ou da vida adulta, conforme observado por Suteau et al. (2020)⁷. Ao investigarem uma mistura contendo os ftalatos di(2etilhexil) ftalato (DEHP) e dibutil ftalato (DBP), associados ao bisfenol A (BPA), os autores relataram alterações na expressão do gene *RXFP2* (*Relaxin Family Peptide Receptor 2*), envolvido na regulação do desenvolvimento fetal do sistema reprodutor e na espermatogênese. Esses achados indicam que misturas de DEs podem induzir efeitos distintos daqueles causados por compostos isolados, reforçando a importância de abordagens experimentais que considerem a exposição combinada e realista, a mais próxima possível da exposição ambiental humana.

Diante desse cenário, torna-se evidente a importância de estudos que considerem o maior número possível de variáveis envolvidas na exposição aos DEs, como a combinação de diferentes compostos e a aplicação de longos períodos de exposição. Para preencher esta lacuna, adaptamos uma mistura elaborada por Christiansen et al. (2012)⁸ composta por 12 DEs, contendo ftalatos, pesticidas, filtros ultravioletas, bisfenol A e butilparabeno. A mesma mistura foi utilizada por Sousa et al. (2023)⁹, onde a exposição prolongada, desde fase gestacional até fase adulta, causou alterações prostáticas, incluindo atrofia epitelial e modificações no ambiente estromal, além do desenvolvimento de lesões preneoplásicas. Hinokuma et al. (2025)¹⁰, utilizando o mesmo delineamento experimental, constataram que a mistura foi capaz de alterar o fenótipo nuclear de células renais, além de causar fibrose.

Em vista das evidências elencadas acima, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos dessa mistura de DEs, com excessão do paracetamol, sobre a histoarquitetura testicular de ratos expostos cronicamente, desde a gestação até a idade adulta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e Ambiente de Experimentação

Foram utilizadas 24 fêmeas adultas (120 dias de idade) e 12 machos adultos (90 dias de idade), da linhagem Sprague-Dawley, com peso aproximado de 300 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação da UNOESTE, sob condições controladas de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (23 °C a 25 °C). Receberam ração comercial isenta de fitoestrógenos (NUVILAB CR1/Nuvital PR) e água filtrada, fornecidas *ad libitum* em bebedouros de vidro com tampa e bico metálico (capacidade de 500 mL).

Para o acasalamento, os animais foram distribuídos em gaiolas de polipropileno (41 × 34 × 16 cm), contendo de duas a três fêmeas para cada macho. As gaiolas apresentavam tampas de aço inox em formato de grade e estavam forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo substituídas duas vezes por semana. Durante toda a fase experimental, foram monitoradas a umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) e a exaustão contínua. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNOESTE (Protocolo CEUA 6034).

2.2 Mistura de DEs

Os compostos dibutilftalato (DBP; CAS n° 175606-05-0), di(2-etilhexil)ftalato (DEHP; CAS n° 117-81-7), vinclozolina (CAS n° 50-47-144-8), procloraz (CAS n° 67747-09-5), procimidona (CAS n° 32809-16-8), linuron (CAS n° 330-55-2), epoxiconazol (CAS n° 133855-98-8), p,p'-DDE (CAS n° 72-55-9), 4-metilbenzilideno cânfora (4-MBC; CAS n° 36861-47-9), octil metoxicinamato (OMC; CAS n° 5466-773), bisfenol A (BPA; CAS n° 80-05-7) e butilparabeno (CAS n° 94-26-8) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

A mistura foi preparada em óleo de milho (veículo) na concentração de 32,11 mg/kg/dia e administrada por via oral (gavagem).

2.3 Delineamento Experimental

Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo circadiano, colocando-se de duas a três fêmeas na mesma caixa do macho. O dia gestacional zero (DG0) foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e confirmação da fase de estro por citologia. As fêmeas identificadas como prenhes foram alocadas individualmente em gaiolas e distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais (n = 10/grupo): Grupo ED Mix, o qual recebeu 32,11 mg/kg/dia da mistura de DEs diluída em óleo de milho (2 mL/kg), por gavagem; e o Grupo Ctrl, que recebeu apenas o veículo (óleo de milho, 2 mL/kg), também por gavagem.

A mistura de DEs foi originalmente desenvolvida por Christiansen et al. (2012)⁸ e reproduzida por diversos autores, incluindo Axelstad et al. (2014)¹¹, Isling et al. (2014)¹², Boberg et al. (2015)¹³, Mandrup et al. (2015)¹⁴ e Johansson et al. (2016)¹⁵. A composição baseou-se na estimativa de ingestão humana diária ajustada por peso corporal (mg/kg/dia), multiplicada por um fator de segurança de 100, valor comumente adotado

para extrapolação de doses sem efeitos adversos observáveis (NOAEL – *no observed adverse effect levels*) em roedores para níveis considerados seguros em humanos¹⁶. A composição da mistura (em mg/kg/dia) foi a seguinte: DBP (0,01), DEHP (0,02), vinclozolina (0,009), procloraz (0,014), procimidona (0,015), linuron (0,0006), epoxiconazol (0,01), p,p'-DDE (0,001), 4-MBC (0,06), OMC (0,12), bisfenol A (0,0015) e butilparabeno (0,06). Ao multiplicar esses valores por 100, obteve-se a dose final da mistura (32,11 mg/kg/dia), conforme descrito por Christiansen et al. (2012). Para o presente experimento, a fórmula original foi adaptada pela exclusão do paracetamol, devido ao seu conhecido potencial hepatotóxico, o que inviabilizaria sua administração diária e prolongada.

Como ilustrado na Figura 1, a mistura de DEs foi administrada por gavagem às ratas prenhes/lactantes do DG7 até o 21º dia pós-natal (DPN21), sempre no mesmo intervalo do dia (8h às 10h). Durante esse período, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais e pesadas em dias alternados, a fim de ajustar o volume da mistura de acordo com o peso corporal.

Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi padronizado para oito (quatro machos e quatro fêmeas), mantendo a proporção sexual de 1:1. Ninhadas com menos de sete filhotes foram excluídas do experimento.

No DPN22, os filhotes machos foram desmamados e alojados em grupos de três por caixa. A partir de então, continuaram a receber diariamente a mistura completa de DEs até os 220 dias de idade. Ao final do protocolo, os animais foram eutanasiados por overdose dos anestésicos xilazina e cetamina. Os testículos foram removidos, pesados e destinados às análises subsequentes.

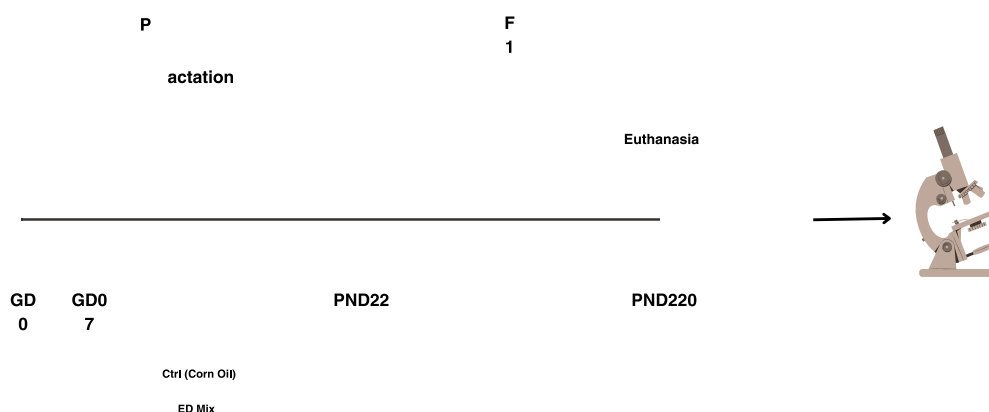


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental. As linhas referem-se ao período de exposição das ratas prenhas (GD07 a PND21) e da prole (PND22 a PND220) com a mistura de 12 DE. As linhas verdes representam a gavagem para o grupo exposto apenas ao óleo de milho e linhas azuis para a exposição à mistura de DE. Período da eutanásia (seta vermelha – PND220). GD (Gestational Day); PND (Postnatal Day)⁹.

2.4 Processamento histológico

Fragments dos testículos foram fixados por imersão em solução metacarn (metanol, clorofórmio e ácido acético glacial, na proporção 6:3:1) por três horas, e posteriormente incluídos em Paraplast® (Sigma-Aldrich®). Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, montados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento do uso. As secções histológicas foram submetidas às seguintes colorações: Hematoxilina-eosina (HE) para análise morfológica e histopatológica; e Picrosírius para evidenciar e quantificar fibras colágenas. As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Leica® (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha), acoplado a sistema de captura de imagens e análise digital por meio do software ImageJ.

2.5 Análise da estrutura testicular

2.5.1 Análise histopatológica testicular

Avaliação histopatológica foi realizada utilizando-se cortes transversais do órgão (3 cortes não consecutivos por animal), com auxílio de microscópio de luz (aumentos de 100, 200 e 400X). As imagens para fotodocumentação foram capturadas com auxílio de um fotomicroscópio e um computador. Foram analisados 100 cortes de túbulos seminíferos por animal e classificando-os em normais ou anormais. Os túbulos foram considerados anormais na presença de: células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, vacuolização do epitélio ou presença de células germinativas imaturas na luz.

2.5.2 Avaliação do processo espermatogénico (*dinâmica da espermatogênese*)

Foram analisadas 100 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, os quais apresentaram forma mais regular e circular possível, nos estágios I-VI, VII-VIII, IX-XIII e XIV, sendo os mesmos caracterizados como se segue:

- Estágios I-VI: apresenta duas gerações de espermátides;
- Estágios VII-VIII: apresenta espermátides maduras localizadas na borda do lúmen;
- Estágios IX-XIII: apresenta somente uma geração de espermátides;
- Estágio XIV: apresenta espermatócito secundário.

2.5.3 Diâmetro dos Túbulos Seminíferos e Altura do Epitélio Germinativo

Para a análise do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio germinativo, foram avaliados dez túbulos seminíferos por animal, todos no estágio IX da

espermatogênese, em duas secções histológicas diferentes com distância de 50µm de distância entre elas. As mensurações foram realizadas em microscópio de luz, com aumento de 200×, acoplado à sistema de análise de imagens. Em cada túbulo foram obtidas quatro medidas do diâmetro e quatro medidas da altura do epitélio germinativo. As médias de cada parâmetro foram calculadas por animal e utilizadas para a análise estatística.

2.5.4 Contagem do Número de Células de Sertoli e de Leydig

A contagem das células de Sertoli e de Leydig foi realizada por microscopia de luz, utilizando objetiva de 40×, em duas secções histológicas diferentes com distância de 50µm entre elas. Para a contagem das células de Sertoli, foram considerados os núcleos presentes em 20 túbulos seminíferos por animal (n = 10 animais por grupo), no estágio VII da espermatogênese. Já as células de Leydig foram quantificadas com base na contagem dos seus núcleos em 10 secções histológicas aleatórias por animal.

2.5.5 Quantificação do Volume Relativo de Colágeno

O volume relativo de colágeno foi quantificado em cortes histológicos corados com picrossírius, utilizando o software Leica QWin V3 acoplado ao microscópio Leica™ DMLB 80 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Foram analisadas duas secções histológicas por animal (n = 10 animais por grupo), com intervalo de 50 µm entre cada secção. De cada secção, foram capturados dez campos histológicos aleatórios sob aumento de 400×. As imagens obtidas foram analisadas com o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA) para mensuração da área ocupada por fibras colágenas em relação à área total do tecido, expressa como volume relativo.

2.6 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis com distribuição normal, utilizou-se o teste t de Student para comparação entre grupos. Quando a distribuição foi não paramétrica, aplicou-se o teste de MannWhitney. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA), adotando-se nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Neste estudo, foi possível observar que a exposição à mistura de DEs interferiu na cinética da espermatogênese. Essa interferência é evidenciada pelo aumento do número de túbulos nos estágios I – VI e uma menor quantidade de túbulos nos estágios VII – VIII, demonstrando um atraso no processo. Além disso, nos animais expostos, observou-se uma maior porcentagem de túbulos seminíferos anormais, caracterizados, principalmente, pela presença de vacúolos e células na luz do túbulo (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos da exposição crônica à uma mistura de DEs sobre a cinética e histopatologia testicular.

Estágio	Ctrl	ED Mix	Valor de p
Estágios I - VI ^a	53.17± 1.98	61.00 ±0.87	0.002
Estágios VII – VIII ^b	46.5 [38.25 - 48.0]	37.0 [33.0 - 39.0]	0.017
Estágios IX - XIII ^a	3.66 ± 0.54	2.45 ±0.63	0.159
Histopatologia			
Túbulos normais ^b	100 [99 – 100]	98 [97 – 99]	0.002
Túbulos anormais ^b	0 [0 -1]	2 [1 -3]	0.002

^aDados apresentados como média ±erro padrão da média.

^bDados apresentados como mediana [Q1 – Q3].

As análises morfométricas evidenciaram uma redução do diâmetro tubular ($p = 0,018$, Figura 2C) e da altura do epitélio germinativo ($p = 0,0004$, Figura 2D) após exposição à mistura de DEs.

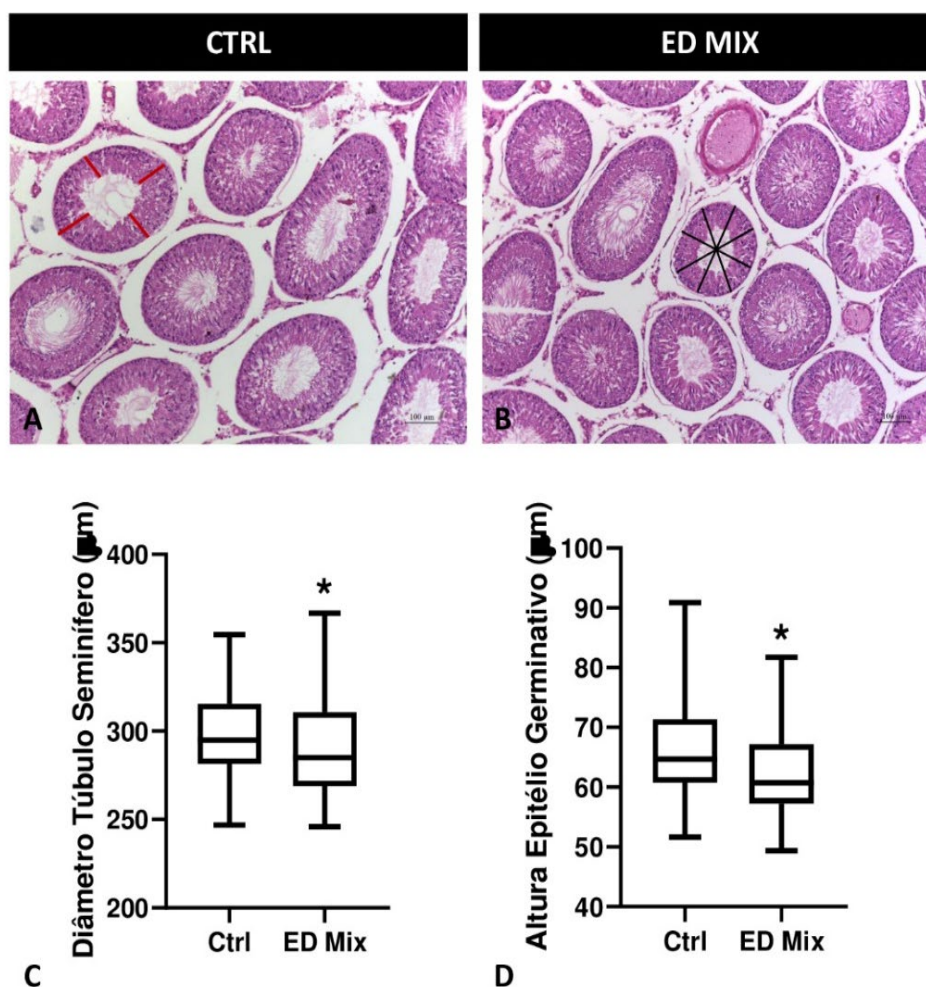


Figura 2- Secções histológicas e análises morfométricas no testículo de ratos expostos a uma mistura de DEs durante a gestação, lactação e até a vida adulta. (A): medição diâmetro tubular indicado por linhas pretas; (B) medição da altura do epitélio germinativo indicado por linhas vermelhas Representação gráfica da análise de diâmetro dos túbulos seminíferos (C) e da análise de altura do epitélio germinativo (D). Barras: 100µm Coloração: HE. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Ctrl.

Em relação à quantificação de células de Sertoli e de Leydig, observou-se que a exposição à mistura de DEs resultou em uma redução na quantidade dessas células ($p < 0,0001$, Figura 3A e C; $p = 0,0035$, Figura 3B e D). Essa diminuição acompanha as alterações morfométricas e histopatológicas observadas (Figura 3).

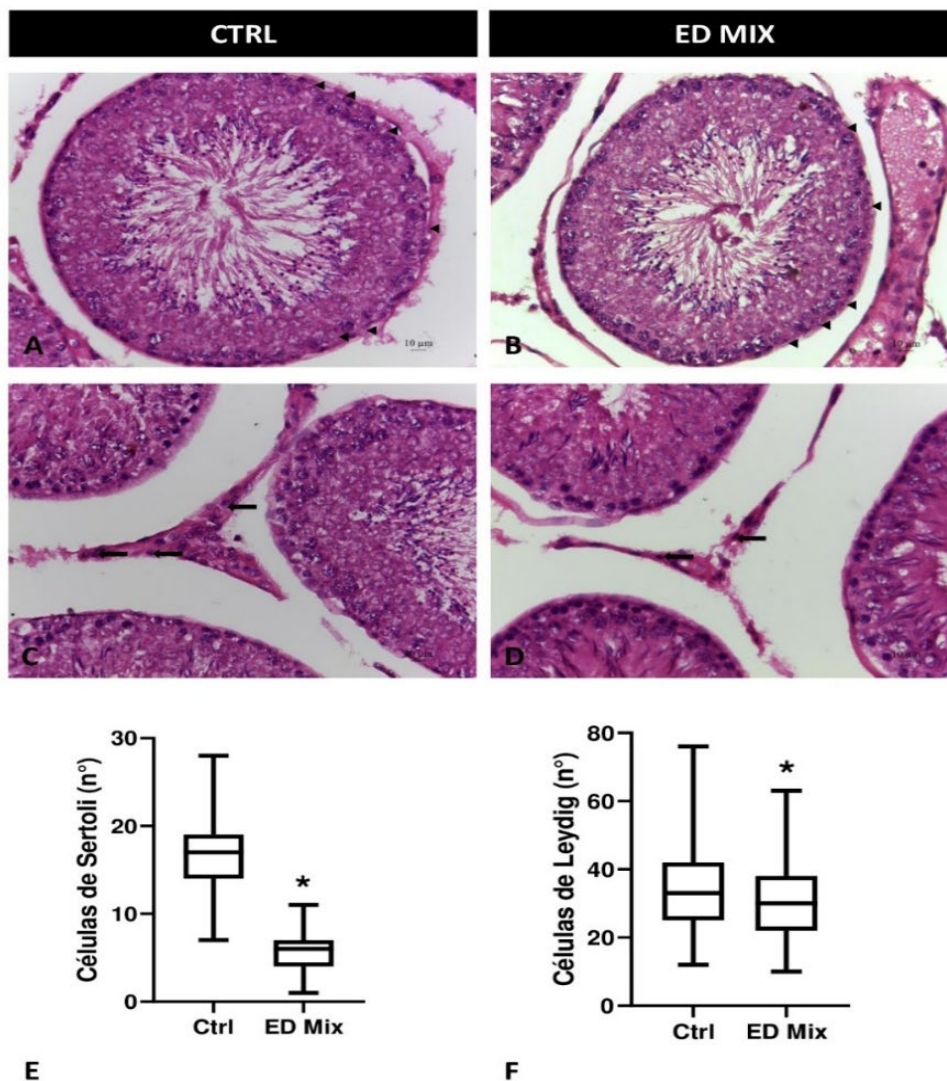


Figura 3- Secções histológicas e análises morfométricas dos testículos de ratos expostos a uma mistura de DEs durante a gestação, lactação e até a vida adulta. (A, C) Grupo CTRL: túbulos seminíferos no estágio VII da espermatogênese; núcleos de células de Sertoli evidenciados na periferia tubular (cabeças de seta); células de Leydig na região intersticial (seta). (B, D) Grupo ED Mix: túbulos seminíferos no estágio VII; núcleos de células de Sertoli na periferia tubular e células de Leydig no interstício. (E) Representação gráfica da contagem de células de Sertoli. (F) Representação gráfica da contagem de células de Leydig. Barras de escala: 10 μ m. Coloração: HE. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Ctrl.

Além da quantificação das células de Leydig no compartimento intersticial, o presente estudo avaliou a presença de fibras colágenas nessa região. Diferentemente dos demais parâmetros analisados, a exposição à mistura DEs não promoveu alterações

significativas na proporção de colágeno no interstício testicular ($p = 0,0603$), conforme demonstrado na Figura 4.

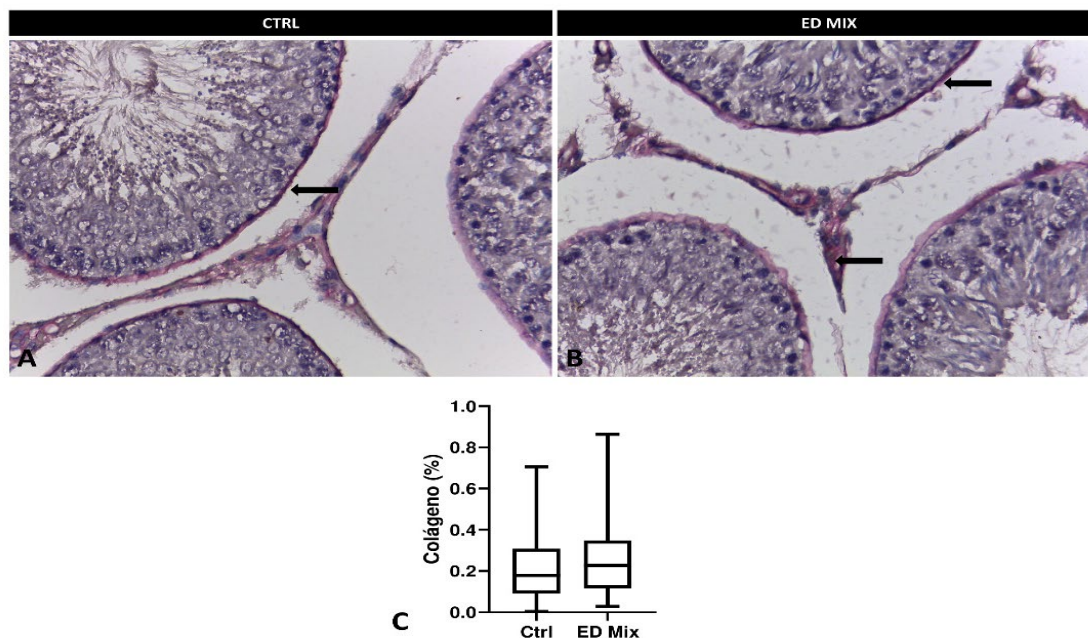


Figura 4- Secções histológicas testiculares de ratos expostos a uma mistura DEs durante a gestação, lactação e até a vida adulta. **(A)** Grupo Ctrl; **(B)** Grupo ED Mix. Fibras colágenas evidenciadas pelas setas pretas. **(C)** Representação gráfica da quantificação da área ocupada por colágeno (%) no interstício testicular dos grupos experimentais. Coloração: Picrossírius. Aumento: 400 \times .

4. DISCUSSÃO

O presente estudo tem como objetivo contribuir para o avanço do conhecimento acerca dos efeitos associados à exposição contínua a desreguladores endócrinos, explorando variáveis relevantes que simulam padrões reais de contato com essas substâncias. A abordagem adotada busca integrar achados atuais sobre como exposições prolongadas que os compostos podem impactar processos fisiológicos, incluindo alterações hormonais e reprodutivas, conforme evidenciado nos estudos epidemiológicos recentes. A partir desse modelo experimental, foi possível investigar a ação dos DEs sobre o sistema reprodutor masculino. Os resultados demonstraram que a exposição crônica à

mistura de DEs promoveu alterações na histoarquitetura testicular, incluindo atraso na espermatogênese, aumento de túbulos anormais, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, da altura do epitélio germinativo e do número de células de Sertoli e de Leydig, sem alteração na quantidade de colágeno intersticial. Tais estruturas são reguladas por receptores hormonais desde a fase fetal até a vida adulta, o que as torna especialmente vulneráveis à ação dos DEs¹⁷.

Além das alterações morfológicas descritas, a exposição crônica à mistura de DEs também interferiu na cinética da espermatogênese, evidenciada pelo aumento proporcional de túbulos nos estágios I–VI e redução nos estágios VII–VIII. Esse padrão sugere um atraso na progressão espermatogênica, indicando que os DEs podem comprometer etapas críticas que antecedem a espermiogênese. Achados semelhantes foram relatados em modelos experimentais expostos a compostos organofosforados e ftalatos, nos quais a desorganização tubular e a modificação da distribuição dos estágios também refletem prejuízo funcional da linhagem germinativa (¹⁸; ¹⁹). Assim, a alteração do ciclo espermatogênico observada neste estudo reforça que a toxicidade reprodutiva dos DEs não se limita à estrutura, mas atinge igualmente a dinâmica celular necessária para a continuidade da espermatogênese, ampliando a relevância dos efeitos observados na vida adulta.

Outro achado relevante foi o aumento significativo de túbulos seminíferos anormais, caracterizados principalmente pela presença de vacúolos e células imaturas na luz. Estudos com subnutrição neonatal ou exposição gestacional a DEHP e butilparabeno demonstram que vacuolização, retenção de células germinativas e degeneração epitelial estão associadas à menor produção diária de espermatozoides e à redução da reserva espermática, reforçando o papel crítico das células de Sertoli na homeostase tubular (²⁰;

¹⁹). Esses achados se alinham aos resultados do presente estudo, sugerindo que a presença de túbulos degenerados não representa apenas uma alteração morfológica, mas um indicador de comprometimento funcional, com impacto direto sobre a eficiência da espermatogênese. Dessa forma, as alterações estruturais e cinéticas observadas atuam de maneira integrada, contribuindo para o prejuízo reprodutivo associado à exposição prolongada à mistura de DEs.

A exposição crônica à mistura de DEs comprometeu o desenvolvimento testicular, com estreitamento dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio germinativo. Achados semelhantes foram descritos por Abdel-Maksoud et al.²¹, que observaram desorganização do epitélio germinativo, dilatação da luz tubular e atrofia dos túbulos seminíferos em filhotes de ratas expostas gestacionalmente, entre os dias 12 e 21, ao bisfenol A (BPA) ou ao di-2-etilhexil ftalato (DEHP). Essas alterações foram observadas em animais com 35 dias de idade, sugerindo que mesmo a exposição intrauterina a compostos isolados pode comprometer precocemente a morfologia testicular. Os achados do presente estudo demonstram que tais alterações podem persistir até a vida adulta, especialmente quando a exposição se estende ao longo do desenvolvimento.

Por outro lado, Costa et al.²² não observaram alterações significativas no diâmetro dos túbulos seminíferos após a exposição peri-puberal (DPN25 – DPN65) ao inseticida organofosforado clorpirifós. No entanto, foi observada redução significativa na altura do epitélio germinativo, além da diminuição no número de células de Sertoli e de Leydig, o que pode explicar a desorganização estrutural dos túbulos e o comprometimento funcional testicular. A redução das células de Sertoli, em especial, pode contribuir diretamente para a menor espessura epitelial e sustentação da espermatogênese, corroborando com os achados do presente estudo.

Em relação à quantificação das células de Sertoli e de Leydig, foi possível identificar que a exposição à mistura de DE promoveu redução significativa no número desses dois tipos celulares, achado que corrobora com a diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio germinativo observada neste estudo. As células de Sertoli são as únicas células somáticas presentes nos túbulos seminíferos de mamíferos e apresentam morfologia colunar, estendendo-se da base do túbulo até o lúmen, com prolongamentos citoplasmáticos que envolvem as células germinativas²³. Essas células são metabolicamente ativas e desempenham múltiplas funções essenciais, incluindo a produção de fatores tróficos, expressão de genes envolvidos na divisão celular e no metabolismo testicular. Segundo Sharpe²⁴, a proliferação das células de Sertoli em roedores ocorre principalmente durante os períodos fetal e neonatal, sendo esse processo determinante para o número total de células disponíveis na fase adulta, o que impacta diretamente a capacidade espermatogênica do testículo.

As células de Leydig são células esteroidogênicas localizadas no espaço intersticial dos testículos, sendo as principais responsáveis pela produção de testosterona, um hormônio crítico para a saúde reprodutiva e metabólica masculina²⁵. Sua função é regulada pelo hormônio luteinizante (LH) e modulada por diferentes moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento e prolactina²⁶. Dessa forma, a desregulação das células de Leydig pode comprometer a esteroidogênese e contribuir para a infertilidade. No presente estudo, a exposição crônica à mistura de DEs reduziu significativamente o número de Leydig nos animais expostos, sugerindo comprometimento do compartimento somático testicular. Resultados semelhantes foram observados por Guerra et al.¹⁹, ao avaliarem a exposição pré-natal de ratas ao DEHP (500 mg/kg/dia, por gavagem), ao butilparabeno (100 mg/kg/dia, via subcutânea) ou à

combinação de ambos do DG12 ao DPN21. Nesse estudo, os autores verificaram que a exposição ao butilparabeno isolado levou à diminuição no número de células de Leydig, enquanto o DEHP reduziu a contagem de células de Sertoli, no DPN22. Os autores sugerem que a exposição a esses compostos pode interromper ou retardar a proliferação de células somáticas testiculares, reforçando o potencial de toxicidade reprodutiva dos DEs.

As fibras colágenas são os principais componentes estruturais da matriz extracelular (MEC), exercendo papel essencial na sustentação e homeostase dos tecidos, sendo os colágenos do tipo I e III os principais constituintes do compartimento estromal²⁷. Nos testículos, o colágeno é naturalmente encontrado em pequenas quantidades, distribuído principalmente no espaço intersticial e na túnica albugínea²⁸. Diferentemente dos demais parâmetros avaliados, não foram observadas alterações significativas na quantidade de colágeno entre os grupos no presente estudo. Este achado contrasta com o estudo de Hassanin²⁸, que demonstraram aumento do colágeno testicular e fibrose após exposição de ratos adultos ao pesticida atrazina (300 µg/kg/dia) por dois meses, sugerindo que a fibrogênese pode estar relacionada a processos inflamatórios induzidos por exposições tóxicas de maior intensidade. Assim, é possível que a ausência de alterações observadas no presente estudo esteja relacionada à menor toxicidade da mistura utilizada, cuja formulação e dosagem foram baseadas em exposições humanas realistas, não sendo suficientes para deflagrar processos significativos de remodelamento da matriz extracelular no testículo.

5. CONCLUSÃO

A exposição crônica a uma mistura de DEs em dose ambientalmente relevante, desde o período gestacional até a vida adulta, compromete a integridade estrutural testicular. Esses achados reforçam o potencial desses compostos em afetar negativamente a saúde reprodutiva de mamíferos, mesmo em condições de exposição compatíveis com a realidade humana. Diante da ampla disseminação ambiental dos DEs, é fundamental aprofundar os estudos sobre seus efeitos tóxicos e os mecanismos envolvidos, visando à preservação da fertilidade em diferentes espécies.

REFERÊNCIAS

1. Mínguez-Alarcón L, Gaskins AJ, Meeker JD, Braun JC, Chavarro JE. Endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. *Fertil Steril*. 2023;120(6):1138-1149. doi:10.1016/j.fertnstert.2023.10.008.
2. Monneret C. What is an endocrine disruptor? *C R Biol*. 2017;340(9-10):403-405. doi:10.1016/j.crvi.2017.07.004.
3. Passos OP, Santos AB, Silva JRF, Mota SB. Action of two endocrine disruptors on the sexual differentiation of Nile tilapia. *Rev Cienc Agron*. 2019;50(3):402-410. doi:10.5935/18066690.20190048.
4. Czarnywojtek A, Jaz K, Ochmańska A, Zgorzalewicz-Stachowiak M, Czarnocka B, Sawicka-Gutaj N, et al. The effect of endocrine disruptors on the reproductive system-current knowledge. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(15):4930-4940. doi:10.26355/eurrev_202108_26450.
5. Zouma Z, Dourou P, Diamanti A, et al. Associations between endocrine-disrupting chemical exposure and fertility outcomes: a decade of human epidemiological evidence. *Life (Basel)*. 2025;15(7):993. doi:10.3390/life15070993.
6. Maske P, Dighe V, Mote C, Vanage G. n-Butylparaben exposure through gestation and lactation impairs spermatogenesis and steroidogenesis causing reduced fertility in the F1 generation male rats. *Environ Pollut*. 2020;256:112957. doi:10.1016/j.envpol.2019.112957.
7. Suteau V, Briet C, Lebeault M, Gourdin L, Henrion D, Rodien P, et al. Human amniotic fluid-based exposure levels of phthalates and bisphenol A mixture

- reduce INSL3/RXFP2 signaling. *Environ Int.* 2020;138:105585. doi:10.1016/j.envint.2020.105585.
8. Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, et al. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl.* 2012;35(3):303-316. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x.
 9. Sousa TC, de Souza LP, Ricardo MLS, Yoshigae AY, Hinokuma KD, Gorzoni ABR, et al. Long exposure to a mixture of endocrine disruptors predisposes the ventral prostate of rats to preneoplastic lesions. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023;30(47):104015-104028. doi:10.1007/s11356-023-29768-z.
 10. Hinokuma KD, Ricardo MLS, Yoshigae AY, Sousa TC, de Souza LP, Nai GA, et al. Chronic exposure to an environmentally relevant mixture of endocrine disruptors alters nuclear phenotype and induces renal fibrosis in rats. *Environ Toxicol.* 2025;40(8):1087-1101. doi:10.1002/tox.24502.
 11. Axelstad M, Christiansen S, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Isling LK, et al. Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction.* 2014;147(4):489-501. doi:10.1530/REP-13-0447.
 12. Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, et al. Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disruptors. *Reproduction.* 2014;147(4):465-476. doi:10.1530/REP-13-0448.
 13. Boberg J, Johansson HK, Hadrup N, Dreisig K, Berthelsen L, Almstrup K, et al. Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes proliferative lesions in rat prostate. *Prostate.* 2015;75(2):126-140. doi:10.1002/pros.22897.
 14. Mandrup KR, Johansson HK, Boberg J, Pedersen AS, Mortensen MS, Jørgensen JS, et al. Mixtures of environmentally relevant endocrine disrupting chemicals affect mammary gland development in female and male rats. *Reprod Toxicol.* 2015;54:47-57. doi:10.1016/j.reprotox.2014.09.016.
 15. Johansson ME, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):639-649. doi:10.1038/nri.2016.88.
 16. European Chemicals Agency (ECHA). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.8: Characterization of dose [concentration]-response for human health. Helsinki: ECHA; 2010.
 17. Lacouture A, Lafront C, Peillex C, Pelletier M, Audet-Walsh É. Impacts of endocrine-disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environ Res.* 2022;204(Pt B):112085. doi:10.1016/j.envres.2021.112085.
 18. Sampaio CF, Prates KV, Siervo GEML, Mathias PCF, Fernandes GSA. Impairment of testicular development in rats exposed to acephate during maternal gestation and lactation. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(5):5482-5488. doi:10.1007/s11356-019-07209-0.

19. Guerra MT, Erthal RP, Punhagui-Umbelino APF, Trinque CM, Torres de Bari MA, Nunes TDM, et al. Reproductive toxicity of maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate and butyl paraben (alone or in association) on both male and female Wistar offspring. *J Appl Toxicol.* 2023;43(2):242-261. doi:10.1002/jat.4377.
20. Menezes ACF, Wunderlich ALM, Luiz KG, Frigoli GF, Costa IRD, Stopa LRDS, et al. Neonatal undernutrition induced by litter size expansion alters testicular parameters in adult Wistar rats. *Br J Nutr.* 2024;132(7):862-873. doi:10.1017/S0007114524002149.
21. Abdel-Maksoud FM, Ali FAZ, Akingbemi BT. Prenatal exposures to bisphenol A and di(2-ethylhexyl) phthalate disrupted seminiferous tubular development in growing male rats. *Reprod Toxicol.* 2019;88:85-90. doi:10.1016/j.reprotox.2019.07.017.
22. da Costa IR, Quadreli DH, da Silva LMM, de Andrade FG, Fernandes GSA. Chlorpyrifos impairs sperm parameters and number of Sertoli and Leydig cells in rats after exposure during the peripubertal period. *Toxicology.* 2024;504:153789. doi:10.1016/j.tox.2024.153789.
23. Skinner MK, Griswold MD, editors. *Sertoli Cell Biology.* San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
24. Sharpe RM. Androgens and the masculinization programming window: human-rodent differences. *Biochem Soc Trans.* 2020;48(4):1725-1735. doi:10.1042/BST20200200.
25. Adamczewska D, Słowikowska-Hilczer J, Walczak-Jędrzejowska R. The fate of Leydig cells in men with spermatogenic failure. *Life (Basel).* 2022;12(4):570. doi:10.3390/life12040570.
26. Mattos K, Dumas FO, Campolina-Silva GH, Belleannée C, Viger RS, Tremblay JJ. ERK5 cooperates with MEF2C to regulate Nr4a1 transcription in MA-10 and MLTC1 Leydig cells. *Endocrinology.* 2023;164(9):bqad120. doi:10.1210/endo/bqad120.
27. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
28. Hassanin HM, Kamal AA, Ismail OI. Resveratrol ameliorates atrazine-induced caspase-dependent apoptosis and fibrosis in the testis of adult albino rats. *Sci Rep.* 2024;14(1):17743. doi:10.1038/s41598-024-67636-z.

ANEXO - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – ANIMAL REPRODUCTION

Guidelines and Policies

The Editorial Policies and Guidelines outlined here must be followed. If you have any questions, please [contact us](#) prior to your submission.

Editorial Policies

General policies

Submitted manuscripts must be original and should not be under simultaneous consideration by any other publication or have been previously published in any form or medium. Furthermore, if the article has already undergone any previous evaluation, the corresponding decision letter must be attached during submission, and this fact should be mentioned in the submitted Cover Letter. All authors are entirely responsible for all data, concepts and information contained in the article.

Article processing charges

This journal does not have submission charges. Animal Reproduction charges only a flat fee after the acceptance of the article. There are three different values for the Article Processing Charge (APC), as follows:

- R\$ 1600,00 for non CBRA members
- R\$ 800,00 for CBRA members
- US\$ 650,00 for foreign authors

You will receive by e-mail a Paypal invoice with the payment link from Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Once your payment has been made, we will start producing your article. (<http://cbra.org.br/br/pagamentos/>).

Waiver and discounts

Authors from low-income countries and without access to grant to cover Article Processing Charges may request a waiver or discount after their manuscript is accepted for publication. Waiver and discounts must be requested through the journal contact page, and should include the accepted manuscript information and author reasons for requesting the waiver or discount.

Open access, copyright and self-archiving policies

This is an open access journal which means that all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Users are allowed to read, download, copy,

distribute, print, search, or link to the full texts of the articles, or use them for any other lawful purpose, without asking prior permission from the publisher or the author. This is in accordance with the BOAI (Budapest Open Access Initiative) definition of open access. Accepted articles will be published as Open Access and distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Authors of articles published by Animal Reproduction retain copyright of their work without restrictions, licensing it under the Creative Commons Attribution License, which allows articles to be re-used and re-distributed without restriction, as long as the original work is correctly cited.

Animal Reproduction encourages Authors to self archive accepted manuscripts by posting them in personal blogs, institutional repositories and scientific social medias, as well as on their personal social medias, as long as the full citation to the journal website version is included.

Language

All manuscripts must be written in Standard American English. We recommend MerriamWebster's Dictionary (<http://www.m-w.com/>) for spelling check and the EASE Guidelines for Authors and Translators of Scientific Articles to be Published in English (<http://www.ease.org.uk/publications/author-guidelines>). Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by a reviewer familiar with scientific language and vocabulary, or by a specialized company, and present a certificate of English editing. Manuscripts not written in acceptable Standard English will be returned to the author before being sent to the scientific reviewers. Peer Review Process

Animal Reproduction has a 3-stage review process:

1. All submitted manuscripts undergo a technical verification for compliance with Animal Reproduction policies and manuscript preparation guidelines. Submissions that fail to comply will be un-submitted so that the authors can fix the problems and resubmit them.
2. Manuscripts are then sent to the Editor-in-chief, who performs a pre-evaluation that includes originality, scope and journal fit. Rejected manuscripts will not be sent to peer-review and will be returned to the authors with the reasons for such editorial decision. The Editors strive to accomplish this first screening stage and send their decision in 70 days.
3. Manuscripts accepted in this first screening will be sent for a single blind evaluation by at least two reviewers. After the ad hoc reviewers finish their evaluation, the handling Editor will return the manuscript to the authors with an accepted, rejected, or for review decision, according to the reviewers' suggestions.

Revised manuscripts submitted by the authors will be sent to the Editor-in-chief for final decision, and reviewers might be asked to perform additional evaluations.

Section Policies

Animal Reproduction does not impose a limit on the number of words and references for Original and Review articles, but editors and reviewers might make recommendations regarding text clarity and quality and excess or lack or relevance of references.

Original Articles

Articles reporting original research studies and/or data related to the subject fields covered by Animal Reproduction. 30 pages.

Original Articles are open for author submission and must not have been previously published elsewhere.

Review Articles

Review Articles of interest to the field of animal reproduction will be submitted by direct invitation of the editorial board, but authors might also submit review manuscripts. 30 pages

Short Communications

Short Communications must report or be related to new techniques involved in the biology of reproduction.

They are open for author submissions and must have a maximum of 2000 words, including the list of references, and only two panel figures and two tables.

Conference proceedings

The Journal publishes full original papers, abstracts and workshops when presented in conferences from Scholarly Societies of Animal Reproduction supported by the journal.

Authorship and Disclosures

Authorship byline

Authors must agree on the manuscript authorship making sure it accurately illustrates and includes contributors who actually and significantly contributed to the work. All those listed as authors should qualify for authorship according to the substantial contributions on the concept and design the work, data acquisition, interpretation and evaluation, and should have been actively involved during manuscript revision and approval of the final manuscript version, with substantial and intellectual involvement, specially in the results discussion.

Author contributions and responsibility

All authors must approve the final version of the manuscript and be responsible for each part of collaborative work done in its final version. In addition, each author's specific contribution according to the CRediT's standard designations available at <https://credit.niso.org/>, should be included in the Cover Letter as outlined in the manuscript preparation guidelines.

Changes in Authorship after Submission

Any changes in authorship during the revision process of the manuscript will only be considered by the editors if important additional experiments or relevant contributions have been made and justified. Such changes in authorship must be requested in the revised version submission letter, and they need to be described in detail, explaining their rationale.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the authorship criteria should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical support, collaboration of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support).

Conflict of Interest

Authors are required to include a statement disclosing any potential conflicts of interest. Animal Reproduction considers potential conflicts of interest any event of a personal, commercial, political or academic nature, whether or not involving financial compensation.

Funding disclosure statement

All financial support received must be disclosed by all authors. Use the author's initials followed by a short description and include the funding agency's name and grant identification number(s), in that order. Research ethics and publication malpractice

Authors, Editors and Reviewers are expected to follow the highest level of ethics throughout research, data acquisition and processing, and manuscript writing, evaluation and publishing.

During the evaluation stages authors, reviewers and editors should report to the Editor-in-Chief whenever they observe a potential conflict of interest that may influence manuscript design or evaluation. Animal Reproduction considers potential conflicts of interest any event of a personal, commercial, political or academic nature, whether or not involving financial compensation. Animal Reproduction Editors will take active measures regarding any ethical or misconduct concerns either during evaluation or after publication. Whenever necessary, issues will be investigated according to the Committee on Publication Ethics (COPE) flowcharts available at <https://publicationethics.org/>.

As of 2019, Animal Reproduction will actively scan submitted manuscripts using the Similarity check (<https://www.crossref.org/services/similarity-check/>) system provided by CrossRef.

Authors, Reviewers and Editors are encouraged to report any suspected research ethics or publication malpractice issue using the journals contact page or by directly writing to the CBRA Publications or Scientific Affairs directors.

All reports of suspected misconduct will be investigated and, when required, corrections, retractions or expressions of concern will be published.

Human and animal rights

Authors must include a statement detailing compliance with guidelines and/or ethical approval in the material and methods section of the manuscript. Editors might request authors to send a copy of the official letter of approval from the ethics committee. Authors are encouraged to conform to the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines for reporting animal studies, available at <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>. Clinical trials are not the focus of the Journal; however, preclinical trials and use of animals in the experiments will be critically evaluated to avoid animal suffering and verifying that animal rights are being respected. In researches involving pets or whenever required, authors should collect and archive a signed informed consent form from the pet owner.

Reporting Guidelines

Authors are encouraged to follow good practices when designing and writing their work. Animal Reproduction recommends authors to seek appropriate guidelines on the type of study they are reporting and suggests the following resources, as stated on the [ICMJE - International Committee of Medical Journal Editors](#):

- **ARRIVE** (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) for reporting animal studies,
- **PRISMA** for systematic reviews and meta-analyses,
- **STARD** for studies of diagnostic accuracy, and
- **EQUATOR Network** and the NLM's **Research Reporting Guidelines and Initiatives** for other guidelines.

Furthermore, review manuscripts should describe the methods used for locating, selecting, extracting, and synthesizing the data.

Manuscript preparation guidelines

Units of measurements

Units of measurements must be used according to the International System of Units.

Abbreviations and Symbols

Abbreviations, acronyms and Symbols should be avoided, unless widely adopted. When using acronyms or abbreviations, their meaning should be fully spelled upon their first occurrence in the text.

Cover Letter

Filename: **coverletter.doc**

The cover letter must be uploaded in the submission system at the appropriate step, and should include the following elements:

Manuscript presentation

A brief presentation describing the research, highlighting why the authors believe it is suited for publication in *Animal Reproduction*. This presentation should also mention if the manuscript has already undergone evaluation by other journals and, if so, the final decision letters and reports must be uploaded in the submission system under the “Supplemental file NOT for Review”.

Data sharing statement

The authors' statement regarding deposit and availability of raw data should indicate whether the data is available and how it can be obtained. If data cannot be made available, authors should state the reason for that.

Copyright Agreement Form

Filename: **agreement.doc**

As stated in our policies, the copyright remains with the authors. However, the corresponding author is required to upload the “Animal Reproduction Authorship Responsibility, Copyright and Publishing License Agreement” (available at [this link](#)) signed on behalf of all authors.

This file must be uploaded in the submission system under the “Supplemental File NOT for Review” designation.

Main Document

Filename: **manuscript.doc**

The main document file for the manuscript must be formatted using Microsoft Word© 2010 or more recent. Pages must be set to A4 (21.0 x 29.7) size, with 3 cm margins, using Times New Roman font size 12 without unnecessary formatting, double spaced, with numbered lines and pages. Sections and subsection titles should use the built-in Heading Styles.

The main document must be structured as described in the following sections:

1. Title page

The first page of the manuscript must include the following information.

Article type

Indicate the same article type as selected in the submission system: Basic Research Article, Biotechnology Article, Applied Research Article, or Review Article.

Running title

No more than 50 letters, including spaces.

Manuscript Title

The title should be succinct but include the study design and major findings.

Title words should be in bold, with only the first letter of the first word in uppercase.

Authorship byline

The full names of all authors are to be listed below the title. Follow each name with superscript Arabic numerals to indicate their affiliations, and include the ORCID URL of all authors in parenthesis. An asterisk (*) must be used to indicate the corresponding author.

Example:

Rex Rex A. Hess^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0003-2345-6789>), Kay Carnes² (<https://orcid.org/0000-0002-2345-6789>), Luiz Renato França^{3*} (<https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>)

⇒ Authors who do not have an ORCID must register at <https://orcid.org>.

Affiliations

Author affiliations should be listed below the authors' names using the same superscript Arabic numerals used in the byline. The affiliation list must include only institutions where each author actually carried out work related to the article.

Names of Institutions should be written in their original language or English when not in Roman alphabet.

Example:

¹ Full Institution Name, Department, City, State, Country

² Nome da Instituição no seu Idioma de Origem, Department, City, State, Country

³ Full Institution Name, Department, City, State, Country

Correspondence information

The Corresponding author's name, email and postal address should be listed after the affiliations and identified with an asterisk (*).

Example:

* Correspondence: Full Author Name, e, corresponding@author.email.com, full postal address.

2. Abstract

The purpose of the work must be clearly and briefly stated and include the methods and summarized conclusions. Word number limit: 300 words.

3. Keywords

Keywords should be listed after the abstract. Maximum of five keywords.

4. Introduction

This section should provide background information leading to the hypothesis tested. It should end with a very brief statement of the objectives of the work.

5. Methods

The methods should include the design of the study, type of materials involved, number of animals per group, a clear description of all methods used and/or clear references to published methods, and the type of analysis used.

Information about registration and ethics committee approval must be insert at the end of this section, including a complete description of data and location where the experiment was conducted, and required authorizations for animal or animal tissue obtained.

6. Results

Main results found should be clearly and objectively stated. This section may be broken into subsections with short, informative headings.

7. Discussion

This section may be broken into subsections with short, informative headings. The discussion should be focused on the results found. It is recommended that the main conclusions supported by the research data be stated as a last paragraph.

8. Conclusion

Main conclusions supported by the research data and discussion must be clearly and objectively stated.

9. Acknowledgments

Collaborators that do not meet the authorship criteria as stated in our policies should be mentioned in this section if they have granted their permission.

10. References

The references section must begin on a new page and follow the Vancouver style, as described ahead. All references must be cited and the correctness of all information is the author's responsibility.

11. Tables

A set of alphanumeric data that is organized in lines and columns. All tables must be included at the end of manuscript, each on a separate page. Tables must be as simple as possible, and only horizontal lines should be used at the top and bottom of the table. Table cells must never be split with diagonal lines. The table legends must precede it and start with the word “Table” followed by its number in Arabic numerals. Tables must be cited in the text as Table 1, Table 2, etc., in the order that they are included. All abbreviations or annotations should be explained in footnotes; if necessary, symbols should be used to include the explanations (*, †, ‡, §, etc.).

12. Figures and figure legends

Any illustration that contains line drawings, photographs, graphics, schemes, flowcharts, etc. should be cited as figures. Each figure should be identified and submitted in a separate high-resolution file, making sure that the smallest text is perfectly readable. The list of figure legends should begin on a new page at the end of the manuscript. Figures must be cited in the numerical order that they are listed; e.g., Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc.

When necessary, authors are responsible to collect appropriate authorization to use images, pictures and illustrations from other sources according to their original copyright owner and include proper citation.

References and citation style

The references section must follow the Vancouver style. A small sample of the most commonly used bibliographic references is included ahead. An extensive list with many more examples and details is available at http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

All references must be cited and the correctness of all information is the author's responsibility.

References must be listed first in alphabetical order, then by year using lower case letters to differentiate references of the same authors and year. Use “in press” only when formal acceptance has been granted.

Text citations

All references must be cited using the Author-Date style as shown in the following examples:

1. sole author: (Ginther, 1992) or Ginther (1992).
2. two authors: (Varley and Foxcroft, 1990) or Varley and Foxcroft (1990).
3. more than two authors: (Quintero et al., 2000) or Quintero et al. (2000).
4. more than one paper cited: (Varley and Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal et al., 1999a, b; Quintero et al., 2000) or Varley and Foxcroft (1990); Ginther (1992); Gastal et al. (1999a, b); Quintero et al. (2000), always cited in ascending chronological order.

Reference style sample list

For ARTICLES IN JOURNALS:

- Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biol Reprod.* 1999a;61(3):724-30. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod61.3.724>. PMID:10456850.
- Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. *Theriogenology.* 1999b;52(5):803-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00173-9). PMID:10735121.
- Hess RA, Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod.* 2004;1:5-30.
- Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod.* 2004;1:86-90.
- Varley MA, Foxcroft GR. Endocrinology of lactating and weaned sow. *J Reprod Fertil Suppl.* 1990;40:47-61. PMID:2192052.

For BOOKS, DISSERTATIONS AND CONFERENCES:

- Basrur PK, Kochhar HS. Inherited sex abnormalities in goats. In: Youngquist RS, Threlfall WR, editors. *Current therapy in large animal theriogenology.* Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 590-4.
- Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects.* 2nd ed. Cross Plains: Equiservices Publishing; 1992. p. 105-72.
- Leal MC. *Análise morfológica e funcional do testículo e eficiência espermatogênica em Sagüis Callithrix penicillata (Primates: Callitrichidae)* [dissertation]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004. Portuguese.
- Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. Effect of season on LH concentrations and LH pulse dynamics in mares located in the tropics. In: *Abstracts of the 14th International Congress on Animal Reproduction; 2000 Jul 2-6; Stockholm, Sweden.* Stockholm: ICAR; 2000. p. 290.

For ELECTRONIC DOCUMENTS:

CD-ROM:

- Anderson SC, Poulsen KB. *Anderson's electronic atlas of hematology* [CDROM]. 2nd version. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 1 CDROM: color, 4 3/4 in.

Journal article on the Internet:

- Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2019 Jul 25];102(6):[about 3 p.]. Available from:

https://journals.lww.com/ajnonline/Abstract/2002/06000/Quality_Improvement_Initiative_in_Nursing_Homes.31.aspx. Monograph on the Internet:

- Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site:

- Cancer Pain [homepage on the Internet]. New York: American Cancer Society; 2019 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physicalsideeffects/pain.html>.

Part of a homepage/Web site:

- AMA [homepage on the Internet]. Chicago: American Medical Association; 19952019. What's healthy dying? 6 steps on the path for doctors to know; 2019 Jul 22 [cited 2019 Jul 25]; [about 2 screens]. Available from: <https://www.amaassn.org/delivering-care/ethics/what-s-healthy-dying-6-stepspath-doctors-know>. Open database on the Internet:
- Who's Certified [database on the Internet]. Alexandria (VA): American Board of Facial Plastic and Reconstructive Surgery; 2019 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <https://www.abfprs.org/certified/disclaimer>.

Closed database on the Internet:

- Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly, Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2001 [cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Part of a database on the Internet:

- MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2002. Meta-analysis; unique ID: D015201; [cited 2003 Jun 10]; [about 3 screens]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

For NON PUBLISHED WORK:

- It should be mentioned only in the text, and not in the list of references.

For VERBAL INFORMATION:

- References concerning unpublished data and “personal communications” should not be cited in the reference list, but should be mentioned in the text. After the information, the author must write the expression “verbal information” or “personal communication”.

Manuscript Submission

All manuscripts must be submitted using the online submission system available at <https://mc04.manuscriptcentral.com/ar-scielo>.

Data sharing policies

Animal Reproduction is developing its data sharing policies with the [TOP \(Transparency and Openness Promotion\) Guidelines](#) in mind.

As of July 2019, Animal Reproduction is encouraging authors to deposit their research data into the relevant data repository and include a citation and link to the dataset in the submitted articles. If this is not possible, authors should make a statement in the Cover Letter explaining why research data cannot be shared.

Corrections and retractions policy

Animal Reproduction fully endorses the ICMJE recommendations regarding scientific misconduct and is committed to publishing corrections when problems are detected in published information that affect the publication record and/or its scientific accuracy.

Editors will follow the ICMJE recommendations and the procedures detailed by the Committee on Publication Ethics (COPE) when suspected misconduct arises, before or after publication. CBRA Scientific Affairs and Publications Directors might be called to assist with the investigation but final decision to publish corrections, expressions of concern, or retracting published articles will be made by the Editor-in-Chief.

Authors, Reviewers and Editors are encouraged to report any suspected research ethics or publication malpractice issue using the journals contact page or by directly writing to the CBRA Publications or Scientific Affairs directors.