

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Efeitos da exposição gestacional ao herbicida Calaris® no desenvolvimento
pós-natal da próstata ventral de ratos Wistar**

João Victor Leles Faria
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

JOÃO VICTOR LELES FARIA

Efeitos da exposição gestacional ao herbicida Calaris® no desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos Wistar

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariana Machado Neves

Coorientador: Luiz O. Guimarães Ervilha

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F224e Faria, João Victor Leles, 1999-
2026 Efeitos da exposição gestacional ao herbicida Calaris® no desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos Wistar / João Victor Leles Faria. – Viçosa, MG, 2026.
1 dissertação eletrônica (67 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariana Machado Neves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2026.
Referências bibliográficas: f. 51-66.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.231>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ratos - Reprodução. 2. Toxicologia reprodutiva.
3. Pesticidas. 4. Disruptores endócrinos. 5. Estresse oxidativo.
6. Ratos - Morfogênese. 7. Próstata. I. Neves, Mariana
Machado, 1977-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 599.352

JOÃO VICTOR LELES FARIA

Efeitos da exposição gestacional ao herbicida Calaris® no desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos Wistar

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2026.

Assentimento:

João Victor Leles Faria
Autor

Mariana Machado Neves
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 19/05/2026 às 16:02:52 e pela orientadora em 19/05/2026 às 16:11:40. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **18A7.BOTJ.D31R** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wagner e Luciene, pelo apoio ao longo de toda a minha vida como estudante, por todo amor e suporte. Nada disso seria possível sem vocês.

Aos meus avós, Natalino, Noeme, Lenir e Cida, por todo carinho e por participarem da minha infância enquanto meus pais estavam ausentes.

Aos meus irmãos, Ana Laura e Thiago, por estarem sempre ao meu lado e por ressignificarem o conceito de família.

À minha namorada, Fabi, por me dar forças para continuar, por acreditar em mim e pelo carinho inigualável. Te amo!

À minha família, por toda admiração e incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução Animal e Toxicologia (LARAT), os patinhos. Em especial ao Luiz Otávio, por todos os ensinamentos e broncas do seu jeito peculiar.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Mariana, pela orientação excepcional e pela confiança no meu trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação. A seus funcionários e professores, por todos os ensinamentos e orientações.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

FARIA, João Victor Leles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2026. **Efeitos da exposição gestacional ao herbicida Calaris® no desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos Wistar.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientador: Luiz Otávio Guimarães Ervilha.

O uso crescente de herbicidas na agricultura tem ampliado a exposição ambiental a compostos potencialmente tóxicos, incluindo formulações comerciais cuja toxicidade combinada ainda é pouco compreendida. O Calaris®, composto por atrazina e mesotriona, é amplamente utilizado no controle de plantas daninhas no Brasil. Porém, seus efeitos sobre o sistema reprodutor masculino, especialmente após exposição gestacional, permanecem sem investigação. Considerando a sensibilidade do período intrauterino à programação do desenvolvimento prostático, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição gestacional ao Calaris® sobre a próstata ventral de filhotes aos 28, 44 e 70 dias de idade. Ratos Wistar prenhes foram expostas a doses baixas (2 mg Kg^{-1}) e altas (20 mg Kg^{-1}) da mistura de herbicidas durante a gestação. Após o desmame, os filhotes machos foram eutanasiados nas diferentes idades para coleta da próstata ventral (CEUA 32/2023). Fragmentos do órgão foram avaliados quanto a parâmetros histopatológicos, histomorfométricos e oxidativos. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA unidirecional e Tukey ao nível de significância $p = 0,05$. Animais de 28 dias de idade expostos à maior dose apresentaram maior concentração de proteínas carboniladas e malondialdeído, menor percentual de lúmen e maior percentual de epitélio, com presença de células apoptóticas. Já ratos com 44 dias de idade expostos à maior dose de Calaris® apresentaram maior concentração de malondialdeído e alterações morfológicas, como maior proporção epitelial e do lúmen, descamação epitelial, marginação leucocitária e atrofia glandular. Animais adultos (70 dias de idade), na maior dose, apresentaram alterações histológicas como atrofia glandular, pregueamento epitelial, marginação leucocitária, infiltrado inflamatório, descamação e apoptose, seguidas por menor proporção luminal, menor atividade de superóxido dismutase e maior quantidade de mastócitos. Podemos concluir que Calaris®, especialmente quando administrada na maior dose, foi capaz de rebalancear precocemente o equilíbrio redox e desencadear modificações estruturais progressivas na próstata ventral ao longo do desenvolvimento pós-natal. Esses achados reforçam a importância de investigar os efeitos de formulações comerciais completas, além de evidenciar a vulnerabilidade do período gestacional na programação de alterações tardias no sistema reprodutor masculino.

Palavras-chave: mistura de pesticidas; disruptores endócrinos; morfogênese prostática; estresse oxidativo

ABSTRACT

FARIA, João Victor Leles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2026. **Effects of gestational exposure to the herbicide Calaris® on the postnatal development of the ventral prostate in Wistar rats.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: Luiz Otávio Guimarães Ervilha.

The increasing use of herbicides in agriculture has increased environmental exposure to potentially toxic compounds, including commercial formulations whose combined toxicity is still poorly understood. Calaris®, composed of atrazine and mesotrione, is widely used for weed control in Brazil. However, its effects on the male reproductive system, especially after gestational exposure, remain uninvestigated. Considering the sensitivity of the intrauterine period to prostate development programming, this study aimed to evaluate the effects of gestational exposure to Calaris® on the ventral prostate of pups at 28, 44, and 70 days of age. Pregnant Wistar rats were exposed to low (2 mg Kg^{-1}) and high doses of the herbicide mixture (20 mg Kg^{-1}) during gestation. After weaning, male pups were euthanized at different ages for collection of the ventral prostate (CEUA 32/2023). Fragments of the organ were evaluated for histopathological, histomorphometric, and oxidative parameters. The data were submitted to one-way ANOVA and Tukey tests at a significance level of $p = 0.05$. Animals aged 28 days exposed to the highest dose showed higher concentrations of carbonyl proteins and malondialdehyde, a lower percentage of lumen, and a higher percentage of epithelium, with the presence of apoptotic cells. Rats aged 44 days exposed to the highest dose of Calaris® showed higher concentrations of malondialdehyde and morphological changes, such as a higher proportion of epithelium and lumen, epithelial desquamation, leukocyte margination, and glandular atrophy. Adult animals (70 days old) exposed to the highest dose showed histological changes such as glandular atrophy, epithelial folding, leukocyte margination, inflammatory infiltrate, desquamation, and apoptosis, followed by a lower luminal proportion, lower superoxide dismutase activity, and a higher number of mast cells. We can conclude that Calaris®, especially when administered at the highest dose, was able to rebalance the redox balance early and trigger progressive structural changes in the ventral prostate throughout postnatal development. These findings reinforce the importance of investigating the effects of complete commercial formulations, in addition to highlighting the vulnerability of the gestational period in programming late changes in the male reproductive system.

Keywords: pesticide mixture; endocrine disruptors; prostate morphogenesis;
oxidative stress

SUMÁRIO

Sumário

1. Introdução geral e justificativa	9
2. Revisão de literatura	10
3. Justificativa	22
4. Objetivos.....	22
5. Materiais e métodos.....	23
6. Resultados	29
7. Discussão	44
8. Conclusão.....	50
9. Referências.....	51

1. Introdução geral

O uso de herbicidas consolidou-se como um dos pilares da agricultura moderna, contribuindo para o aumento da produtividade e a viabilização de cultivos em larga escala em regiões com condições climáticas desfavoráveis ou solos de menor qualidade (Gianessi, 2013). Esses compostos têm papel inegável na segurança alimentar global, ao permitir colheitas mais eficientes e economicamente viáveis. Contudo, o benefício agrônômico vem acompanhado de impactos crescentes na saúde humana e de outros animais, uma vez que o uso intensivo de herbicidas favorece sua dispersão no solo, na água e na cadeia alimentar. Em consequência, além das gramíneas e ervas daninhas, organismos não-alvo, tais como animais silvestres e seres humanos, são expostos a esses agentes químicos. A estabilidade de muitos herbicidas no ambiente e sua capacidade de bioacumulação suscitam preocupações substanciais quanto aos efeitos deletérios sobre a saúde humana e de outros animais (Gore et al., 2015).

Nesse contexto, destaca-se o herbicida comercial Calaris[®], uma mistura contendo atrazina, mesotriona e adjuvantes, desenvolvida pela Syngenta com o intuito de ampliar a eficácia no controle de gramíneas e plantas daninhas de folhas largas, especialmente em culturas como milho e sorgo (Qu et al., 2021). Estudos têm documentado efeitos deletérios da atrazina em zooplânctons, peixes, anfíbios e répteis, com poucas informações quanto a danos em mamíferos (Hanson et al., 2019; Shim et al., 2022; Araújo et al., 2023). A maioria dos trabalhos disponíveis avalia atrazina e mesotriona de forma isolada, e há uma lacuna crítica no conhecimento sobre os possíveis efeitos sinérgicos ou aditivos dessa mistura em organismos não-alvo, particularmente durante fases sensíveis do desenvolvimento.

Sabe-se que a atrazina pode induzir estresse oxidativo, alterar a expressão gênica e provocar disfunções em múltiplos órgãos, incluindo músculo esquelético, fígado e sistema nervoso central (Lim et al., 2009; Li et al., 2018; Das et al., 2023). No sistema reprodutor masculino, a atrazina tem sido associada a efeitos antiandrogênicos e pró-estrogênicos, redução da espermatogênese, atrofia de túbulos seminíferos, alterações hormonais e até proliferação de células tumorais na próstata (Hu et al., 2016; Abarikwu et al., 2015; Durand et al., 2020; Pandey et al., 2021). Já a mesotriona, embora menos investigada, tem mostrado potencial para induzir estresse oxidativo e danos ao DNA em organismos aquáticos (Piancini et al., 2015). Há pouquíssimos estudos abordando seus efeitos em mamíferos, o que reforça a necessidade de investigações mais abrangentes.

Determinados grupos populacionais são particularmente vulneráveis à exposição a pesticidas, incluindo crianças, idosos e gestantes, devido a diferenças metabólicas, capacidade

reduzida de detoxificação e maior sensibilidade a agentes disruptores endócrinos (Street et al., 2021). Durante a gestação, o organismo materno e o feto formam um sistema interdependente altamente sensível. No geral, os contaminantes podem ser encontrados no líquido amniótico, na placenta, no plasma fetal, no leite e no sangue do cordão umbilical. Dessa forma, os herbicidas podem ser transferidos da mãe para o feto, afetando o desenvolvimento intrauterino (Ikezuki et al., 2002; Wigle et al., 2008). A exposição a estes compostos nesse período pode comprometer processos fundamentais de desenvolvimento, como proliferação celular, diferenciação tecidual e estabelecimento de eixos hormonais, aumentando o risco de alterações funcionais e estruturais que podem se manifestar ao longo da vida pós-natal (Griffiths et al., 2022). Nesse cenário, torna-se essencial compreender não apenas os efeitos diretos desses herbicidas em indivíduos adultos, mas também suas consequências quando a exposição ocorre em janelas críticas do desenvolvimento.

2. Revisão de literatura

2.1. Pesticidas e herbicidas

Pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias, químicas ou biológicas, destinadas a prevenir, destruir, repelir ou mitigar organismos considerados pragas, incluindo insetos, plantas daninhas, fungos e outros agentes que interferem na produção ou qualidade de produtos agrícolas e na saúde pública (FAO, 2025; US EPA, 2025). Os pesticidas são usados desde o ano 2500 a.C. pelos sumérios para o controle de insetos, e, até o fim de 1870, o controle de pragas era feito por compostos de origem animal, vegetal ou mineral (Tudi et al., 2021). Com a ascensão da agricultura, a qual demandava milhares de hectares para ser praticada, foram desenvolvidos compostos sintéticos com ação pesticida mais eficiente (Bernardes et al., 2015). Em 2022, o uso de pesticidas na agricultura extrapolou a marca de 3,70 milhões de toneladas, sendo 42,48% deles herbicidas e o restante inseticidas, fungicidas, nematicidas, moluscicidas, rodenticidas e avicidas (Bernardes et al., 2015; FAO, 2022). Os defensivos agrícolas são compostos cruciais para as práticas de agricultura, otimizando colheitas em larga escala e tornando os alimentos acessíveis e baratos. Além disso, os defensivos agrícolas são essenciais em áreas com condições climáticas adversas e ajudam a reduzir a fome em regiões com escassez de alimentos (Gianessi, 2013). Entretanto, o uso descontrolado desses compostos pode causar riscos significativos aos organismos que vivem próximos a áreas em que os defensivos agrícolas estão atuando (Saha & Dutta, 2024). Em contexto global, o uso excessivo de herbicidas torna-

se um problema de saúde pública, agravado por sua estabilidade química, facilidade de incorporação no ambiente celular e capacidade de perturbação endócrina (Gore et al., 2015).

Dentre os grupos de herbicidas mais usados mundialmente destacam-se os herbicidas fenoxiacéticos, triazinas, glicinas, tricetonas e sulfonilureias. Os herbicidas fenoxiacéticos como o 2,4-diclorofenoxiacético e o ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético, atuam como auxinas sintéticas e reguladores de crescimento que combatem ervas daninhas de folhas largas em lavouras, pastagens e gramados (Islam et al., 2018; Blachnio et al., 2023). Os herbicidas triazinas, como a atrazina e a simazina, são utilizados desde 1950 e também atuam no controle de gramíneas e ervas daninhas de folha larga na agricultura (Ahmad et al., 2023; Manousi et al., 2022). A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um pó inodoro, levemente alcalino e solúvel em água amplamente utilizado no controle de gramíneas e ervas daninhas, atuando através da inibição do fotossistema II. Este herbicida está presente em mais de 70 países e é o segundo mais utilizado no mundo, com um consumo anual estimado em 80 mil toneladas (Deng et al., 2024). Embora seja removido do ambiente por meio da absorção por plantas e solo, degradação microbiana e hidrólise química, sua estrutura química, rica em átomos de nitrogênio no anel aromático, contribui para sua persistência e toxicidade (Boopathy, 2017).

O glifosato é a base do herbicida RoundUp® e é o principal herbicida do grupo das glicinas (Peillex & Pelletier, 2020). Juntamente com adjuvantes, o glifosato penetra nas folhas das plantas e as leva à morte, por esse motivo, ele é geralmente usado antes de ocorrer a plantação de interesse (Van Bruggen et al., 2018). No grupo das tricetonas destaca-se o herbicida desenvolvido pela Syngenta®, a mesotriona [2-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)-5-[[[(metilsulfinil)carbamoil]amino]benzoico]. Este composto é usado para o controle de plantas daninhas de folhas largas por meio da inibição da enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, responsável pela produção de pigmentos fotossintéticos (Mitchell et al., 2001). Aplicada em culturas agrícolas como milho, sorgo, algodão e batata, a mesotriona é altamente solúvel em água, o que eleva seu potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas (Ni et al., 2014). Por fim, o grupo das sulfonilureias é composto por herbicidas como o tribenuron-metil, o qual possui capacidade de inibir enzimas que produzem proteínas em plantas, prejudicando o crescimento celular (Palma-Bautista et al., 2022).

2.2. *Disruptores endócrinos e placentários*

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), os disruptores endócrinos compreendem um grupo amplo e heterogêneo de substâncias exógenas capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação de hormônios endógenos, alterando a homeostase endócrina materna e fetal (Kavlock et al., 1996). Durante a gestação, a exposição a esses compostos pode se dar por meio da cadeia alimentar, da pele ou do trato respiratório. Posteriormente, esses compostos podem atingir o sangue, líquido amniótico, leite materno, urina e placenta (Shekhar et al., 2017; Maitre et al., 2018). A exposição a disruptores endócrinos na gestação é particularmente preocupante, pois ocorre em um período crítico de programação do desenvolvimento fetal, no qual pequenas perturbações hormonais podem resultar em efeitos persistentes como aumento do risco de doenças metabólicas, cardiovasculares, reprodutivas e neurocomportamentais na vida adulta (Plante et al., 2022). Estudos indicam que, além de atuarem diretamente sobre o feto, muitos disruptores endócrinos exercem seus efeitos iniciais e determinantes por meio da placenta, caracterizando também seu papel como disruptores placentários (Tang et al., 2020; Gingrich et al., 2020).

A placenta apresenta elevada sensibilidade à ação de disruptores endócrinos devido à abundante expressão de receptores hormonais, enzimas esteroideogênicas e sistemas de transporte, tornando-se um alvo central da toxicidade endócrina ambiental (Gingrich et al., 2020). Alterações placentárias induzidas por esses compostos incluem disfunções na esteroideogênese, estresse oxidativo, alterações epigenéticas, prejuízos na diferenciação e invasão trofoblástica, além de comprometimento do remodelamento vascular uterino, processos essenciais para a manutenção da gestação e o adequado suprimento fetal (Martínez-Razo et al., 2020; Gonçalves et al., 2022; Yan et al., 2023).

Entre as classes de disruptores endócrinos mais amplamente estudadas, destacam-se os bisfenóis, produtos químicos sintéticos amplamente utilizados na produção de plásticos de policarbonato, papel térmico e resinas epóxi (Eckardt & Simat, 2017). O bisfenol mais estudado é o bisfenol A, um sólido incolor capaz de contaminar o ser humano por ser encontrado em embalagens de muitos produtos alimentícios do cotidiano (Hartle et al., 2016). Dados experimentais *in vivo* e epidemiológicos mostram que a exposição gestacional ao bisfenol A está associada a alterações na metilação global do DNA placentário, modulação da expressão de receptores hormonais nucleares e aumento de apoptose em células trofoblásticas (Nahar et al., 2014; Strakovsky & Schantz, 2018). Essas alterações estão correlacionadas a fenótipos gestacionais adversos, como restrição de crescimento intrauterino e características semelhantes à pré-eclâmpsia, frequentemente atribuídas a falhas no remodelamento das artérias endometriais (Ye et al., 2018; Müller et al., 2018). No recém-nascido, o bisfenol A atua como

um antagonista do receptor de andrógeno e inibe a atividade transcricional induzida por 5 α -dihidrotestosterona (DHT), afetando o desenvolvimento e a função do sistema reprodutivo masculino (Tang et al., 2020). O estudo de Timms et al. (2005) mostrou que camundongas prenhes, expostas a 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de bisfenol A por dia, tiveram filhotes com desenvolvimento anormal da próstata, apresentando disrupção no controle celular permanente e aumento do risco de câncer de próstata quando adultos.

Os ftalatos são disruptores endócrinos e placentários plastificantes amplamente utilizados para aumentar a flexibilidade e maleabilidade de plásticos de produtos de higiene pessoal, peças automotivas, brinquedos infantis, embalagens de alimentos e materiais de construção (Mikula et al., 2005). A exposição materna a ftalatos tem sido associada a modificações no metiloma e no transcriptoma placentário humano, com metilação de genes como o fator de crescimento de insulina 2 (IGF2), sugerindo um papel importante desses compostos na reprogramação epigenética intrauterina (Grindler et al., 2018). Essas alterações podem impactar a expressão de genes envolvidos no transporte placentário, na resposta inflamatória e na sinalização hormonal, contribuindo para desfechos gestacionais adversos e possíveis efeitos de longo prazo na prole como doenças cardiovasculares, criptorquidismo e câncer (Tang et al., 2020). De fato, Grindler et al. (2018) identificaram 39 genes diferentes com metilação alterada na placenta de mulheres do estado do Colorado (EUA) após exposição a ftalatos. Além disso, os ftalatos aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo pela ativação do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos com posterior combinação com o receptor X retinoide (RXR; Zhao et al., 2012; Shoaito et al., 2019)

Os pesticidas organoclorados, como o diclorodifeniltricloroetano, representam exemplos clássicos de disruptores endócrinos persistentes, bioacumulativos e capazes de atravessar a barreira placentária (Grindler et al., 2018; Tang et al., 2020). Chen et al. (2024) demonstraram que a exposição de machos ao diclorodifeniltricloroetano levou à disfunção da invasão trofoblástica na placenta de camundongos fêmeas não expostas. Além disso, os autores observaram comprometimento do remodelamento das artérias espiraladas, estresse oxidativo, alteração na esteroidogênese placentária e alterações na expressão de genes relacionados com a invasão trofoblástica e remodelamento vascular, esteroidogênese e sinalização hormonal. Adicionalmente a exposição aos pesticidas organoclorados gestacionalmente mostrou-se associada às disrupções nos hormônios tireoidianos, infertilidade masculina, baixo peso ao nascer, distúrbios hipertensivos da gestação e maior susceptibilidade a doenças metabólicas na vida pós-natal (Freire et al., 2011; Bonde et al., 2016; Tang et al., 2020).

Ainda no contexto de disruptores placentários, os compostos perfluorados utilizados como matéria-prima de painéis antiaderentes e roupas impermeáveis também vêm sendo implicados em alterações placentárias relevantes (Gingrich et al., 2020). Estudos apontam para a associação dos compostos perfluorados à pré-eclâmpsia, redução do peso fetal e placentário, aumento da corticosterona sérica fetal e inibição da atividade da 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase (Li et al., 2016; Gingrich et al., 2020).

2.3. Interface materno-fetal: papel da placenta durante o desenvolvimento fetal

A interface materno-fetal se forma durante a gestação com o objetivo de permitir a troca eficiente de nutrientes, gases, metabólitos e sinais hormonais entre a mãe e o embrião/feto, ao mesmo tempo em que preserva a integridade imunológica de ambos (Bauer et al., 1998). Essa interface é formada principalmente pela placenta, órgão transitório, porém fundamental, que exerce funções metabólicas, endócrinas, imunológicas e vasculares essenciais para o desenvolvimento fetal adequado (Soares et al., 2012). As placentas de mamíferos podem ser classificadas como epiteliocorial, endoteliocorial ou hemocorial, de acordo com a relação entre o córion e a parede uterina (Furukawa et al., 2014). Humanos e roedores apresentam placentação do tipo hemocorial, em que o sangue materno entra em contato direto com o trofoblasto fetal, o que maximiza a eficiência das trocas materno-fetais, mas também aumenta a vulnerabilidade do feto à exposição a fatores ambientais adversos, incluindo contaminantes químicos e disruptores endócrinos (Furukawa et al., 2011). Dessa forma, a placenta deixa de ser apenas uma barreira passiva e passa a ser reconhecida como um alvo primário de toxicidade gestacional, além de um mediador crítico dos efeitos sistêmicos da exposição intrauterina (Furukawa et al, 2011).

A parte fetal da placenta de ratos é organizada em duas zonas: a zona labiríntica e a zona juncional. A zona labiríntica é o principal local de trocas materno-fetais, onde sinusoides cheios de sangue materno passam diretamente pelo septo do trofoblasto sem passar por endotélio (Furukawa et al, 2011). O sangue fetal e o materno encontram-se em estreita proximidade, em função da extensa superfície de contato formada pelos numerosos microvilos do citotrofoblasto e da presença de capilares fetais fenestrados, facilitando a troca de substâncias entre mãe e feto (Fig.1; Metz et al., 1976). Ao mesmo tempo, forma-se uma barreira placentária composta por duas camadas de sinciciotrofoblasto do lado sinusoide materno unidas por junções gaps (Wooding & Burton, 2008). Já a zona juncional ou basal, abriga diferentes linhagens de células trofoblásticas especializadas, como os espongiotrofoblastos, células ricas em glicogênio, células trofoblásticas invasivas e principalmente as células trofoblásticas gigantes que desempenham função estrutural, sintetizam e secretam hormônios e citocinas da família da prolactina (Soares et al., 2012). Essas populações celulares desempenham funções endócrinas e estruturais cruciais para a manutenção da gestação e para a adaptação do útero materno às demandas fetais (Wooding & Burton, 2008).

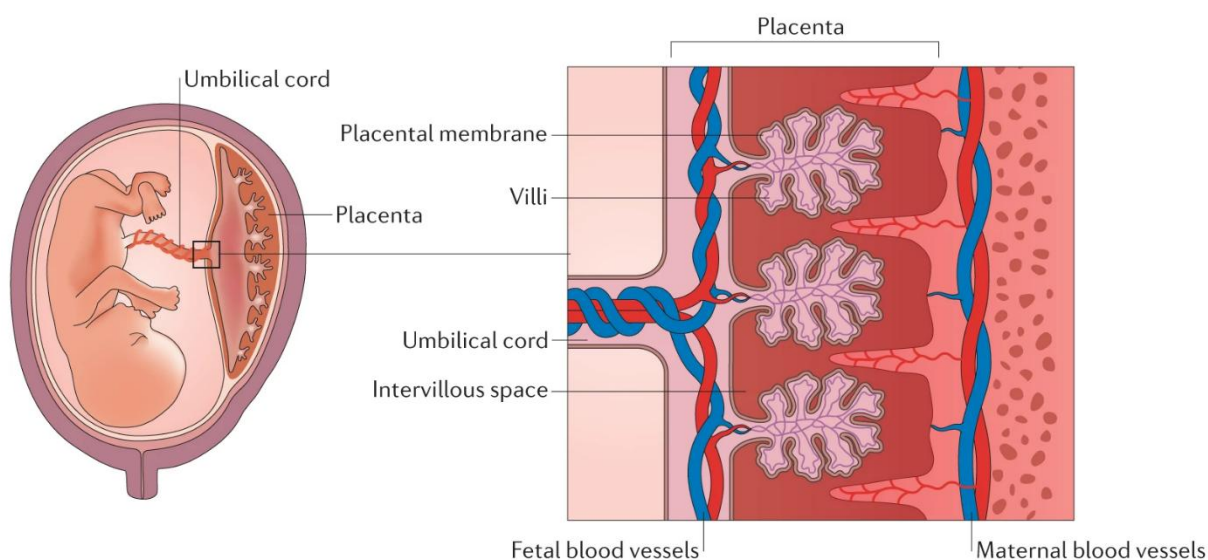


Figura 1. Desenho esquemático da estrutura da interface materno-fetal. Fonte: adaptado de Megli & Coyne, 2021.

Um dos eventos centrais da interface materno-fetal em placentas hemocoriais é o remodelamento das artérias espiraladas uterinas, processo pelo qual vasos de alta resistência são transformados em condutos de grande calibre e baixa resistência, garantindo fluxo sanguíneo adequado para o crescimento fetal, entrega adequada de nutrientes e proteção contra exposição inadequada a espécies reativas de oxigênio (Burton, 2009). A remodelação das

artérias espiraladas uterinas envolve a reestruturação de todos os componentes arteriais, incluindo endotélio, membrana basal e músculo liso. Falhas nessa remodelação estão associadas com doenças na gravidez que causam seu término prematuro (Soares et al., 2012). No rato, esse remodelamento ocorre em duas ondas coordenadas. A primeira onda ocorre na metade da gestação, quando células *natural killer* maternas estabelecem forte relação com as artérias espiraladas uterinas formando a glândula metrial que promove a produção de interferon γ , óxido nítrico e fatores de crescimento angiogênicos (Wang et al., 2001; Ashkar & Croy, 2001; Burnett et al., 2002). A segunda onda é dependente da invasão de células trofoblásticas endovasculares no interior das artérias espiraladas mediada principalmente pela proteína TAFP2C (Dominguez et al., 2024). Uma vez dentro dos vasos, essas células facilitam a erosão das artérias, permitindo que o sangue materno flua diretamente para os trofoblastos, otimizando a troca de nutrientes (Red-Horse et al., 2004).

Embora tradicionalmente considerada uma barreira protetora, a placenta é hoje reconhecida como um órgão metabolicamente ativo, capaz de expressar enzimas de biotransformação, transportadores de efluxo e influxo, além de receptores hormonais e nucleares (Covarrubias et al., 2023). Essas características conferem à placenta a capacidade tanto de modular quanto de amplificar os efeitos de substâncias químicas ambientais sobre o feto (Bloom et al., 2022). Estudos experimentais em ratos demonstram que alterações no ambiente materno como desnutrição, hipóxia, inflamação, estresse hormonal ou exposição a agentes disruptores endócrinos, resultam em mudanças significativas na organização da zona juncional, na profundidade da invasão trofoblástica e na eficiência do remodelamento vascular (Rosário et al., 2008; Hayes et al., 2014; Zhang et al., 2015; Ye et al., 2018; Roberts et al., 2021). Essas alterações, por sua vez, impactam a disponibilidade de oxigênio, nutrientes e hormônios para o feto em fases críticas do desenvolvimento, incluindo a formação da próstata (Covarrubias et al., 2023).

2.4. Morfologia e histologia da próstata

A próstata de ratos é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino, cuja principal função é a produção e secreção de componentes do fluido seminal que contribuem para a liquefação do sêmen, ciclo de coagulação e motilidade espermática (Verze et al., 2016). Essas funções específicas estão associadas a três fatores presentes no fluido prostático, como caliceínas, citrato e zinco (Zn^{2+}). O Zn^{2+} torna-se o mediador principal para funções prostáticas, uma vez que ele inibe a oxidação do citrato em isocitrato no ciclo de Krebs. O

acúmulo de citrato nas células epiteliais, por sua vez, é secretado no fluido prostático e serve como substrato energético crítico para os espermatozoides, aumentando sua produção de ATP (Medrano et al., 2006). Além disso, o Zn^{2+} inibe a ação das caliceínas por ligação alostérica reversível (Verze et al., 2016). Ao ocorrer a ejaculação, o fluido prostático se mistura às secreções das vesículas seminais, ricas em semenogelinas, uma proteína com alta afinidade por Zn^{2+} . Dessa forma, o Zn^{2+} deixa de se ligar às caliceínas e inicia-se o processo de liquefação do sêmen (Kalinska et al., 2016).

A regulação endócrina da próstata é feita pelos hormônios esteroides sexuais masculinos, através do receptor de andrógeno, que atua como um fator de transcrição ativado por ligantes (Verze et al., 2016). Na próstata, a testosterona é convertida pela enzima 5α -redutase em DHT, que possui uma afinidade de ligação com o receptor de andrógeno. A DHT regula centenas de genes associados à homeostase prostática, incluindo o próprio gene do receptor de andrógeno (Verze et al., 2016). Os andrógenos controlam transportadores de zinco, como ZIP1-4 e ZnT1-10, que regulam o acúmulo e liberação intraprostática de Zn^{2+} . Adicionalmente, os andrógenos controlam o acúmulo de citrato, bem como a inibição do ciclo de Krebs, a expressão das caliceínas, especialmente o PSA e a caliceína 2 (Verze et al., 2016).

Em roedores, a próstata é organizada em quatro lobos distintos e, de acordo com suas posições em relação à uretra, são denominados como lobos ventral, dorsal, lateral e anterior (Oliveira et al., 2016). A próstata lateral é formada por dois lobos situados bilateralmente à uretra. A próstata dorsal localiza-se na base das vesículas seminais. Os lobos anteriores da próstata, ou glândulas coagulantes, são translúcidos e posicionam-se bilateralmente na curvatura côncava das vesículas seminais (Oliveira et al., 2016). O lobo ventral é o mais proeminente da próstata de roedores e localiza-se ventralmente à uretra e caudal à bexiga, envolvendo parcialmente a porção ventral da uretra, onde desembocam seus ductos (Oliveira et al., 2016). Adicionalmente, a próstata ventral é o lobo mais sensível a alterações relacionadas a andrógenos e tem a capacidade de se regenerar completamente após reversão de privação androgênica (Colombel & Buttyan, 1995). Em razão dessas características, a próstata ventral é o lobo mais utilizado em estudos relacionados à disrupção endócrina.

Histologicamente, os lobos da próstata de roedores contêm glândulas exócrinas tubuloalveolares compostas por células epiteliais prismáticas secretoras voltadas para o lúmen, células basais e células neuroendócrinas, sendo as duas últimas, menos frequentes (Ginja et al., 2019). Cada lobo é envolvido por uma fina cápsula de mesotélio e cada ácino é separado por uma fina camada de tecido conjuntivo composto de células do estroma, fibras de colágeno, células musculares lisas, vasos sanguíneos, nervos, gânglios, macrófagos e mastócitos (Ginja

et al., 2019). Os lobos prostáticos possuem características histológicas distintas entre si. A próstata ventral apresenta ácinos moderados a grandes, revestidos por epitélio cúbico a colunar simples, com núcleos basais e pequenos nucléolos, pregueamento epitelial brando e uma fina camada fibromuscular ao redor dos ácinos. O lúmen contém secreção serosa homogênea pálida. A próstata dorsal possui ácinos menores, revestidos por epitélio cúbico a colunar, com pregueamento moderado e estroma relativamente denso. As células epiteliais secretoras contêm núcleos centrais e citoplasma levemente eosinofílico e granular, com secreção luminal homogênea e eosinofílica. A próstata lateral é revestida por epitélio cúbico a colunar baixo com pouco pregueamento, lúmen de tamanho variável contendo secreção eosinofílica e células secretoras com núcleos basais em citoplasma eosinofílico menos granular que o da próstata dorsal. Por fim, a próstata anterior apresenta ácinos complexos com estruturas papilares ou cribriformes, epitélio cúbico, secreção luminal abundante e eosinofílica homogênea, núcleos centrais com nucléolos pouco evidentes e uma camada fibromuscular mais espessa ao redor dos ácinos (Oliveira et al., 2016; Ginja et al., 2019).

2.5. Desenvolvimento embrionário da próstata

O desenvolvimento embrionário da próstata em mamíferos se inicia no período fetal e se estende até a maturidade sexual. Em ratos, a próstata se origina no 13º dia após a concepção a partir do seio urogenital, uma estrutura derivada do endoderma da cloaca, circundada por um mesênquima de origem mesodérmica (Seifert et al., 2008). Essa mesma organização embrionária inicial é observada em humanos, evidenciando uma conservação da organogênese prostática entre espécies, apesar de diferenças temporais e morfológicas (Hamilton et al., 1959).

Durante o desenvolvimento embrionário de ratos, o seio urogenital é indistinguível entre machos e fêmeas até os dias embrionários 17 e 18. A diferenciação sexual do seio urogenital ocorre tardiamente na gestação, quando há um aumento da produção de andrógenos pelos testículos fetais (Marker et al., 2003). A presença de andrógenos circulantes é indispensável para o desenvolvimento prostático, uma vez que, na ausência de sinalização androgênica funcional, o seio urogenital não forma próstata, mesmo em indivíduos geneticamente masculinos (Meeks & Schaeffer, 2011).

O evento morfológico característico da organogênese prostática é mediado por sinalização parácrina para o epitélio do seio urogenital a partir do mesênquima do seio urogenital (Timms et al., 1994). Esse processo envolve a formação de brotos epiteliais sólidos do epitélio do seio urogenital para dentro do mesênquima do seio urogenital circundante,

iniciando o crescimento do tecido e a formação de um sistema de ductos por mediação de receptores de andrógeno (Toivanen & Shen, 2017). Nesse processo, andrógenos derivados da testosterona fetal são convertidos em DHT pela enzima 5 α -redutase (Prins & Putz, 2008). Esse intervalo da formação de ductos é considerado uma janela crítica de vulnerabilidade, pois o epigenoma das células germinativas e somáticas passa por um processo de reprogramação, de modo que variações sutis no ambiente hormonal podem desencadear alterações permanentes na organização estrutural da próstata e nos perfis de expressão gênica (Prins, 2008).

2.6. *Desenvolvimento pós-natal da próstata ventral*

Os brotos epiteliais do epitélio do seio urogenital, ao longo do período pós-natal inicial, irão crescer e se ramificar, dando origem aos diferentes lobos prostáticos típicos dos roedores: anterior, ventral, dorsal e lateral (Marker et al., 2003). Cada lobo possui padrões específicos de ramificação, histologia e expressão de proteínas secretoras (Sugimura et al., 1986). Dentre esses lobos, o presente trabalho tem como foco o lobo ventral da próstata, amplamente utilizado como modelo experimental por apresentar elevada sensibilidade à sinalização androgênica e por exibir características morfofuncionais bem definidas (Zhang et al., 2024).

Nas primeiras duas a três semanas após o nascimento em ratos, concomitantemente ao crescimento dos brotos epiteliais, ocorre o processo de citodiferenciação epitelial e mesenquimal (Marker et al., 2003). As células epiteliais indiferenciadas dos brotos prostáticos em desenvolvimento se diferenciam em cordões de células basais e luminais pela coexpressão das citoqueratinas 5, 8, 14 e 18 e do fator de transcrição p63 (Wang et al., 2001). À medida que o desenvolvimento progride, esses cordões se alongam no mesênquima circundante e sofrem canalização, formando o lúmen ductal (Sugimura et al., 1986). Esse alongamento é mediado pelas células mesenquimais que produzem o fator de crescimento de fibroblastos 10, que orienta a migração e ramificação dos brotos epiteliais (Sanchez et al., 2021).

A formação dos ductos inicia-se a partir da porção uretral dos cordões epiteliais e avança distalmente até suas extremidades (Marker et al., 2003). Nesse processo, o epitélio da próstata ventral se reorganiza em duas populações de células: células epiteliais basais que expressam citoqueratinas 5 e 14 e p63 formando uma camada descontínua de células ao longo da membrana basal, e células epiteliais secretoras que expressam citoqueratinas 8 e 18 e revestem os lúmens dos ácinos prostáticos (Hayward et al., 1996a). Simultaneamente à citodiferenciação epitelial, o mesênquima/estroma da próstata se diferencia em camadas de músculo liso que envolvem os ductos (Hayward et al., 1996b). Essa diferenciação é mediada pelo fator de

crescimento transformador beta-1 secretado pelos telócitos, um tipo celular estromal que estabelece uma rede de prolongamentos que conecta o epitélio às células estromais e as células estromais entre si, ajudando na organização e compartimentação do estroma (Sanchez et al., 2021).

No desenvolvimento pós-natal, a próstata ventral apresenta mudanças morfofuncionais marcantes que refletem diferentes estágios de maturação (Fig. 2). Aos 28 dias pós-natal (DPN), a próstata já teria passado pelo primeiro pico de proliferação celular e pela formação inicial do lúmen glandular que ocorre depois da segunda semana após o nascimento. Neste período, as concentrações de testosterona séricas se encontram baixas, e o peso da próstata aumenta à medida que o peso do indivíduo aumenta (Vilamaior et al., 2006). Aos 28 DPN, o epitélio prostático apresenta altura moderada, o lúmen ainda é relativamente pequeno e a atividade secretora é incipiente, indicando que a glândula ainda não atingiu plena maturidade funcional (Vilamaior et al., 2006). Aos 44 DPN (fase puberal), a próstata ventral atravessa um estágio de transição entre um estado de relativa quiescência e o segundo pico de proliferação celular. Esse período é caracterizado por remodelação tecidual, refinamento da arquitetura glandular e início mais evidente da atividade secretora (Vilamaior et al., 2006). O volume epitelial torna-se maior, há um pico de atividade mitótica, o lúmen começa a expandir-se progressivamente, o volume das células musculares lisas do estroma diminui e a dependência da sinalização androgênica torna-se ainda mais pronunciada, uma vez que ocorre a elevação dos níveis circulantes de testosterona, a qual exerce papel central na maturação prostática (Donjacour & Cunha, 1988; Vilamaior et al., 2006; Verze et al., 2016). Aos 70 DPN, a próstata ventral atinge um estágio de maior maturidade estrutural e funcional, típico do início da vida adulta jovem. Nessa fase, finaliza-se o segundo pico de proliferação das células epiteliais, em que é possível observar dobramentos no tecido epitelial. Dessa forma, observam-se epitélio secretor plenamente diferenciado, lúmen amplamente expandido e acúmulo significativo de secreção prostática, refletindo a consolidação da função glandular (Fig.3). À medida que a próstata ventral chega à fase adulta, os dobramentos epiteliais diminuem e o volume do lúmen aumenta para dar espaço à secreção produzida pelas células prismáticas secretoras (Vilamaior et al., 2006).

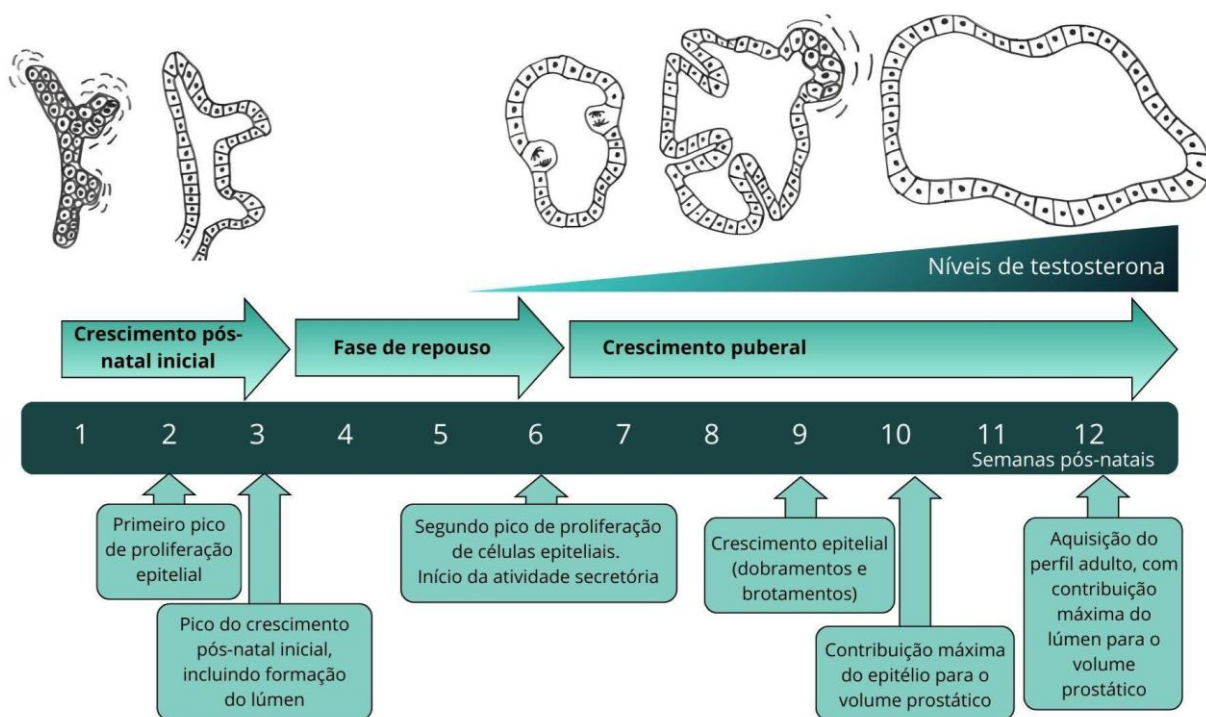


Figura 2. Diagrama esquemático de eventos que ocorrem durante 12 semanas do desenvolvimento da próstata ventral de ratos. Fonte: adaptado de Vilamaior et al., 2006.

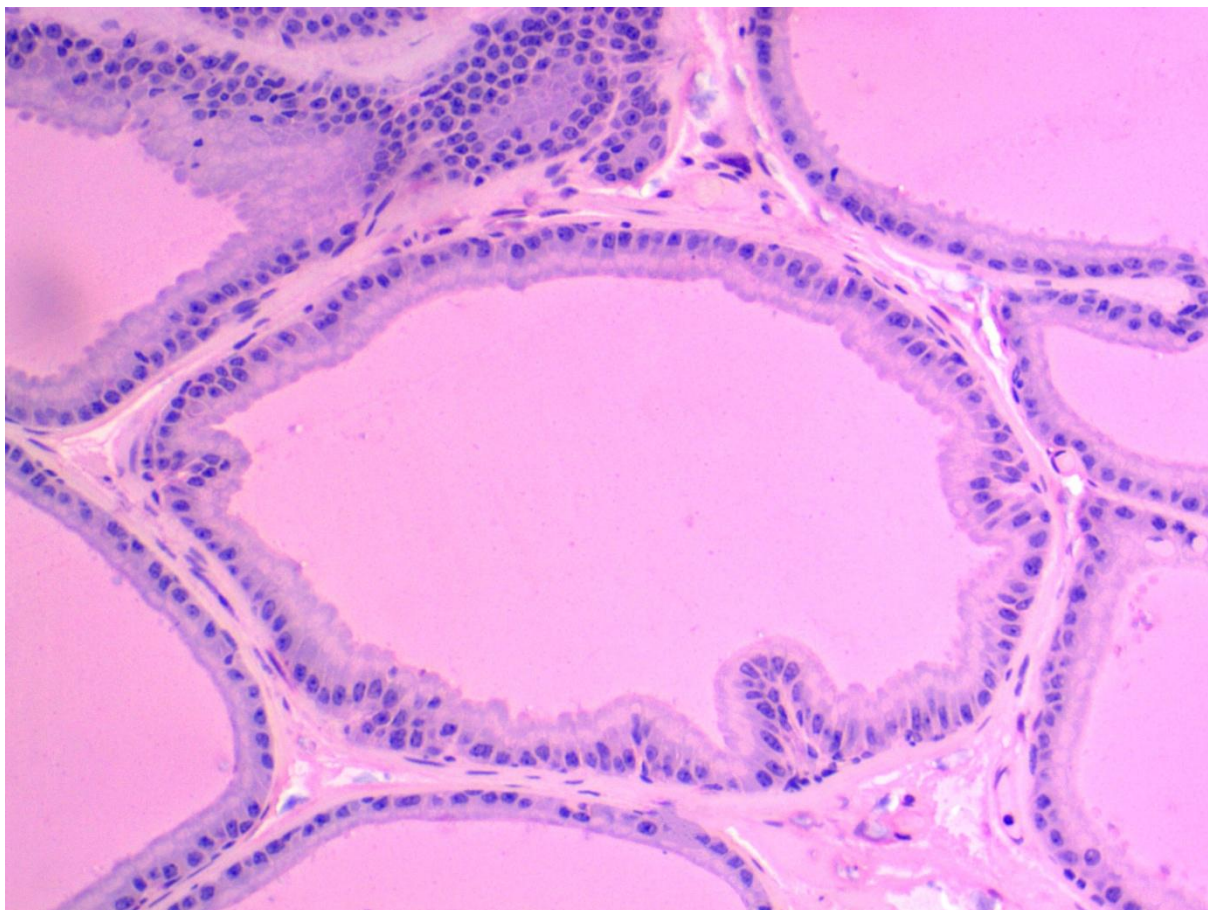


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico corado por HE da próstata ventral de rato Wistar. O corte apresenta um exemplo da histologia padrão do órgão sem quaisquer patologias. Fonte: elaboração própria.

3. Justificativa

Não há informação na literatura sobre os efeitos da mistura de atrazina e mesotriona sobre órgãos reprodutivos masculinos, especialmente sobre a próstata, apesar das evidências de danos causados por esses agentes quando expostos de forma isolada. Considerando que a próstata é altamente sensível a variações hormonais e a agentes tóxicos, levanta-se a hipótese de que a exposição gestacional ao Calaris® pode interferir na programação do desenvolvimento pós-natal da próstata ventral. Essa interferência pode se manifestar de forma distinta em momentos do desenvolvimento, tornando-se mais evidente na vida jovem-adulta, quando esta glândula atinge maturidade estrutural e funcional. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da exposição gestacional ao herbicida Calaris® sobre o desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos Wistar. Para testar essa hipótese, foram usadas análises microscópicas e de estresse oxidativo em glândulas de ratos com 28, 44 e 70 dias de idade. Os resultados desse estudo podem contribuir com o conhecimento inicial sobre potenciais mecanismos envolvidos na toxicidade transplacentária e na programação de alterações prostáticas decorrentes dessa exposição.

4. Objetivos

4.1. *Objetivo geral*

Investigar os efeitos da exposição gestacional ao herbicida Calaris® sobre o desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos Wistar aos 28, 44 e 70 dias de idade.

4.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a organização tecidual da próstata de filhotes com 28, 44 e 70 dias de idade expostos ao Calaris® no período gestacional e identificar possíveis patologias relacionadas a esta exposição.
- Investigar alterações histomorfométricas no parênquima da próstata ventral de filhotes expostos à mistura de atrazina e mesotriona, tais como: proporção de epitélio, estroma e lúmen, quantificação de colágeno e mastócitos.

- Quantificar marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO) proteínas carboniladas (PC) e a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST) na próstata ventral de ratos expostos ao Calaris[®] no período gestacional.

5. Materiais e métodos

5.1. Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar fêmeas adultas em idade reprodutiva (70 dias) e 15 machos em idade reprodutiva provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob temperatura (21 °C) e fotoperíodo (12h claro/escuro) controlados, sendo ofertadas ração comercial e água *ad libitum*. Este estudo foi realizado seguindo as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética Animal da UFV (processo CEUA número 32/2023).

5.2. Design experimental

Animais foram aclimatados durante dez dias e colocados para o acasalamento natural na proporção de duas fêmeas para um macho (2:1). Os animais foram mantidos juntos por 72 h, sendo realizada citologia vaginal a cada 24 h para verificar a presença de espermatozoides no esfregaço. Uma vez encontrados espermatozoides na lâmina, este fato é considerado o dia gestacional zero (DG0; Lima et al., 2018). Após o período de acasalamento, os machos foram separados e eutanasiados, enquanto as fêmeas foram alojadas individualmente em gaiolas durante o período experimental, que compreendeu as fases de gestação, parto e lactação.

A exposição das fêmeas prenhes ao herbicida ocorreu a partir do DG1, sendo feita diariamente até o momento do parto (DG21). Neste período, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais, com dez animais em cada grupo. Animais do grupo controle receberam 0,5 mL de água destilada durante o período gestacional, enquanto ratas dos grupos expostos receberam Calaris[®] (Syngenta) em duas concentrações de 2 ou 20 mg Kg⁻¹. A administração das soluções ocorreu diariamente por gavagem. As concentrações testadas foram obtidas a partir da diluição do produto comercial em solução salina (NaCl 140 mM; pH 7,4), mantendo-se o volume final de administração em 0,5 mL por animal. A dose de 2 mg Kg⁻¹ de Calaris[®] corresponde a aproximadamente 1,8 mg/kg de atrazina e 0,18 mg/kg de

mesotriona, além dos adjuvantes da formulação. Essa dose (2 mg Kg^{-1}) é próxima ao valor aceitável para ingestão diária de atrazina para humanos ($0,02 \text{ mg Kg}^{-1}$; WHO, 2011) e próxima à faixa do NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) em ratos ($1,8 \text{ mg/kg}$). Já a dose de 20 mg Kg^{-1} corresponde a 10 vezes a dose próxima aos valores de NOAEL, estabelecido em ratos. Como o presente estudo testa o uso de uma mistura da atrazina com a mesotriona, aqui não podemos afirmar que a dose de 2 mg Kg^{-1} é uma dose aceitável. Por isso, aqui, a chamaremos de dose baixa, enquanto a dose de 20 mg Kg^{-1} será considerada dose alta.

Após o nascimento, a administração da mistura comercial de herbicidas foi interrompida e a prole foi mantida com as mães até 21 dias para lactação, quando ocorreu o desmame. No DPN 3, foi feita a detecção do sexo de filhotes, visando manter mais filhotes machos, garantindo o sucesso no desenvolvimento e alimentação. Quatro filhotes machos por ninhada foram selecionados para serem analisados quanto à metodologia estabelecida. Assim, após o desmame, filhotes machos foram mantidos vivos recebendo água de beber e ração *ad libitum* até serem eutanasiados quando atingiram as idades de 28 dias, 44 e 70 dias ($n = 6/\text{idade}$). Respectivamente, essas três diferentes idades pós-natais correspondem aos períodos juvenil, peripúbere e jovem adulto (Parker & Picut, 2016; Picut et al., 2017). Portanto, ao final do experimento, filhotes machos foram analisados em três condições experimentais (controle, 2 mg Kg^{-1} e 20 mg Kg^{-1} de Calaris[®]), em três idades experimentais (DPN 28, DPN 44 e DPN 70). Essas idades permitiram realizar o acompanhamento do desenvolvimento prostático frente à exposição gestacional ao herbicida. Todo o design experimental se encontra esquematizado na Figura 4.

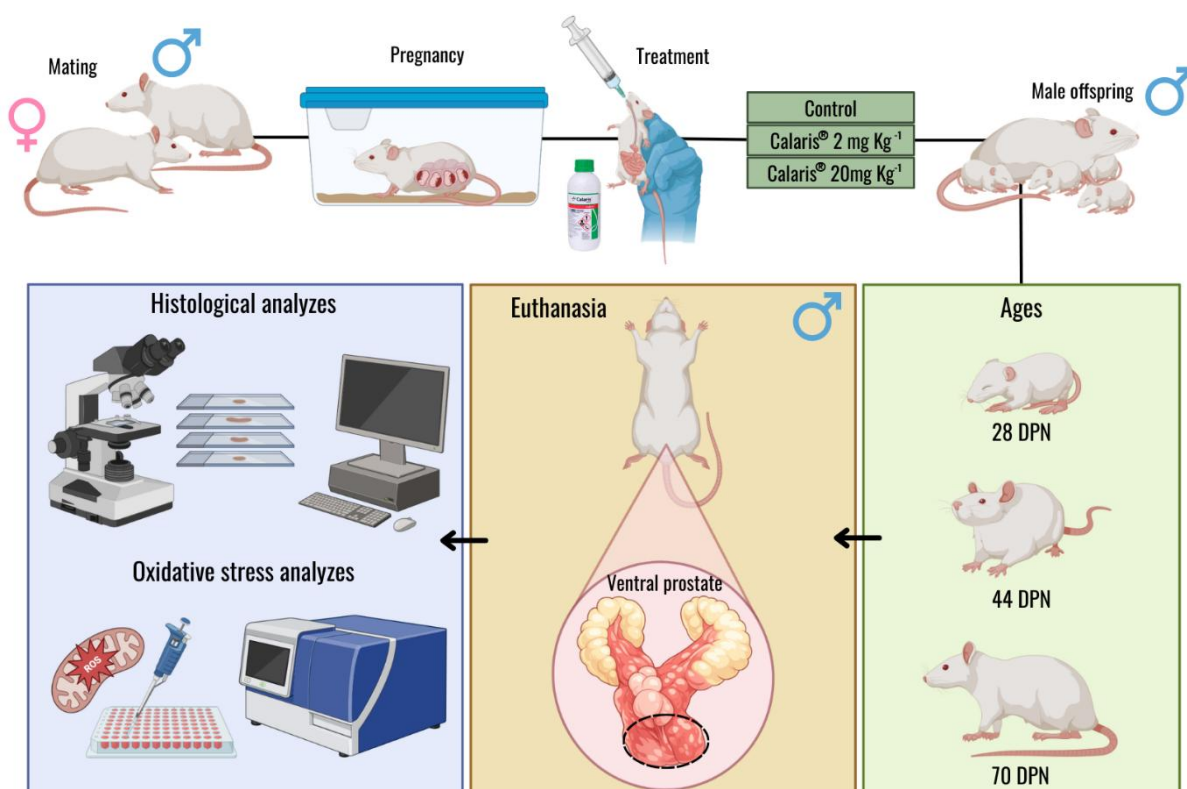


Figura 4. Desenho esquemático do experimento. Criado com auxílio parcial do Biorender.com

5.3. Eutanásia e coleta de material

A eutanásia de animais, nos tempos DPN 28, DPN 44 e DPN 70, foi realizada por meio da administração de doses altas de xilazina (30 mg Kg⁻¹, intraperitoneal) e cloridrato de cetamina (300 mg Kg⁻¹, intraperitoneal), seguida de punção cardíaca para a coleta de sangue e pesagem dos animais. A próstata ventral de 18 ratos/grupo, em cada idade experimental, foi cuidadosamente removida e dissecada. A próstata foi dividida em duas porções: uma porção foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para análises de estresse oxidativo e a outra porção foi fixada em formalina tamponada a 10% para avaliações histopatológicas e histomorfométricas.

5.4. Processamento histológico

As próstatas ventrais destinadas às análises histomorfométricas e histopatológicas foram fixadas por 24 horas em solução de formalina 10% tamponada. Fragmentos do lobo ventral da próstata foram desidratados em séries crescentes de etanol e posteriormente imersos em historesina (Historesin[®], Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Cortes de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch,

Alemanha). Para garantir a diversidade das amostras analisadas, as seções foram avaliadas em semi-série (Coimbra et al., 2024). Após a obtenção dos cortes, as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análises histopatológicas, com azul de toluidina para a quantificação de mastócitos e com o corante *Picrosirius* para análise do conteúdo de colágeno.

5.5. Análises histomorfométricas e estereológicas

Fotomicrografias do parênquima prostático, coradas com HE, foram adquiridas utilizando um microscópio de luz (Olympus BX-53, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas com os softwares Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) ou ImageJ®. Para as análises estereológicas, uma grade contendo 266 pontos foi sobreposta a dez imagens digitalizadas, totalizando 2660 pontos por animal. Foram registrados os pontos coincidentes com os componentes epitelial, estromal e o lúmen da próstata. A proporção de cada componente foi calculada utilizando a fórmula: $\text{Proporção (\%)} = (\text{número de pontos sobre cada componente} / 2660 \text{ pontos totais}) \times 100$ (Guimarães-Ervilha et al., 2025b).

A contagem de mastócitos foi realizada utilizando dez campos histológicos, selecionados aleatoriamente para cada animal (Correia et al., 2022). Os campos foram fotografados usando um microscópio (Olympus BX53, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão) e a quantificação se deu pela contagem da quantidade de mastócitos por área total do campo com uma ampliação de 200×. O corante azul de toluidina cora esse tipo celular por metacromasia de grânulos citoplasmáticos, contendo heparina e glicosaminoglicanos. Para a análise do colágeno, cortes corados com *Picrosirius* foram observados e fotografados em microscópio óptico com filtro polarizador de luz. A análise foi realizada usando o software ImageJ (Sousa et al., 2022), sendo o sistema programado para reconhecer os pixels de cores vermelha e verde, estimando a porcentagem de colágeno total no campo histológico obtido.

5.6. Atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), bem como a quantificação das concentrações de óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA), foram realizadas com o sobrenadante obtido após a homogeneização em tampão fosfato (pH 7.4) das amostras de ~100 mg dos fragmentos da próstata ventral congelados a -80°C (homogeneizador Tissue Master 125, OMNI). Os homogenatos foram

centrifugados a 10.000 xg por 20 min na temperatura de 4°C. A quantificação de proteínas carboniladas (PC) foi realizada com o *pellet* resultante da centrifugação do homogenato. A leitura das amostras foi feita em leitor de microplacas ELISA (Multiskan SkyHigh; Thermo Scientific).

5.6.1 Superóxido dismutase

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com a auto-oxidação do pirogalol, a partir da habilidade da SOD de catalisar a reação do superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Dieterich et al., 2000). A mistura reacional continha 10 μ L da amostra e 170 μ L de tampão fosfato de sódio (pH 7,8). Foram adicionados 20 μ L de pirogalol (10 mM) durante 30 min a 37°C para iniciar a reação e foi medida por absorbância a 320 nm. Os resultados foram expressos como (U)/mg de proteína, sendo U de SOD definido como a quantidade que inibiu a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50%.

5.6.2 Catalase

A atividade de CAT foi avaliada de acordo com o método de Aebi (1984) por meio da mensuração da cinética da taxa de decomposição do H_2O_2 . Em resumo, foram adicionados 100 μ L de H_2O_2 (20 mM) em 5 μ L da amostra. Depois de 3 min, foram adicionados 150 μ L de molibdato de amônio (32,4 mM) com o intuito de parar a reação. Os espaços em branco das amostras foram feitos substituindo H_2O_2 por tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4). Os valores de teste foram subtraídos dos valores em branco. Uma curva padrão foi realizada para calcular o valor CAT com a diluição serial de H_2O_2 . A leitura foi feita a 374 nm no espectrofotômetro. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína, sendo U de atividade da CAT a quantidade de enzima que decompõe 1 mmol de H_2O_2 durante 1 min.

5.6.3 Glutathione S-transferase

A atividade de GST foi calculada de acordo com a formação de 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) conjugado com glutathione (Habig et al., 1974). Para isso, foram adicionados a um tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,2) 0,1 M de CDNB, 0,1 M de GSH e 10 μ L da amostra. Com a adição de CDNB, a solução foi alterada e medida com absorbância a 340 nm por 60s nos intervalos de 30 e 90s. O coeficiente de extinção molar utilizado para CDNB foi $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$. A atividade de GST foi expressa em U/mg de proteína,

sendo U de atividade de GST a quantidade de enzima que catalisou a formação de um μmol de produto/min/mL.

5.6.4 Óxido nítrico

A produção de NO foi quantificada indiretamente a partir dos níveis de nitrito nos sobrenadantes do homogenato, usando a reação padrão de Griess (Tsikas, 2007). As amostras (50 ml) foram incubadas com um volume igual de reagente de Griess (50 ml; 1% de sulfanilamida, 0,1% de N-(1-naftil)etilenodiamina e 2,5% de H_3PO_4) à temperatura ambiente durante 10 min. O resultado foi expresso a partir da concentração de NO ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e foi determinado por meio de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–125 μM), com absorbância medida a 570 nm.

5.6.5 Malondialdeído

A análise de MDA foi feita pela avaliação da peroxidação lipídica a partir da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Buege & Aust, 1978). Resumidamente, 200 μL do sobrenadante foram adicionados em 400 μL de solução de TBARS (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e 0,25 M de HCl). Após ser deixada por 40 min em banho-maria (90°C) a reação foi resfriada em gelo e adicionados 600 μL de álcool butílico. A solução foi agitada e centrifugada a 3500 rpm durante 5 min. Uma curva padrão de concentrações pré-estabelecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano foi utilizada para determinar a concentração de MDA. Foi monitorada a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

5.6.6 Proteínas carboniladas

A concentração de PC foi mensurada baseado na presença de grupos carbonil formados a partir da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (Levine et al., 1990). As amostras foram centrifugadas e os pellets resultantes foram retirados e adicionados a 0,5 mL de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (10 mM) diluída em HCl 2M, agitados em vórtice e mantidos em temperatura ambiente no escuro. Durante 30 min a solução era agitada periodicamente. Em seguida, foram adicionados aos tubos 0,5 mL de TCA gelado a 10%, depois os tubos foram centrifugados (5000xg por 10 min a 4°C) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetato de etil e etanol (1:1 v/v) e centrifugado. Após isso, 1 mL de dodecil sulfato de sódio a 6% foi adicionado e centrifugado. O sobrenadante resultante foi

medido a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol mL^{-1} com base no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$.

5.6.7 Proteínas totais

As concentrações de proteínas totais nos órgãos foram determinadas de acordo com Bradford, (1976) usando albumina sérica bovina como padrão. O resultado foi utilizado na normalização da atividade das enzimas antioxidantes e do MDA.

5.7. Análises estatísticas

Todos os resultados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados por meio de ANOVA unidirecional, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram apresentados como médias \pm desvio padrão (DP).

6. Resultados

6.1 Parâmetros biométricos corporais e prostáticos

Ratos expostos às duas concentrações de Calaris[®] durante o desenvolvimento intrauterino apresentaram menor peso corporal que ratos controle aos 28 dias de idade ($p < 0,05$; Tabela 1). Já animais de 44 dias de idade expostos à alta dose da mistura do herbicida apresentaram menor peso corporal que ratos controle e aqueles expostos à menor concentração de Calaris[®] ($p < 0,05$; Tabela 1). O peso corporal foi menor em ratos de 70 dias de idade expostos a 20 mg Kg^{-1} do herbicida que em ratos do grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos corporais de ratos Wistar expostos ao Calaris[®] durante a gestação em duas concentrações (2 e 20 mg Kg^{-1}), avaliados em diferentes idades pós-natais (28, 44 e 70 DPN).

Peso corporal (g)	Controle	Calaris [®] (2 mg Kg^{-1})	Calaris [®] (20 mg Kg^{-1})
DPN 28	$82,09 \pm 1,27^a$	$68,44 \pm 1,21^b$	$66,89 \pm 1,77^b$

DPN 44	168,2 ± 1,23 ^a	167,3 ± 1,61 ^a	161,9 ± 0,98 ^b
DPN 70	280,3 ± 1,11 ^a	275,6 ± 2,06 ^{ab}	270,1 ± 1,61 ^b

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos de acordo com ANOVA unidirecional e teste *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$; $n=6$ animais/grupo).

6.2 Análises histológicas, estereológicas e histoquímicas

Ao analisar qualitativamente as lâminas histológicas coradas com HE de ratos do grupo controle, aos 28 dias de idade, o estroma e o parênquima da próstata ventral se mostraram íntegros, com a porção glandular formada por epitélio simples a pseudoestratificado contendo células cúbicas a prismáticas, bem como lúmen contendo secreção de aspecto eosinofílico e homogêneo (Fig. 5 A). Também foi possível observar células em divisão típicas de um órgão em desenvolvimento (Fig. 5 B, B'). Já em ratos com 28 DPN expostos ao Calaris[®] nas duas doses foram observadas células em processo de apoptose, caracterizadas por citoplasma escasso, eosinofílico, retração de células vizinhas e núcleo picnótico ou em cariorrexe (Fig. 5 C-F).

Em animais controle com 44 DPN, foi possível observar arquitetura tecidual da próstata ventral regular, com células em divisão celular (Fig. 6 A-B'). Ratos expostos à 2 mg Kg⁻¹ da mistura de herbicidas, com 44 dias de idade, apresentaram parênquima prostático contendo células epiteliais em descamação (Fig. 6 C) e alterações vasculares, identificadas por vasos sanguíneos congestionados e marginação de leucócitos, um indicativo de fase inicial de processo inflamatório (Fig. 6 D). Além disso, foram identificadas, em menor proporção, áreas de atrofia, caracterizadas por reduzida altura do epitélio glandular (Fig. 6 E). Ainda nesta idade, ratos expostos a 20 mg Kg⁻¹ de Calaris[®] também apresentaram atrofia glandular, acompanhada por mudança no aspecto da secreção prostática, que se apresentou mais rarefeita (Fig. 6 F). Neste grupo também foi possível observar a presença de marginação leucocitária (Fig. 6 G, G') e descamação das células epiteliais no lúmen do adenômero (Fig. 6 H).

Ratos controle, com 70 DPN, também apresentaram histologia normal da próstata ventral (Fig. 7 A). Já ratos expostos gestacionalmente a 2 mg Kg⁻¹ de Calaris[®] apresentaram apoptose (Fig. 7 B), atrofia glandular (Fig. 7 C), marginação leucocitária (Fig. 7 D), além de infiltrado inflamatório, caracterizado pela presença exacerbada de células de defesa no estroma da próstata (Fig. 7 D). Já ratos expostos a 20 mg Kg⁻¹ do herbicida, aos 70 DPN, apresentaram patologias na próstata ventral, como infiltrado inflamatório (Fig. 7 E), atrofia (Fig. 7 F), pregueamento e marginação leucocitária (Fig. 7 G), pregueamento (Fig. 7 H) e apoptose (Fig. 7 I).

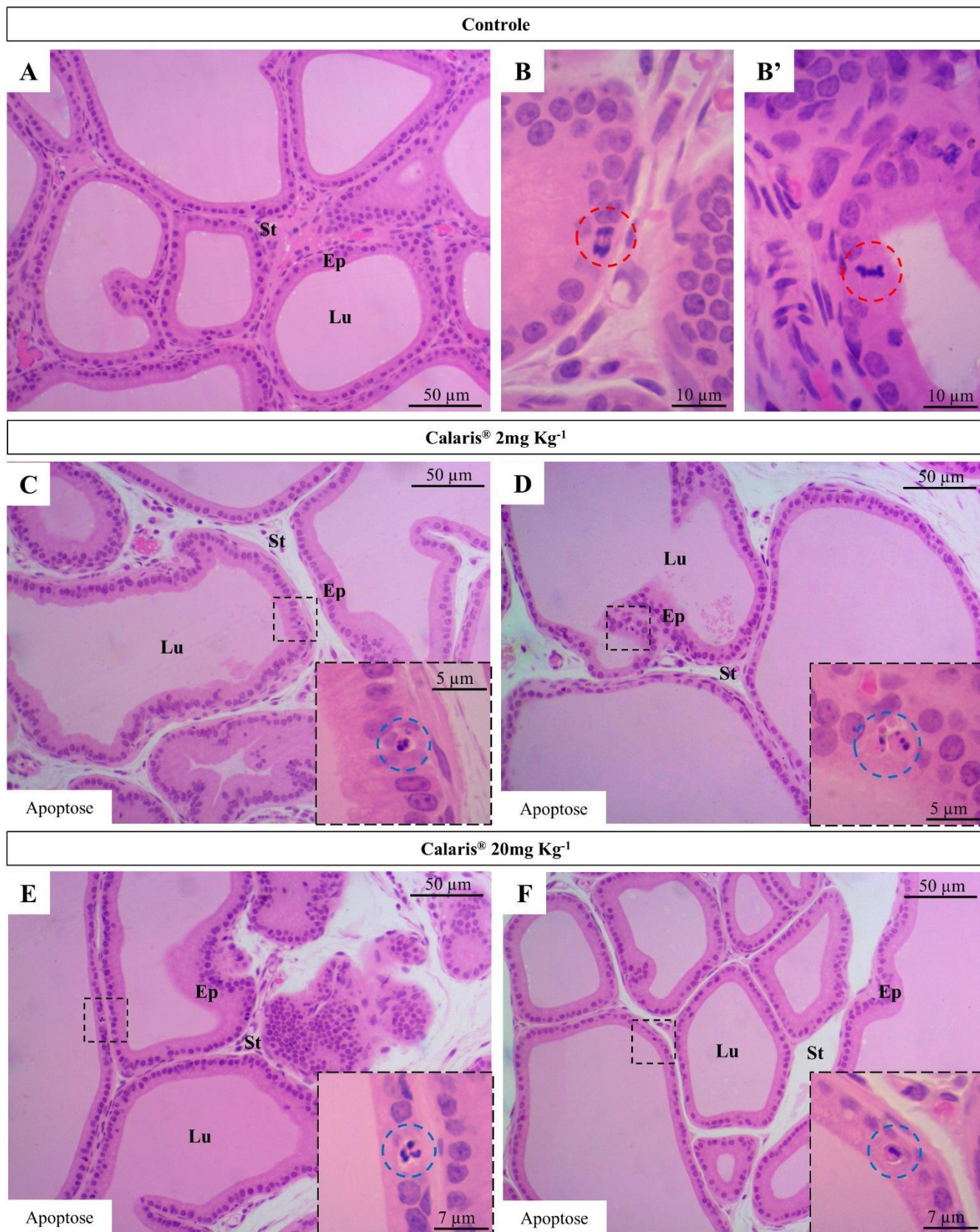


Figura 5: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados por HE da próstata ventral de ratos Wistar adultos 28 DPN controle (A-B') e submetidos ao Calaris® durante a gestação nas concentrações de 2 mg Kg⁻¹ (C, D) e 20 mg Kg⁻¹ (E, F). A) Visão geral do tecido prostático dos ratos do grupo controle. B, B') Células secretoras em divisão celular (círculo tracejado vermelho). C-F) Insertos: Células em apoptose (círculo tracejado azul). Ep = Epitélio; Lu = Lúmen; St = Estroma; Círculo tracejado vermelho = célula em divisão celular; Círculo tracejado azul = célula apoptótica. (n = 6 animais/grupo)

1

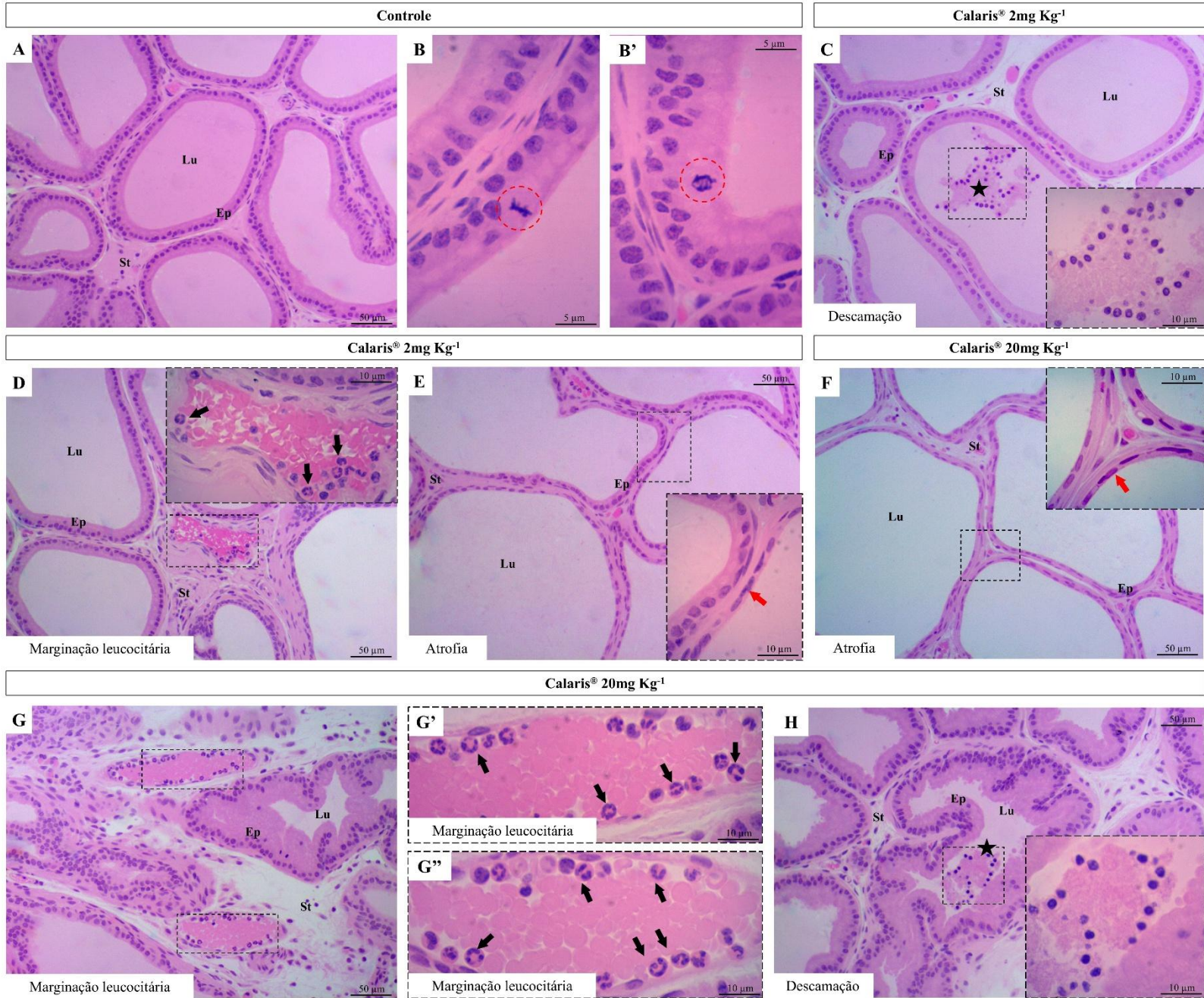


Figura 6: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados por HE da próstata ventral de ratos Wistar adultos 44 DPN controle (A-B') e submetidos ao Calaris® durante a gestação nas concentrações de 2 mg Kg⁻¹ (C-E) e 20 mg Kg⁻¹ (F-H). A) Visão geral da próstata dos ratos do grupo controle. B, B') Células secretoras em metáfase e anáfase (círculo tracejado vermelho). C, H) Descamação de células epiteliais no lúmen do adenômero (estrela). D) Vaso congesto apresentando marginação leucocitária (setas pretas). E, F) Atrofia glandular (seta vermelha). G-G'') Vaso congesto apresentando marginação, adesão e/ou rolamento leucocitário (seta preta). Ep = Epitélio; Lu = Lúmen; St = Estroma; Círculo tracejado vermelho = célula em divisão celular; Estrela = descamação de células epiteliais; Seta vermelha = atrofia epitelial; Seta preta = células inflamatórias. (n = 6 animais)

1

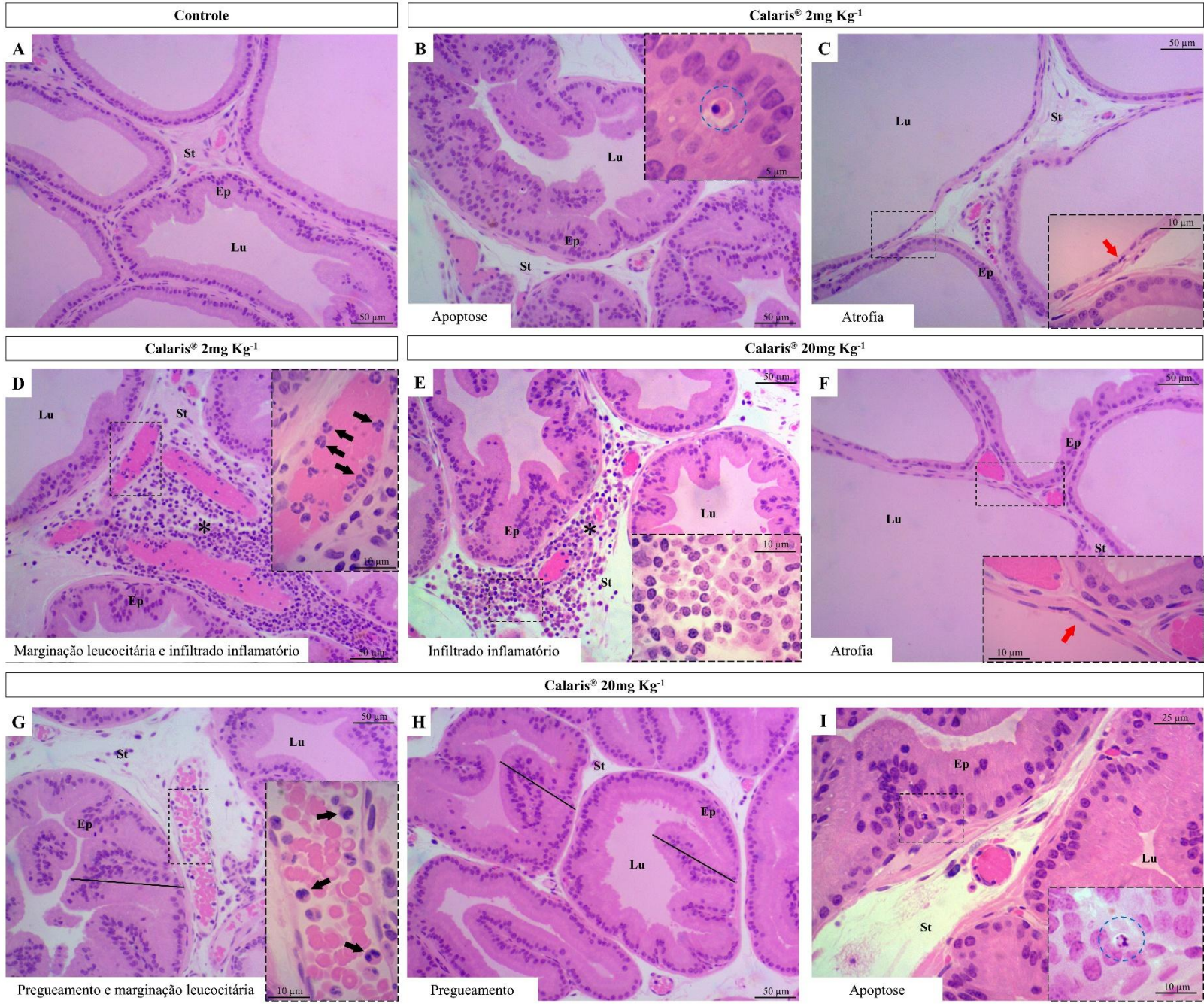


Figura 7: Fotomicrografias representativas coradas por HE da próstata ventral de ratos Wistar adultos 70 DPN controle (A) e submetidos ao Calaris® durante a gestação nas concentrações de 2 mg Kg⁻¹ (B-D) e 20 mg Kg⁻¹ (E-I). A) Visão geral da próstata dos ratos do grupo controle. B) Célula em processo de apoptose. C, F) Atrofia (seta vermelha). D) Vaso congesto apresentando marginação leucocitária (seta preta). E) Intenso infiltrado inflamatório típico de prostatite no estroma da próstata (*). G) Pregueamento epitelial e vaso congesto apresentando marginação leucocitária (seta preta). H) Pregueamento epitelial. I) Célula em processo de apoptose. Ep = Epitélio; Lu = Lúmen; St = Estroma; Estrela = descamação de células epiteliais; Seta vermelha = atrofia epitelial; Seta preta = células inflamatórias; * = infiltrado inflamatório; Círculo tracejado azul = célula apoptótica. (n = 6 animais).

Para analisar o impacto da exposição gestacional ao Calaris®, foi determinada a proporção dos componentes da próstata ventral, como epitélio, estroma e lúmen (Tabela 2). Ratos com 28 DPN apresentaram maior proporção de epitélio e menor proporção de lúmen quando expostos intrauterinamente à concentração de 20 mg Kg⁻¹ de Calaris® que ratos dos demais grupos experimentais ($p < 0,05$; Tabela 2). O percentual de estroma não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Tabela 2).

Em ratos com 44 DPN, a proporção de epitélio foi maior naqueles expostos gestacionalmente a 20 mg Kg⁻¹ do Calaris® que em animais dos outros grupos experimentais ($p < 0,05$; Tabela 2). Não houve diferença na proporção de lúmen e estroma entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; Tabela 2).

Ratos com 70 DPN apresentaram percentual de lúmen maior após a exposição intrauterina a 2 mg Kg⁻¹ do Calaris® que ratos expostos a 20 mg Kg⁻¹ ($p < 0,05$; Tabela 2). Não foram observadas alterações entre os grupos experimentais para proporção de estroma e epitélio ($p > 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros morfométricos da próstata ventral de ratos Wistar expostos ao Calaris® durante a gestação em duas concentrações (2 e 20 mg Kg⁻¹), avaliados em diferentes idades pós-natais (28, 44 e 70 DPN).

Parâmetros	Controle	Calaris® (2 mg Kg ⁻¹)	Calaris® (20 mg Kg ⁻¹)
<i>28 DPN</i>			
% Lúmen	41.74 ± 4.03 ^a	32.42 ± 4.25 ^{ab}	24.95 ± 4.25 ^b

% Estroma	18.44 ± 3.5 ^a	22.84 ± 4.43 ^a	25.67 ± 2.99 ^a
% Epitélio	39.82 ± 5.01 ^a	44.74 ± 5.88 ^{ab}	49.38 ± 3.17 ^b
<i>44 DPN</i>			
<hr/>			
% Lúmen	44.66 ± 4.92 ^a	45.88 ± 5.94 ^a	38.68 ± 4.19 ^a
% Estroma	20.04 ± 3.84 ^a	20.81 ± 4.20 ^a	20.14 ± 3.45 ^a
% Epitélio	35.30 ± 1.88 ^a	33.30 ± 2.07 ^a	41.17 ± 3.10 ^b
<i>70 DPN</i>			
<hr/>			
% Lúmen	42.95 ± 3.40 ^{ab}	49.84 ± 5.59 ^a	36.08 ± 6.81 ^b
% Estroma	41.39 ± 3.11 ^a	34.18 ± 5.57 ^a	43.80 ± 4.41 ^a
% Epitélio	15.66 ± 2.39 ^a	15.98 ± 3.01 ^a	20.12 ± 2.28 ^a

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos de acordo com ANOVA unidirecional e teste *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$; $n=6$ animais/grupo). DPN = dias pós-natal

A quantificação de colágeno utilizando *Picrosirius* não mostrou nenhuma alteração significativa na quantidade de fibras de colágeno totais em machos expostos intrauterinamente pelas duas doses da mistura de herbicidas, independentemente da idade ($p > 0,05$; Fig. 8 J). Já a contagem de mastócitos, realizada em lâminas coradas com azul de toluidina, foi maior em ratos machos com 70 DPN, expostos intrauterinamente à dose alta de Calaris[®], que ratos dos demais grupos experimentais ($p < 0,05$; Fig. 9 J). Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto ao número de mastócitos em machos com 28 e 44 DPN ($p > 0,05$; Fig. 9 J).

1

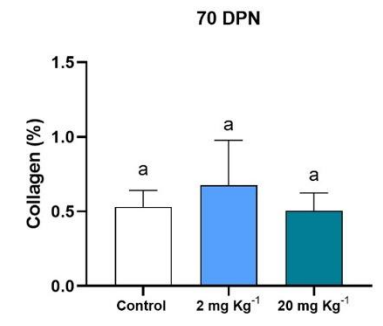
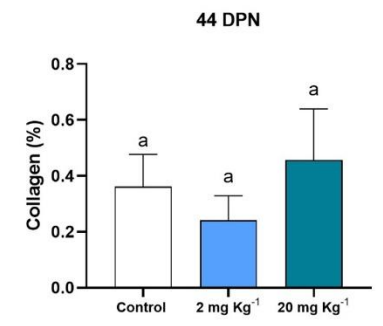
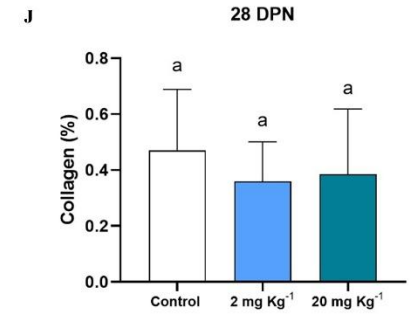
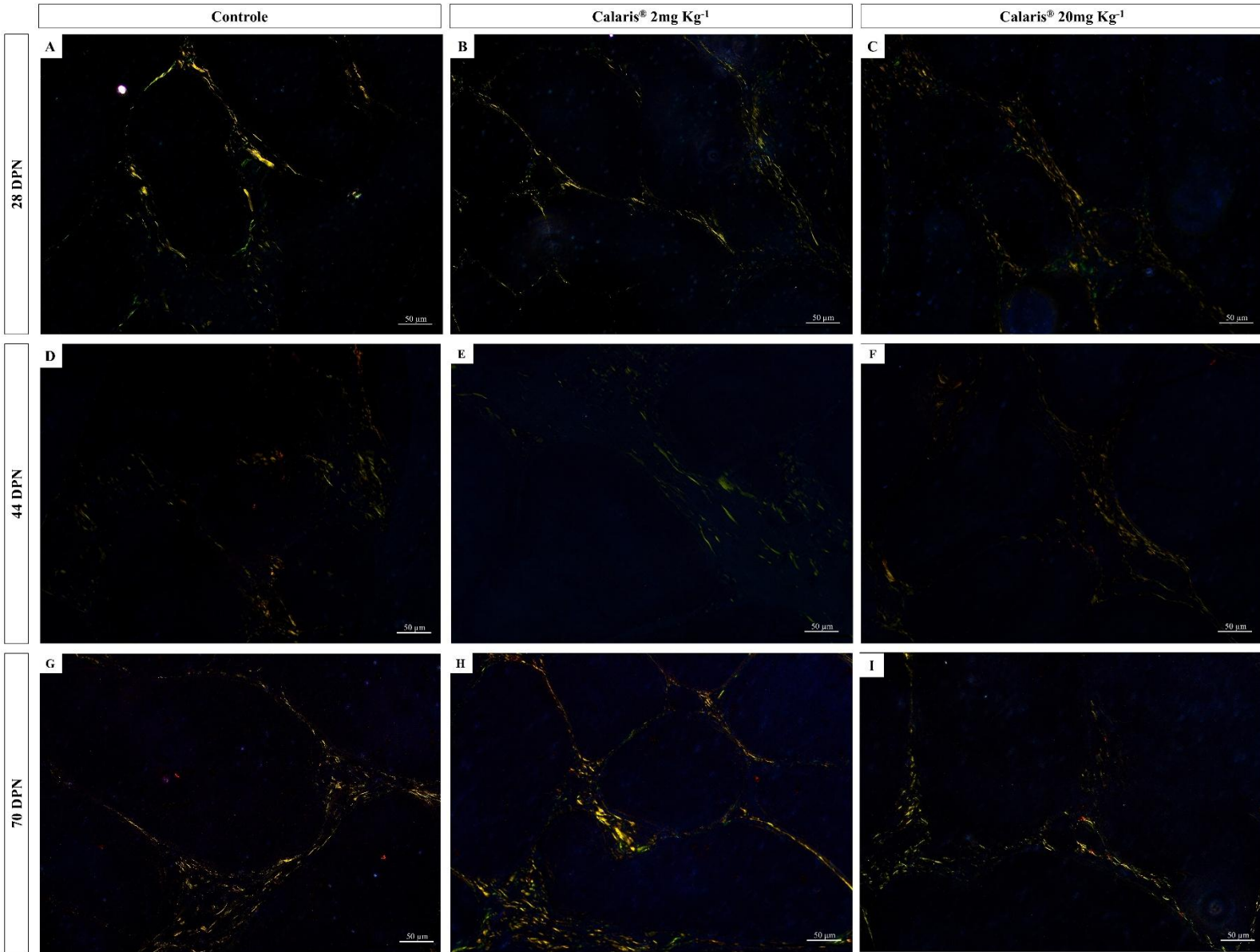


Figura 8: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados por Picrosirius visto sob luz polarizada da próstata ventral de ratos Wistar adultos de diferentes idades pós-natais (28, 44 e 70 DPN) submetidos ao Calaris[®] durante a gestação em duas concentrações (2 e 20 mg Kg⁻¹). O colágeno do tipo I cora-se em verde e o colágeno do tipo II em amarelo a alaranjado (A-I). Os gráficos em J mostram análise quantitativa das fibras colágenas totais. Média ± DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA unidirecional e teste *post hoc* de Tukey; $p < 0,05$. (n = 6 animais/grupo).

1

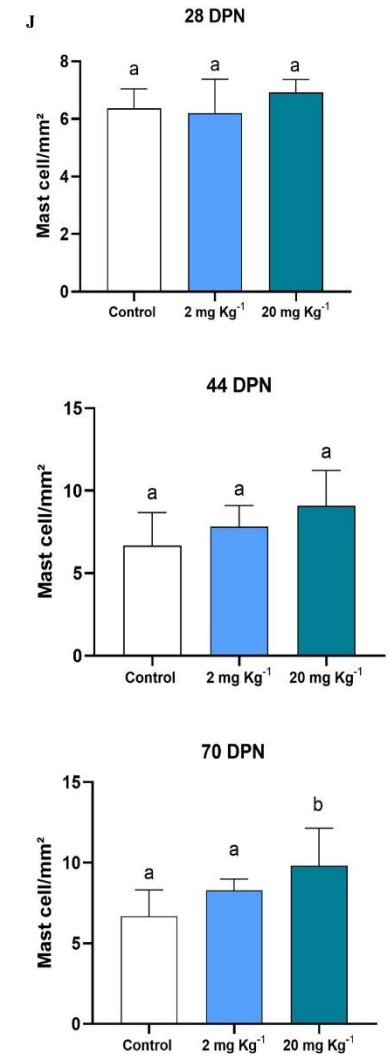
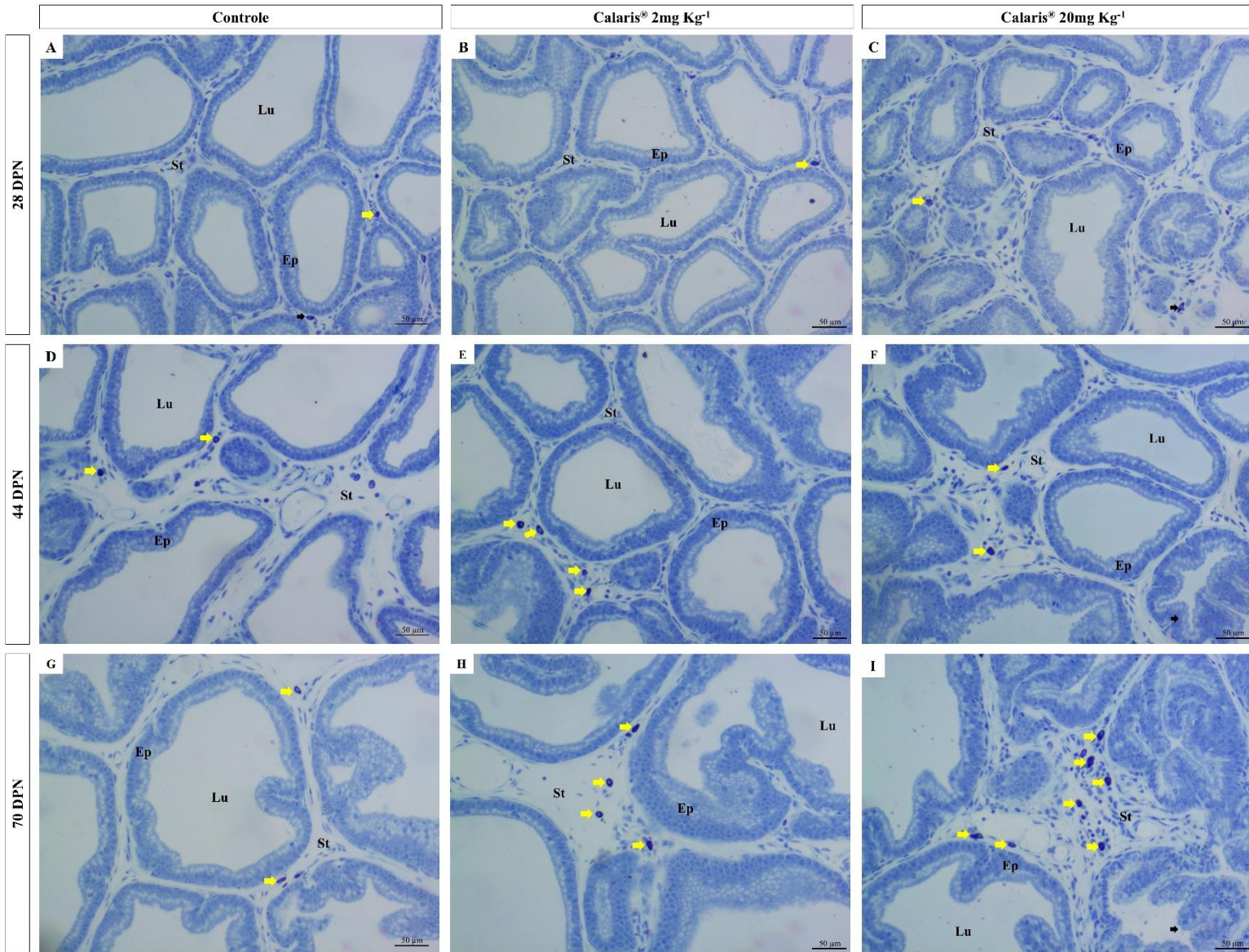


Figura 9: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados por Azul de Toluidina da próstata ventral de ratos Wistar adultos de diferentes idades pós-natais (28, 44 e 70 DPN) submetidos ao Calaris[®] durante a gestação em duas concentrações (2 e 20 mg Kg⁻¹). O corante revela a presença de mastócitos (seta amarela) corados por metacromasia pelo azul de toluidina, em que estas células se coram de vermelho-púrpura. Os gráficos em J mostram a quantificação dos mastócitos. Média ± DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey; p < 0,05). Ep = Epitélio; Lu = Lúmen; St = Estroma. (n = 6 animais/grupo).

6.3 Atividade das enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

Entre animais com 28 DPN foi observada maior concentração de MDA no grupo exposto gestacionalmente a 20 mg Kg⁻¹ de Calaris[®] em relação aos demais grupos (p < 0,05; Fig. 10 E). A quantidade de PC foi maior nos grupos expostos à mistura em relação ao grupo controle (p < 0,05; Fig. 10 F). Não houve alterações na atividade de SOD, CAT, GST e nas concentrações de NO entre animais de diferentes grupos analisados (p > 0,05; Fig. 10).

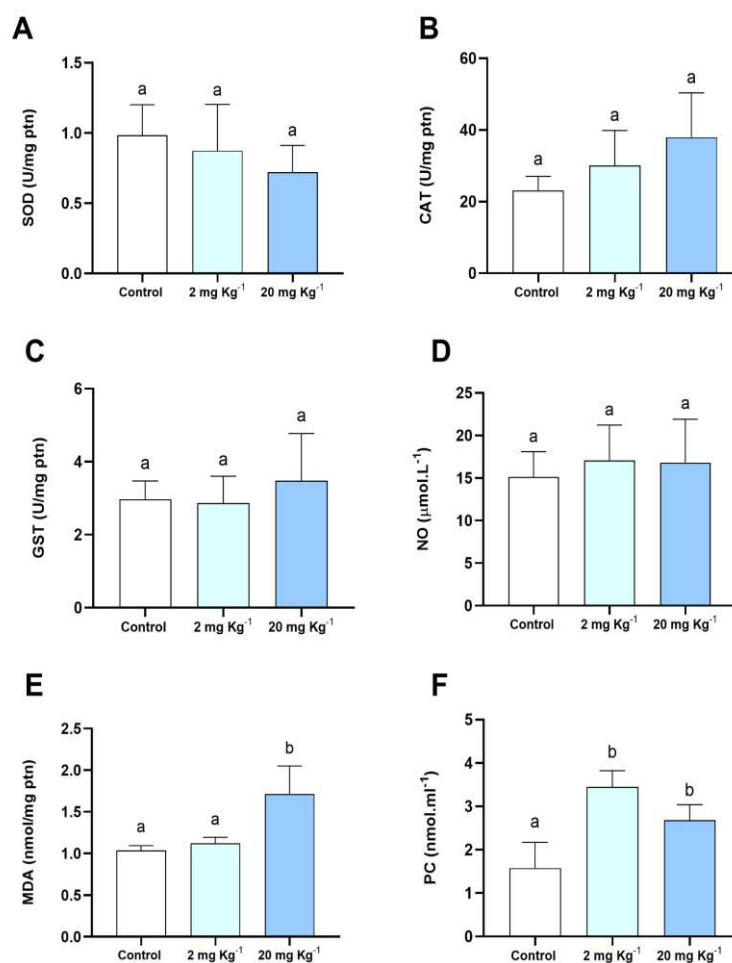


Figura 10: Efeitos da exposição gestacional de Calaris[®], em duas concentrações (2 e 20 mg Kg⁻¹), sobre a atividade de enzimas antioxidantes e concentração de subprodutos do estresse oxidativo e nitrosativo na próstata ventral de ratos Wistar com 28 DPN. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GST = glutathiona S-transferase; NO = óxido nítrico; MDA = malondialdeído; PC = proteínas carboniladas. Média ± DP. ^{a,b}Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; P < 0,05). n = 6 animais/grupo.

Já a próstata ventral de machos com 44 DPN não apresentou alterações em parâmetros de atividade enzimática e subprodutos do estresse oxidativo, entre ratos controle e aqueles expostos às duas doses da mistura de herbicidas (p > 0,05; Fig. 11), exceto para MDA. Ratos expostos ao Calaris[®] na dose de 20 mg Kg⁻¹ apresentaram maior concentração de MDA no tecido prostático que em animais dos demais grupos experimentais (p < 0,05; Fig. 11 E).

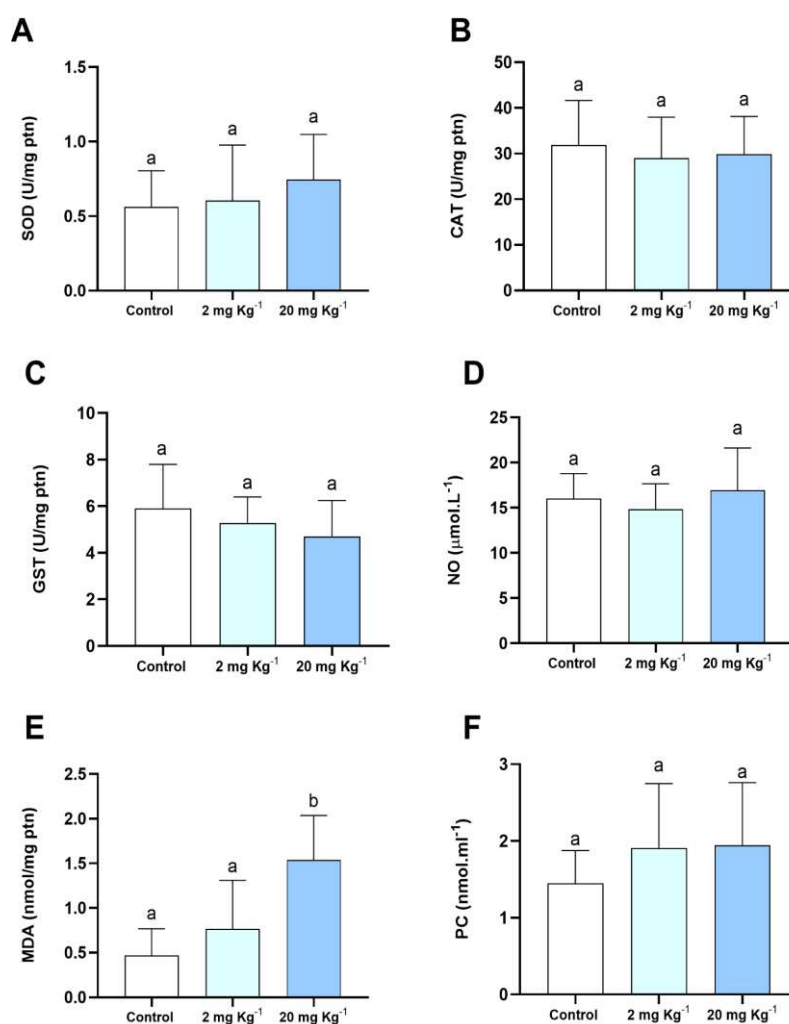


Figura 11: Efeitos da exposição gestacional de Calaris[®], em duas concentrações (2 e 20 mg Kg⁻¹), sobre a atividade de enzimas antioxidantes e as concentrações de subprodutos do estresse oxidativo e nitrosativo das próstatas ventrais de ratos Wistar com 44 DPN. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GST = glutathiona S-transferase; NO = óxido nítrico; MDA = malondialdeído; PC = proteínas carboniladas. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; P < 0,05). n = 6 animais/grupo.

Por fim, as próstatas ventrais de ratos com 70 DPN não apresentaram alterações na atividade enzimática e na concentração prostática de marcadores de estresse oxidativo entre os grupos experimentais (p > 0,05; Fig. 12), excetuando SOD. A próstata de ratos do grupo 20 mg Kg⁻¹ de Calaris[®] apresentou menor atividade dessa enzima que a próstata de ratos controle e ratos expostos intrauterinamente com a dose baixa do herbicida (p < 0,05; Fig. 12 A).

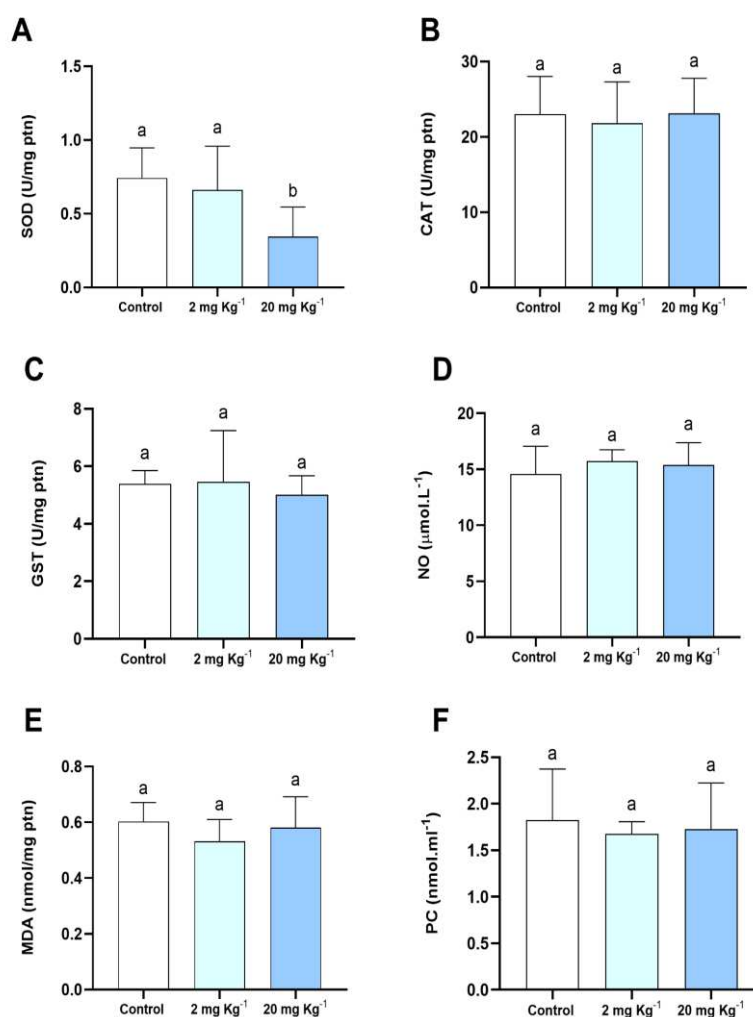


Figura 12: Efeitos da exposição gestacional de Calaris[®], em duas concentrações (2 e 20 mg Kg⁻¹), sobre a atividade de enzimas antioxidantes e a concentração de subprodutos do estresse oxidativo e nitrosativo no tecido prostático de ratos Wistar com 70 DPN. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GST = glutathione S-transferase; NO = óxido nítrico; MDA = malondialdeído; PC = proteínas carboniladas. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e teste de Tukey; P < 0,05). n = 6 animais/grupo.

7. Discussão

Neste estudo, avaliamos pela primeira vez os efeitos da exposição intrauterina à mistura de herbicidas Calaris[®], em diferentes doses, sobre a próstata ventral de filhotes em três momentos fisiológicos (Fig. 13). Os achados mostraram que a exposição gestacional ao Calaris[®] provocou um desequilíbrio redox na próstata, o que constitui o primeiro nível de

perturbação induzido pela mistura de herbicidas, funcionando como um gatilho para as alterações celulares, histológicas e estereológicas observadas em idades subsequentes. De fato, o contato gestacional com os herbicidas provocou alterações celulares e histológicas, como aumento do número de mastócitos, ocorrência de apoptose, congestão vascular com marginação leucocitária, infiltrado inflamatório, atrofia glandular e sutil descamação e hiperplasia. Entretanto, as concentrações ofertadas não alteraram a quantidade de colágeno total no estroma prostático dos animais.

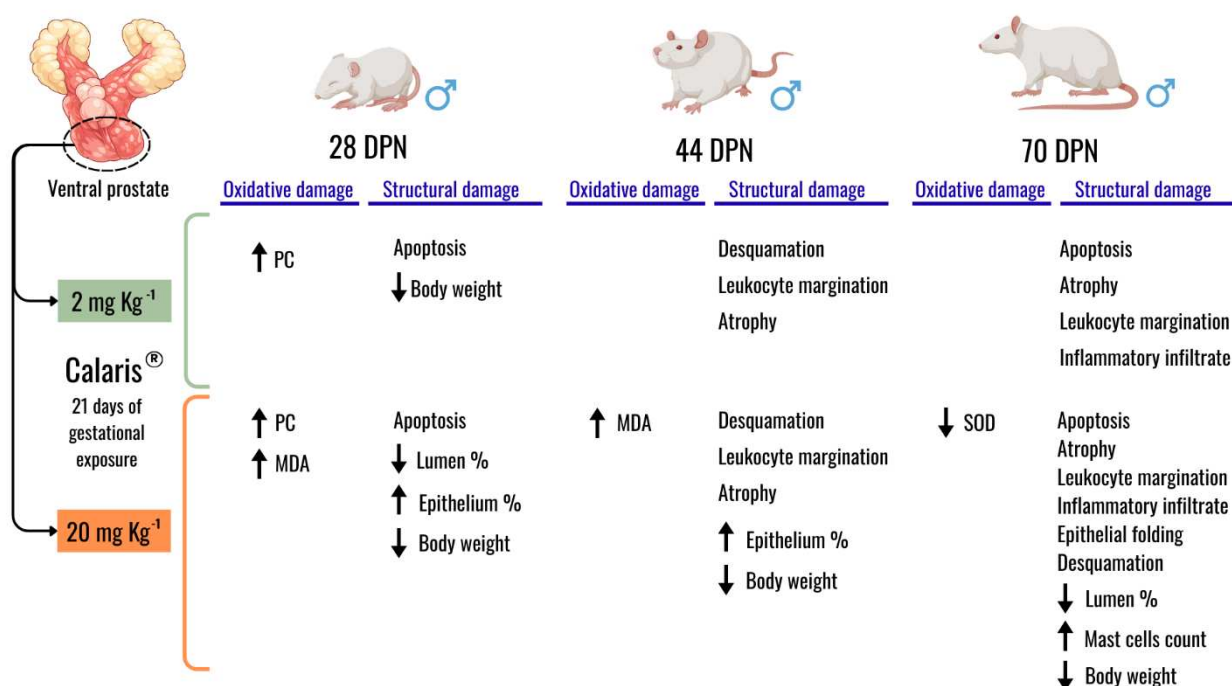


Figura 13: Desenho esquemático sintetizando os principais resultados obtidos a partir da exposição de fêmeas gestantes ao Calaris® e suas consequências na próstata ventral da prole nas idades pós-natais (DPN) 28, 44 e 70. SOD = superóxido dismutase; MDA = malondialdeído; PC = proteínas carboniladas.

O aumento significativo das concentrações de MDA e de PC observado aos 28 DPN, particularmente no grupo exposto à dose alta, evidencia a ocorrência precoce de dano oxidativo a lipídios de membrana e a proteínas estruturais e funcionais em um tecido ainda imaturo. Nesta idade pós-natal a próstata ventral se encontra no final do estado de repouso da ramificação dos ductos com a proliferação epitelial se iniciando logo após este período (Vilamaior et al., 2006). O desequilíbrio redox observado favorece a peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento da concentração de MDA, um aldeído reativo capaz de comprometer a fluidez, a assimetria, integridade da membrana e a organização de microdomínios lipídicos (Ayala et al., 2014).

Adicionalmente, os aldeídos reativos derivados da peroxidação lipídica têm a capacidade de formar adutos covalentes com proteínas sinalizadoras, quinases e fosfatases, modulando negativamente vias intracelulares sensíveis ao estado redox, incluindo MAPK, PI3K/AKT e NF- κ B (Esterbauer et al., 1991; Schaur et al., 2015). Na próstata em desenvolvimento, a disfunção dessas vias pode resultar em desequilíbrio entre proliferação e apoptose e prejuízo da resposta androgênica, podendo contribuir para a instabilidade funcional do epitélio prostático (Shiota et al., 2012). O estresse oxidativo constitui o evento inicial da toxicidade prostática induzida pela exposição direta ao herbicida Calaris® (Martins-Santos & Oliveira, 2026). Walters et al. (2015) mostraram que a atrazina exposta gestacionalmente é capaz de atingir a prole e causar disrupção em neurônios, causando prejuízos em comportamentos associados à função motora. Neste contexto, sabendo que alguns herbicidas conseguem passar pela interface materno-fetal, os achados deste trabalho sugerem que a exposição gestacional ao Calaris® também provoca o desequilíbrio redox prostático como evento inicial de toxicidade.

A ausência de alterações significativas nas atividades das enzimas antioxidantes avaliadas (SOD, CAT e GST) e do NO em animais com 28 DPN sugere que a próstata imatura apresenta capacidade limitada de resposta adaptativa frente ao aumento da carga oxidativa evidenciado pelo aumento de PC. A carbonilação de proteínas pode afetar diretamente enzimas e proteínas envolvidas na sinalização hormonal, em especial o receptor androgênico, cuja atividade é fundamental para a diferenciação e maturação do epitélio prostático (Verze et al., 2016). De acordo com England et al., (2003) a perda da funcionalidade enzimática por carbonilação de proteínas pode reduzir a capacidade adaptativa das células epiteliais frente a demandas metabólicas elevadas, favorecendo a ativação de vias de morte celular programada evidenciada pela presença de células apoptóticas no grupo com 28 DPN exposto ao Calaris® nas duas doses. A apoptose em um órgão em desenvolvimento sugere que o estresse oxidativo ultrapassa o limiar de adaptação celular, ativando vias de morte programada (Sinha et al., 2013). Apesar de não ter sido encontrada maior quantidade de mastócitos em animais com 28 DPN a disfunção de vias intracelulares sensíveis ao desequilíbrio redox pode ativar sinais pró-inflamatórios (Wang et al., 2024).

Ainda no contexto do período de 28 DPN, a maior proporção de epitélio e a menor proporção de lúmen observados em animais expostos à dose alta indicam um atraso funcional do crescimento glandular em relação ao grupo controle, uma vez que, em indivíduos saudáveis nesta idade, a próstata já passou pelo primeiro pico de proliferação celular e pela formação do lúmen (Vilamaior et al., 2006). O padrão observado é compatível com um epitélio ainda predominantemente proliferativo evidenciado pela perda celular por apoptose. Em adição, o

menor peso de animais expostos ao Calaris[®] nas duas doses também corrobora com a hipótese de que houve um atraso do crescimento do órgão, uma vez que o crescimento do órgão é diretamente proporcional ao crescimento do indivíduo (Vilamaior et al., 2006).

Na fase puberal, aos 44 DPN, a maior concentração isolada de MDA concomitante à ausência de alterações em proteínas carboniladas ou na atividade das enzimas antioxidantes no grupo exposto à dose de 20 mg Kg⁻¹, sugere um evento oxidativo inicial. Esse achado pode indicar que a peroxidação lipídica ocorre de forma pontual, sem progressão para dano proteico generalizado, possivelmente devido a mecanismos compensatórios ainda eficientes nesse estágio do desenvolvimento prostático. Segundo Ayala et al. (2014), nos estágios iniciais ou moderados de estresse oxidativo, a peroxidação lipídica constitui um dos primeiros eventos detectáveis. Os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares como o ácido linoleico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico são altamente suscetíveis à oxidação (Ayala et al., 2014). Esses ácidos com alto número de ligações duplas esterificados em fosfolipídios de membrana possuem ligações bis-aliílicas que facilitam a abstração de hidrogênio por radicais livres (Gaschler & Stockwell, 2017). Atuando como os principais substratos de peroxidação lipídica, esses ácidos graxos iniciam rapidamente reações em cadeia que amplificam o dano, resultando em aumento precoce de produtos como o MDA, mesmo na ausência de carbonilação de proteínas ou na inalteração da atividade de enzimas antioxidantes (Gaschler & Stockwell, 2017). Entretanto, produtos da peroxidação lipídica podem ativar a via NF-κB e induzir eventos iniciais de inflamação evidenciados pela presença de vasos congestos com marginação leucocitária branda em animais expostos às duas doses da mistura de herbicidas (Yin et al., 2015). A peroxidação lipídica, mesmo em níveis moderados, pode comprometer a integridade das junções celulares, prejudicando a coesão do epitélio glandular e facilitando a descamação de células epiteliais observadas em animais com 44 DPN expostos ao Calaris[®] (Rao, 2008; Shigetomi et al., 2018).

Em 44 DPN, embora os resultados indiquem alterações oxidativas mais discretas, observa-se concomitantemente manifestações histológicas sugestivas de instabilidade tecidual causada pela disrupção endócrina (Guimarães-Ervilha et al., 2025a). Neste período de transição puberal, a próstata passa por processos fortemente dependentes da sinalização androgênica mediada pelo eixo hipotálamo–hipófise–gonadal (HPG) e pela ativação local do receptor de andrógeno (AR) para estabelecer sua atividade secretora (Marker et al., 2003). O herbicida atrazina, que compõe o Calaris[®], é capaz de suprimir a esteroidogênese testicular pela inibição da atividade de StAR (Proteína reguladora aguda esteroidogênica) e de enzimas como CYP17A1 e 3β-HSD com consequente diminuição da síntese de testosterona (Pogrmic et al.,

2009; Jin et al., 2013). Essa redução sistêmica de andrógenos na puberdade resulta em menor ativação do AR na próstata, podendo causar regressão parcial da estrutura glandular, evidenciada pela atrofia dos adenômeros observados em animais expostos a ambas as doses (Guimarães-Ervilha et al., 2025a). Adicionalmente, a atrazina pode reduzir a expressão do AR indiretamente pela redução das concentrações de DHT, comprometendo a organização estrutural do parênquima prostático e atrasando sua maturação funcional (Pogrmic et al., 2009). De fato, os achados evidenciaram uma maior proporção de epitélio na próstata ventral de animais do grupo exposto à maior dose, o que sugere uma redução da expansão do lúmen glandular, possivelmente decorrente do comprometimento da atividade secretora do epitélio ou por um processo de remodelação compensatória frente à perda celular por descamação ou atrofia do adenômero (Felix-Patricio et al., 2017). Além disso, animais expostos à alta dose do herbicida apresentaram menor peso corporal, o que pode refletir em uma redução do peso prostático de maneira indireta, uma vez que o crescimento e a manutenção da próstata são fortemente dependentes da estimulação hormonal androgênica durante essa fase do desenvolvimento (Vickman et al., 2020).

De acordo com Picut et al. (2017), ratos com 70 DPN são considerados jovens adultos, pois, apesar de férteis, ainda não atingiram a maturação sexual completa. A próstata ventral, nessa fase, atinge um estágio de maior maturidade estrutural e funcional, tornando-se mais suscetível à manifestação tardia de efeitos programados durante a vida intrauterina (Vilamaior et al., 2006). Em nível molecular, a menor atividade da SOD observada no grupo 20 mg Kg⁻¹ sugere um comprometimento direto da capacidade antioxidante. A SOD é responsável pela remoção do ânion superóxido e quando sua atividade diminui, há um acúmulo intracelular desse íon e um desequilíbrio redox (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). Mesmo não sendo observada maior concentração de PC em animais expostos a ambas as doses, o cenário de desequilíbrio redox pode promover a oxidação de proteínas estruturais do citoesqueleto como a β -actina e vimentina comprometendo a manutenção da polaridade celular, a adesão célula-célula e a integridade do epitélio (Rouyère et al., 2022; Pérez-Sala & Quinlan, 2024). A descamação de células epiteliais para o lúmen do adenômero prostático observada de forma branda em animais 70 DPN expostos à alta dose de Calaris[®] pode ter sido causada por este desbalanço redox.

Embora a atividade das outras enzimas antioxidantes e os níveis de MDA e NO não apresentem alterações significativas, a redução da SOD pode indicar uma condição de estresse oxidativo subcrônico de baixa intensidade, suficiente para sustentar processos inflamatórios pela ativação de vias clássicas de inflamação como a NF- κ B e AP-1 que regulam a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Mittal et al., 2014). O processo

inflamatório também é evidente quando se observa um maior número de mastócitos no grupo exposto à alta dose. Os mastócitos desempenham papel na regulação da inflamação, uma vez que possuem diferentes receptores que reconhecem padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs), que induzem a liberação de citocinas inflamatórias, podendo amplificar o dano celular e perpetuar o desequilíbrio redox (Beghdadi et al, 2011; Chelombitko et al., 2016; Wang et al., 2024). A maior quantidade de mastócitos em animais com 70 DPN expostos à dose alta de Calaris[®] vai de encontro aos dados da literatura que identificaram maior número dessas células em ratos expostos a disruptores endócrinos, incluindo a atrazina (Mizota & Ueda, 2006), indicando que o herbicida pode atuar como DAMPS, ativando receptores nos mastócitos e culminando na indução e/ou manutenção da resposta inflamatória verificada nestes animais. O cenário inflamatório é corroborado com os achados histológicos marcantes, como apoptose, congestão vascular com marginação leucocitária e infiltrado inflamatório moderado no estroma prostático. Ambientes caracterizados por inflamação de baixa intensidade podem potencializar a ativação de vias pró-apoptóticas como NF- κ B, STAT3 e AP-1 que regulam o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular liberando mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Grivennikov et al., 2010). Além disso, a próstata é um órgão altamente sensível à privação androgênica, e a apoptose epitelial pode representar um mecanismo celular responsável pela involução glandular nesse contexto (Kyprianou & Isaacs, 1988; Prins, 2016).

A atrofia glandular observada aos 70 DPN é compatível com um processo de regressão prostática dependente de andrógenos. Estudos demonstram que a redução da sinalização via receptor de andrógeno resulta em regressão do epitélio secretor, diminuição do volume luminal e redução do peso prostático em roedores (Felix-Patricio et al., 2017; Liu et al., 2022). Assim, a disrupção endócrina induzida pela atrazina, ao comprometer a esteroidogênese e a ativação do receptor de andrógeno, fornece um mecanismo plausível para a atrofia parcial dos adenômeros sustentada pela menor proporção de lúmen e menor peso corporal observado em animais expostos à dose alta da mistura de herbicidas. Adicionalmente, é parcimonioso interpretar o pregueamento epitelial identificado em animais expostos à alta dose como um rearranjo estrutural secundário à redução da atividade secretora e à menor proporção de lúmen, e não como um processo de hiperplasia. Durante a involução prostática, Felix-Patricio (2017) mostrou considerável redução na densidade luminal da próstata de ratos castrados, reforçando a hipótese de comprometimento funcional do epitélio glandular por disrupção endócrina.

Em adição, a ausência de alterações significativas na quantidade total de colágeno, mesmo diante de evidências claras de estresse oxidativo, apoptose, inflamação e alterações epiteliais, sugere que a exposição gestacional ao Calaris[®] não foi suficiente para induzir

remodelação fibrótica do estroma prostático nas três idades avaliadas. A deposição de colágeno é característica de processos inflamatórios crônicos e persistentes (Lo et al., 2019), nos quais há ativação prolongada de fibroblastos e miofibroblastos mediada por citocinas pró-fibróticas, especialmente TGF- β 1, PDGF e CTGF (Wynn, 2007; Kim et al., 2017). Nos resultados, apesar da presença de marginação leucocitária em 44 e 70 DPN e infiltrado inflamatório mais evidente aos 70 DPN, o padrão observado é compatível com um processo inflamatório predominantemente subcrônico, insuficiente para desencadear fibrogênese estromal mensurável.

8. Conclusão

A exposição gestacional ao herbicida Calaris[®] atua como um fator crítico de desregulação no desenvolvimento da próstata ventral de ratos Wistar. O desequilíbrio redox estabelece-se como o evento inicial de toxicidade e um gatilho para as alterações celulares e histológicas observadas, manifestando-se precocemente através da peroxidação lipídica, do dano a proteínas estruturais e funcionais e da diminuição de SOD. Além do estresse oxidativo, a mistura dos herbicidas atrazina e mesotriona exerce um papel de disruptor endócrino conhecido da atrazina, porém pouco estudado da mesotriona, que compromete a síntese de testosterona e a sinalização via receptor androgênico, resultando em atraso no desenvolvimento glandular e atrofia dos adenômeros. Essas perturbações culminam em um quadro de inflamação subcrônica, aumento no número de mastócitos e ativação de vias de morte celular por apoptose ao longo das fases pós-natais, embora a intensidade do dano não tenha sido suficiente para induzir remodelamento fibrótico do estroma. Portanto, o contato intrauterino com o herbicida promove uma programação fetal deletéria que compromete a homeostase e a maturação funcional da próstata até a idade jovem adulta.

9. Referências

- Abarikwu, S.O., Akiri, O.F., Durojaiye, M.A. and Alabi Adenike (2014). Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, [online] 25(1), pp.70–80. doi:<https://doi.org/10.3109/15376516.2014.989349>.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology*, [online] 105, pp.121–126. doi:[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).
- Ahmad, S., Chandrasekaran, M., & Ahmad, H. W. (2023). Investigation of the Persistence, Toxicological Effects, and Ecological Issues of S-Triazine Herbicides and Their Biodegradation Using Emerging Technologies: A Review. *Microorganisms*, 11(10), 2558. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11102558>
- Araújo, R. dos S., Viana, T.A., Botina, L.L., Bastos, D.S.S., da Silva Alves, B.C., Machado-Neves, M., Bernardes, R.C. and Martins, G.F. (2023). Investigating the effects of mesotrione/atrazine-based herbicide on honey bee foragers. *Science of The Total Environment*, [online] 898, p.165526. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165526>.
- Ashkar, A.A. and Croy, B.Anne. (2001). Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Seminars in Immunology*, [online] 13(4), pp.235–241. doi:<https://doi.org/10.1006/smim.2000.0319>.
- Ayala, A., Muñoz, M.F. and Sandro Argüelles (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [online] 2014, pp.1–31. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Bauer, M.K., Harding, J.E., Bassett, N.S., Breier, B.H., Oliver, M.H., Gallaher, B.H., Evans, P.C., Woodall, S.M. and Gluckman, P.D. (1998). Fetal growth and placental function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, [online] 140(1-2), pp.115–120. doi:[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00039-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00039-2).
- Beghdadi, W., Madjene, L.C., Benhamou, M., Charles, N., Gautier, G., Launay, P. and Blank, U. (2011). Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Frontiers in Immunology*, [online] 2. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00037>.

Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Dorta, L. C. P. and D. J., Bernardes, M. F. F., Pazin, M., & Dorta, L. C. P. and D. J. (2015). Impact of Pesticides on Environmental and Human Health. *Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*. <https://doi.org/10.5772/59710>

Blachnio, M., Kusmierk, K., Swiatkowski, A., & Derylo-Marczewska, A. (2023). Adsorption of Phenoxyacetic Herbicides from Water on Carbonaceous and Non-Carbonaceous Adsorbents. *Molecules*, 28(14), 5404. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28145404>

Bloom, M.S., Meghana Varde and Newman, R.B. (2022). Environmental toxicants and placental function. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, [online] 85(Pt B), pp.105–120. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2022.09.003>.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, [online] 72(1-2), pp.248–254. doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Buege, J.A. and Aust, S.D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology*, [online] 52, pp.302–310. doi:[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6).

Chelombitko, M.A., Fedorov, A.V., Ilyinskaya, O.P., Zinovkin, R.A. and Chernyak, B.V. (2016). Role of reactive oxygen species in mast cell degranulation. *Biochemistry (Moscow)*, [online] 81(12), pp.1564–1577. doi:<https://doi.org/10.1134/s000629791612018x>.

Coimbra, J.L.P., Campolina-Silva, G., Lair, D.F., Guimarães-Ervilha, L.O., Souza, A.C.F., Oliveira, C.A., Costa, G.M.J. and Machado-Neves, M. (2024). Subchronic intake of arsenic at environmentally relevant concentrations causes histological lesions and oxidative stress in the prostate of adult Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, [online] 128, pp.108647–108647. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108647>.

Colombel, M.C. and Buttyan, R. (1995). Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. *Methods in Cell Biology*, [online] pp.369–385. doi:[https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61936-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61936-6).

Correia, R.R., Rogério, V., Cruz, S., Eduarda, M., Lima, F., Pacagnelli, F.L., Henrique, D., Giometti, I.C. and Teixeira, G.R. (2021). High-intensity interval training attenuates the effects

caused by arterial hypertension in the ventral prostate. *The Prostate*, [online] 82(3), pp.373–387. doi:<https://doi.org/10.1002/pros.24285>.

Das, S., Sakr, H., Al-Huseini, I., Jetti, R., Al-Qasmi, S., Sugavasi, R. and Sirasanagandla, S.R. (2023). Atrazine Toxicity: The Possible Role of Natural Products for Effective Treatment. *Plants*, [online] 12(12), p.2278. doi:<https://doi.org/10.3390/plants12122278>.

Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G. and Prestle, J. (2000). Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart. *Circulation*, [online] 101(1), pp.33–39. doi:<https://doi.org/10.1161/01.cir.101.1.33>.

Dominguez, E.M., Moreno-Irusta, A., Scott, R.L., Iqbal, K. and Soares, M.J. (2024). TFAP2C is a key regulator of intrauterine trophoblast cell invasion and deep hemochorial placentation. *JCI Insight*, [online] 10(2). doi:<https://doi.org/10.1172/jci.insight.186471>.

Donjacour, A.A. and Cunha, G.R. (1988). The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Developmental Biology*, [online] 128(1), pp.1–14. doi:[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90260-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90260-6).

Durand, P., Blondet, A., Martin, G., Carette, D., Georges Pointis and Marie-Hélène Perrard (2019). Effects of a mixture of low doses of atrazine and benzo[a]pyrene on the rat seminiferous epithelium either during or after the establishment of the blood-testis barrier in the rat seminiferous tubule culture model. *Toxicology in Vitro*, [online] 62, pp.104699–104699. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104699>.

Eckardt, M. and Simat, T.J. (2017). Bisphenol A and alternatives in thermal paper receipts - a German market analysis from 2015 to 2017. *Chemosphere*, [online] 186, pp.1016–1025. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.037>.

England, K., C O'Driscoll and Cotter, T.G. (2003). Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, [online] 11(3), pp.252–260. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401338>.

FAO. (2022). Pesticides use and trade. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>.

FAO. (2025) International Code of Conduct on Pesticide Management. FAO, Rome. Available at: <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/pesticide-risk-reduction/code-conduct/en/>

Felix-Patricio, B., Miranda, A.F., Medeiros Jr., J.L., Gallo, C.B.M., Gregório, B.M., Souza, D.B. de, Costa, W.S. and Sampaio, F.J.B. (2017). The prostate after castration and hormone replacement in a rat model: structural and ultrastructural analysis. *International braz j urol*, [online] 43(5), pp.957–965. doi:<https://doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2016.0484>.

Freire, C., Maria-Jose Lopez-Espinosa, Marieta Fernández, Jose-Manuel Molina-Molina, Prada, R. and Olea, N. (2011). Prenatal exposure to organochlorine pesticides and TSH status in newborns from Southern Spain. *The Science of The Total Environment*, [online] 409(18), pp.3281–3287. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.037>.

Fukai, T. and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, [online] 15(6), pp.1583–1606. doi:<https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.

Furukawa, S., Hayashi, S., Usuda, K., Abe, M., Hagio, S. and Ogawa, I. (2011). Toxicological Pathology in the Rat Placenta. *Journal of Toxicologic Pathology*, [online] 24(2), pp.95–111. doi:<https://doi.org/10.1293/tox.24.95>.

Furukawa, S., Kuroda, Y. and Sugiyama, A. (2014). A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, [online] 27(1), pp.11–18. doi:<https://doi.org/10.1293/tox.2013-0060>.

Gianessi, L.P. (2013). The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Management Science*, [online] 69(10), pp.1099–1105. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.3598>.

Gingrich, J., Ticiani, E. and Veiga-Lopez, A. (2020). Placenta Disrupted: Endocrine Disrupting Chemicals and Pregnancy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, [online] 31(7), pp.508–524. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.03.003>.

Ginja, M., Pires, M.J., Gonzalo-Orden, J.M., Seixas, F., Correia-Cardoso, M., Ferreira, R., Fardilha, M., Oliveira, P.A. and Faustino-Rocha, A.I. (2019). Anatomy and Imaging of Rat

Prostate: Practical Monitoring in Experimental Cancer-Induced Protocols. *Diagnostics*, [online] 9(3), p.68. doi:<https://doi.org/10.3390/diagnostics9030068>.

Gonçalves, B.M., Graceli, J.B., Paula, Tilli, H.P., Vieira, E.M., Maria, Peghinelli, V.V., Deprá, I.C., Mathias, L.S., Regiane M.C. Olímpio, Belik, V.C. and Nogueira, C.R. (2022). Placental model as an important tool to study maternal-fetal interface. *Reproductive Toxicology*, [online] 112, pp.7–13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.06.005>.

Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., J. Toppari and Zoeller, R.T. (2015). Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, [online] 36(6), pp.593–602. doi:<https://doi.org/10.1210/er.2015-1093>.

Griffiths, M.J., Winship, A.L., Stringer, J.M., Swindells, E.O., Harper, A.P., Finger, B.J., Hutt, K.J. and Green, M.P. (2021). Prolonged atrazine exposure beginning in utero and adult uterine morphology in mice. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, [online] 13(1), pp.39–48. doi:<https://doi.org/10.1017/s2040174421000106>.

Grindler, N.M., Vanderlinden, L., R. Karthikraj, Kannan, K., Teal, S., Polotsky, A.J., Powell, T.L., Yang, I.V. and Jansson, T. (2018). Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting Chemical, Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women. *Scientific Reports*, [online] 8(1), pp.6086–6086. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24505-w>.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, [online] 140(6), pp.883–899. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.

Guimarães-Ervilha, L.O., Assis, M.Q., Bento, I.P. da S., Lopes, I. da S., Iasbik-Lima, T., Carvalho, R.P.R. and Machado-Neves, M. (2025a). Exploring the endocrine-disrupting potential of atrazine for male reproduction: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology*, [online] 25(1), p.100989. doi:<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2024.100989>.

Guimarães-Ervilha, L.O., Iasbik-Lima, T., Soares, L.L., Faria, J.V.L., Oliveira, M.S., Carvalho, R.P.R., Morais-Santos, M., Natali, A.J. and Machado-Neves, M. (2025b). Effect of pulmonary arterial hypertension on the morphology and antioxidant defence of the ventral prostate of

sedentary and exercised rats. *International Journal of Experimental Pathology*, [online] 106(6). doi:<https://doi.org/10.1111/iep.70007>.

Habig (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*, [online] 249(22). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4436300/>.

Hamilton W, Boyd J, Mossman H (1959) *Human embryology*. Williams and Wilkins Co, Baltimore

Hanson, M.L., Solomon, K.R., Van Der Kraak, G.J. and Brian, R.A. (2019). Effects of atrazine on fish, amphibians, and reptiles: update of the analysis based on quantitative weight of evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, [online] 49(8), pp.670–709. doi:<https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1701985>.

Hartle, J.C., Navas-Acien, A. and Lawrence, R.S. (2016). The consumption of canned food and beverages and urinary Bisphenol A concentrations in NHANES 2003–2008. *Environmental Research*, [online] 150, pp.375–382. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.008>.

Hayes, E.K., Tessier, D.R., Percival, M.E., Holloway, A.C., Petrik, J.J., Gruslin, A. and Raha, S. (2014). Trophoblast Invasion and Blood Vessel Remodeling Are Altered in a Rat Model of Lifelong Maternal Obesity. *Reproductive Sciences*, [online] 21(5), pp.648–657. doi:<https://doi.org/10.1177/1933719113508815>.

Hayward, S.W., Baskin, L.S., Haughney, P.C., Cunha, A.R., Foster, B.A., Dahiya, R., Prins, G.S. and Cunha, G.R. (1996). Epithelial Development in the Rat Ventral Prostate, Anterior Prostate and Seminal Vesicle. *Cells Tissues Organs*, [online] 155(2), pp.81–93. doi:<https://doi.org/10.1159/000147793>.

Hayward, S.W., Baskin, L.S., Haughney, P.C., Cunha, A.R., Foster, B.A., Dahiya, R., Prins, G.S. and Cunha, G.R. (1996). Stromal Development in the Ventral Prostate, Anterior Prostate and Seminal Vesicle of the Rat. *Cells Tissues Organs*, [online] 155(2), pp.94–103. doi:<https://doi.org/10.1159/000147794>.

Hu, Y., Jiang, Z., Hou, A., Wang, X., Zhou, Z., Qin, B., Cao, B. and Zhang, Y. (2023). Impact of atrazine on soil microbial properties: A meta-analysis. *Environmental Pollution*, [online] 323, pp.121337–121337. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121337>.

Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. and Y. Taketani (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, [online] 17(11), pp.2839–2841. doi:<https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2839>.

Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S. S., Xu, L., Zhu, J., Zhao, M., Muños, S., Li, Q. X., & Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment International*, 111, 332–351. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2017.10.020>

Jin, Y., Wang, L. and Fu, Z. (2013). Oral exposure to atrazine modulates hormone synthesis and the transcription of steroidogenic genes in male peripubertal mice. *General and Comparative Endocrinology*, [online] 184, pp.120–127. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.01.010>.

Kim, K.K., Sheppard, D. and Chapman, H.A. (2017). TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [online] 10(4), p.a022293. doi:<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022293>.

Kyprianou, N. and Isaacs, J.T. (1988). Activation of Programmed Cell Death in the Rat Ventral Prostate after Castration. *Endocrinology*, [online] 122(2), pp.552–562. doi:<https://doi.org/10.1210/endo-122-2-552>.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, Anke-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, [online] pp.464–478. doi:[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h).

Li, J., Li, X., Bi, H., Ma, K. and Li, B. (2018). Developmental Exposure to Atrazine Impairs Spatial Memory and Downregulates the Hippocampal D1 Dopamine Receptor and cAMP-Dependent Signaling Pathway in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 19(8), pp.2241–2241. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms19082241>.

Lim, S., Ahn, S.Y., Song, I.C., Chung, M.H., Jang, H.C., Park, K.S., Lee, K.-U., Pak, Y.K. and Lee, H.K. (2009). Chronic Exposure to the Herbicide, Atrazine, Causes Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance. *PLoS ONE*, [online] 4(4), p.e5186. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005186>.

Lima, G.D. de A., Sertorio, M.N., Souza, A.C.F., Menezes, T.P., Mouro, V.G.S., Gonçalves, N.M., Oliveira, J.M. de, Henry, M. and Machado-Neves, M. (2018). Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reproductive Toxicology*, [online] 78, pp.130–140. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.04.015>.

Liu, Y., Wang, J., Horton, C., Yu, C., Knudsen, B., Stefanson, J., Hu, K., Stefanson, O., Green, J., Guo, C., Xie, Q. and Wang, Z.A. (2022). Stromal AR inhibits prostate tumor progression by restraining secretory luminal epithelial cells. *Cell Reports*, [online] 39(8), p.110848. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110848>.

Lo, B.C., Shin, S.B., Messing, M. and McNagny, K.M. (2019). Chronic Salmonella Infection Induced Intestinal Fibrosis. *Journal of Visualized Experiments*, [online] (151). doi:<https://doi.org/10.3791/60068>.

Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R. and Cunha, G.R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, [online] 253(2), pp.165–174. doi:[https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00031-3](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00031-3).

Martínez-Razo, L.D., Martínez-Ibarra, A., Vázquez-Martínez, E.R. and Cerbón, M. (2020). The impact of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in placental development, function, and pathophysiology. *Environment International*, [online] 146, pp.106228–106228. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106228>.

Martins-Santos, E. and Oliveira, C.A. (2026). A Review on the Effects of Atrazine on Male Rat Reproductive System Cytoarchitecture, Steroidogenesis and Oxidative Pathway. *Journal of Molecular Histology*, [online] 57(1). doi:<https://doi.org/10.1007/s10735-025-10671-5>.

Medrano, A., Fernández-Novell, J.Ma., Ramió, L., Alvarez, J., Goldberg, E., Montserrat Rivera, Ma., Guinovart, J.J., Rigau, T. and Rodríguez-Gil, J.E. (2006). Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, [online] 73(3), pp.369–378. doi:<https://doi.org/10.1002/mrd.20414>.

Meeks, J.J. and Schaeffer, E.M. (2011). Genetic Regulation of Prostate Development. *Journal of Andrology*, [online] 32(3), pp.210–217. doi:<https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011577>.

- Megli, C.J. and Coyne, C.B. (2021). Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. *Nature Reviews Microbiology*, [online] 20(2), pp.67–82. doi:<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00610-y>.
- Metz, J., Heinrich, D. and Forssmann, W.G. (1976). Ultrastructure of the labyrinth in the rat full-term placenta. *Anatomy and Embryology*, [online] 149(2), pp.123–148. doi:<https://doi.org/10.1007/bf00317893>.
- Mikula, P., Svobodová, Z. and Smutná, M. (2005). Phthalates: toxicology and food safety - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, [online] 23(6), pp.217–223. doi:<https://doi.org/10.17221/3394-cjfs>.
- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K. and Wichert, R.A. (2001). Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science*, [online] 57(2), pp.120–128. doi:[https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200102\)57:2%3C120::aid-ps254%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200102)57:2%3C120::aid-ps254%3E3.0.co;2-e).
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P. and Malik, A.B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, [online] 20(7), pp.1126–1167. doi:<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.
- Mizota, K. and Ueda, H. (2005). Endocrine Disrupting Chemical Atrazine Causes Degranulation through Gq/11 Protein-Coupled Neurosteroid Receptor in Mast Cells. *Toxicological Sciences*, [online] 90(2), pp.362–368. doi:<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj087>.
- Müller, J.E., Meyer, N., Santamaria, C.G., Schumacher, A., Luque, E.H., Zenclussen, M.L., Rodriguez, H.A. and Zenclussen, A.C. (2018). Bisphenol A exposure during early pregnancy impairs uterine spiral artery remodeling and provokes intrauterine growth restriction in mice. *Scientific Reports*, [online] 8(1), pp.9196–9196. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27575-y>.
- Oliveira, D.S.M., Dzinic, S., Bonfil, A.I., Saliganan, A.D., Sheng, S. and Bonfil, R.D. (2016). The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. [online] doi:<https://doi.org/10.17305/bjbms.2016.917>.
- Palma-Bautista, C., Portugal, J., Vázquez-García, J. G., Osuna, M. D., Torra, J., Lozano-Juste, J., Gherekhloo, J., & De Prado, R. (2022). Tribenuron-methyl metabolism and the rare

Pro197Phe double mutation together with 2,4-D metabolism and reduced absorption can evolve in *Papaver rhoeas* with multiple and cross herbicide resistance to ALS inhibitors and auxin mimics. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188, 105226. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2022.105226>

Pandey, N., Maske, P., Mote, C. and Dighe, V. (2021). Exposure to Atrazine through gestation and lactation period led to impaired sexual maturation and subfertility in F1 male rats with congenital deformities in F2 progeny. *Food and Chemical Toxicology*, [online] 157, p.112586. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112586>.

Parker, G.A. & Picut, C.A. (eds.) (2016) *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. Amsterdam: Academic Press. ISBN 978-0-12-802682-3.

Peillex, C. and Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, 17(1), 163–174. https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492/ASSET/912FCC2B-3B59-4299-9BED-9AB73D0AEC16/ASSETS/IMAGES/IIMT_A_1804492_F0003_C.JPG

Pérez-Sala, D. and Quinlan, R.A. (2024). The redox-responsive roles of intermediate filaments in cellular stress detection, integration and mitigation. *Current Opinion in Cell Biology*, [online] 86, p.102283. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102283>.

Piancini, L.D.S., Guiloski, I.C., Silva, H.C., Cestari, M.M. (2015). Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. *Toxicology Reports*, [online] 2, pp.1157–1163. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.08.007>.

Picut, C.A., Ziejewski, M.K. and Stanislaus, D. (2017). Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Research*, [online] 110(3), pp.190–227. doi:<https://doi.org/10.1002/bdr2.1133>.

Plante, I., Winn, L.M., Vaillancourt, C., Grigorova, P. and Parent, L. (2022). Killing two birds with one stone: Pregnancy is a sensitive window for endocrine effects on both the mother and the fetus. *Environmental Research*, [online] 205, p.112435. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112435>.

Pogrmic, K., Fa, S., Dakic, V., Kaisarevic, S. and Kovacevic, R. (2009). Atrazine Oral Exposure of Peripubertal Male Rats Downregulates Steroidogenesis Gene Expression in Leydig Cells. *Toxicological Sciences*, 111(1), pp.189–197. doi:<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp135>.

Prins, G. S., & Korach, K. S. (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3), 233–244. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2007.10.013>

Prins, G. S., & Putz, O. (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, 76(6), 641–659. <https://doi.org/10.1111/J.1432-0436.2008.00277.X>

Prins, G.S. (2016). The Endocrine Society Centennial: Hormones and Apoptosis in the Prostate Gland... Live and Let Die. *Endocrinology*, [online] 157(6), pp.2197–2200. doi:<https://doi.org/10.1210/en.2016-1192>.

Qu, R., He, B., Yang, J., Lin, H., Yang, W., Wu, Q., Li, Q.X. and Yang, G. (2021). Where are the new herbicides? *Pest Management Science*, [online] 77(6), pp.2620–2625. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.6285>.

Rao, R. (2008). Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Frontiers in Bioscience*, [online] Volume(13), p.7210. doi:<https://doi.org/10.2741/3223>.

Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Akraporn Prakobphol, Foulk, R., McMaster, M. and Fisher, S.J. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *Journal of Clinical Investigation*, [online] 114(6), pp.744–754. doi:<https://doi.org/10.1172/jci22991>.

Roberts, H., Woodman, A.G., Baines, K.J., Jeyarajah, M.J., Bourque, S.L. and Renaud, S.J. (2021). Maternal Iron Deficiency Alters Trophoblast Differentiation and Placental Development in Rat Pregnancy. *Endocrinology*, [online] 162(12). doi:<https://doi.org/10.1210/endocr/bqab215>.

Rosário, G.X., Konno, T. and Soares, M.J. (2008). Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. *Developmental Biology*, [online] 314(2), pp.362–375. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.007>.

Rouyère, C., Serrano, T., Frémont, S. and Echard, A. (2022). Oxidation and reduction of actin: Origin, impact in vitro and functional consequences in vivo. *European Journal of Cell Biology*, [online] 101(3), p.151249. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151249>.

Saha, R. and Dutta, S.M. (2024). Pesticides' mode of action on aquatic life. *Toxicology Reports*, [online] 13, pp.101780–101780. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101780>.

Sanches, B.D.A., Maldarine, J.S., Vilamaior, P.S.L., Felisbino, S.L., Carvalho, H.F. and Taboga, S.R. (2021). Stromal cell interplay in prostate development, physiology, and pathological conditions. *The Prostate*, [online] 81(13), pp.926–937. doi:<https://doi.org/10.1002/pros.24196>.

Seifert, A.W., Harfe, B.D. and Cohn, M.J. (2008). Cell lineage analysis demonstrates an endodermal origin of the distal urethra and perineum. *Developmental Biology*, [online] 318(1), pp.143–152. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.017>.

Shekhar, S., Sood, S., Showkat, S., Lite, C., Chandrasekhar, A., Vairamani, M., Barathi, S. and Santosh, W. (2017). Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *General and Comparative Endocrinology*, [online] 241, pp.100–107. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.05.025>.

Shigetomi, K., Ono, Y., Inai, T. and Ikenouchi, J. (2018). Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition. *Journal of Cell Biology*, [online] 217(7), pp.2373–2381. doi:<https://doi.org/10.1083/jcb.201711042>.

Shim, K.-Y., Sukumaran, V., Yeo, I.-C., Shin, H. and Jeong, C.-B. (2022). Effects of atrazine and diuron on life parameters, antioxidant response, and multixenobiotic resistance in non-targeted marine zooplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [online] 258, p.109378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109378>.

Shiota, M., Yokomizo, A. and Naito, S. (2011). Oxidative stress and androgen receptor signaling in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, [online] 51(7), pp.1320–1328. doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.011>.

Shoaito, H., Petit, J., Chissey, A., Auzeil, N., Guibourdenche, J., Gil, S., Laprévotte, O., Fournier, T. and Degrelle, S.A. (2019). The Role of Peroxisome Proliferator–Activated

Receptor Gamma (PPAR γ) in Mono(2-ethylhexyl) Phthalate (MEHP)-Mediated Cytotrophoblast Differentiation. *Environmental Health Perspectives*, [online] 127(2). doi:<https://doi.org/10.1289/ehp3730>.

Sinha, K., Das, J., Pal, P.B. and Sil, P.C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, [online] 87(7), pp.1157–1180. doi:<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>.

Soares, M.J., Chakraborty, D., Karim Rumi, M.A., Konno, T. and Renaud, S.J. (2012). Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*, [online] 33(4), pp.233–243. doi:<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.026>.

Sousa, T.C., Bonillo, C., Luiza, M., Musa, A., Scarano, W.R., Cruz, S., Eduarda, M., Teixeira, G.R., César, A., Pacagnelli, F.L., Brandt, J.Z. and Leonardo (2022). Prostate histological investigation in rats exposed to bisphenol a and phytochemicals during the perinatal period and subjected to hormonal stimulus in adulthood. *International Journal of Environmental Health Research*, [online] 34(1), pp.201–212. doi:<https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2140127>.

Strakovsky, R.S. and Schantz, S.L. (2018). Impacts of bisphenol A (BPA) and phthalate exposures on epigenetic outcomes in the human placenta. *Current Zoology*, [online] 4(3), pp.dvy022–dvy022. doi:<https://doi.org/10.1093/eep/dvy022>.

Street, M.E., Audouze, K., Legler, J., Sone, H. and Palanza, P. (2021). Endocrine Disrupting Chemicals: Current Understanding, New Testing Strategies and Future Research Needs. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 22(2), p.933. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms22020933>.

Syngenta. (2019). CALARIS. [online] Available at: <https://www.syngenta.com.br/product/crop-protection/calaris>.

Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A. and Frederick (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [online] 102(19), pp.7014–7019. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0502544102>.

Timms, B.G., Mohs, T.J. and Didio, L.J.A. (1994). Ductal Budding and Branching Patterns in the Developing Prostate. *The Journal of Urology*, [online] 151(5), pp.1427–1432. doi:[https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)35273-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)35273-4).

Toivanen, R. and Shen, M.M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, [online] 144(8), pp.1382–1398. doi:<https://doi.org/10.1242/dev.148270>.

Tsikakos, D. (2006). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, [online] 851(1-2), pp.51–70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>.

Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1112. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18031112>

US EPA (2025) What is a Pesticide? EPA. Available at: <https://www.epa.gov/minimum-risk-pesticides/what-pesticide>

Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *The Science of the Total Environment*, 616–617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.10.309>

Verze, P., Cai, T. and Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, [online] 13(7), pp.379–386. doi:<https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>.

Vickman, R.E., Franco, O.E., Moline, D.C., Vander Griend, D.J., Thumbikat, P. and Hayward, S.W. (2020). The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian Journal of Urology*, [online] 7(3), pp.191–202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajur.2019.10.003>.

Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R. and Carvalho, H.F. (2006). Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. *The Anatomical Record Part*

A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, [online] 288A(8), pp.885–892. doi:<https://doi.org/10.1002/ar.a.20363>.

Walters, J.L., Lansdell, T.A., Lookingland, K.J. and Baker, L.E. (2015). The effects of gestational and chronic atrazine exposure on motor behaviors and striatal dopamine in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, [online] 289(2), pp.185–192. doi:<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.026>.

Wang, X., Zhang, P., Tang, Y., Chen, Y., Zhou, E. and Gao, K. (2024). Mast cells: a double-edged sword in inflammation and fibrosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [online] 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1466491>.

Wang, Y., Hayward, S.W., Cao, M., Thayer, K.A. and Cunha, G.R. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, [online] 68(4-5), pp.270–279. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.680414.x>.

WHO. (2011). Atrazine and Its Metabolites in Drinking-water. WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/atrazine-background-document.pdf>.

Wigle, D.T., Arbuckle, T.E., Turner, M.C., Bérubé, A., Yang, Q., Liu, S. and Krewski, D. (2008). Epidemiologic Evidence of Relationships Between Reproductive and Child Health Outcomes and Environmental Chemical Contaminants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, [online] 11(5-6), pp.373–517. doi:<https://doi.org/10.1080/10937400801921320>.

Wooding, P. and Burton, G. (2008) *Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution*. Berlin: Springer-Verlag.

Wynn, T. (2007). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, [online] 214(2), pp.199–210. doi:<https://doi.org/10.1002/path.2277>.

Yan, Y., Guo, F., Liu, K., Ding, R. and Wang, Y. (2023). The effect of endocrine-disrupting chemicals on placental development. *Frontiers in Endocrinology*, [online] 14, pp.1059854–1059854. doi:<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1059854>.

Ye, Y., Tang, Y., Xiong, Y., Feng, L. and Li, X. (2018). Bisphenol A exposure alters placentation and causes preeclampsia-like features in pregnant mice involved in reprogramming of DNA methylation of WNT2. *The FASEB Journal*, [online] 33(2), pp.2732–2742. doi:<https://doi.org/10.1096/fj.201800934rrr>.

Yin, G., Wang, Y., Cen, X., Yang, M., Liang, Y. and Xie, Q. (2015). Lipid Peroxidation-Mediated Inflammation Promotes Cell Apoptosis through Activation of NF- κ B Pathway in Rheumatoid Arthritis Synovial Cells. *Mediators of Inflammation*, [online] 2015(1). doi:<https://doi.org/10.1155/2015/460310>.

Zhang, D., Liu, H., Zeng, J., Miao, X., Huang, W., Chen, H., Huang, Y., Li, Y. and Ye, D. (2015). Glucocorticoid exposure in early placentation induces preeclampsia in rats via interfering trophoblast development. *General and Comparative Endocrinology*, [online] 225, pp.61–70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.019>.

Zhang, H., Liu, T.T., Ricke, E.A. and Ricke, W.A. (2024). Prostatic androgen receptor signaling shows an age-related and lobe-specific alteration in mice. *Scientific Reports*, [online] 14(1), pp.30302–30302. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-024-79879-x>.

Zhao, Y., Ao, H., Chen, L., Sottas, C.M., Ge, R., Li, L. and Zhang, Y. (2012). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate affects the steroidogenesis in rat Leydig cells through provoking ROS perturbation. *Toxicology in Vitro*, [online] 26(6), pp.950–955. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.003>.

ANEXO A – ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

1. Participação na comissão organizadora do X Simpósio de Integração dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Celular (X SIBC) realizado em 08/10/2025 a 10/10/2025, na Universidade Federal de Viçosa - UFV (Viçosa - MG), de março a outubro de 2025, contabilizando carga horária total de 305 horas.

ANEXO B – ARTIGOS GERADOS DURANTE O MESTRADO

Submetidos:

1. *Metabolites*. Unravelling mechanisms of oxi-inflammation induced by heavy metals. Luiz Otávio Guimarães-Ervilha; Mírian Quintão Assis; Izabela da Silva Lopes; Thainá Iasbik-Lima; **João Victor Leles Faria**; Ana Cláudia Ferreira Souza; Mariana Machado-Neves – Situação: *Under review*.
2. *Toxicology*. Fertility decline induced by subchronic exposure to an atrazine–mesotrione mixture in male Wistar rats. Luiz Otávio Guimarães-Ervilha; Izabela da Silva Lopes; Mírian Quintão Assis; Isabela Pereira da Silva Bento; Thainá Iasbik-Lima; **João Victor Leles Faria**; Luís Miguel Ribeiro de Almeida; Renner Philipe Rodrigues Carvalho; John Lennon de Paiva Coimbra; Renê Chagas da Silva; Fernanda Aparecida Ferrari Soares; Ana Paula Mitiko Fialho Toma; Guilherme Mattos Jardim Costa; Wellington Ronildo Clarindo; Mariana Machado-Neves – Situação: *Under review*.

Publicados:

1. Guimarães-Ervilha, L.O., Iasbik-Lima, T., Soares, L.L., **Faria, J.V.L.**, Oliveira, M.S., Carvalho, R.P.R., Morais-Santos, M., Natali, A.J. and Machado-Neves, M. (2025). Effect of pulmonary arterial hypertension on the morphology and antioxidant defence of the ventral prostate of sedentary and exercised rats. *International Journal of Experimental Pathology*, [online] 106(6). doi:<https://doi.org/10.1111/iep.70007>.
2. **Faria, J.V.L.**, Guimarães-Ervilha, L.O., Iasbik-Lima, T., Coimbra, J.L.P., Souza, T.L., Costa, G.M.J., da Silva, R.C., Morais-Santos, M. and Machado-Neves, M. (2026). Co-exposure to arsenic and nickel alters the morphology and oxidative status of the ventral prostate of Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, [online] 141, p.109182. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2026.109182>.