

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

IC-14

Isabela Dinis dos Santos

**TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA ANÁLISE DE DANOS
SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATAS ADULTAS**

São Paulo

2025

Isabela Dinis dos Santos

**TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA ANÁLISE DE DANOS
SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATAS ADULTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Ms. Rodrigo Alessandro Riemma Vela e co-orientado pela Profa. Dra. Camila Cicconi Paccola, como requisito parcial para a obtenção do título de Biomédica.

São Paulo

2025

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. CONTEXTO DO PROJETO.....	6
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 OBJETIVO GERAL.....	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. SEQUÊNCIA DE ETAPAS.....	11
4.1 ETAPA 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.2 ETAPA 2: BUROCRACIAS PARA REALIZAÇÃO DE BOLSA FAPESP.....	13
4.3 ETAPA 3: OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	15
4.3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	16
4.3.2 ACASALAMENTO E ADMINISTRAÇÃO DA DROGA.....	16
4.3.3 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	18
4.4 ETAPA 4: FIXAÇÃO, PROCESSAMENTO E PREPARO DE AMOSTRAS....	20
4.4.1 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	21
4.4.2 PREPARO DE AMOSTRAS PARA WESTERN-BLOTTING.....	22
4.5 ETAPA 5: TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	24
4.6 ETAPA 6: TÉCNICA DE WESTERN-BLOTTING.....	27
4.7 ETAPA 7: ANÁLISE DE RESULTADOS.....	29
4.7.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	29
4.7.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE WESTERN-BLOTTING.....	30
4.7.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4.8 ETAPA 8: APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO E FINALIZAÇÃO DA BOLSA. 32	
5. CONCLUSÃO.....	34
6. REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

A Biomedicina surgiu no Brasil na década de 60, e até os dias atuais o curso passou por diversas modificações institucionais, ampliando cada vez mais as suas habilitações e qualificando seus profissionais na área de saúde (1). Ela se dedica ao estudo e pesquisa em diversos setores da saúde, com ampla área para atuação, podendo auxiliar no diagnóstico de doenças, contribuir na prevenção, controle, enfrentamento e tratamentos de novas patologias e promover o bem-estar através de práticas integrativas da saúde (2). Possuindo isso em vista, um biomédico possui um papel importante no âmbito laboratorial. Desse modo, é necessário que ele possua um domínio sobre as técnicas presentes nele, executando-as com domínio sobre o manuseio dos equipamentos e materiais de pesquisa.

Para obter a competência necessária e me tornar uma profissional capacitada, ao longo da graduação, presenciei aulas teóricas que forneceram uma base de conhecimento sobre diversos conteúdos relevantes para a área da saúde e aulas práticas, onde experienciei algumas das técnicas de bancada. Além disso, por meio de trabalhos e seminários, pratiquei a leitura de artigos e realização de apresentações com os temas vistos, os quais permitiram o aprofundamento do conteúdo, onde também foi possível praticar a apresentação em público.

Nesse percurso, uma das matérias vistas foi Embriologia, a qual introduziu a explicação do início da vida e todo seu processo de formação a partir de duas únicas células, o gameta feminino e o masculino. Foi em sala de aula que surgiu o interesse nesse tema e senti a necessidade de me aprofundar no mesmo para além dela. Portanto, iniciei a busca por caminhos que abrissem oportunidades para estudar mais sobre a biologia do desenvolvimento.

O primeiro passo, foi participar da Liga Acadêmica de Reprodução Humana e Genética (LARHG) do Centro Universitário São Camilo, a qual apresentou uma área em que um biomédico pode atuar relacionada a embriologia. Nessa Liga, tive a possibilidade de conhecer mais sobre essa capacitação dentro da Biomedicina, como também, estudar mais sobre o desenvolvimento humano e por consequência formar uma base maior sobre o assunto.

Logo depois, busquei uma iniciação científica que me permitisse obter maior conhecimento sobre a embriologia. Após realizar uma busca de professores da área,

conheci a Dra. Profa. Camila Cicconi Paccola e sua linha de pesquisa, a qual realizava na Universidade Federal de São Paulo no Departamento de Morfologia e Genética, nos laboratórios da Disciplina de Biologia do Desenvolvimento (3–9) .

Na linha de pesquisa do meu projeto de iniciação científica, observei como o uso da nicotina poderia afetar o sistema reprodutor feminino através de experimentos realizados em ratas adultas. Esse cenário me proporcionou relacionar a biologia do desenvolvimento a uma questão de saúde pública, ou seja, relacionar o consumo de cigarro e seus possíveis efeitos no sistema reprodutor feminino. Nesse momento, tive contato com o campo da pesquisa e reconheci a sua importância na contribuição para a saúde da população.

Antes de iniciar o manuseio dos materiais de pesquisa, foi necessário desenvolver uma base teórica através de leitura de artigos, através da busca de informações relevantes para se embasar e formar o projeto. Para isso, foram realizadas pesquisas em sites como PubMed, Scielo e Google Acadêmico.

Iniciei a escrita do projeto, sendo os objetivos os primeiros a serem definidos para que existisse um foco da pesquisa, e assim, quais caminhos seriam seguidos para obter as respostas do que era buscado. É essencial que todo o projeto de pesquisa tenha essa etapa para delimitar aquilo que será visto, e assim, seja definida a finalidade das técnicas que serão utilizadas ao longo dele.

A seguir, as demais partes do projeto foram elaboradas com o auxílio da minha orientadora de iniciação científica, sendo elas a introdução e justificativa, materiais e métodos e forma de análise de resultados. Toda a escrita foi elaborada seguindo as normas exigidas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (10) e por consequência, o projeto foi submetido no Sistema de Apoio à Gestão (SAGe) (11) para a aquisição de uma bolsa de iniciação científica FAPESP (12).

Devido ao projeto possuir a necessidade de manejo de animais, foi também realizada a submissão do projeto no Sistema de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Paulo. Desse modo, o projeto poderia possuir a autorização para a aquisição e manejo desses animais.

Em seguida, iniciei os experimentos e realizei o manuseio das ratas, para posteriormente serem utilizadas as técnicas laboratoriais como Imuno-histoquímica e

Western-Blotting. Em sala de aula, eu já havia estudado essas técnicas e foi notório, que ao ter contato com esses assuntos anteriormente, foi um facilitador para possuir maior propriedade no que seria realizado em laboratório.

Ao realizar o projeto, desde suas primeiras etapas de leitura, até a obtenção dos resultados e discussões realizadas, obtive habilidades relevantes para o profissional da Biomedicina competente. Além de obter experiência em bancada laboratorial e manuseio de técnicas de pesquisa, me aprofundei em temas relacionados à biologia do desenvolvimento através da leitura de artigos e por consequência, formei um pensamento crítico sobre tudo aquilo que foi visto e sendo possível realizar a discussão e conclusão sobre os resultados vistos no Relatório Final do projeto.

Por fim, a pesquisa possui uma grande relevância, pois ela me permitiu a expansão dos conhecimentos e fundamentos sobre variados temas acerca da saúde e do corpo humano que possuímos hoje. Sendo assim, a área da pesquisa e as técnicas laboratoriais realizadas, são essenciais para a descoberta de novas informações que permitam a evolução da saúde humana.

2. CONTEXTO DO PROJETO

O consumo de cigarros, conhecido como tabagismo, é a principal causa evitável de morte e adoecimento no mundo (13). Dentre os principais componentes do cigarro destaca-se a nicotina, uma substância psicoativa derivada da folha do tabaco, e capaz de causar dependência química (14).

No Brasil, foi observado que a prevalência de mulheres grávidas fumantes aumentou no período de 2013 a 2019, sendo que a proporção de mulheres grávidas fumantes e mulheres não grávidas fumantes se tornou praticamente equivalente (15). Mundialmente, mais da metade das mulheres que fumavam antes da gravidez continuaram com a prática no período pré-natal (16). Em decorrência da nicotina e dos demais componentes presentes nos cigarros, o hábito de fumar causa diversos malefícios à saúde, incluindo risco de infertilidade e complicações na gestação, tais como aborto espontâneo, parto prematuro e baixo peso ao nascer (17).

Apesar dos efeitos do cigarro sobre a gestação serem estudados há muitos anos (18), até hoje não se sabe o real mecanismo pelo qual a nicotina afeta os gametas em desenvolvimento. Além disso, segundo pesquisas a respeito do impacto do fumo na saúde reprodutiva de filhas de mães fumantes, a exposição pré-natal aos componentes dos cigarros pode estar relacionada à prematuridade da menarca (19), e à possíveis alterações no ciclo reprodutivo (20–22). Estudos experimentais também verificaram alterações dos ciclos reprodutivos de ratas (23,24), bem como nos níveis de hormônios sexuais das proles (masculina e feminina) tratadas com nicotina durante a vida intrauterina (3,4,25–27).

Em mamíferos, o controle neuroendócrino dos ciclos reprodutivos se dá a partir da liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (28), o qual estimula a secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) pela adenohipófise na circulação periférica (29). Estes hormônios, então, induzem a síntese de esteróides pelas gônadas. As gônadas, por sua vez, regulam a secreção de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) por meio de *feedbacks* positivo e negativo (28).

Sabe-se, portanto, que é fundamental o bom funcionamento do eixo HHG na vida reprodutiva de homens e mulheres. O desenvolvimento normal da puberdade e a fertilidade dependem da ativação e ação conjunta do eixo hormonal, constituído pelos hormônios hipotalâmicos, hipofisários e gonadais. Nas mulheres em idade fértil, o FSH atua sobre o folículo ovariano primordial, estimulando o seu desenvolvimento morfológico e funcional. Além disso, induz aumento no número de células da granulosa, acarretando a formação do antro folicular e a produção da aromatase. O LH, por sua vez, estimula a síntese de andrógenos pelas células da teca, que sofrem aromatização em estradiol sob estímulo do FSH (30). Contudo, existem inúmeras pesquisas mostrando ação desreguladora da nicotina perante a liberação dos hormônios sexuais, tanto hipofisário como gonadais (3,31–33).

Além disso, tanto a nicotina como seu metabólito, cotinina, são detectáveis em tecido e fluidos gonadais de fumantes. A cotinina é incorporada pelas células granulosa-luteínicas do ovário, podendo comprometer o desenvolvimento do folículo (34). Isso é extremamente prejudicial visto que existe uma intensa comunicação entre as células foliculares e, ainda, as substâncias que atingem as células da teca e da granulosa podem afetar o gameta feminino. Cada tipo de célula dentro do

microambiente folicular desempenha um papel no suporte ao crescimento, maturação e aquisição de competência do oócito (35). Todas as mudanças morfológicas, celulares e moleculares pelas quais o oócito precisa passar durante sua vida, para ganhar as competências necessárias antes da fertilização, ocorrem enquanto ele está “encapsulado” no folículo ovariano. Assim, somente um folículo saudável pode conter um oócito com maquinário e componentes celulares necessários para remodelar a cromatina masculina e feminina, sustentar o desenvolvimento inicial do embrião e, em última análise, gerar um indivíduo completo e complexo (35).

A cotinina também pode inibir a apoptose em embriões de fumantes, conferindo sobrevivência “perigosa” a embriões geneticamente alterados (36,37). Neste contexto, a nicotina é citada como uma droga com ação “aparentemente contraditória” em relação às taxas de proliferação e morte celular. Enquanto alguns trabalhos mostram uma ação da droga estimulando apoptose em células ovarianas da granulosa (38,39) e células esteroideogênicas de Leydig (40), outros mostram uma ação de redução de morte celular programada (41), inclusive favorecendo o aparecimento de tumores em diversos tecidos. Da mesma forma, enquanto alguns trabalhos evidenciam sua ação mitogênica sobre certos tecidos, como musculatura lisa endotelial (42), outros mostram redução da proliferação celular, como em células somáticas e germinativas de embriões (43).

A proliferação e a morte celular são fenômenos fisiológicos com intensa ocorrência nos ovários. Mesmo antes do nascimento as células foliculares já proliferam, formando uma camada celular ao redor dos oócitos. Por outro lado, desde o nascimento das fêmeas, vários folículos ovarianos degeneram constantemente. Esse mecanismo natural de degeneração de folículos que não chegam à ovulação é denominado atresia folicular (44,45), e ocorre por um processo ativo de morte celular programada, denominado apoptose. A apoptose tem como objetivo principal eliminar células indesejadas, excessivas ou cancerígenas, tendo papel fundamental na manutenção da homeostase (46). Porém, esse processo precisa ser muito bem regulado, uma vez que a ocorrência desordenada do mesmo pode levar a diversas condições patológicas e doenças (47,48).

O processo de atresia folicular é também mediado por hormônios (49,50). De acordo com Billig et al. (51), o bloqueio da liberação de estrogênio em ratas

hipofisectomizadas aumenta a incidência de apoptose nas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais, enquanto o tratamento com o mesmo hormônio previne a morte celular. Tais observações vão de encontro aos resultados obtidos em outras pesquisas, nas quais o aumento da apoptose folicular ocorreu em consonância com a redução dos níveis de estradiol (49,52).

Como dito, o hormônio FSH é responsável por controlar a proliferação das células da granulosa ao redor do oócito, favorecendo o crescimento folicular, e ele também parece performar uma proteção celular essencial no desenvolvimento dos folículos, suprimindo a morte de células da granulosa (53). Em estudos realizados em ovários de ratas, foi observado que a presença de FSH consegue impedir a fosforilação e ativação da proteína pró-apoptótica Bad (49), promovendo o desenvolvimento do folículo antral que virá a se tornar um folículo de Graaf (50).

No que diz respeito à influência da nicotina sobre a reserva ovariana, existem trabalhos mostrando redução do número total de folículos nos ovários de roedores tratados com esta droga (52,54), associados ao comprometimento da proliferação de células da granulosa. Já em humanos, mulheres fumantes e ex-fumantes entre 35 e 54 anos apresentaram cerca da metade do número de folículos ovarianos de mulheres, na mesma faixa de idade, que nunca fumaram (55). Além disso, Sanders et al. (56) descreveram diminuição da esteroidogênese em folículos ovarianos bovinos causada por ação da nicotina sobre as células da teca interna. Nesse sentido, trabalhos realizados por nosso grupo já comprovaram efeitos da nicotina após exposição intrauterina e na amamentação sobre as células de Leydig de ratos jovens e adultos (3). Como as células de Leydig possuem função análoga às células esteroidogênicas da teca encontradas em fêmeas, ressalta-se a hipótese de ação da nicotina sobre a sobrevivência e proliferação destas.

Portanto, considerando que a exposição à nicotina durante a vida pré-natal altera o sistema neuroendócrino fetal, agindo sobre o eixo hipotálamo-hipófise e gerando efeitos a longo prazo sobre a fertilidade da prole exposta (3,6,57), é de se esperar que a perturbação dos níveis hormonais causada pela exposição à nicotina impacte o desenvolvimento e manutenção dos folículos ovarianos por meio da alteração do padrão de proliferação e morte celular.

Por fim, haja visto os efeitos do tabagismo em oposição à lenta redução do número de fumantes no mundo (58), o índice de mulheres fumantes que não abdicam do uso de cigarros ao longo da gravidez e lactação (16), aliado a pesquisas, principalmente clínicas, que conectam a exposição pré-natal à nicotina com a infertilidade feminina e antecipação da menopausa, ressalta-se a importância da realização deste estudo. Acreditamos que compreender como uma droga administrada na fase intrauterina pode impactar no funcionamento das células foliculares e dos receptores hormonais, os quais influenciam a aquisição de competência oocitária e a reserva ovariana (35), é fundamental para desenvolver estratégias para proteger o gameta feminino de condições nocivas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho terá como objetivo descrever e discutir sobre as técnicas utilizadas em laboratório de experimentação animal para avaliação de efeitos toxicológicos sobre o sistema reprodutor de ratas adultas, utilizando ratas expostas à nicotina na fase intrauterina e de lactação como modelo experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o manuseio de animais: anestesia, administração de drogas e coleta de material biológico (sangue e ovários de ratas);
- Descrever os procedimentos de fixação, processamento, inclusão e microtomia de material histológico;
- Descrever os procedimentos de coloração histológica e análise morfológica em microscopia de luz;
- Descrever os procedimentos envolvidos na técnica de imuno-histoquímica e western blotting para marcação de antígenos em tecidos de ratas;
- Discutir sobre as técnicas utilizadas, abordando suas vantagens e desvantagens.

4. SEQUÊNCIA DE ETAPAS

4.1 ETAPA 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Objetivo da etapa:

Reconhecer a linha de pesquisa do projeto e inteirar-se dos assuntos relacionados.

Desenvolvimento:

No começo da iniciação científica, foi de extrema importância formar uma base teórica para os assuntos abordados e técnicas laboratoriais realizadas, os quais seriam vivenciados ao longo da mesma. Para isso, a orientadora do projeto indicou a leitura de alguns artigos e trabalhos publicados e incentivou a pesquisa de mais materiais sobre esses assuntos a fim buscar um aprofundamento maior.

Para realizar essa etapa, além do material já disponibilizado pela orientadora, foram consultados estudos e artigos científicos na base de dados de sites como: Pubmed, NCBI, Scielo e Google Acadêmico. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave para busca: nicotina, reprodução feminina, ovário, ratas, Imuno-histoquímica, Western-Blotting.

Os primeiros artigos, eram referentes a projetos anteriores que a orientadora já havia realizado e foram utilizados para apresentar a sua linha de pesquisa (3,5–7). Além disso, foi necessário se familiarizar com protocolos e reações que ocorreriam nas técnicas laboratoriais que seriam realizadas. Para a imunohistoquímica (59–61) e Western-Blotting (62–65), inicialmente foram consultados artigos que abordavam todo o processo das técnicas e possíveis resultados futuros.

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

3. Paccola CC, Neves FMO, Cipriano I, Stumpp T, Miraglia SM. Effects of prenatal and lactation nicotine exposure on rat testicular interstitial tissue. *Andrology* [Internet]. 2014 Mar;2(2):175–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00168.x>
5. Paccola CC, Miraglia SM. Prenatal and lactation nicotine exposure affects Sertoli cell and gonadotropin levels in rats. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2016 Feb;151(2):117–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26556892/>

6. Paccola C. Impact Nicotine Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis its Repercussion Gametes Future Generation. *EC Endocrinology Metabolic Research*. 2019;
7. Paccola CC, Souza GS, Freitas IMM, Souza JC, Martins LL, Vendramini V, et al. Does maternal exposure to nicotine affect the oocyte quality and reproductive capacity in adult offspring? *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2021 Sep 1;426(115638):115638. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2021.115638>
59. Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2008 Jul [cited 2025 Mar 31];20(4):393–413. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18599844/>
60. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry-the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2025 Mar 31];51(1):42–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24129895/>
61. Gil E de S, Kubota LT, Yamamoto YI. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Quim Nova* [Internet]. 1999 Dec;22(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421999000600015>
62. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1979 Sep;76(9):4350–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
63. LeGendre N. Immobilon-P transfer membrane: applications and utility in protein biochemical analysis. *Biotechniques* [Internet]. 1990 Dec [cited 2025 Mar 31];9(6 Suppl):788–805. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2271178/>
64. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2015 [cited 2025 Mar 31];1312:17–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26043986/>

65. Sule R, Rivera G, Gomes AV. Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *Biotechniques* [Internet]. 2023 Sep [cited 2025 Mar 31];75(3):99–114. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36971113/>

Considerações e reflexões da etapa:

Essa etapa foi essencial para formar uma base teórica sólida sobre os assuntos relacionados ao projeto de pesquisa, pois me permitiu possuir um maior domínio sobre as questões que seriam abordadas. Sendo assim, formei um pensamento crítico sobre o tema do projeto e consolidei como e quais seriam as práticas laboratoriais realizadas.

Por consequência, com a leitura de artigos que realizei, foi possível formar os protocolos que seriam utilizados nos experimentos de Imuno-histoquímica e Western-Blotting, o que facilitou para ter um ponto de partida para a realização dos mesmos. Devido à diferença de materiais e de estrutura, os protocolos tiveram de ser modificados para se enquadrarem ao projeto.

Com o acervo obtido através das pesquisas que realizei e conteúdos fornecidos, tive a possibilidade de escrever o projeto utilizando-os como referências teóricas para o texto e, desse modo, ter uma linha de pesquisa bem estruturada e definida.

4.2 ETAPA 2: BUROCRACIAS PARA REALIZAÇÃO DE BOLSA FAPESP

Objetivos da etapa:

Aquisição da bolsa de iniciação científica através da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Desenvolvimento:

Ao finalizar a escrita do projeto, acreditei que o mesmo possuía potencial para ser submetido para uma bolsa de iniciação científica. Para isso, iniciei a busca por informações dos critérios e como poderia ser realizada essa submissão, sendo elas disponibilizadas no site da fundação (12).

Após ler atentamente as informações e critérios, verifiquei que me enquadrava nos mesmos e poderia realizar a solicitação assim que tivesse os

documentos necessários. Desse modo, iniciei o processo ajustando o corpo do texto do projeto para que ficasse adequado ao que era exigido pela instituição (10). O texto deveria ser subdividido em 6 partes: resumo (máximo 20 linhas), introdução e justificativa (síntese da bibliografia fundamental), objetivos (geral e específicos), plano de trabalho e cronograma de sua execução (organizado em dois semestres), material e métodos e forma de análise dos resultados.

Além disso, a FAPESP exigia outros documentos, tanto por parte do aluno de iniciação científica, quanto por parte do orientador do projeto. Portanto, eu e minha orientadora também tivemos que reunir todos esses documentos e para facilitar esse processo, utilizamos uma nuvem de compartilhamento online, na qual ambas poderiam acessar todos eles.

Ao final de todo o processo, realizei a solicitação da bolsa por meio do SAGe (11), o qual é uma página online onde todos os documentos exigidos foram registrados. Após a submissão, recebi um número de processo correspondente ao meu projeto e o retorno de um avaliador que pontuava possíveis ajustes no texto do projeto e da documentação.

Depois de realizar os ajustes, recebi a aprovação da aquisição da bolsa de iniciação científica da FAPESP, a qual teve duração de 12 meses. Além dela, foi fornecida uma Reserva Técnica como auxílio para possíveis despesas relacionadas ao projeto (66), onde a verba poderia ser liberada de acordo com a necessidade através do Sistema de Administração Financeira (SIAF) (67).

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

10. FAPESP. Projeto de Pesquisa [Internet]. [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://fapesp.br/253/projeto-de-pesquisa>
11. SAGe - Sistema de Apoio à Gestão do Fomento - Identificação [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: https://sage.fapesp.br/SAGe_WEB/jsp/loginAdm.jsp
12. FAPESP. Bolsa de Iniciação Científica [Internet]. [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://fapesp.br/bolsas/ic>
66. FAPESP. Normas para Uso dos Recursos de Reserva Técnica – válidas a partir

de 25/09/2021 [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: <https://fapesp.br/RT>

67. SIAF [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: https://sso.fapesp.br/auth/realms/sage/protocol/openid-connect/auth?response_type=code&client_id=gateway&state=F6O4kDIWtEinTNLZF9A5VPMr1AD9kLKNzt8zpfXL-ho=&redirect_uri=https://siaf.fapesp.br/login/oauth2/code/keycloak-sage

Considerações e reflexões da etapa:

A submissão da bolsa de pesquisa constituiu uma etapa de grande relevância para minha formação enquanto aluna de iniciação científica e graduanda em Biomedicina. Esse processo me proporcionou uma visão mais abrangente acerca dos aspectos burocráticos envolvidos na pesquisa científica financiada, além de ter me exigido uma postura mais madura e responsável em relação ao cumprimento de prazos e à atenção das normas estabelecidas.

A bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) não apenas foi um suporte financeiro pessoal, mas também desempenhou um papel essencial na execução do projeto de pesquisa. Isso se deve à utilização da reserva técnica associada à bolsa, pois foi possível adquirir materiais de consumo necessários para a realização dos experimentos, o que contribuiu para a continuidade e o bom andamento do projeto.

4.3 ETAPA 3: OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Objetivo da etapa:

Realizar o tratamento dos animais para a obtenção dos ovários a fim de serem analisados posteriormente.

Desenvolvimento:

Para iniciar os experimentos que seriam realizados, primeiro era necessário realizar a coleta do material que seria utilizado. No caso do projeto em questão seria o ovário de ratas não expostas à nicotina (grupo sham) e ratas expostas à nicotina (grupo nicotina). Para isso, 20 ratas foram divididas igualmente entre ambos os grupos e foram tratadas de forma adequada para a obtenção das fêmeas descendentes e conseqüentemente, foi realizada a coleta dos ovários das mesmas

Para a obtenção dos animais, o projeto em questão foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP/UNIFESP) – Comissão de Ética no uso de animais (CEUA), sendo considerado aprovado (Nº 9565270923).

4.3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizadas as proles obtidas de acasalamentos de 20 ratas albinas primíparas (*Rattus norvegicus albinus*), pertencentes à linhagem Wistar, com 10 ratos pertencentes à mesma linhagem, todos provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da UNIFESP. Somente foram utilizados animais com características aparentemente normais e saudáveis, com peso entre 220-260g (fêmeas) e 250-300g (machos). Os animais mantidos no Biotério da Disciplina de Biologia do Desenvolvimento/Departamento de Morfologia e Genética/UNIFESP, acondicionados em caixas de polietileno medindo 40x30x15 cm, sob maravalha, com água e ração *ad libitum*, em condições padronizadas de temperatura (22°-23° C), higiene, alimentação e luminosidade (12 horas de luminosidade e 12 horas de escuridão).

As ratas foram divididas em dois grupos, de acordo com o tratamento a que foram submetidas: 10 ratas receberam um implante (bomba osmótica) contendo 2mg/Kg/dia de nicotina dissolvida em água bacteriostática (Grupo N), as quais permaneceram com o implante durante toda a gestação e amamentação; 10 ratas foram utilizadas como controle “Sham” e receberam implante sem nicotina (Grupo S), ou seja, o mesmo possuiu apenas água bacteriostática, conforme descrito a seguir.

4.3.2 ACASALAMENTO E ADMINISTRAÇÃO DA DROGA

Após uma semana de acompanhamento do ciclo estral (cerca de 2 ciclos), as ratas em fase receptiva (final de proestro) foram submetidas a acasalamento ao escurecer (após 18h), com machos da mesma linhagem, na proporção de um macho para duas fêmeas. No início da manhã seguinte (até 8h), foram obtidos esfregaços de células do epitélio vaginal para a detecção da presença de espermatozoides. O dia em que o teste se apresentou positivo (presença de espermatozoides no esfregaço), foi considerado o primeiro dia (dia 1) do desenvolvimento embrionário

(68). Neste mesmo dia, as fêmeas foram submetidas à anestesia para implante subcutâneo de uma mini-bomba osmótica (*minipump*, modelo 2ML4 da Alzet®). Este é o método mais comum para exposição crônica à nicotina (mini-bomba osmótica subcutânea), pois libera, diariamente, uma taxa constante de nicotina (69).

Desta forma, a mini-bomba foi implantada subcutaneamente, na região do dorso, através de uma incisão cirúrgica, em condições estéreis, após tricotomia na área de implante. Cada mini-bomba possui capacidade para 2 ml (2000 µl) de solução; este volume é liberado continuamente na taxa de 2,5 µl/h, ao longo de 28 dias, conforme calibração e especificação do fabricante (Alzet®). Com base na literatura, cada fêmea prenhe foi tratada cronicamente durante a gestação e durante a lactação com a dose de 2 mg/Kg/dia de nicotina que, em ratos, corresponde ao consumo humano diário de 20 cigarros (70).

Portanto, cada mini-bomba foi abastecida com a dose de nicotina (D) calculada de acordo com a fórmula: **D = 2 mg de nicotina X peso da rata em Kg X 28 dias**. A nicotina (Sigma Chemical®) foi dissolvida em 2 ml de água bacteriostática (Abbott®) e injetada na mini-bomba minutos antes da cirurgia, conforme normas estabelecidas pelo fabricante. O primeiro implante, realizado no 1º dia gestacional, garantiu a exposição da prole à droga através da placenta, liberando nicotina na circulação materna até o nascimento. Como este modelo de mini-bomba tem duração de 28 dias, no dia seguinte ao nascimento dos filhotes, a mini-bomba foi substituída por uma nova, utilizando-se o mesmo procedimento cirúrgico previamente descrito. No momento da substituição da mini-bomba, cada fêmea foi novamente pesada e a dose de 2 mg/kg/dia calculada, de acordo com o peso da rata. Este segundo implante, através da passagem de nicotina da circulação materna para o leite, garantiu o recebimento de nicotina pela prole até o desmame realizado no 22º dia pós-natal. Este protocolo já está padronizado e vem sendo utilizado em diversos experimentos realizados em outros projetos da minha orientadora de iniciação científica (3–5,7–9).

As fêmeas que originaram os grupos controle “sham” também receberam o implante da mini-bomba que, entretanto, foi abastecida apenas com água bacteriostática, sem a nicotina, que foi liberada da mesma forma que a solução de nicotina para os grupos experimentais.

As ratas prenhes foram monitoradas diariamente. Os sinais clínicos de toxicidade e de possíveis distúrbios gestacionais (reabsorção fetal, sangramentos vaginais, ocorrência de parto prematuro) também foram monitorados.

4.3.3 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Após o nascimento dos filhotes, cada gaiola acondicionou a mãe e 8 filhotes, preferencialmente fêmeas, de modo a obter-se o máximo possível de homogeneidade no peso corpóreo da prole ao final da amamentação. Após o desmame (aos 22 dias pós-parto), as ratas (mães) foram submetidas a eutanásia com overdose de anestésico (71).

Quando a prole atingiu a idade de 90 dias, as ratas foram pesadas e avaliadas quanto aos aspectos clínicos de saúde (pelagem, coloração dos olhos, comportamento) e quanto à regularidade do ciclo estral, por meio da coleta diária de esfregaços da citologia vaginal, por 10 dias consecutivos (correspondente a 2 ciclos estrais). Somente as fêmeas com pesos considerados normais (acima de 220g) e saudáveis foram analisadas. Para os experimentos, 1 fêmea de cada ninhada foi avaliada, de acordo com o grupo de tratamento materno: prole exposta à nicotina (N, n = 10 fêmeas) e prole não exposta à nicotina (S, n = 10 fêmeas).

Após os 10 dias de coleta de citologia vaginal (por volta de 100 dpp), as ratas foram submetidas à eutanásia para coleta de sangue (para demais análises) e dos ovários.

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

3. Paccola CC, Neves FMO, Cipriano I, Stumpp T, Miraglia SM. Effects of prenatal and lactation nicotine exposure on rat testicular interstitial tissue. *Andrology* [Internet]. 2014 Mar;2(2):175–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00168.x>
4. Miranda-Spooner M, Paccola CC, Neves FMO, de Oliva SU, Miraglia SM. Late reproductive analysis in rat male offspring exposed to nicotine during pregnancy and lactation. *Andrology* [Internet]. 2016 Mar;4(2):218–31. Available from: <https://doi.org/10.1111/andr.12100>
5. Paccola CC, Miraglia SM. Prenatal and lactation nicotine exposure affects Sertoli

- cell and gonadotropin levels in rats. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2016 Feb;151(2):117–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26556892/>
7. Paccola CC, Souza GS, Freitas IMM, Souza JC, Martins LL, Vendramini V, et al. Does maternal exposure to nicotine affect the oocyte quality and reproductive capacity in adult offspring? *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2021 Sep 1;426(115638):115638. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2021.115638>
 8. Francisco CM, Fischer LW, Vendramini V, de Oliva SU, Paccola CC, Miraglia SM. Resveratrol reverses male reproductive damage in rats exposed to nicotine during the intrauterine phase and breastfeeding. *Andrology* [Internet]. 2022 Jul;10(5):951–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/andr.13183>
 9. Souza GS, Freitas IMM, Souza JC, Miraglia SM, Paccola CC. Transgenerational effects of maternal exposure to nicotine on structures of pituitary-gonadal axis of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2023 Jun 1;468(116525):116525. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2023.116525>
 68. Witschi E. Prenatal vertebrate development: rat. In: Altman PL, Dittmer DS, editors. *Growth, Including Reproduction Morphological b Development*. Washington, DC; 1962. p. 304–14.
 69. Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2007 Feb;190(3):269–319. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>
 70. Levin ED, Wilkerson A, Jones JP, Christopher NC, Briggs SJ. Prenatal nicotine effects on memory in rats: pharmacological and behavioral challenges. *Brain Res Dev Brain Res* [Internet]. 1996 Dec 23;97(2):207-15. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-3806\(96\)00144-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-3806(96)00144-7)
 71. Andersen ML, Tufik S. Rodent model as tools in ethical biomedical research [Internet]. Berlin, Germany: Springer; 2015. 514 p. Available from: <https://books.google.at/books?id=FtQLCwAAQBAJ>

Considerações e reflexões da etapa:

Essa etapa foi a primeira que exigiu habilidade para a realização das técnicas laboratoriais. Ela envolveu todo o processo do manejo de animais a fim de coletar as amostras que foram analisadas ao longo do projeto, o qual foi devidamente autorizado pelo CEUA. Para tal, foi essencial eu realizar um curso de extensão oferecido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), onde foi possível retomar conceitos básicos vistos em sala aula e estudar mais sobre o tema.

Realizar o manejo de animais me exigiu elevada precisão e agilidade por se tratar de animais vivos e conscientes. Foi imprescindível saber como realizar a contenção e manipulação adequada para a redução de danos e coleta de informações, como a identificação do ciclo estral. Ao realizar implante contendo nicotina/água bacteriostática e posteriormente a eutanásia, me demandou minuciosidade ao manipular o organismo animal, a fim de minimizar a dor e possíveis interferências aos resultados experimentais.

Desse modo, adotei todas as precauções necessárias com os animais envolvidos: busquei utilizar uma quantidade reduzida de ratas, utilizando-se alternativas para reduzir a dor e sofrimento causados, possuindo como princípio a bioética e os 3 R's envolvidos no bioterismo, os quais são redução, refinamento e substituição.

4.4 ETAPA 4: FIXAÇÃO, PROCESSAMENTO E PREPARO DE AMOSTRAS

Objetivo da etapa:

Preparar as amostras adequadamente para as técnicas realizadas posteriormente no projeto.

Desenvolvimento:

Esta etapa ocorreu logo após a coleta do material biológico do animal, ou seja, os ovários. Assim que foram coletados, parte deles foram submersos em líquido de Bouin, segundo protocolo recomendado pelo fabricante (72), o qual promove diversos benefícios ao material como: o cessamento das reações bioquímicas, o que permite a preservação das estruturas celulares e teciduais, incluindo proteínas solúveis e estruturais, como também previne a autólise e o

deslocamento dos constituintes celulares, incluindo antígenos e enzimas, levando a preservação da antigenicidade e dos componentes teciduais (60). Os demais ovários sofreram o processo de congelamento rápido com o mesmo objetivo de preservar o material biológico e permitir a realização de um homogeneizado para a obtenção de amostra de proteínas posteriormente.

4.4.1 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Metade dos ovários obtidos foram destinados à fixação em líquido de Bouin e antes de serem imersos, tiveram os excessos de gordura e tecido conjuntivo retirados de sua superfície e foi realizada lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para a remoção do excesso de sangue da estrutura. Desse modo, as amostras estavam preparadas para serem submersas no líquido, onde ficaram por no máximo 24 horas, finalizando o processo de fixação. Essa técnica foi registrada pela primeira vez na década de 50 (73) e ao longo dos anos continuou sendo muito utilizada para a realização de lâminas histológicas (3,74–76).

Posteriormente, esses ovários foram submetidos ao processo de hidratação para inclusão em parafina. Para isso, esse material passou por uma bateria gradativa de álcool etílico, sendo submerso por 30 minutos em cada uma, com concentrações de 70%, 90% e 100% respectivamente. Como o nome do processo diz, o álcool realiza a retirada de água existente no material e o mesmo é necessário pois a parafina é hidrofóbica e o material precisa estar viável para ser incluído na mesma para que sejam obtidos cortes histológicos de boa qualidade.

Após a desidratação ocorre a diafanização, a qual consiste na submersão do material em um solvente intermediário entre a etapa do álcool e da inclusão parafina. O solvente utilizado neste cenário é o xilol, foram realizadas duas baterias do mesmo em duas concentrações gradativas por 30 minutos, o que deixou os ovários mais translúcidos e retirou a característica amarelada causada pelo ácido pícrico presente no líquido de Bouin.

Desse modo, o material estava preparado para a impregnação em parafina que consiste na submersão do material em uma bateria de parafina líquida a 60 °C em uma estufa histológica. Os ovários foram submersos em parafinas com três concentrações gradativas por 30 minutos cada.

Por fim, eles estavam prontos para serem incluídos em blocos de parafina. Para isso, em um molde metálico com o tamanho adequado para os ovários, foi adicionada a parafina e os órgãos foram devidamente posicionados para que posteriormente a realização dos cortes no micrótomo obtivesse as seções desejadas. Após o endurecimento da parafina, foi realizado o desmolde e assim o bloco estava pronto para a etapa de microtomia.

4.4.2 PREPARO DE AMOSTRAS PARA WESTERN-BLOTTING

A outra metade de ovários obtidos pós eutanásia, também tiveram os excessos de gordura e tecido conjuntivo retirados de sua superfície e foi realizada lavagem em PBS para a remoção do excesso de sangue da estrutura. Os ovários processados, foram armazenados na geladeira a -80°C até sua utilização para realizar o Western-Blotting. A descrição da realização dessa etapa é realizada por diversas pesquisas (77,78), porém ela pode sofrer pequenas modificações de protocolo para que se enquadre no contexto de cada uma.

Essa técnica para o armazenamento e preparo de amostra, tem como principal objetivo cessar as reações bioquímicas e por outro lado, não possui como prioridade preservar a estrutura do material biológico. Isso se deve ao fato de que esse preparo foi utilizado para a realização de Western-Blotting, onde seria somente necessário a extração de proteínas através da realização de um homogeneizado da amostra, portanto não foi necessária a estrutura do órgão para a realização e análise dessa técnica.

Após o congelamento, as amostras foram homogeneizadas em microtubos contendo beads, coquetel de inibidores de proteases livre de ácido tilenodiamino tetra-acético (EDTA) e inibidores de proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK; Roche Applied Science, Mannheim, Germany), diluídos em $1000\mu\text{l}$ de solução de tampão lise (Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM) e 1% de PBS, pH 7,4. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C , por 10 minutos. A concentração de proteínas presente nos sobrenadantes foi determinada utilizando o sistema Qubit (Quanti-iT Protein. Assay Kit, Invitrogen).

Para a realização do WB, as amostras (sobrenadante) foram diluídas em tampão Laemmli (Bio-Rad Laboratories, USA) na proporção 1:1 e as proteínas desnaturadas em banho seco a 100°C , por 5 minutos.

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

3. Paccola CC, Neves FMO, Cipriano I, Stumpp T, Miraglia SM. Effects of prenatal and lactation nicotine exposure on rat testicular interstitial tissue. *Andrology* [Internet]. 2014 Mar;2(2):175–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00168.x>
60. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry-the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2025 Mar 31];51(1):42–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24129895/>
72. Bouin Data Sheet [Internet]. *Bio Optica*; 2017. Available from: https://bio-optica.it/ftp/Sito/technical_datasheet/01008_en.pdf
73. Baker JR. Fixation in cytochemistry and electron-microscopy. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 1958 Sep [cited 2025 Apr 15];6(5):303–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/6.5.303>
75. Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der Merwe L, Donner P. Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2001 Feb [cited 2025 Apr 29];303(2):277–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s004410000287>
76. Akkoyunlu G, Tepekoy F. Immunohistochemistry of paraffin sections from mouse ovaries. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2016 [cited 2025 Apr 15];1457:269–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3795-0_20
77. Li X, Lin Y, Cheng X, Yao G, Yao J, Hu S, et al. Ovarian ferroptosis induced by androgen is involved in pathogenesis of PCOS. *Hum Reprod Open* [Internet]. 2024 Feb 28;2024(2):hoae013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoae013>
78. Qu Q, Liu L, Cui Y, Liu H, Yi J, Bing W, et al. miR-126-3p containing exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote angiogenesis and attenuate ovarian granulosa cell apoptosis in a preclinical rat model of premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022 Jul 26;13(1):352. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-022-03056-y>

Considerações e reflexões da etapa:

No momento que as amostras foram coletadas pós a eutanásia dos animais, elas ainda passariam por reações bioquímicas e poderiam entrar no processo de decomposição. Para prevenir que isso ocorresse e preservar os ovários coletados, a fixação, o processamento e preparo das mesmas deve ser realizado para que eles se mantenham inalterados para a realização das técnicas.

Tive a oportunidade de compreender a importância da preservação do material estudado e entender como ela é realizada. Apesar de ter considerado uma etapa simples de realizar, observei que possui grande importância e que a preservação foi um fator crítico para a realização dos experimentos e dos resultados obtidos. Poucas amostras foram mal preparadas, mas aquelas que tiveram alguma intercorrência no processo, pude notar uma maior dificuldade na realização das técnicas e obtenção dos resultados.

Além disso, o preparo de amostras para cada técnica também é essencial pois cada uma delas necessita da amostra em diferentes formas para serem realizadas. Por exemplo, na Imuno-histoquímica é preciso preservar toda a estrutura física do material para a análise histológica, e por outro lado, para a técnica de Western-Blotting é necessário extrair a maior quantidade possível de proteínas dos ovários para quantificá-las, sendo necessário destruir sua estrutura para isso. Através do preparo dos ovários, observei que cada técnica possui sua exigência e complexidade para a realização.

4.5 ETAPA 5: TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Objetivo da etapa:

Realização da técnica de Imuno-histoquímica, a fim de identificar os antígenos desejados para possibilitar a análise em microscópio.

Desenvolvimento:

Para realizar a imuno-histoquímica, em um micrótomo foram realizadas secções histológicas transversais de ovário, com 4,5 μ m de espessura, as quais foram dispostas em duplas nas lâminas de vidro silanizadas, tomando-se o cuidado

de não inserir cortes sequenciais numa mesma lâmina (mínimo de 35 µm de espaçamento entre um corte e outro) (79).

Os cortes foram, então, desparafinizados e re-hidratados em soluções decrescentes de álcool etílico. Para marcação imuno-histoquímica dos oócitos por anticorpo específico (MVH), os cortes histológicos foram submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0) aquecido em micro-ondas por 14 minutos. A fixação e o processamento realizados anteriormente, modificam as estruturas das proteínas presentes no tecido, o que pode tornar antígenos indetectáveis por anticorpos específicos, sendo assim, o procedimento de recuperação de antígeno e reverteu as alterações produzidas pela fixação (80).

Em amostras ricas em sangue como os ovários, é necessário realizar o bloqueio da peroxidase endógena, essa etapa evitou a formação de marcação de fundo que poderia ser gerada devido à atividade enzimática naturalmente presente em hemácias (pseudoperoxidase) e granulócitos (mieloperoxidase), os quais poderiam reagir com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e produzir uma marcação marrom inespecífica (81,82).

Para isso, os cortes foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (EnVision Flex Peroxidase-Blocking Reagent; DAKO-SM801) por 20 minutos. Após lavados, os cortes foram submetidos ao bloqueio de ligações inespecíficas com albumina de soro bovino (BSA 5%) por 10 minutos (8). A seguir, o material foi incubado com anticorpo primário (MVH), por 1 hora em câmara úmida, à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário junto a uma enzima (EnVision Flex/HRP; DAKO-SM802) por 20 minutos.

Após a lavagem em PBS, foi realizada revelação da reação imuno-histoquímica pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (EnVision FLEX DAB+ Chromogen; DM827) que gera uma coloração marrom-dourada ao reagir com a enzima HRP, e para a contra-coloração foi utilizada a Hematoxilina de Harris. Em sequência, as lâminas foram montadas com lamínula para análise em microscópio de luz (8).

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

8. Francisco CM, Fischer LW, Vendramini V, de Oliva SU, Paccola CC, Miraglia SM. Resveratrol reverses male reproductive damage in rats exposed to nicotine during the intrauterine phase and breastfeeding. *Andrology* [Internet]. 2022 Jul;10(5):951–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/andr.13183>
79. Chen M, He C, Zhu K, Chen Z, Meng Z, Jiang X, et al. Resveratrol ameliorates polycystic ovary syndrome via transzonal projections within oocyte-granulosa cell communication. *Theranostics* [Internet]. 2022 Jan 1;12(2):782–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.7150/thno.67167>
80. Hayat MA. *Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods* [Internet]. 2002nd ed. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum; 2002. 355 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/b112626>
81. Copete M, Garratt J, Gilks B, Pilavdzic D, Berendt R, Bigras G, et al. Inappropriate calibration and optimisation of pan-keratin (pan-CK) and low molecular weight keratin (LMWCK) immunohistochemistry tests: Canadian Immunohistochemistry Quality Control (CIQC) experience. *J Clin Pathol* [Internet]. 2011 Mar;64(3):220–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2010.085258>
82. Elias JM. *Immunohistopathology: a practical approach to diagnosis* [Internet]. 2nd ed. Elias JM, editor. Chicago, IL: ASCP Press; 1 online resource (xvi, 589 pages illustrations). Available from: <https://archive.org/details/immunohistopatho02edelia>

Considerações e reflexões da etapa:

A imunohistoquímica é uma técnica amplamente utilizada no âmbito da pesquisa científica, ela permite a identificação e a localização de antígenos específicos em materiais biológicos, possibilitando a visualização de sua distribuição espacial em um corte histológico do material.

A execução desta técnica me exigiu elevado grau de atenção, uma vez que envolve múltiplas etapas e a utilização de diversos reagentes e protocolos. Assim, foi fundamental manter constante vigilância e planejamento, antecipando as ações subsequentes a cada procedimento realizado. Ademais, a imunohistoquímica demanda um tempo considerável de execução, o que exigiu de mim uma rigorosa organização da rotina e dos horários disponíveis.

A oportunidade de aprender e aplicar a técnica de imunohistoquímica durante a iniciação científica foi um diferencial relevante para a minha formação acadêmica como futura biomédica. Essa experiência me proporcionou não apenas o domínio prático do método, mas também a capacidade de compreender suas etapas, interpretar seus resultados e analisar criticamente suas reações, consolidando uma formação técnica e científica mais sólida.

4.6 ETAPA 6: TÉCNICA DE WESTERN-BLOTTING

Objetivo da etapa:

Realização da técnica de Western-Blotting, a fim de quantificar e analisar as proteínas desejadas.

Desenvolvimento:

A técnica de Western-Blotting é extremamente comum na área da pesquisa, sendo utilizada por diversos de modo similar ao descrito a seguir (65,77,78). É utilizada para analisar quantitativamente as proteínas extraídas de determinado material, a partir de sua transferência para uma membrana, na qual é possível realizar uma estimativa da presença e quantidade relativa, sendo possível avaliar modificações como degradação ou modificações das proteínas alvo (83).

As amostras (padronizadas em 30 µg de proteínas) e o marcador de peso molecular (Bio-Rad Life Science, USA) foram separadas em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio – gel de poliacrilamida a 10% e 12%) e, posteriormente, transferidas para membrana de nitrocelulose ECL Hybond. Para verificar a eficácia da transferência das proteínas, as membranas foram coradas com Ponceau-S 0,1% em ácido acético 5% (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Posteriormente, as membranas serão incubadas por 1 hora em solução de PBS com BSA 5%. Para detecção das proteínas foram utilizados os anticorpos primários específicos para as proteínas que eram procuradas, além de anti-β actina, como controle endógeno (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS e incubados overnight a 4°C.

Após três lavagens por 5 minutos em Wash Buffer, as membranas foram incubadas a temperatura ambiente, por 2 horas, com o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase, lavadas três vezes em Wash Buffer por 5 minutos e, reveladas por amplificação quimioluminescente (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad) no equipamento GeneGenome5 (SynGene, Cambridge, U.K.).

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

65. Sule R, Rivera G, Gomes AV. Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *Biotechniques* [Internet]. 2023 Sep [cited 2025 Mar 31];75(3):99–114. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36971113/>

77. Li X, Lin Y, Cheng X, Yao G, Yao J, Hu S, et al. Ovarian ferroptosis induced by androgen is involved in pathogenesis of PCOS. *Hum Reprod Open* [Internet]. 2024 Feb 28;2024(2):hoae013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoae013>

78. Qu Q, Liu L, Cui Y, Liu H, Yi J, Bing W, et al. miR-126-3p containing exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote angiogenesis and attenuate ovarian granulosa cell apoptosis in a preclinical rat model of premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022 Jul 26;13(1):352. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-022-03056-y>

83. Moritz CP. 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *J Proteomics* [Internet]. 2020 Feb 10;212(103575):103575. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103575>

Considerações e reflexões da etapa:

A realização do Western-Blotting foi um dos momentos da minha iniciação científica em que tive a oportunidade de praticar mais uma técnica laboratorial e expandir meus conhecimentos acerca da área da pesquisa. O principal objetivo dessa etapa era quantificar e analisar as proteínas de interesse, e, para isso, precisei seguir rigorosamente cada etapa do protocolo estabelecido.

Durante o preparo das amostras, pude perceber o quanto a atenção aos detalhes técnicos, como a concentração dos géis e a correta aplicação das amostras, impactou diretamente na qualidade dos resultados. As incubações *overnight*, foram um lembrete da necessidade de planejamento da minha rotina e

respeito ao tempo de cada etapa, reforçando que a pesquisa científica demanda não apenas habilidade técnica, mas também disciplina e comprometimento.

Percebi o quanto o Western-Blotting é uma técnica sensível e minuciosa, aprendi que a preparação cuidadosa, a padronização dos procedimentos e a validação de cada etapa são fundamentais para gerar dados confiáveis e reproduzíveis. Sinto que a realização dela consolidou ainda mais meu entendimento sobre a relação a parte prática da pesquisa, e fortaleceu minha autonomia e segurança no ambiente laboratorial.

4.7 ETAPA 7: ANÁLISE DE RESULTADOS

Objetivo da etapa:

Analisar qualitativamente e quantitativamente os resultados após as técnicas realizadas.

Desenvolvimento:

Para cada técnica realizada, foi feita uma análise específica sobre cada um dos resultados obtidos. Cada uma delas possui diferentes formas de resultados e por isso, necessidades diferentes para chegar às conclusões e formar um raciocínio crítico para a discussão e conclusão do projeto. A forma de análise dos resultados realizada e os meios escolhidos para realizá-la, são conhecidos de pesquisas científicas anteriores realizadas nos laboratórios de Disciplina da Biologia do Desenvolvimento da Unifesp (3–5,7–9)

4.7.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para obtenção das densidades das marcações foliculares por imuno-histoquímica, foi utilizado o Sistema de Análise de Imagem computadorizado (Leica LAS, Cambridge/UK), acoplado a um microscópio Olympus Bx50. Para análise da densidade numérica (Dn) de oócitos foram contadas todas as células com perfis nucleares evidentes, cuja marcação foi evidenciada pela cor castanho-dourada dentro da área folicular delimitada. Após o rastreamento e análise do corte histológico completo, o cálculo da densidade numérica (DN) de células marcadas foi obtido pela divisão do número total de células marcadas pela área total de folículo

analisado. O número de células foi, então, expresso em micrômetros quadrados (mm²): [DN = No total de células marcadas / área total de folículo analisado].

4.7.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE WESTERN-BLOTTING

Após as membranas serem reveladas por amplificação quimioluminescente, foram formadas imagens, as quais foram salvas no computador. Desse modo, as imagens foram utilizadas para realizar a quantificação das proteínas por densitometria (unidades arbitrárias) usando o software livre ImageJ para determinar a expressão relativa de cada proteína avaliada em relação ao controle endógeno β -actina.

4.7.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados, foi utilizado o programa estatístico SigmaPlot, versão 12.0, com finalidade de comparar os grupos expostos e não expostos à nicotina. Os valores dos resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise paramétrica, por meio do teste “t de Student”. Por outro lado, os valores dos resultados que não apresentaram distribuição normal e similaridade de variância, detectadas pelo programa estatístico, foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças serão consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

3. Paccola CC, Neves FMO, Cipriano I, Stumpp T, Miraglia SM. Effects of prenatal and lactation nicotine exposure on rat testicular interstitial tissue. *Andrology* [Internet]. 2014 Mar;2(2):175–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00168.x>
4. Miranda-Spooner M, Paccola CC, Neves FMO, de Oliva SU, Miraglia SM. Late reproductive analysis in rat male offspring exposed to nicotine during pregnancy and lactation. *Andrology* [Internet]. 2016 Mar;4(2):218–31. Available from: <https://doi.org/10.1111/andr.12100>
5. Paccola CC, Miraglia SM. Prenatal and lactation nicotine exposure affects Sertoli cell and gonadotropin levels in rats. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2016 Feb;151(2):117–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26556892/>

7. Paccola CC, Souza GS, Freitas IMM, Souza JC, Martins LL, Vendramini V, et al. Does maternal exposure to nicotine affect the oocyte quality and reproductive capacity in adult offspring? *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2021 Sep 1;426(115638):115638. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2021.115638>
8. Francisco CM, Fischer LW, Vendramini V, de Oliva SU, Paccola CC, Miraglia SM. Resveratrol reverses male reproductive damage in rats exposed to nicotine during the intrauterine phase and breastfeeding. *Andrology* [Internet]. 2022 Jul;10(5):951–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/andr.13183>
9. Souza GS, Freitas IMM, Souza JC, Miraglia SM, Paccola CC. Transgenerational effects of maternal exposure to nicotine on structures of pituitary-gonadal axis of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2023 Jun 1;468(116525):116525. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2023.116525>

Considerações e reflexões da etapa:

A etapa de análise qualitativa e quantitativa dos resultados representou para mim um momento crucial na construção do pensamento crítico e científico do projeto. A partir dos dados obtidos das técnicas distintas e da subsequente análise estatística, pude desenvolver uma compreensão mais profunda não apenas dos resultados isolados, mas também relacioná-los entre os diferentes grupos (controle e nicotina).

Durante a análise dos resultados de Imuno-histoquímica, exigiu de mim atenção redobrada aos detalhes e rigor metodológico. A necessidade de identificar as marcações específicas dos folículos e calcular as densidades numéricas reforçou a importância da interpretação adequada da histologia específica do tecido ovariano. Esse processo fortaleceu minhas competências na padronização de critérios de contagem e no controle de variáveis experimentais, aspectos fundamentais para a validação dos resultados obtidos.

Na análise dos dados provenientes do Western-Blotting, a experiência de trabalhar utilizando o software ImageJ através da densitometria, no qual pude realizar a quantificação relativa das proteínas, normalizando-as em relação ao

controle interno (β -actina), ressaltou para mim a importância da análise comparativa para a interpretação dos dados.

A etapa de análise estatística também foi decisiva para validar os achados experimentais, ela permitiu que eu consolidasse minha capacidade de interpretar resultados de forma crítica. Ela me permitiu que eu analisasse quantitativamente todos os resultados obtidos, sendo possível realizar comparações entre os grupos de animais e correlacionar os diferentes experimentos realizados.

Assim, a análise dos resultados não se limitou apenas à obtenção de números ou imagens. Para mim, este processo foi um importante exercício de formação científica que reforçou a importância do olhar analítico e questionador, indispensável para um pesquisador.

4.8 ETAPA 8: APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO E FINALIZAÇÃO DA BOLSA

Objetivo da etapa:

Apresentar o desenvolvimento do projeto e entregar os documentos de finalização de bolsa de iniciação científica FAPESP.

Desenvolvimento:

Após finalização de toda a trajetória do projeto, desde as primeiras pesquisas até a obtenção da análise dos resultados, tive a oportunidade de apresentá-lo no Congresso Acadêmico da Unifesp 2024. Para realizar a apresentação, encaminhei o projeto para a comissão do evento e obtive a aprovação dela.

Posteriormente, montei a apresentação no formato Power-Point e fiz sua divisão conforme o modelo do projeto encaminhado para a FAPESP (10). A montagem da mesma, consistiu principalmente na utilização de esquemas ilustrativos e mapas mentais com frases impactantes que geraram cativação da bancada e do público.

Além disso, devido a finalização da bolsa após 12 meses, foi necessário realizar um relatório científico final, o qual consta uma folha de rosto, resumo do projeto, realizações no período, participação em eventos científicos, lista de

publicações resultantes da bolsa e lista dos trabalhos preparados ou submetidos ainda não publicados (84).

Acompanhando esse relatório, a minha orientadora encaminhou uma revisão com comentários em relação ao relatório e ao meu desempenho na iniciação científica, através do “Formulário de Acompanhamento de Atividades de Bolsistas de IC”. Juntamente, também foi necessário anexar o formulário “Justificativas de Aplicação dos Recursos da Reserva Técnica de Bolsas”, o qual justificou as despesas realizadas com recursos da reserva técnica da bolsa (12).

Citações da bibliografia e ferramentas utilizadas:

10. FAPESP. Projeto de Pesquisa [Internet]. [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://fapesp.br/253/projeto-de-pesquisa>

12. FAPESP. Bolsa de Iniciação Científica [Internet]. [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://fapesp.br/bolsas/ic>

84. FAPESP. Formato para os Relatórios Científicos anuais e final - Bolsas no País [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: <https://fapesp.br/14453/formato-para-os-relatorios-cientificos-anuais-e-final-bolsas-no-pais>

Considerações e reflexões da etapa:

Durante a apresentação do projeto, tive a oportunidade de aprimorar minha criatividade na elaboração dos slides e selecionei a forma mais adequada de comunicação. Entendi que, para captar e manter a atenção da audiência, a utilização de imagens ilustrativas que complementam a apresentação oral foi fundamental, enriquecendo a mensagem transmitida de maneira mais didática e envolvente.

Para a confecção do relatório final e o preenchimento dos formulários exigidos, foi necessária uma organização rigorosa da minha agenda, a fim de atender os prazos estabelecidos. Esse contexto demandou uma reestruturação da minha rotina, que permitisse a conclusão das últimas atividades da iniciação científica, bem como a elaboração adequada de toda a documentação de finalização.

Nesse processo, tive a oportunidade de revisar e consolidar os conhecimentos e as experiências adquiridas ao longo de todo o período de iniciação científica, revisitando conceitos teóricos e práticas experimentais realizados. Assim, considero que esse momento final contribuiu significativamente para a fixação do aprendizado e das competências desenvolvidas, o que será levado para além do meu período de graduação em Biomedicina.

5. CONCLUSÃO

Realizar a iniciação científica foi uma experiência que foi um diferencial e complementou minha formação na Biomedicina. Quando tive os primeiros contatos com a embriologia ainda na graduação, e posteriormente iniciei a busca por aprofundamento no conteúdo e por práticas na área de interesse, me proporcionou novos conhecimentos e reforçou meu desejo de atuar nessa área. O interesse pela biologia do desenvolvimento surgiu em sala de aula, mas foi além dela ao me oferecer uma rotina regrada e de constância no aprendizado.

A linha de pesquisa do projeto chamou minha atenção não apenas pela relevância científica, mas pelo impacto social do tema. O tabagismo entre gestantes, continua sendo um desafio de saúde pública. Dessa forma, é extremamente relevante entender como substâncias envolvidas, como a nicotina, interferem no funcionamento do sistema reprodutor feminino, sendo possível contribuir para o estímulo de estratégias para a prevenção e cuidado com a saúde.

O desenvolvimento da pesquisa exigiu inicialmente uma imersão teórica, a revisão bibliográfica foi essencial para que eu compreendesse os mecanismos biológicos envolvidos e as técnicas que foram utilizadas. Assim, formei um raciocínio científico e uma linha de pesquisa e a estrutura textual para o projeto.

Já na fase experimental, tive meu primeiro contato com o manejo de animais. O respeito aos princípios bioéticos e ao bem-estar animal foi prioridade em todo o processo. Essa etapa exigiu técnica e minuciosidade por se tratar de modelos vivos, o que me demandou muito cuidado, responsabilidade e precisão. Após coletar os ovários, iniciei a preparação das amostras para as duas principais técnicas do estudo: imunohistoquímica e Western-Blotting. Em ambas, percebi o quanto a

fixação, processamento e preparo adequados interferem diretamente na qualidade dos resultados.

Na Imuno-histoquímica, o desafio se deu pela quantidade de etapas envolvidas e pela necessidade de cuidado com os tempos adequados de cada uma delas. Desde o momento da fixação e processamento do material, incluindo o manuseio dos anticorpos e componentes de pesquisa e até o momento da análise histológica, exigiram atenção constante. Ver o resultado final das lâminas no microscópio foi um dos momentos mais gratificantes do trabalho, pois nesse momento tive a possibilidade de observar visualmente as respostas biológicas que eu buscava. Essa técnica, além de completar meus conhecimentos no laboratório, me demandou uma organização da rotina pessoal e profissional.

Realizando a técnica de Western-Blotting, também necessitei de organização de dias para a execução cuidadosa, o que me leva a perceber que as técnicas realizadas em laboratório podem ser diferentemente executadas, porém todas necessitam de atenção e tempo para serem bem executadas. Todo o processo, desde o preparo das amostras até a revelação por quimioluminescência exigiram técnica, paciência e planejamento.

A análise dos resultados foi o momento em que as técnicas realizadas se conectaram. Foi necessário reunir o conhecimento obtido nos artigos científicos, as observações feitas ao longo das técnicas e os dados extraídos das análises em microscopia e do equipamento de quimioluminescência. Com isso, pude construir uma discussão crítica, relacionando o que foi observado com os efeitos da nicotina no funcionamento ovariano.

Como o projeto de pesquisa que foi submetido à FAPESP, foi necessário respeitar todas as normas e exigências da instituição, incluindo o momento da submissão da bolsa, o seu período de duração e finalização. Esse processo burocrático, me proporcionou uma vivência real das exigências de uma pesquisa científica financiada.

Encerrar minha iniciação científica com a apresentação dos resultados em um congresso, me permitiu aprender a compartilhar o que aprendi e ouvir contribuições de outros pesquisadores. Este processo me ofereceu mais conhecimento, maturidade científica, senso de responsabilidade e consciência sobre

o papel do biomédico na área da pesquisa e na Biologia do Desenvolvimento. Ao experienciar todo o processo de iniciação científica, o meu interesse pela pesquisa científica aumentou e fortaleceu em mim a crença de que o conhecimento é uma ferramenta de transformação.

6. REFERÊNCIAS

1. História da Biomedicina – Conselho Federal de Biomedicina [Internet]. [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://cfbm.gov.br/o-que-fazemos/historia-da-biomedicina/>
2. Manual do biomédico [Internet]. Conselho Regional de Biomedicina - 1ª Região; 2024 [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://crbm1.gov.br/site2019/wp-content/uploads/2024/10/MANUAL-DO-BIOMEDICO-OUT24.pdf>
3. Paccola CC, Neves FMO, Cipriano I, Stumpp T, Miraglia SM. Effects of prenatal and lactation nicotine exposure on rat testicular interstitial tissue. *Andrology* [Internet]. 2014 Mar;2(2):175–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00168.x>
4. Miranda-Spooner M, Paccola CC, Neves FMO, de Oliva SU, Miraglia SM. Late reproductive analysis in rat male offspring exposed to nicotine during pregnancy and lactation. *Andrology* [Internet]. 2016 Mar;4(2):218–31. Available from: <https://doi.org/10.1111/andr.12100>
5. Paccola CC, Miraglia SM. Prenatal and lactation nicotine exposure affects Sertoli cell and gonadotropin levels in rats. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2016 Feb;151(2):117–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26556892/>
6. Paccola C. Impact Nicotine Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis its Repercussion Gametes Future Generation. *EC Endocrinology Metabolic Research*. 2019;
7. Paccola CC, Souza GS, Freitas IMM, Souza JC, Martins LL, Vendramini V, et al. Does maternal exposure to nicotine affect the oocyte quality and reproductive capacity in adult offspring? *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2021 Sep 1;426(115638):115638. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2021.115638>
8. Francisco CM, Fischer LW, Vendramini V, de Oliva SU, Paccola CC, Miraglia SM. Resveratrol reverses male reproductive damage in rats exposed to nicotine during the intrauterine phase and breastfeeding. *Andrology* [Internet]. 2022 Jul;10(5):951–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/andr.13183>
9. Souza GS, Freitas IMM, Souza JC, Miraglia SM, Paccola CC. Transgenerational effects of maternal exposure to nicotine on structures of pituitary-gonadal axis of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2023 Jun 1;468(116525):116525. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2023.116525>
10. FAPESP. Projeto de Pesquisa [Internet]. [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://fapesp.br/253/projeto-de-pesquisa>
11. SAGe - Sistema de Apoio à Gestão do Fomento - Identificação [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: https://sage.fapesp.br/SAGe_WEB/jsp/loginAdm.jsp

12. FAPESP. Bolsa de Iniciação Científica [Internet]. [cited 2025 Apr 26]. Available from: <https://fapesp.br/bolsas/ic>
13. Anuththiga. Tobacco Atlas. 2022 [cited 2025 Mar 19]. Global tobacco control information & statistics I. Available from: <https://tobaccoatlas.org/>
14. da Saúde Secretaria-Executiva BS de A à. SM. Glossário temático : fatores de proteção e de risco de câncer [Internet]. Brasil: Ministério da Saúde; 2016. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/glossario-tematico-fatores-protecao-cancer.pdf>
15. Szklo AS, Grilo G, Drope J. Prevalência de tabagismo materno no Brasil em 2013 e 2019: não foi o que esperávamos quando eles estavam esperando! *Nicotine & Tobacco Research* [Internet]. Dezembro de 2024;26(12):1749–53. Available from: <https://doi.org/10.1093/ntr/ntae157>
16. Lange S, Probst C, Rehm J, Popova S. National, regional, and global prevalence of smoking during pregnancy in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* [Internet]. 2018 Jul;6(7):e769–76. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30223-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30223-7)
17. Ernst A, Kristensen SL, Toft G, Thulstrup AM, Håkonsen LB, Olsen SF, et al. Maternal smoking during pregnancy and reproductive health of daughters: a follow-up study spanning two decades. *Hum Reprod* [Internet]. 2012 Dec;27(12):3593–600. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/des337>
18. Simpson WJ. A preliminary report on cigarette smoking and the incidence of prematurity. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1957 Apr;73(4):807–15. Available from: [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(57\)90391-5](https://doi.org/10.1016/0002-9378(57)90391-5)
19. Håkonsen LB, Ernst A, Ramlau-Hansen CH. Maternal cigarette smoking during pregnancy and reproductive health in children: a review of epidemiological studies. *Asian J Androl* [Internet]. 2014 Jan;16(1):39–49. Available from: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122351>
20. Thomas EJ, Edridge W, Weddell A, McGill A, McGarrigle HH. The impact of cigarette smoking on the plasma concentrations of gonadotrophins, ovarian steroids and androgens and upon the metabolism of oestrogens in the human female. *Hum Reprod* [Internet]. 1993 Aug;8(8):1187–93. Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138226>
21. Soldin OP, Makambi KH, Soldin SJ, O'Mara DM. Steroid hormone levels associated with passive and active smoking. *Steroids* [Internet]. 2011 Jun;76(7):653–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.042>
22. Fried PA, James DS, Watkinson B. Growth and pubertal milestones during adolescence in offspring prenatally exposed to cigarettes and marihuana. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2001 Sep;23(5):431–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0892-0362\(01\)00161-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0892-0362(01)00161-1)
23. Patil SR, Ravindra, Patil SR, Londonkar R, Patil SB. Nicotine induced ovarian and uterine changes in albino mice. *Indian J Physiol Pharmacol* [Internet]. 1998 Oct;42(4):503–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874351>
24. Patil S, Patil S, Bhaktaraj B, Patil SB. Effect of graded doses of nicotine on ovarian and uterine activities in albino rats. *Indian J Exp Biol* [Internet]. 1999 Feb;37(2):184–6.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10641142>

25. Kolawole T, Adienbo O, Dapper V. Ameliorative effects of hydromethanolic extract of *Citrullus lanatus* (watermelon) rind on semen parameters, reproductive hormones and testicular oxidative status following nicotine administration in male Wistar rats. *Niger J Physiol Sci* [Internet]. 2019 Jun 30;34(1):83–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31449276>
26. Holloway AC, Kellenberger LD, Petrik JJ. Fetal and neonatal exposure to nicotine disrupts ovarian function and fertility in adult female rats. *Endocrine* [Internet]. 2006 Oct;30(2):213–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/ENDO:30:2:213>
27. Meyer DC, Carr LA. The effects of perinatal exposure to nicotine on plasma LH levels in prepubertal rats. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 1987 Mar;9(2):95–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0892-0362\(87\)90084-5](http://dx.doi.org/10.1016/0892-0362(87)90084-5)
28. Uenoyama Y, Inoue N, Maeda KI, Tsukamura H. The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals. *J Reprod Dev* [Internet]. 2018 Dec 14;64(6):469–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2018-110>
29. Desaulniers AT, Cederberg RA, Lents CA, White BR. Expression and role of gonadotropin-releasing hormone 2 and its receptor in mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2017 Dec 11;8:269. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2017.00269>
30. Kohek MB da F, Latronico AC. O papel dos receptores das gonadotrofinas na reprodução feminina. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. 2001 Aug;45(4):369–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302001000400009>
31. Guo X, Wang H, Wu X, Chen X, Chen Y, Guo J, et al. Nicotine affects rat Leydig cell function in vivo and vitro via down-regulating some key steroidogenic enzyme expressions. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2017 Dec;110:13–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.055>
32. Halder S, Trauth S, Pearce AR. Oral nicotine alters uterine histo-morphology but does not disrupt the estrous cycle in female rats. *Nicotine Tob Res* [Internet]. 2016 May;18(5):590–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ntr/ntv134>
33. Oyeyipo IP, Adeyemi DH, Abe TR. Testosterone and testicular changes in F1 offspring of Wistar rats maternally exposed to nicotine during gestation. *JBRA Assist Reprod* [Internet]. 2018 Sep 1;22(3):162–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.5935/1518-0557.20180031>
34. Levy R, Elder K, Ménéz Y. Cytoplasmic transfer in oocytes: biochemical aspects. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2004 May;10(3):241–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmh016>
35. Del Collado M, Andrade GM, Meirelles FV, da Silveira JC, Perecin F. Contributions from the ovarian follicular environment to oocyte function. *Anim Reprod* [Internet]. 2018 Aug 17;15(3):261–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0082>
36. Zenzes M, Reed T. Cigarette smoking inhibits apoptosis (programmed cell death) early human embryos. *Fertil Steril*. 1999;72.
37. Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2000 Mar [cited 2025 Mar 27];6(2):122–31. Available

from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10782570/>

38. Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B. Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod* [Internet]. 2006 Mar;21(3):610–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dei393>
39. El-Meligy MMS, Hady RHA, Samaei ARB, Eldien HMS. [CITAÇÃO] Effect of nicotine administration and its withdrawal on the reproductive organs, fertility, and pregnancy outcome in female rats. *J Forensic Med Clin Toxicol* [Internet]. 2007; Available from: <https://scholar.google.com.br/citations?user=c8q9mNwAAAAJ&hl=pt-BR&oi=sra>
40. Kim KH, Joo KJ, Park HJ, Kwon CH, Jang MH, Kim CJ. Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells. *Fertil Steril* [Internet]. 2005 Apr;83 Suppl 1(4):1093–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.12.013>
41. Hakki A, Pennypacker K, Eidizadeh S, Friedman H, Pross S. Nicotine inhibition of apoptosis in murine immune cells. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2001 Nov;226(10):947–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/153537020122601011>
42. Carty CS, Huribal M, Marsan BU, Ricotta JJ, Dryjski M. Nicotine and its metabolite cotinine are mitogenic for human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* [Internet]. 1997 Apr;25(4):682–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0741-5214\(97\)70295-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0741-5214(97)70295-7)
43. Mamsen LS, Lutterodt MC, Andersen EW, Skouby SO, Sørensen KP, Andersen CY, et al. Cigarette smoking during early pregnancy reduces the number of embryonic germ and somatic cells. *Hum Reprod* [Internet]. 2010 Nov;25(11):2755–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq215>
44. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* [Internet]. 1994 Dec;15(6):707–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-15-6-707>
45. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev* [Internet]. 2012 [cited 2025 Mar 27];58(1):44–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22450284/>
46. Li M, Wang D, He J, Chen L, Li H. Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020 Jan;151(104547):104547. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104547>
47. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* [Internet]. 1998 Jan 28;279(4):300–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.279.4.300>
48. Kist M, Vucic D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *EMBO J* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2025 Mar 27];40(5):e106700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33439509/>
49. Kaipia A, Hsu SY, Hsueh AJ. Expression and function of a proapoptotic Bcl-2 family member Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter (BAD) in rat ovary. *Endocrinology* [Internet]. 1997 Dec;138(12):5497–504. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.138.12.5588>
50. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* [Internet].

- 1997;59(1):349–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.349>
51. Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* [Internet]. 1993 Nov;133(5):2204–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.133.5.8404672>
 52. Sezer Z, Ekiz Yilmaz T, Gungor ZB, Kalay F, Guzel E. Effects of vitamin E on nicotine-induced lipid peroxidation in rat granulosa cells: Folliculogenesis. *Reprod Biol* [Internet]. 2020 Mar;20(1):63–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2019.12.004>
 53. Yadav AK, Yadav PK, Chaudhary GR, Tiwari M, Gupta A, Sharma A, et al. Autophagy in hypoxic ovary. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019 Sep;76(17):3311–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-019-03122-4>
 54. Wang YF, Sun XF, Han ZL, Li L, Ge W, Zhao Y, et al. Protective effects of melatonin against nicotine-induced disorder of mouse early folliculogenesis. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2018 Mar 28;10(3):463–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/aging.101405>
 55. Westhoff C, Murphy P, Heller D. Predictors of ovarian follicle number. *Fertil Steril* [Internet]. 2000 Oct;74(4):624–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01527-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01527-2)
 56. Sanders SR, Cuneo SP, Turzillo AM. Effects of nicotine and cotinine on bovine theca interna and granulosa cells. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2002 Nov;16(6):795–800. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0890-6238\(02\)00049-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0890-6238(02)00049-7)
 57. Smith L, Cloak C, Poland R, Torday J, Ross M. Prenatal nicotine increases testosterone levels in the fetus and female offspring. *Nicotine Tob Res* [Internet]. 2003 Jun 1;5(3):369–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/146222031000094196>
 58. OMS. Consumo de tabaco está diminuindo, mas ritmo de redução ainda é insuficiente, alerta novo relatório da OMS [Internet]. 2018 [cited 2025 Mar 29]. Available from: <https://www.paho.org/pt/noticias/30-5-2018-consumo-tabaco-esta-diminuindo-mas-ritmo-reducao-ainda-e-insuficiente-alerta>
 59. Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2008 Jul [cited 2025 Mar 31];20(4):393–413. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18599844/>
 60. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry-the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2025 Mar 31];51(1):42–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24129895/>
 61. Gil E de S, Kubota LT, Yamamoto YI. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Quim Nova* [Internet]. 1999 Dec;22(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421999000600015>
 62. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1979 Sep;76(9):4350–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

63. LeGendre N. Immobilon-P transfer membrane: applications and utility in protein biochemical analysis. *Biotechniques* [Internet]. 1990 Dec [cited 2025 Mar 31];9(6 Suppl):788–805. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2271178/>
64. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2015 [cited 2025 Mar 31];1312:17–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26043986/>
65. Sule R, Rivera G, Gomes AV. Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *Biotechniques* [Internet]. 2023 Sep [cited 2025 Mar 31];75(3):99–114. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36971113/>
66. FAPESP. Normas para Uso dos Recursos de Reserva Técnica – válidas a partir de 25/09/2021 [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: <https://fapesp.br/RT>
67. SIAF [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: https://sso.fapesp.br/auth/realms/sage/protocol/openid-connect/auth?response_type=code&client_id=gateway&state=F6O4kDIWtEinTNLZF9A5VPMr1AD9kLKNzt8zpfXL-ho=&redirect_uri=https://siaf.fapesp.br/login/oauth2/code/keycloak-sage
68. Witschi E. Prenatal vertebrate development: rat. In: Altman PL, Dittmer DS, editors. *Growth, Including Reproduction Morphological Development*. Washington, DC; 1962. p. 304–14.
69. Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2007 Feb;190(3):269–319. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>
70. Levin ED, Wilkerson A, Jones JP, Christopher NC, Briggs SJ. Prenatal nicotine effects on memory in rats: pharmacological and behavioral challenges. *Brain Res Dev Brain Res* [Internet]. 1996 Dec 23;97(2):207–15. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-3806\(96\)00144-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-3806(96)00144-7)
71. Andersen ML, Tufik S. *Rodent model as tools in ethical biomedical research* [Internet]. Berlin, Germany: Springer; 2015. 514 p. Available from: <https://books.google.at/books?id=FtQLCwAAQBAJ>
72. Bouin Data Sheet [Internet]. *Bio Optica*; 2017. Available from: https://bio-optica.it/ftp/Sito/technical_datasheet/01008_en.pdf
73. Baker JR. Fixation in cytochemistry and electron-microscopy. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 1958 Sep [cited 2025 Apr 15];6(5):303–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/6.5.303>
74. Wordinger RJ, Brun-Zinkernagel AM, Chang IF. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) within growing and atretic mouse ovarian follicles. *Growth Factors* [Internet]. 1993 [cited 2025 Apr 29];9(4):279–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/08977199308991588>
75. Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der Merwe L, Donner P. Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2001 Feb [cited 2025 Apr 29];303(2):277–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s004410000287>

76. Akkoyunlu G, Tepekoy F. Immunohistochemistry of paraffin sections from mouse ovaries. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2016 [cited 2025 Apr 15];1457:269–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3795-0_20
77. Li X, Lin Y, Cheng X, Yao G, Yao J, Hu S, et al. Ovarian ferroptosis induced by androgen is involved in pathogenesis of PCOS. *Hum Reprod Open* [Internet]. 2024 Feb 28;2024(2):hoae013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoae013>
78. Qu Q, Liu L, Cui Y, Liu H, Yi J, Bing W, et al. miR-126-3p containing exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote angiogenesis and attenuate ovarian granulosa cell apoptosis in a preclinical rat model of premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022 Jul 26;13(1):352. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-022-03056-y>
79. Chen M, He C, Zhu K, Chen Z, Meng Z, Jiang X, et al. Resveratrol ameliorates polycystic ovary syndrome via transzonal projections within oocyte-granulosa cell communication. *Theranostics* [Internet]. 2022 Jan 1;12(2):782–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.7150/thno.67167>
80. Hayat MA. *Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods* [Internet]. 2002nd ed. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum; 2002. 355 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/b112626>
81. Copete M, Garratt J, Gilks B, Pilavdzic D, Berendt R, Bigras G, et al. Inappropriate calibration and optimisation of pan-keratin (pan-CK) and low molecular weight keratin (LMWCK) immunohistochemistry tests: Canadian Immunohistochemistry Quality Control (CIQC) experience. *J Clin Pathol* [Internet]. 2011 Mar;64(3):220–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2010.085258>
82. Elias JM. *Immunohistopathology: a practical approach to diagnosis* [Internet]. 2nd ed. Elias JM, editor. Chicago, IL: ASCP Press; 1 online resource (xvi, 589 pages illustrations). Available from: <https://archive.org/details/immunohistopatho02edelia>
83. Moritz CP. 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *J Proteomics* [Internet]. 2020 Feb 10;212(103575):103575. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103575>
84. FAPESP. *Formato para os Relatórios Científicos anuais e final - Bolsas no País* [Internet]. [cited 2025 Apr 28]. Available from: <https://fapesp.br/14453/formato-para-os-relatorios-cientificos-aneais-e-final-bolsas-no-pais>