

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/02/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR AO  
DIMETANOSSULFONATO DE ETANO ASSOCIADO OU NÃO AO  
DIEPÓXIDO DE 4-VINILCICLOHEXENO: UMA NOVA ABORDAGEM  
PARA O CONTROLE POPULACIONAL DE ROEDORES

**KAROLINA DA SILVA TONON**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral  
e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular  
Estrutural e Funcional*

*Orientadora: Prof. Dra. Wilma De Grava Kempinas*

KAROLINA DA SILVA TONON

**EFEITOS REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR AO  
DIMETANOSSULFONATO DE ETANO ASSOCIADO OU NÃO AO DIEPÓXIDO  
DE 4-VINILCICLOHEXENO: UMA NOVA ABORDAGEM PARA O CONTROLE  
POPULACIONAL DE ROEDORES**

**REPRODUCTIVE EFFECTS OF THE EXPOSURE OF FEMALE WISTAR RATS  
TO ETHANE DIMETHANESULPHONATE ASSOCIATED OR NOT TO 4-  
VINYLCHYCLOHEXENE DIEPOXIDE: A NEW APPROACH TO RODENTS  
POPULATION CONTROL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia  
Celular Estrutural e Funcional*

Dissertation presented to the Biosciences Institute,  
Campus Botucatu, São Paulo State University  
(UNESP), to obtain the degree of Master in the General  
and Applied Biology Post-Graduate Program, in the  
Area of *Structural and Functional Cellular Biology*

Orientadora: Prof. Dra. Wilma De Grava Kempinas

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tonon, Karolina da Silva.

Efeitos reprodutivos da exposição de ratas Wistar ao dimetanossulfonato de etano associado ou não ao diepóxido de 4-vinilciclohexeno : uma nova abordagem para o controle populacional de roedores / Karolina da Silva Tonon. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wilma De Grava Kempinas

Capes: 21007004

1. Ratos Wistar. 2. Reprodução. 3. Controle da população. 4. Animais - População.

Palavras-chave: Controle populacional de ratos; Diepóxido de 4-vinilciclohexeno; Dimetanossulfonato de etano; Ratas Wistar; Reprodução feminina.

Botucatu, 18 de fevereiro de 2022

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Prof. Dr. André Luis Filadelpho

Dra. Josiane de Lima Rosa

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se na Seção Técnica de Pós-Graduação do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

# *Dedicatória*

---

Dedico este trabalho à minha família: Meus pais, **Reinaldo José Tonon** e **Kátia Simone da Silva Tonon**, minha irmã, **Karen da Silva Tonon**, e minha avó **Maria Eliza Paschoalinotto Tonon**, que são meus maiores incentivadores e a razão maior de tudo o que consegui conquistar até aqui. Sem seu apoio, que me foi concedido de maneira incondicional e ilimitada, nada teria sido possível.

Amo vocês!!!

*“I am not afraid of storms, for I am learning how to sail my ship.”*

Louisa May Alcott  
(Little Women)

# *Agradecimentos*

---

A **Deus**, que me guiou até aqui. Pela proteção e por tudo que sou e tenho, pelo amparo encontrado em momentos de solidão, tristeza e fraqueza. Por me levantar e não me deixar desistir. Por tudo.

À minha família: Meus pais, **Reinaldo José Tonon** e **Kátia Simone da Silva Tonon**, e minha irmã, **Karen da Silva Tonon**, que são minha maior riqueza. Por todo incentivo e apoio em todas as horas, boas ou difíceis, confusas ou claras. Todo meu amor a vocês, meu refúgio e fortaleza. À minha avó, **Maria Eliza Paschoalinotto Tonon**, minha incentivadora de todas as horas, minha avó **Irene da Silva** (in memoriam), guerreira invencível e altruísta, meu avô **Cícero da Silva** (in memoriam), que se foi muito cedo e deixou sua diligência como lição, e meu avô **Valter Tonon** (in memoriam), homem de negócios, visão, inteligência e coração. Cada um dos meus avós é ou foi um(a) batalhador(a). Um(a) mágico(a), que transforma palha em ouro. Cada um dos meus avós é uma das minhas raízes, de onde vim. Levo comigo para sempre no coração.

À minha orientadora, Profa. **Dra. Wilma De Grava Kempinas**, por ser modelo e referência de profissional, professora e pesquisadora. Por todas as oportunidades criadas para o laboratório e por todos os esforços para trazer o melhor para seus alunos. Pela orientação, dada de bom grado e atenta às nossas necessidades, sempre realizada de forma excepcional. Por acreditar no meu trabalho e em mim. A senhora é minha inspiração. Te admiro muito e tenho, e sempre terei, muito orgulho de ser orientada pela senhora!

Ao **Jorge Willian Franco de Barros**, meu amigo e essa pessoa incrível, que sempre está disposto a ajudar a todos, muitas vezes deixando a si mesmo para depois. Muito obrigada por todos esses anos de amizade, de parceria no laboratório, de risadas e sessões karaokê. Você é um arraso! Tenho certeza que você vai ser um pesquisador/professor incrível! Sempre que precisar, conta comigo! E you better work (tongue pop)!

À **Mayara Silva Moura**, por ser essa amiga incrível, dedicada, atenciosa, disposta a ajudar, gentil, engraçada, parceira de festa, parceira de laboratório... São muitos adjetivos, amiga! Você é incrível mesmo! Nunca deixe ninguém falar o contrário. Conte comigo sempre!

À **Mariane Aparecida Pereira Silva**, minha amiga de todas as horas, parceira de carona, com quem eu divido mais de seis anos de histórias de estrada e mais de vinte e três anos de amizade. Inteligentíssima, rainha da biologia molecular, engraçadíssima, meio doida e aérea, mas dona de um coração imenso, que só pensa em ajudar todo mundo. Você é maravilhosa, amiga! Tenho orgulho de ser sua amiga! E eu estava certa no primeiro dia de aula, meu caminho nos levaria até a biblioteca. O seu caminho nos levou até os cavalos da veterinária hahaha

À **Ana Flávia Quiarato Lozano**, minha amiga professora, pesquisadora e divulgadora científica, que arrasa em tudo o que faz e faz os dias durarem 30 horas para poder fazer mais coisas. Você é incrível, amiga! Eu não conseguiria fazer metade do que você faz, ainda mais com tanta competência. Muito obrigada pela sua amizade, pelas ajudas, pelos momentos engraçados, sessões sobrenaturais (somos as netas das bruxas que vocês não conseguiram queimar!!! hahaha), debates sobre pets/gatos e de karaokê Dancing Queen ABBA hits. Tenho muito orgulho de ser sua amiga!

À **Lethicia Valencise**, minha amiga artista, que arrasa nos desenhos e nos trabalhos, rainha das tecnologias e novidades virtuais, irmã-gêmea de gosto musical, parceira de karaokê ABBA, rainhas do pop e rock antigo (I see a little silhouetto of a man...Scaramouche, Scaramouche, Will you do the fandango?) e de debates sobre pets/gatos também. Você é incrível, amiga!!

À **Patrícia Vilella e Silva**, pela disposição em ajudar e ensinar e pelos momentos felizes e de amizade. Muito obrigada por tudo, Pati! Tenho certeza que você será uma professora incrível!

À **Thamiris Moreira Figueiredo**, pelas conversas engraçadas e pelas profundas também. Você é maravilhosa! Não deixe ninguém duvidar disso!

Ao **Gustavo Aurélio Chavari**, por toda a disposição em aprender e ajudar. Tenho muito orgulho do seu crescimento e sei que você cada vez chegará mais longe. À **Taís Raquel Batissoco Dinhani** e à **Raquel Guedes de Oliveira Brito**, pela ajuda e parceria no laboratório. Vocês são incríveis!



Ao **José Eduardo Bozano**, técnico de laboratório do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, por toda a assistência, apoio e momentos descontraídos.

À **Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci**, pelo estoque de VCD cedido, sem o qual a realização deste estudo teria sido impossível. Muito obrigada.

À **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, ao **Instituto de Biociências de Botucatu (IBB)** e ao **Departamento de Biologia Estrutural e Funcional**, pela infraestrutura e recursos que permitiram a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)** e à **Unidade de Pesquisa Experimental da FMB (UNIPEX)**, pela disposição em ajudar, cedendo infraestrutura para confecção das rações usadas neste estudo, e ao **Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos**, pela disposição e colaboração na confecção das rações.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo financiamento deste trabalho.

Aos meus gatos, **Soraya** e **Rony Weasley**, meus filhos adotivos que amo muito. Sem o conforto de ter vocês sempre perto, ronronando, sendo amorosos e combatendo ansiedade, tudo teria sido mil vezes mais difícil.

Aos **animais de experimentação**, que contribuíram com a realização deste e tantos outros estudos, sem os quais não teria sido impossível obter o conhecimento, de nós mesmos e do mundo que nos cerca, que temos hoje.

A **Todos**, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação profissional e pessoal, deixo aqui meus mais profundos agradecimentos.

**Muito Obrigada!!!**

*“Anything is possible when you have the right people there to support you”*

Misty Copeland

# Resumo

---

Anualmente, mais de um milhão de casos de leptospirose são confirmados no mundo. Esta doença endêmica, que se torna epidêmica em épocas de chuva, é apenas uma de muitas zoonoses transmitidas por roedores. A profilaxia mais indicada para prevenção deste tipo de zoonose é o controle populacional desses animais. Tendo em vista que os métodos atuais utilizados neste controle, raticidas anticoagulantes, podem trazer desequilíbrios ecológicos, contribuir para a criação de ambientes propícios para a transmissão de outras doenças (geração de carcaças) e são, ainda, causadores de sofrimento animal (métodos não humanizados), existe a necessidade da aplicação de métodos alternativos para este fim. A castração cirúrgica é um método eficaz para o controle populacional de animais domésticos e muito usado na pecuária, para melhorar a qualidade e a maciez da carne, porém impraticável para animais sinantrópicos. A esterilização química, por outro lado, apresenta obstáculos quanto à escolha do composto químico e a via de administração. Em estudos realizados em nosso Laboratório, o Dimetanossulfonato de Etano (EDS), administrado através da ração (via oral), demonstrou resultados promissores na castração química de ratos machos, uma vez que causa depleção androgênica através de sua citotoxicidade às células de Leydig. Visto que essas células apresentam semelhanças morfofuncionais com as células da teca dos folículos ovarianos, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos deste fármaco e do Diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) - composto causador de morte celular em folículos ovarianos primordiais e primários - sobre o sistema reprodutor feminino, além de testar seu uso conjunto, a fim de avaliar a possível utilização de tais compostos na castração química de fêmeas e como alternativa para controle populacional de roedores. Para tanto, ratas Wistar adultas (90 dias; n = 9 a 10/grupo) foram alocadas em 7 grupos experimentais (doses e concentrações omitidas por tramitação de solicitação de patente): Grupo Controle, que recebeu ração para roedores com veículos; Grupo EDS G1, que recebeu EDS por via oral (gavagem) na dose 1; Grupo EDS G2, que recebeu o dobro da concentração de EDS administrada aos animais do grupo EDS G1 (via oral, gavagem); Grupo EDS R, que recebeu o composto misturado à ração para roedores; Grupo VCD GAV, que recebeu VCD por via oral (gavagem); Grupo VCD R, que recebeu VCD por via oral (ração) e Grupo EDS+VCD, que recebeu EDS e VCD por via oral (ração). Após 30 dias de tratamento, durante os quais o consumo de ração e o peso corpóreo foram monitorados, os animais foram avaliados por 15 dias consecutivos quanto à ciclicidade estral e seu comportamento sexual. Ao final de tais análises, as fêmeas foram eutanasiadas (na fase de estro) para coleta de órgãos e sangue. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido por Dunnett (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis seguido por Dunn (dados não paramétricos), e considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ . Houve diferenças quanto à ingestão de ração, principalmente quando comparadas as ratas de grupos tratados com EDS, que apresentaram menor ingestão do que o controle em dias específicos. Os pesos relativos dos fígados das ratas do grupo EDS G1 e os das hipófises das ratas do grupo EDS+VCD apresentaram-se aumentados quando comparados ao controle. Estros prolongados foram observados nos grupos EDS G2, EDS R e VCD GAV. EDS G1 e VCD R, apresentaram menores coeficientes de lordose do que o controle. VCD GAV apresentou menos folículos marcados por antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e

hormônio anti-mülleriano (AMH), menor número de folículos terciários marcados por AMH e menor intensidade de marcação de folículos secundários e terciários. EDS G2 apresentou menos folículos terciários marcados por AMH, assim como EDS R apresentou menos folículos, no total, marcados por AMH. EDS R, ainda, apresentou menor altura do epitélio glandular uterino. Em conclusão, em ratos, o EDS, administrado pela via oral, parece ter afetado o funcionamento da fisiologia reprodutiva feminina, reserva ovariana e histologia uterina normal. O VCD, assim como o EDS, causou déficits a fisiologia reprodutiva feminina e reserva folicular ovariana, além de danos à expressão de PCNA e proliferação celular. A mistura entre as drogas parece, ainda, ter tido efeitos sobre as hipófises, além do comportamento sexual. Portanto, EDS parece ser um composto químico promissor para utilização na castração química e como método de controle populacional de roedores. Novos estudos são encorajados para entender os efeitos do EDS na reprodução feminina. Espera-se que os resultados do presente trabalho possam contribuir para o desenvolvimento de um método de castração química e de controle populacional de roedores, que seja ético, acessível e de ampla aplicabilidade.

# *Abstract*

---

Each year, more than one million cases of leptospirosis are confirmed worldwide. This endemic disease, which becomes epidemic during rainy seasons, is just one of many zoonoses transmitted by rats. The most indicated prophylaxis for preventing this type of zoonosis is population control of these animals. Considering that the current methods used in this control, anticoagulant rodenticides, can bring ecological imbalances, contribute to the creation of favorable environments for the transmission of other diseases (generation of carcasses) and are also the cause of animal suffering (non-humanized methods), there is a need to find alternative methods for this purpose. Surgical castration is an effective method for population control of domestic and in livestock animals, to improve meat's quality and tenderness, but impractical for synanthropic animals. Chemical sterilization, on the other hand, presents obstacles as choice of chemical compound and the route of administration. In studies carried out in our laboratory, Ethane Dimethanesulfonate (EDS), administered through the chow (orally), showed promising results in chemical castration of male rats, as it causes androgen depletion through its cytotoxicity to Leydig cells. Since these cells have morphofunctional similarities with theca cells of ovarian follicles, the aim of this work was to analyze the effects of this drug and 4-vinylcyclohexene Diepoxide (VCD) - a compound that causes cell death in primordial and primary ovarian follicles - on the female reproductive system, in addition to testing their associated use, in order to assess the possible use of such compounds in chemical castration of females and as an alternative for rodent population control. For this purpose, adult Wistar rats (90 days; n = 9 to 10/group) were allocated into 7 experimental groups (doses and concentrations omitted due to patent application processing): Control Group, which received rodent chow with vehicles; EDS G1 group, which received oral EDS (gavage) at dose 1; Group EDS G2, which received twice the concentration of EDS administered to animals in group EDS G1 (orally, gavage); EDS R group, which received the compost mixed with rodent chow; VCD GAV group, which received VCD orally (gavage); Group VCD R, which received VCD mixed with rodent chow and Group EDS+VCD, which received EDS and VCD mixed with rodents chow. After 30 days of treatment, during which chow consumption and body weight were monitored, the animals were evaluated for 15 consecutive days for estrous cyclicity and their sexual behavior. At the end of such analyses, the females were euthanized (in the estrus phase) to collect organs and blood. The results were analyzed statistically by ANOVA followed by Dunnett (parametric data) and Kruskal-Wallis followed by Dunn (non-parametric data), and considered statistically significant when  $p \leq 0.05$ . There were differences in chow consumption, especially when comparing rats from groups treated with EDS, which had lower intake than the control on specific days. The relative weights of the livers of the rats of the EDS G1 group and of the pituitary of the rats of the EDS+VCD group were increased when compared to the control. Prolonged estrus was observed in the EDS G2, EDS R and VCD GAV groups. EDS G1 and VCD R, showed lower lordosis coefficients than control. VCD GAV showed fewer follicles marked by nuclear cell proliferation antigen (PCNA) and anti-müllerian hormone (AMH), fewer tertiary follicles marked by AMH and less intense staining of secondary and tertiary follicles. EDS G2 had fewer tertiary follicles marked by AMH, as well as EDS R had fewer follicles, in total, marked

by AMH. EDS R also had a lower height of the uterine gland epithelium. In conclusion, in rats, EDS, applied orally, seems to have affected functioning of female reproductive physiology along with ovarian reserve and normal uterine glands histology. VCD, like EDS, caused deficits in female reproductive physiology and ovarian follicular reserve, in addition to damage to PCNA expression and cell proliferation. The mixture between the drugs also seems to have had effects on the pituitary, in addition to sexual behavior. Therefore, EDS seems to be a promising drug for use in chemical castration and as a method of rodent population control. Further studies are encouraged to understand the effects of EDS in female reproduction. It is expected that the results of this work can contribute to the development of an ethical, accessible and widely applicable method of chemical castration for rodents populational control.

# Sumário

---

<b>Introdução</b> .....	14
O Sistema Reprodutor Feminino .....	14
O problema das zoonoses causadas por ratos.....	22
Métodos de Controle populacional.....	24
Dimetassulfonato de etano.....	26
Diepóxido de 4-vinilciclohexeno .....	29
<b>Justificativa</b> .....	32
<b>Objetivos</b> .....	33
<b>Capítulo 1: <i>Reproductive effects of the exposure of female Wistar rats to ethane dimethanesulfonate associated or not to 4-vinylcyclohexene diepoxide: A new approach to rodents population control</i></b> .....	34
Abstract .....	36
Introduction .....	37
Material and Methods .....	40
Results .....	46
Discussion .....	49
Declaration of Interest .....	55
Acknowledgments .....	56
References .....	57
Tables .....	68
Figures Subtitles .....	72
Figures .....	75
<b>Conclusão</b> .....	88
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	89
<b>Anexos</b> .....	102
Anexo I .....	102

# Introdução

---

## 1. O sistema reprodutor feminino

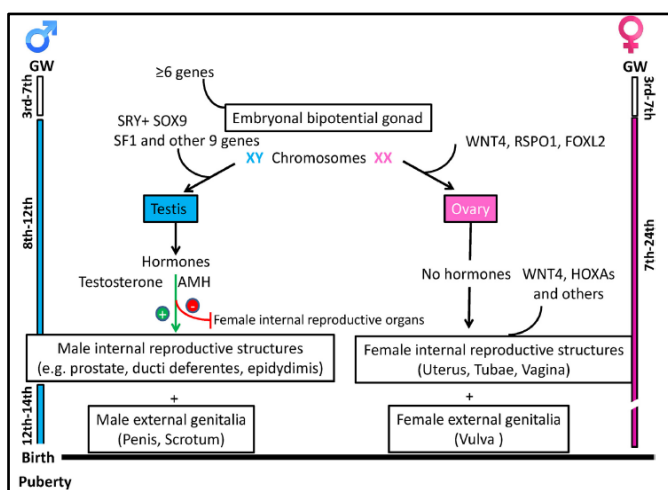
Segundo Simone de Beauvoir, “não se nasce mulher, torna-se mulher” (Santos MG, 2011). Embora o feminino e o masculino, para os humanos, estejam muito ligados a construções sociais, do ponto de vista biológico a genética tem papel fundamental nesta determinação, regendo uma sinfonia ordenada de eventos endócrinos, embriológicos e fisiológicos (Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013). Nos mamíferos therianos, dentre os quais estão incluídos os placentários e os marsupiais, a determinação sexual está relacionada ao gene SRY, localizado no cromossomo Y, que, nos machos destas espécies, ativa o desenvolvimento dos testículos e a diferenciação das células de Sertoli (Pask A, 2016). A expressão do gene SRY e promove upregulação direta de outro gene crítico para a diferenciação dos testículos, o SOX9 (Kuroki S *et al.*, 2013; Pask A, 2016).

O gene SOX9 está presente tanto em embriões masculinos (XY) quanto em femininos (XX), na gônada indiferenciada. Nos machos sua expressão é upregulada, o que resulta na translocação da proteína produzida ao núcleo. Nas fêmeas, na ausência do SRY (cromossomo Y), a transcrição do SOX9 é desativada, portanto a proteína produzida permanece citoplasmática o que leva a gônada a continuar seu desenvolvimento pela programação feminina (Malki S *et al.*, 2005; Pask A, 2016).

Anteriormente acreditava-se que o desenvolvimento dos ovários acontecia de forma passiva. Estudos recentes, entretanto, indicam a participação de outros genes que possuem papel ativo induzindo o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino. O WNT4 é um desses genes. Está diretamente envolvido na diferenciação sexual (Figura 1), sustentando a diferenciação dos ductos paramesonéfricos e atuando na supressão do desenvolvimento sexual masculino (restringindo a expressão do SOX9), além de participar da manutenção de processos fundamentais para o ovócito e para o folículo, como manutenção da polaridade celular e organização da membrana basal que encapsula o complexo células da granulosa/ovócito em folículo ovariano (e onde células da teca se aderem). Sua expressão nos ovários é regulada por uma proteína, R-spondina-1 (RSPO1) (Bianson-Lauber A, Chaboissier MC, 2015; Prunskaitė-Hyyryläinen, R. *et al.*, 2014; Wilhelm D, Palmer S, Koopman P, 2007). Estudos com fêmeas de camundongos desprovidas de expressão de WNT4 constataram a formação de ovários anormais que exibem estruturas semelhantes a túbulos seminíferos testiculares, o que indica o papel ativo

e importância do gene WNT4 na determinação e desenvolvimento da gônada feminina (Richards JS, Pangas SA, 2010; Vainio S *et al*, 1999). Outros estudos sobre o WNT4, ainda, apresentaram resultados que indicam que este gene, além de ter atuação importante na fase de embriogênese, é importante também após o nascimento e durante a vida adulta, controlando a função e maturação ovariana através do controle do hormônio anti-mülleriano (AMH) (Prunskaitė-Hyyryläinen, R. *et al*, 2014).

Dos genes e sua expressão, então, desencadeiam-se eventos embriológicos. Os estágios iniciais do desenvolvimento gonadal acontecem durante a quinta semana de gestação humana. No início, o chamado estágio indiferenciado do desenvolvimento sexual, a área genital é semelhante nos dois sexos e as gônadas são indiferenciadas (ou também chamadas bipotenciais). A partir da quinta semana, nos seres humanos, três fontes principais darão origem às gônadas em sua forma diferenciada: o mesotélio, epitélio mesodérmico que reveste a parede abdominal posterior; o mesênquima, tecido conjuntivo embrionário subjacente e as células germinativas primordiais (CGPs), primórdios das células sexuais indiferenciadas (Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013; Bianson-Lauber A, Chaboissier MC, 2015).



**Figura 1.** Desenho esquemático dos eventos da diferenciação sexual em humanos contendo os genes envolvidos no processo. Adaptado de Bianson-Lauber A, Chaboissier MC (2015)

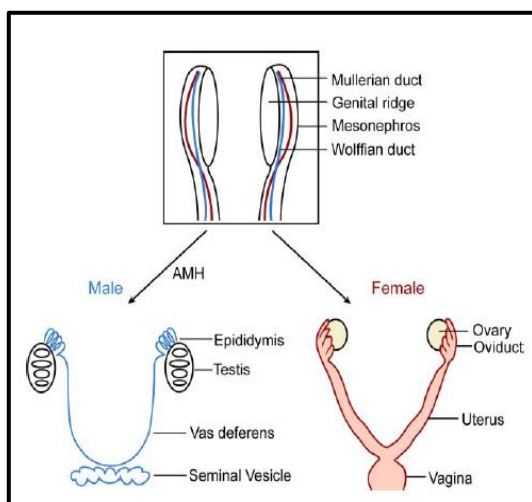
Neste período, uma área espessada se desenvolve ao lado do mesonefro, um rim rudimentar provisório que funciona por aproximadamente 4 semanas até que os rins permanentes se desenvolvam e comecem a funcionar. O epitélio e o mesênquima subjacente se proliferam produzindo uma saliência no lado medial do mesonefro, a crista gonadal. Com isso, cordões epiteliais digitiformes, os chamados cordões gonadais, se formam e crescem para dentro do mesênquima subjacente, resultando em separação de regiões na gônada indiferenciada, o córtex (externo) e a medula (interna). Nos embriões do sexo feminino, que possuem cromossomos sexuais XX, o córtex da gônada indiferenciada se tornará o ovário, enquanto que a medula regride. Já nos do sexo masculino, que possuem cromossomos sexuais



XY, o córtex regride e a medula se diferencia em testículo (Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013; Schoenwolf GC *et al*, 2016).

As CGPs, células grandes e esféricas que posteriormente darão origem aos espermatozoides ou aos ovócitos, surgem longe das células que darão origem à gônada em desenvolvimento. Por isso, durante o desenvolvimento, migram ativamente através do embrião, saindo de sua origem próxima das células endodérmicas da saco vitelínico e do alantóide tendo como destino a região da crista gonadal (Richardson BE, Lehmann R, 2010; Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013). A chegada das CGPs no mesênquima da parte dorsal do corpo, lá pela sexta semana de gestação, induz o epitélio celômico a produzir células somáticas de sustentação, que envolvam as CGPs. Essas células somáticas de sustentação se desenvolvem em células de Sertoli, nos machos, e em células foliculares (células da granulosa), nas fêmeas (Schoenwolf GC *et al*, 2016).

O primeiro sinal morfológico da diferenciação ovariana, portanto, é a distinção entre o córtex e a medula ovariana, que ocorre com o desenvolvimento de “ninhos” de células germinativas no córtex. Durante o desenvolvimento dos ovários, os cordões gonadais se estendem até a medula formando uma rede rudimentar de cordões e canais gonadais, a *rete ovarii*, que se degenera e desaparece. Formam-se então os cordões apicais, que se estendem da superfície do ovário até mesênquima subjacente. Estes crescem em tamanho, incorporando as células germinativas primordiais, e se dividem em grupos de células isoladas durante a 16ª semana de gestação (nos humanos) – os folículos primordiais. Cada folículo é rodeado por uma camada de células derivada do epitélio da superfície e contém uma ovogônia, derivada de uma CGP. As ovogônias são produzidas a partir de mitose durante a vida fetal e não são produzidas novas ovogônias após o nascimento (Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013; Pask A, 2016; Wilhelm D, Palmer S, Koopman P, 2007).

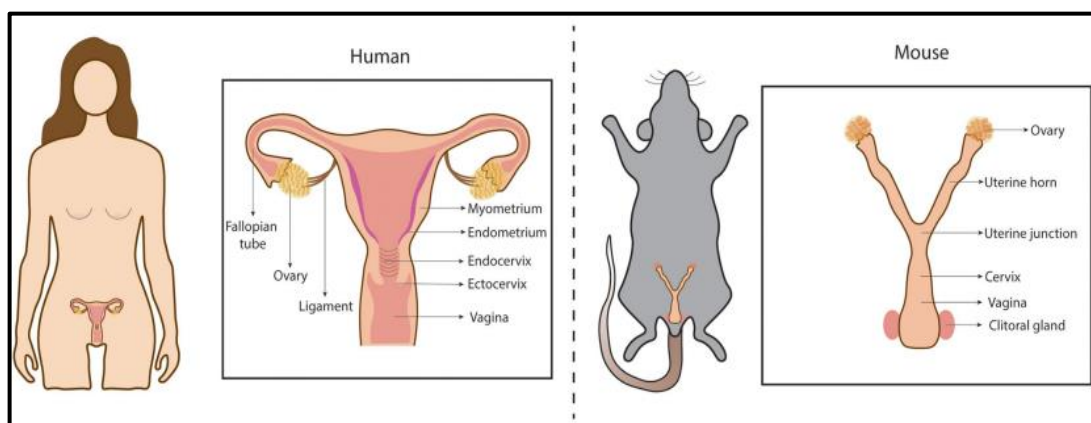


**Figura 2.** Desenho esquemático do desenvolvimento e diferenciação do sistema de ductos genitais (Wilhelm D, Palmer S, Koopman P, 2007)

Além das gônadas, o desenvolvimento do sistema de ductos é de extrema importância para a formação do sistema genital. Nos mamíferos, estes sistemas originam-se a partir do mesonefro. Ambos sistemas, Mesonéfrico (de Wolff) e Paramesonéfrico (de Müller), estão inicialmente presentes tanto em machos quanto em fêmeas (Figura 2). O sistema mesonéfrico, progenitor do sistema de ductos masculino, aparece como segmentos temporários e pequenos que se unem formando um único tubo contínuo por toda a extensão da crista gonadal até a cloaca e seu término caudal. Já o ducto paramesonéfrico, que dará origem ao sistema de ductos femininos, forma-se pela invaginação de um tubo formado paralelamente ao ducto mesonéfrico (tanto em machos quanto em fêmeas), na superfície do mesonefro. Durante o desenvolvimento normal dos mamíferos, somente se desenvolverá (totalmente) um dos dois conjuntos de ductos, dependendo do desenvolvimento gonadal em testículo ou ovário (Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013).

Na ausência do desenvolvimento testicular, produção de testosterona e Hormônio Anti-Mülleriano (AMH), o ducto paramesonéfrico se desenvolverá e formará o oviduto, útero e a porção superior da vagina (a região inferior deriva do seio urogenital), enquanto que o ducto mesonéfrico, não se proliferará, regredindo. Nos machos, o desenvolvimento do ducto mesonéfrico é estimulado pela testosterona produzida pelos testículos em desenvolvimento e dará origem ao epidídimo, ducto deferente, próstata, glândulas seminais e glândulas bulbouretrais, enquanto que o ducto paramesonéfrico regride (Wilhelm D, Palmer S, Koopman P, 2007; Pask A, 2016). Em ratos, os eventos de degeneração do ducto paramesonéfrico (nos machos) e do ducto mesonéfrico (nas fêmeas) acontecem por volta do dia gestacional 17 (Hebel R, Stromberg MW, 1986; Maeda KI, Ohkura S, Tsukamura H, 2000).

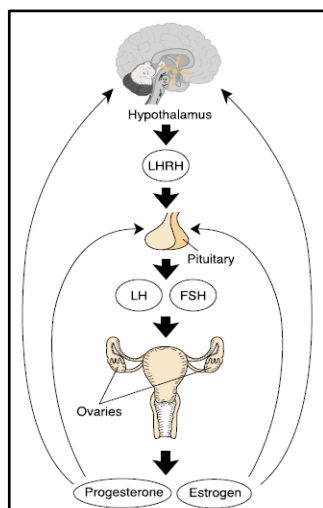
Anatomicamente, o sistema genital feminino compreende o sistema genital e o sistema tegumentar (que inclui as mamas). Compõe-se de gônadas (produtoras de gametas) e ductos ge-



**Figura 3. Anatomia do Sistema Genital Feminino (SGF).** A- Desenho esquemático do SGF humano. B. Desenho esquemático do SGF de rato (Chumduri C, Turco MY, 2021).

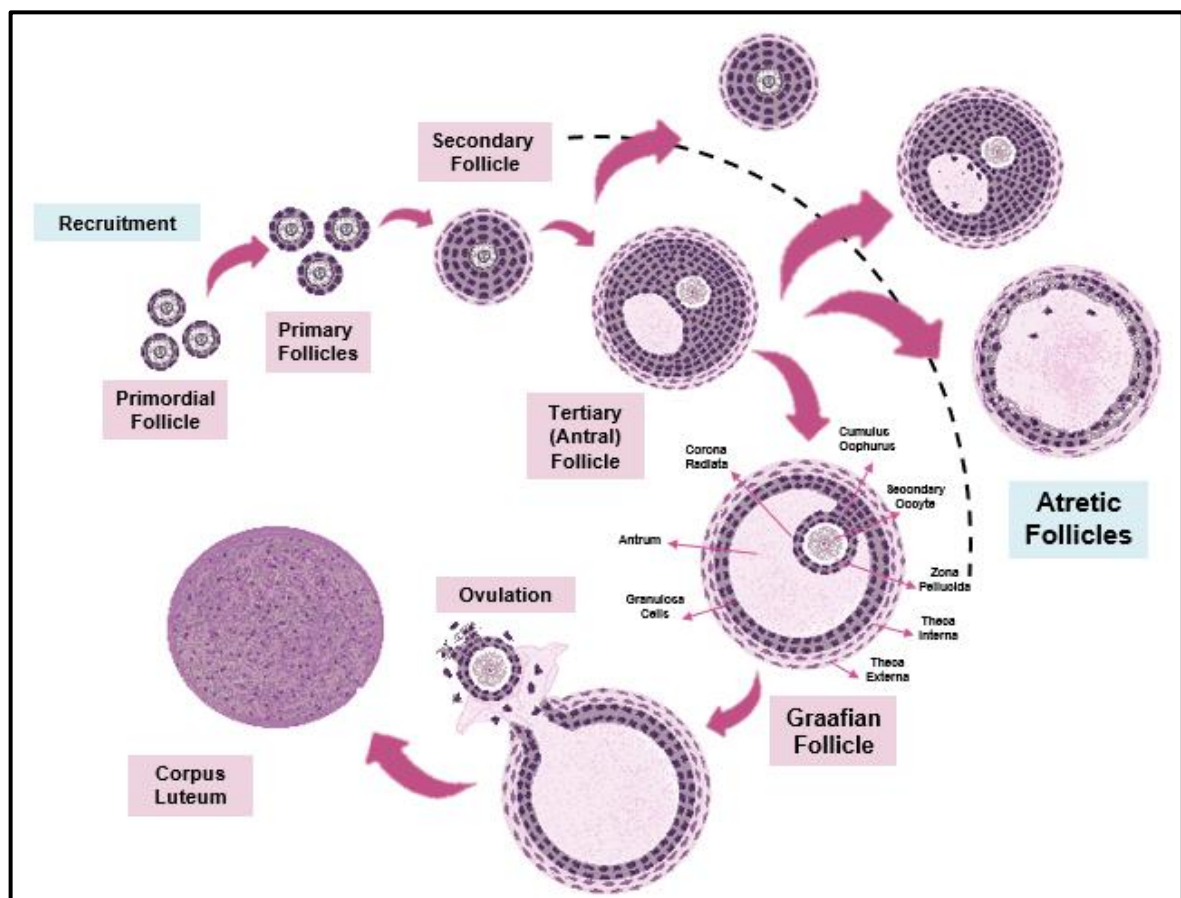
nitais (por onde transitam): ovários, tubas uterinas, vagina, glândulas anexas, órgãos genitais externos e do útero (Figura 3) (Dangelo JG & Fattini CC, 2007). Os ovários, as gônadas femininas, são estruturas pares, com cerca de 10 cm de comprimento e 1cm de diâmetro (em humanos), em forma de amêndoa, e que se estendem lateralmente a partir do corno do útero. Em ratas, possuem formas protrusivas na superfície que conferem ao ovário aparência semelhante a cacho de uvas. Ovários, além de serem responsáveis pela produção de gametas (os ovócitos) controlam muitos aspectos do desenvolvimento e fisiologia feminina, atuando como glândula reprodutiva, ou seja, secretando hormônios (Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM, 2009; Haschek, W M, Rousseaux, CG, Wallig, MA, 2010; Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013).

Durante a puberdade, há ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (HHG) que resulta em alterações na atividade hormonal e em processos fisiológicos, além de mudanças comportamentais. Com o início da secreção de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), também chamado de Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante (LHRH), ocorre estimulação da hipófise a produzir hormônios chamados de gonadotrofinas, o Hormônio Luteinizante (LH) e o Hormônio Folículo Estimulante (FSH), que levam à maturação e ativação funcional dos ovários (Figura 4). Esses passam a recrutar folículos primordiais para se desenvolverem em um processo chamado Folículo-logênese (Figura 5), que prepara o ovócito para ovulação. Os folículos ovarianos, normalmente localizados no córtex ovariano, são as unidades funcionais do ovário e contêm um ovócito envolto pela camada da granulosa (correspondente às células de Sertoli dos machos), que promove sustentação ao ovócito (e estrógenos), e pelas Tecas (correspondentes às células de Leydig dos machos) (Emanuele MA, Wezeman F, Emanuele NV, 2002; Rendi MH *et al*, 2012; Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM, 2009; Tevosian, SG, 2013; Hawkins, SM e Matsuk, MM, 2008).



**Figura 4.** O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (Emanuele MA, Wezeman F, Emanuele NV, 2002)

Nos folículos primordiais e primários (Figura 5) é possível visualizar apenas uma camada de células foliculares, diferenciadas pelo seu aspecto pavimentoso, nos primordiais, e cuboide, nos primários. Na presença de FSH, os folículos crescem com a proliferação de células da granulosa, resultando em mais de uma camada de células envolvendo o ovócito. A partir do estágio de duas camadas inicia-se a formação da teca. Andrógenos produzidos pela teca interna são convertidos em estrógeno na camada da granulosa pela enzima aromatase, resultando em um aumento de estrógeno intrafolicular. Folículos que apresentam mais de uma camada de células da granulosa são classificados como Folículo Secundário ou Em Crescimento. Estes, após acúmulo de líquido em seu interior, desenvolvem uma cavidade, o antrum, sendo então classificados como Folículos Antrais. Um pico de LH desencadeia a ovulação, processo onde há liberação do ovócito (juntamente com líquido e algumas células da corona radiata, parte da granulosa). O folículo que passou por ovulação passa, então, por um processo de luteinização e suas células adquirem capacidade de produzir progesterona (Hawkins, SM e Matsuk, MM, 2008; Magoffin DA, 2005; Hall, J. E., Guyton, A. C., 2017).

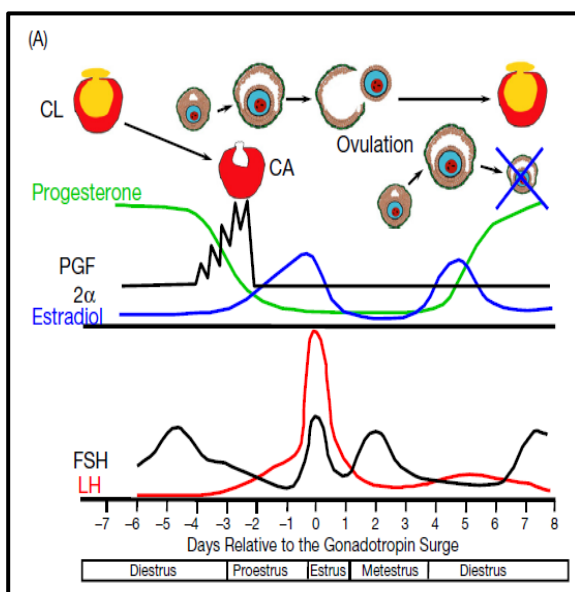


**Figura 5. Foliculogênese.** O processo de Foliculogênese iniciando-se com o recrutamento de folículos primordiais, evolução a folículos primários, folículos secundários, folículos antrais e ovulação. A autora.

Os ovócitos primários (ovócitos I) são células precursoras dos gametas produzidas a partir de mitose das ovogônias, pouco antes do nascimento. A partir da puberdade, os ovócitos retomam a meiose iniciada na vida pré-natal e os ovócitos primários (ovócitos I) se transformam em ovócitos secundários (ovócitos II) após liberação do primeiro corpúsculo polar e divisão de material genético. Com a ovulação, há liberação do ovócito II para a tuba uterina, sendo que este será transportado até o útero. A meiose não se completa. É interrompida na metáfase II e só será retomada com a fertilização do ovócito, quando enfim o óvulo será produzido (Hall, J. E., Guyton, A. C., 2017; Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H, 2000).

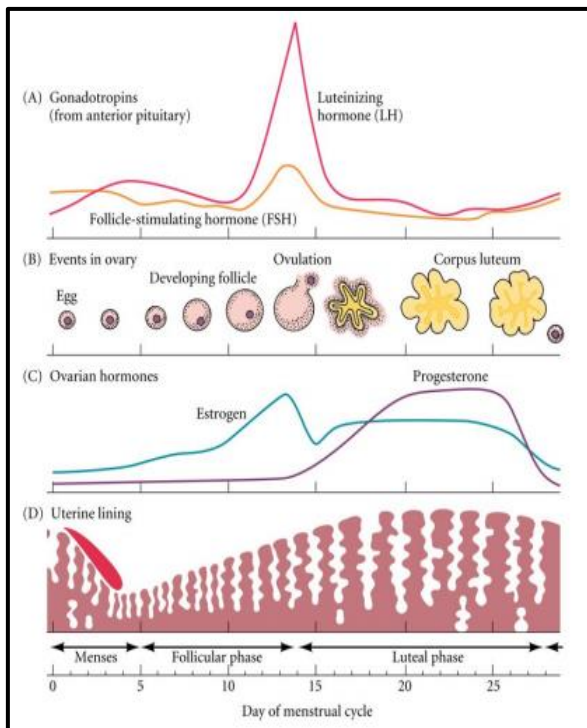
Outro órgão de extrema importância para o trato reprodutor feminino dos mamíferos é o útero. O útero é um órgão muscular que pode ser dividido em quatro regiões principais: o fundo, o corpo, o istmo e a cérvix. O fundo está localizado na região superior do útero e é o local onde usualmente ocorre a implantação do blastocisto, no caso de gravidez. O corpo, como o próprio nome diz, constitui o maior segmento do útero e é ligado à cérvix através do istmo. A cérvix, por sua vez, liga a vagina ao útero. Histologicamente, o útero é formado por três principais camadas: endométrio, miométrio e perimétrio. (Bates GW, Bowling M, 2013; Gasner, A, P.A.A, 2021). Nas ratas, o útero é bicornu, apresentando dois cornos laterais que se unem distalmente em um único corpo (Rendi MH *et al*, 2012). Este órgão, tanto em ratas quanto em outros mamíferos, é regido por processos cíclicos (ciclos ovarianos) resultantes da ação dos hormônios liberados pelo ovário, estrógeno e progesterona, que resultam em mudanças periódicas em sua morfologia (ciclo uterino).

Na maioria dos mamíferos não-primatas a reprodução feminina é coordenada pelo chamado Ciclo Estral (Figura 6). Este, é dividido em quatro fases principais: Proestro, fase em



**Figura 6.** O ciclo estral e suas fases (Adaptado de Nowak, RA (2018). *Estrous and Menstrual Cycles*. Encyclopedia of Reproduction: Elsevier).

que, ao analisar o lavado vaginal ao microscópio ótico, processo utilizado para análise do ciclo em ratas, é notada predominância de células epiteliais nucleada; Estro, fase em que há predominância de células queratinizadas em que as fêmeas estão sexualmente receptivas (assim como no fim do proestro) e ocorre a ovulação; Metaestro, fase em que há iguais proporções numéricas entre os tipos celulares; Diestro, fase onde há predomínio de leucócitos (Rendi MH *et al*, 2012; Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP, 2002). Nas mulheres e em outros primatas, o ciclo ovariano é chamado Ciclo Menstrual (Figura 7), onde padrões rítmicos hormonais organizam cascatas de eventos que resultam em três fases distintas: Fase Proliferativa (Folicu-



**Figura 7.** O ciclo menstrual e suas fases (Adaptado de Gilbert SF (2013). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc.)

lar), Fase Secretora (Lútea) e Fase Menstrual. Estas determinam, principalmente, o exato momento da ovulação, coordenando ovário, útero e todo o organismo e preparando-os para uma potencial gravidez (Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013).

As ratas, como outros mamíferos não-primatas, apresentam ciclos estrais (Maeda KI, Ohkura S, Tsukamura H, 2000). São animais de grande potencial reprodutivo, podendo gerar até 13 filhotes por ninhada (Chahoud, I., & Paumgarten, F. J., 2009). Sabendo, ainda, que os filhotes dessas ratas podem ter seus próprios filhotes em menos de 2 meses após o nascimento (Fuochi S. *et al*, 2022), pode-se considerar que a superfertilidade das ratas seja um problema, já que os ratos são animais transmissores de zoonoses (Himsworth CG *et al*, 2014).

## *Conclusão*

---

Em conclusão, o dimetanossulfonato de etano, misturado à ração, parece ter afetado a fisiologia reprodutiva feminina de ratas, induzindo estros prolongados e irregularidade no ciclo, além de diminuir a receptibilidade sexual. Também parece ter impactado as reservas foliculares ovarianas de AMH (com base na análise imuno-histoquímica) e o epitélio glandular uterino, podendo ter afetado a fertilidade das ratas. Todos esses efeitos parecem estar ligados a uma potencial diminuição de andrógenos causada por essa droga. O diepóxido de 4-vinilciclohexeno neste estudo, aplicado por gavagem, causou estros prolongados, déficits na expressão de AMH dos folículos e diminuição de proliferação de células da granulosa de folículos, reduzindo a expressão de PCNA. A associação das drogas parece ter, ainda, afetado a hipófise, além do comportamento sexual. Contudo, os efeitos do EDS parecem ser bem mais sutis em fêmeas do que em machos, em ratos. Novos estudos são encorajados para o melhor entendimento dos efeitos do EDS sobre fêmeas. Esperamos contribuir com a criação de um método de controle populacional de roedores humanizado, acessível e de ampla aplicabilidade.

## *Referências Bibliográficas*

---

- Afzal, I., Thaker, R., Weissman, S., & Kothari, M. (2020). Leptospirosis as an unusual culprit of acute pancreatitis and portal vein thrombosis in a New Yorker. *Clinical case reports*, 8(4), 690–695. <https://doi.org/10.1002/ccr3.2736>
- Ashby, J., Lefevre, P. A., Deghenghi, R., & Wallis, N. (2001). Replacement of surgical castration by GnRH-inhibition or Leydig cell ablation in the male rat Hershberger antiandrogen assay. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 34(2), 188–203. <https://doi.org/10.1006/rtp.2001.1506>
- Atanassova, N., Koeva, Y., Bakalska, M., Pavlova, E., Nikolov, B., & Davidoff, M. (2006). Loss and recovery of androgen receptor protein expression in the adult rat testis following androgen withdrawal by ethane dimethanesulfonate. *Folia histochemica et cytobiologica*, 44(2), 81–86.
- Barsoum, I. B., & Yao, H. H. (2010). Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *Journal of andrology*, 31(1), 11–15. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008318>
- Bates, G. W., & Bowling, M. (2013). Physiology of the female reproductive axis. *Periodontology* 2000, 61(1), 89–102. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00409.x>
- BBC News Brasil. Por que Austrália vive infestação assustadora de ratos. BBC [Internet]. May 2021 [access in sep. 09 2021]. Available from: <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-57269083>
- BBC News Brasil. Praga de ratos na Austrália: Qual a origem da infestação e como fazendeiros estão lutando contra ela. BBC [Internet]. July 2021 [access in nov. 20 2021]. Available from: <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-57771847>



- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., Vinetz, J. M., & Peru-United States Leptospirosis Consortium (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet. Infectious diseases*, 3(12), 757–771. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)
- Biason-Lauber, A., & Chaboissier, M. C. (2015). Ovarian development and disease: The known and the unexpected. *Seminars in cell & developmental biology*, 45, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.021>
- Bienenfeld, A., Azarchi, S., Lo Sicco, K., Marchbein, S., Shapiro, J., & Nagler, A. R. (2019). Androgens in women: Androgen-mediated skin disease and patient evaluation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(6), 1497–1506. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.08.062>
- Boyd KL, Muehlenbachs A, Rendi MH, Garcia RL, Gibson-Corley KN, 17 - Female Reproductive System, Comparative Anatomy and Histology (Second Edition), Academic Press, 2018, 303-334, ISBN 9780128029008, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00017-8>.
- Brooks, H. L., Pollow, D. P., & Hoyer, P. B. (2016). The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 31(4), 250–257. <https://doi.org/10.1152/physiol.00057.2014>
- Buggia, I., Locatelli, F., Regazzi, M. B., & Zecca, M. (1994). Busulfan. *The Annals of pharmacotherapy*, 28(9), 1055–1062. <https://doi.org/10.1177/106002809402800911>
- Carrasco-Juan, J. L., Álvarez-Argüelles Cabrera, H., Martín Corriente, M. C., González-Gómez, M., Valladares Parrilla, R., Gutiérrez García, R., & Díaz-Flores, L. (2017). Ovarian Leydig cells (OLC): A histomorphological and immunohistochemical study. *Histology and histopathology*, 32(10), 1089–1097. <https://doi.org/10.14670/HH-11-876>

- Carrasco-Juan, J. L., Álvarez-Argüelles-Cabrera, H., Martín-Corriente, C., Gutiérrez-García, R., Vega-Falcón, A., Expósito-Afonso, I., Méndez-Medina, R., & Díaz-Flores, L. (2018). Extraparenchymal ovarian and testicular Leydig cells: ectopic/heterotopic or orthotopic?. *Archives of gynecology and obstetrics*, 298(3), 655–661. <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4846-x>
- Cao, L. B., Leung, C. K., Law, P. W., Lv, Y., Ng, C. H., Liu, H. B., Lu, G., Ma, J. L., & Chan, W. Y. (2020). Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure. *Life sciences*, 262, 118543. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118543>
- Chahoud, I., & Paumgartten, F. J. (2009). Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies?. *Environmental research*, 109(8), 1021–1027. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.07.015>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of a neighborhood rat-management program--New York City, December 2007--August 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012;61:733-6
- Chen H, Guo J, Ge R, Lian Q, Papadopoulos V, & Zirkin BR. (2015). Steroidogenic Fate of the Leydig Cells that Repopulate the Testes of Young and Aged Brown Norway Rats after Elimination of the Preexisting Leydig Cells. *Experimental Gerontology*, 72, 8. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2015.08.014>
- Chumduri, C., & Turco, M. Y. (2021). Organoids of the female reproductive tract. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 99(4), 531–553. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-02028-0>
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9):e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898
- Craig ME, Sudanagunta S, Billow M. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Broad Ligaments. [Updated 2020 Aug 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls

Publishing; 2021 Jan-. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499943/>

Cury FS. Placentação e descrição morfológica do sistema reprodutor feminino do Coendou prehensilis (Porco-espinho Caixeiro). São Paulo. Tese [Doutorado em Ciências] – Universidade de São Paulo; 2016

Dangelo JG & Fattini CC (2007). Anatomia humana sistêmica e segmentar. São Paulo: Atheneu

Di Siena, S., Gimmelli, R., Nori, S. L., Barbagallo, F., Campolo, F., Dolci, S., Rossi, P., Venneri, M. A., Giannetta, E., Gianfrilli, D., Feigenbaum, L., Lenzi, A., Naro, F., Cianflone, E., Mancuso, T., Torella, D., Isidori, A. M., & Pellegrini, M. (2016). Activated c-Kit receptor in the heart promotes cardiac repair and regeneration after injury. *Cell death & disease*, 7(7), e2317. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.205>

Diz, F. A., & Conceição, G. (2021). Human leptospirosis in the municipality of São Paulo, SP, Brazil: distribution and trend according to sociodemographic factors, 2007-2016. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology*, 24, e210034. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210034>

Duron, Q., Shiels, A. B., & Vidal, E. (2017). Control of invasive rats on islands and priorities for future action. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*, 31(4), 761–771. <https://doi.org/10.1111/cobi.12885>

Dyson, A. L., & Orgebin-Crist, M. C. (1973). Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology*, 93(2), 391–402. <https://doi.org/10.1210/endo-93-2-391>

Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30(6), 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>

Edwards, K., Jackson, H., & Jones, A. R. (1970). Studies with alkylating esters. II. A chemical interpretation through metabolic studies of the antifertility effects of ethylene

dimethanesulphonate and ethylene dibromide. *Biochemical pharmacology*, 19(5), 1783–1789. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(70\)90171-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(70)90171-1)

- Emanuele, M. A., Wezeman, F., & Emanuele, N. V. (2002). Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 26(4), 274–281
- Figueiredo JR, Lima LF, Silva JRV, Santos RR (2018). Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. *Animal Reproduction*, 15(1):648-659. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0019
- Fuochi, S., Galasso, M. E., Colombo, R., Giaquinto, D., De Girolamo, P., & D'Angelo, L. (2022). Puberty onset curve in CD (Sprague Dawley) and Long Evans outbred male rats. *Laboratory animals*, 236772221078725. Advance online publication. <https://doi.org/10.1177/00236772221078725>
- Gasner A, P A A. Physiology, Uterus. [Updated 2021 May 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557575/>
- Gravinatti, M. L., Barbosa, C. M., Soares, R. M., & Gregori, F. (2020). Synanthropic rodents as virus reservoirs and transmitters. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20190486. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0486-2019>
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2017). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 13<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier
- Haschek, W M, Rousseaux, CG, Wallig, MA (2010). Female Reproductive System. In: Haschek, W M, Rousseaux, CG, Wallig, MA, *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Philadelphia: Elsevier
- Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2008). The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10–18. <https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>

- Hebel R., & Stromberg M.W. (1986) *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. Worthsee: BioMed Verlag
- Heng K, Anand-Ivell R, Teerds K, & Ivell R. (2012). The endocrine disruptors dibutyl phthalate (DBP) and diethylstilbestrol (DES) influence Leydig cell regeneration following ethane dimethane sulphonate treatment of adult male rats. *International Journal of Andrology*, 35(3), 353–363. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2011.01231.X>
- Himsworth, C. G., Jardine, C. M., Parsons, K. L., Feng, A. Y., & Patrick, D. M. (2014). The characteristics of wild rat (*Rattus* spp.) populations from an inner-city neighborhood with a focus on factors critical to the understanding of rat-associated zoonoses. *PloS one*, 9(3), e91654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091654>
- Hiort O. (2002). Androgens and puberty. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 16(1), 31–41. <https://doi.org/10.1053/beem.2002.0178>
- Houlihan K. E. (2017). A literature review on the welfare implications of gonadectomy of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 250(10), 1155–1166. <https://doi.org/10.2460/javma.250.10.1155>
- Hoyer, P. B., Devine, P. J., Hu, X., Thompson, K. E., & Sipes, I. G. (2001). Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicologic pathology*, 29(1), 91–99. <https://doi.org/10.1080/019262301301418892>
- Jackson, H., & Craig, A. W. (1969). Effects of alkylating chemicals on reproductive cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 160(1), 215–227. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1969.tb15843.x>
- Jackson H, Jackson CM, & Jones P. (1973). Hormonal antagonism to the antispermatogenic effect of ethylene-dimethanesulphonate in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34(1), 133–135. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0340133>
- Khalil, H., Santana, R., de Oliveira, D., Palma, F., Lustosa, R., Eyre, M. T., Carvalho-Pereira, T., Reis, M. G., Ko, A. I., Diggle, P. J., Alzate Lopez, Y., Begon, M., & Costa, F. (2021). Poverty, sanitation, and *Leptospira* transmission pathways in residents from four

Brazilian slums. *PLoS neglected tropical diseases*, *15*(3), e0009256.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009256>

Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Roberts, N. R., Slott, V., & Suarez, J. D. (1990). Multiple effects of ethane dimethanesulfonate on the epididymis of adult rats. *Toxicology and applied pharmacology*, *105*(2), 271–287. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90189-2](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90189-2)

Kuroki, S., Matoba, S., Akiyoshi, M., Matsumura, Y., Miyachi, H., Mise, N., Abe, K., Ogura, A., Wilhelm, D., Koopman, P., Nozaki, M., Kanai, Y., Shinkai, Y., & Tachibana, M. (2013). Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase *Jmjd1a*. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6150), 1106–1109.  
<https://doi.org/10.1126/science.1239864>

Le Turnier, P., & Epelboin, L. (2019). Mise au point sur la leptospirose [Update on leptospirosis]. *La Revue de medecine interne*, *40*(5), 306–312.  
<https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.12.003>

Li, Y., Wang, M., Li, Q., Gao, Y., Li, Q., Li, J., & Cao, Y. (2020). Transcriptome profiling of longissimus lumborum in Holstein bulls and steers with different beef qualities. *PloS one*, *15*(6), e0235218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235218>

Lu, Z., Wang, L., Zhou, R., Qiu, Y., Yang, L., Zhang, C., Cai, M., Mi, M., & Xu, H. (2013). Evaluation of the spermicidal and contraceptive activity of Platycodin D, a Saponin from *Platycodon grandiflorum*. *PloS one*, *8*(11), e82068.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082068>

Maeda KI, Ohkura S, Tsukamura H (2000). Physiology of Reproduction. In GJ Krinke. The Laboratory Rat. New York: Academic Press.

Magoffin D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *37*(7), 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.016>

Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjean, C., Berta, P., Poulat, F., & Boizet-Bonhoure, B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-

determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *The EMBO journal*, 24(10), 1798–1809. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600660>

Mark-Kappeler, C. J., Sen, N., Lukefahr, A., McKee, L., Sipes, I. G., Konhilas, J., & Hoyer, P. B. (2011). Inhibition of ovarian KIT phosphorylation by the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats. *Biology of reproduction*, 85(4), 755–762. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092742>

Marti, S., Realini, C. E., Bach, A., Pérez-Juan, M., & Devant, M. (2013). Effect of castration and slaughter age on performance, carcass, and meat quality traits of Holstein calves fed a high-concentrate diet. *Journal of animal science*, 91(3), 1129–1140. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5717>

Martins FS, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Regulatory factors of folliculogenesis in mammalian. *Rev Bras Reprod Anim*, Mar 2008; 32(1), 36-49

Mason GJ, Littin KE. The humaneness of rodent pest control. *Animal Welfare*. 2003; 12: 1 – 37

McCosker M, Thompson V. Mouse plague wreaks havoc across two states, destroying crops in Qld, blanketing parts of NSW. ABC News [internet]. Jan. 2021 [access in Sep 9 2021]. Available from: <https://www.abc.net.au/news/2021-01-24/mouse-plague-leaves-trail-of-damage-through-queensland-nsw/13069442>

Ministério da Saúde (BR), Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual de Controle de Roedores. Brasília (DF); 2002

Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância, Prevenção e Controle de Zoonoses. Brasília (DF); 2016

Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 41. Brasília (DF); 2018

Ministério da Saúde (BR) [internet]. Leptospirose. Brasília (DF); 2020. Available from:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose>

- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (2012). *Embriologia Clínica* (9th ed). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Morris, I. D., & McCluckie, J. A. (1979). Temporal changes in serum androgen after temporary impairment of Leydig cell function by ethane-1,2-dimethane sulphonate. *Journal of steroid biochemistry*, *10*(4), 467–469. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90336-4](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90336-4)
- Morris, I. D., Phillips, D. M., & Bardin, C. W. (1986). Ethylene dimethanesulfonate destroys Leydig cells in the rat testis. *Endocrinology*, *118*(2), 709–719. <https://doi.org/10.1210/endo-118-2-709>
- Molenaar, R., de Rooij, D. G., Rommerts, F. F., Reuvers, P. J., & van der Molen, H. J. (1985). Specific destruction of Leydig cells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. *Biology of reproduction*, *33*(5), 1213–1222. <https://doi.org/10.1095/biolreprod33.5.1213>
- Naing, C., Reid, S. A., Aye, S. N., Htet, N. H., & Ambu, S. (2019). Risk factors for human leptospirosis following flooding: A meta-analysis of observational studies. *PloS one*, *14*(5), e0217643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217643>
- Netter, F. H. (2014). *Atlas de anatomia humana*. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Nian, Y., Allen, P., Harrison, S. M., & Kerry, J. P. (2018). Effect of castration and carcass suspension method on the quality and fatty acid profile of beef from male dairy cattle. *Journal of the science of food and agriculture*, *98*(11), 4339–4350. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8960>
- Normile D. (2010). Holding back a torrent of rats. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5967), 806–807. <https://doi.org/10.1126/science.327.5967.806>
- Paranzini, C. S., Sousa, A. K., Cardoso, G. S., Perencin, F. M., Trautwein, L., Bracarense, A., & Martins, M. (2018). Effects of chemical castration using 20% CaCl<sub>2</sub> with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and



effectiveness of treatment. *Theriogenology*, *106*, 253–258.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.013>

Pask A. (2016). The Reproductive System. *Advances in experimental medicine and biology*, *886*, 1–12. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_1)

Patel, R., & Tadi, P. (2021). Busulfan. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Potter, S. J., Kumar, D. L., & DeFalco, T. (2016). Origin and Differentiation of Androgen-Producing Cells in the Gonads. *Results and problems in cell differentiation*, *58*, 101–134.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_5)

Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Shan, J., Railo, A., Heinonen, K. M., Miinalainen, I., Yan, W., Shen, B., Perreault, C., & Vainio, S. J. (2014). Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimüllerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *28*(4), 1568–1581.  
<https://doi.org/10.1096/fj.13-233247>

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 20796, Ethylene dimethanesulfonate; [cited 2021 July 26]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethylene-dimethanesulfonate>

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 7833, 4-Vinylcyclohexene dioxide; [cited 2021 Sept. 12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Vinylcyclohexene-dioxide>

Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Ievy, S., Hossain, M. J., El Zowalaty, M. E., Rahman, A. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, *8*(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>

Reino G, Gomes P. Cidade de SP registra 6,3 mil denúncias de infestações de ratos em 2020. G1 Globo [internet]. Fev. 2021 [access in Sep 9 2021]. Portuguese. Available from:

<https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/2021/02/24/cidade-de-sp-registra-63-mil-denuncias-de-infestacoes-de-ratos-em-2020.ghtml>

- Rendi MH, Muehlenbachs A, Garcia RL, Boyd KL (2012). Female Reproductive System. In: Treutin, PM.; Dintzis, S.M. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Elsevier
- Richards, J. S., Hedin, L., & Caston, L. (1986). Differentiation of rat ovarian thecal cells: evidence for functional luteinization. *Endocrinology*, *118*(4), 1660–1668. <https://doi.org/10.1210/endo-118-4-1660>
- Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of clinical investigation*, *120*(4), 963–972. <https://doi.org/10.1172/JCI41350>
- Richards, J. S., Ren, Y. A., Candelaria, N., Adams, J. E., & Rajkovic, A. (2018). Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update. *Endocrine reviews*, *39*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00164>
- Richardson JL, Silveira G, Medrano IS, Arietta AZ, Mariani C, Pertile AC, Carvalho Pereira TC, Childs JE, Ko AI, Costa F, & Caccone A. (2019). Significant Genetic Impacts Accompany an Urban Rat Control Campaign in Salvador, Brazil. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *0*(JUN), 115. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2019.00115>
- Richardson, B. E., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *11*(1), 37–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2815>
- Rommerts, F. F., Teerds, K. J., & Hoogerbrugge, J. W. (1988). In vitro effects of ethylene-dimethane sulfonate (EDS) on Leydig cells: inhibition of steroid production and cytotoxic effects are dependent on species and age of rat. *Molecular and cellular endocrinology*, *55*(1), 87–94. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(88\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0303-7207(88)90094-9)

Santos, M. G. (2011). SIMONE DE BEAUVOIR. “Não se nasce mulher, torna-se mulher”. *Sapere Aude*, 1(2), 108-122. Recuperado de <http://periodicos.pucminas.br/index.php/SapereAude/article/view/2081>

Schoenwolf GC *et al* (2016). Larsen, Embriologia Humana. Rio de Janeiro: Elsevier.

Smart, J. L., Massey, R. F., Lendon, R. G., & Morris, I. D. (1990). Growth and development of male and female rats treated with the Leydig cell cytotoxin ethane dimethane sulphonate during the suckling period. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 28(2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(90\)90019-j](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90019-j)

Tamayo Uria, I., Mateu Mahiques, J., & Mughini Gras, L. (2013). Temporal distribution and weather correlates of Norway rat (*Rattus norvegicus*) infestations in the city of Madrid, Spain. *EcoHealth*, 10(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0829-3>

Taylor, M. F., de Boer-Brouwer, M., Woolveridge, I., Teerds, K. J., & Morris, I. D. (1999). Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a Fas-mediated process. *Endocrinology*, 140(8), 3797–3804. <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6919>

Tevosian S. G. (2013). Genetic control of ovarian development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 7(1-3), 33–45. <https://doi.org/10.1159/000339511>

The New York Times. Plague of Mice in Australia Overruns Farms, Shops and Bedrooms [internet]. May 2021 [access in nov 25 2021]. Available from: <https://www.nytimes.com/2021/05/29/world/australia/mouse-plague.html>

UFPEL. Controle de Roedores Sinantrópicos. UFpel [internet] 2016. [access in Sep 9 2021]. Portuguese. Available from: <https://wp.ufpel.edu.br/ccz/files/2016/03/Controle-de-roedores-sinantr%C3%B3picos-Saneamento.pdf>

- US EPA. 2011. Hershberger Assay OCSP Guideline 890.1400. Retrieved from [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/final\\_890.1600\\_hershberger\\_assay\\_sep\\_10.6.11.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/final_890.1600_hershberger_assay_sep_10.6.11.pdf) on September 10, 2021. Data released October 2011.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, *397*(6718), 405–409. <https://doi.org/10.1038/17068>
- Wilhelm, D., Palmer, S., Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological reviews*, *87*(1), 1–28. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2006>
- Yan, C., Liang, L. J., Zhang, B. B., Lou, Z. L., Zhang, H. F., Shen, X., Wu, Y. Q., Wang, Z. M., Tang, R. X., Fu, L. L., & Zheng, K. Y. (2014). Prevalence and genotyping of *Toxoplasma gondii* in naturally-infected synanthropic rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*) in eastern China. *Parasites & vectors*, *7*, 591. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0591-6>
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., & Nishikawa, S. I. (1997). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental biology*, *184*(1), 122–137. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8503>