

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/05/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Desfechos reprodutivos intergeracionais da exposição oral de ratas
Wistar ao dimetanossulfonato de etano durante a prenhez e lactação

LETHÍCIA VALENCISE

ORIENTADORA: DRA. WILMA DE GRAVA KEMPINAS

COORIENTADORA: DRA. PATRÍCIA VILLELA E SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Dra. Wilma De Grava Kempinas

BOTUCATU – SP
2021

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

Valencise, Lethícia.

Desfechos reprodutivos intergeracionais da exposição oral de ratas Wistar ao dimetanossulfonato de etano durante a prenhez e lactação / Lethícia Valencise. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Wilma De Grava Kempinas
Coorientador: Patrícia Villela e Silva
Capes: 20600003

1. Ratos Wistar - Reprodução. 2. Controle da população.
3. Fertilidade. 4. Hormônios esteroidianos. 5. Prenhez.
6. Lactação.

Palavras-chave: Animais sinantrópicos; Controle populacional; Dimetanossulfonato de etano; Fertilidade; Rato.

Dedicalória

Dedico este trabalho aos meus pais Marco e Vilma, à minha irmã Laryssa, aos animais de laboratório envolvidos na pesquisa e aos meus animais de estimação Billy e Loki. Todos foram de suma importância neste período.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Marco Antonio Valencise e Vilma Rita Marsolla Valencise, e à minha irmã Laryssa Valencise por desde que eu era mais nova incentivarem em mim a curiosidade, por sempre me estimularem e apoiarem nas decisões difíceis e por acreditarem em mim e no que eu faço. O apoio incondicional de vocês foi fundamental e sinto profunda admiração e gratidão.

Agradeço aos demais membros da minha família que torcem por mim de longe e se animam com todas as novidades. Sempre que possível, estarei presente no café da tarde de domingo na casa do vô Toninho.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas, que me acolheu em seu laboratório ainda na Iniciação Científica e continua me auxiliando no meu caminho, agora no mestrado. Agradeço por todos os ensinamentos, oportunidades e direcionamento na área acadêmica. O que aprendi com a senhora e com o laboratório ReproTox é grande parte do que sou hoje. Tenho grande admiração pela pessoa e pesquisadora que a senhora é.

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Patrícia Villela e Silva, pela imensa ajuda e dedicação durante todo o desenvolvimento deste projeto. Por tratar todas as minhas dúvidas e oferecer sugestões com muito carinho e atenção. A sua contribuição e amizade foram muito importantes para mim.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório Thamiris Moreira Figueiredo, Jorge Willian Franco de Barros e Ana Flávia Quiarato Lozano. O auxílio de vocês como pesquisadores e a amizade dentro e fora do laboratório são muito queridos por mim. Com certeza ajudaram a tornar esta experiência ainda mais prazerosa.

Agradeço ao meu namorado, Diogo Pessuto Callegari, pelo carinho, apoio e companheirismo especialmente nesta fase final do meu mestrado.

Agradeço aos demais membros do ReproTox, atuais e egressos, que me ajudaram no desenvolvimento do projeto e contribuíram com conhecimentos sobre a Ciência.

Agradeço ao José Eduardo Bozano, responsável pela confecção das lâminas histológicas.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores que contribuíram de alguma maneira com a minha formação.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro e à UNESP pela oportunidade.

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
1. A formação do sistema genital	10
2. O eixo hipotálamo-hipófise-gônada	13
2.1. Período pré-natal.....	13
2.2. Instalação da puberdade.....	13
3. A diferenciação sexual do cérebro.....	15
4. Andrógenos e células androgênicas.....	16
5. O dimetanossulfonato de etano (EDS)	19
6. Controle populacional de animais sinantrópicos e EDS.....	20
Justificativa	24
Objetivos.....	25
Capítulo 1	26
Capítulo 2	58
Conclusões	85
Referências	86
Anexos.....	94
Anexo I: Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Bioética.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DA INTRODUÇÃO

17 β -HSD	17- β -hidroxiesteroide desidrogenase
AR	Receptor androgênico
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CLA	Células de Leydig adultas
CLF	Células de Leydig fetais
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
EDS	Dimetanossulfonato de etano
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HHG	Hipotálamo-hipófise-gônada
INSL3	Peptídeo 3 semelhante à insulina
LH	Hormônio luteinizante
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCD	Diepóxido de 4-vinilcicloexeno
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DOS MANUSCRITOS

3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
AGD	Anogenital distance
DSP	Daily sperm production
EDS	Ethane dimethanesulfonate
FSH	Follicle-stimulating hormone
GD	Gestational day
HE	Hematoxylin and eosin
HPG	Hypothalamic-pituitary-gonadal
ITT	Intratesticular testosterone
LH	Luteinizing hormone
mDF	Modified Davidson's fluid
PND	Postnatal day
SEM	Standard error of mean
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
VCD	4-vinylcyclohexene diepoxide

Resumo

Hormônios esteroides são fundamentais para a diferenciação sexual, instalação da puberdade e manutenção da fertilidade em animais adultos. Em machos, a esteroidogênese se inicia no período fetal e auxilia no processo de masculinização. Em fêmeas, a esteroidogênese tem início apenas no período pós-natal. Um dos principais hormônios esteroides responsáveis por estes processos é a testosterona, produzida pelas células de Leydig em machos e pelas células da teca em fêmeas. Compostos que comprometem a concentração plasmática de testosterona têm influência direta sobre a fertilidade. O dimetanossulfonato de etano (EDS) é um agente citotóxico para as células de Leydig, causando sua destruição nos 3 dias subsequentes à administração de uma dose única de 75mg/kg de peso corpóreo via injeção intraperitoneal em ratos, com consequente queda da produção de testosterona. Neste trabalho, foram investigados os efeitos da exposição oral materna ao EDS durante a gestação e lactação de ratas Wistar, do dia gestacional (DG) 12 ao 21º dia pós-natal (DPN), sobre as matrizes (F0) e sobre o desenvolvimento e os parâmetros reprodutivos das proles F1 (masculina e feminina) e F2 (masculina). A geração F1 foi avaliada quanto a parâmetros de desenvolvimento físico, sensorial e sexual. Houve atraso na abertura de olhos de fêmeas F1 do grupo EDS. Tanto F0 quanto F1 do grupo EDS apresentaram ingestão de ração e peso corpóreo reduzidos em relação ao controle. Na prole masculina observou-se redução da distância anogenital, peso de testículo e epidídimo, produção espermática diária e redução na inseminação de fêmeas receptivas. Os machos foram acasalados com fêmeas sem tratamento e deram origem à F2. A F2 apresentou redução do peso absoluto do testículo apenas no DPN 21. Na prole feminina da F1, observou-se atraso na instalação da puberdade, redução do peso do útero (DPN 90) e diminuição da contribuição do endométrio para a altura total do epitélio uterino. Essas fêmeas foram acasaladas com machos sem tratamento e eutanasiadas no DG 20 para avaliação de parâmetros de fertilidade. Foi observada a redução do número de corpos lúteos e implantações e aumento no número de reabsorções. Em suma, o tratamento ocasionou redução de peso corpóreo e ingestão alimentar total em F0 e F1, redução do peso de órgãos do sistema genital na F1 masculina (testículo e epidídimo) e feminina (útero) e de parâmetros de fertilidade, bem como redução do peso testicular no início do desenvolvimento da F2. Conclui-se que a combinação das alterações intergeracionais causadas pela ingestão de EDS adicionado ao alimento sólido nas condições acima referidas, leva à redução da fertilidade em ratos, e apresenta um método novo e promissor para o controle populacional de animais sinantrópicos.

Abstract

Steroid hormones are essential for sexual differentiation, puberty onset and maintenance of fertility in adult animals. In males, steroidogenesis begins in the fetal period and contributes to the masculinization process. In females, steroidogenesis starts only in the postnatal period. One of the main steroid hormones responsible for these processes is testosterone, produced by Leydig cells in males and by theca cells in females. Compounds that compromise testosterone plasmatic levels have a direct influence on fertility. Ethane dimethanesulfonate (EDS) is a cytotoxic agent for Leydig cells, causing its destruction in the 3 days following the administration of a single dose of 75mg / kg body weight via intraperitoneal injection in rats, with a consequent drop in testosterone production. In the present study we investigated the effects of maternal exposure to EDS during pregnancy and lactation of Wistar rats, from gestational day (GD) 12 to postnatal day (PND) 21, on the dams (F0) and on the development and reproductive parameters of the F1 and F2 offspring. F1 was evaluated for parameters of physical, sensorial, and sexual development. Eye opening was delayed on F1 females from EDS group. Both F0 and F1 of the EDS-treated group had reduced food intake and body weight compared to the control group. In the male offspring, there was a reduction in anogenital distance, testis and epididymis weight, daily sperm production and insemination rate. Males were mated with untreated females to obtain the second generation (F2). F2 had reduced absolute testis weight only on PND 21. In F1 female offspring, there was a delay in the onset of puberty, a reduction of the weight of the uterus (PND 90) and of the contribution of the endometrium to the total uterine epithelium height. These females were mated with untreated males and euthanized on GD 20 to assess fertility parameters. To summarize, the treatment caused a reduction in body weight and total food intake in F0 and F1, a reduction in the weight of organs of the genital system in male (testis and epididymis) and female (uterus) F1 and in fertility parameters, as well as reduced testicular weight at the beginning of F2 development. It was observed a reduction in the number of corpora lutea and implantation sites and an increase in the number of resorbed fetuses. We conclude that the combination of intergenerational alterations caused by EDS added to the solid food intake, in the specified conditions, leads to reduced fertility in rats, and presents a new and promising method for populational control of synanthropic animals.

Referências da introdução

ALONSO, R. et al. Norway rat (*Rattus norvegicus*) ectoparasites in livestock production systems from central Argentina: Influencing factors on parasitism. **Acta Tropica**, v. 203, p. 105299, mar. 2020.

ARIYARATNE, H. B. et al. Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 1115–1123, out. 2000.

ASTAPOVA, O.; MINOR, B. M. N.; HAMMES, S. R. Physiological and Pathological Androgen Actions in the Ovary. **Endocrinology**, v. 160, n. 5, p. 1166–1174, 26 mar. 2019.

AUBERT, M. L. et al. Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. **Endocrinology**, v. 116, n. 4, p. 1565–1576, abr. 1985.

BAKKER, J.; BAUM, M. J. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 1–16, jan. 2008.

BEDFORD, J. M. Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. **Handbook of physiology**, 1975.

BERMÚDEZ, S. E. et al. Synanthropic Mammals as Potential Hosts of Tick-Borne Pathogens in Panama. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 6 jan. 2017.

BERNY, P. et al. VIGILANCE POISON: Illegal poisoning and lead intoxication are the main factors affecting avian scavenger survival in the Pyrenees (France). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 71–82, ago. 2015.

CAMPANA, C.; PEZZI, V.; RAINEY, W. E. Cell-based assays for screening androgen receptor ligands. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 33, n. 3, p. 225–234, maio 2015.

CHEN, H.; GE, R.-S.; ZIRKIN, B. R. Leydig cells: From stem cells to aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1–2, p. 9–16, 10 jul. 2009.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Hypothalamic control of the male neonatal testosterone surge. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 371, n. 1688, p. 20150115, 19 fev. 2016.

CUPP, A. S.; SKINNER, M. K. Embryonic Sertoli Cell Differentiation. In: **Sertoli Cell Biology**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 43–70.

DUTTA, D. et al. Ethylene dimethane sulfonate (EDS) ablation of Leydig cells in adult rat depletes testosterone resulting in epididymal sperm granuloma: Testosterone replacement prevents granuloma formation. **Reproductive Biology**, v. 19, n. 1, p. 89–99, 1 mar. 2019.

FORGER, N. G. Epigenetic mechanisms in sexual differentiation of the brain and behaviour. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 371, n. 1688, p. 20150114, 19 fev. 2016.

GENTRY, R. T.; WADE, G. N. Androgenic control of food intake and body weight in male rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 90, n. 1, p. 18–25, jan. 1976.

GUYTON; HALL. Hormônios Hipofisários e seu controle pelo Hipotálamo. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 918–920.

HAVELOCK, J. C.; RAINEY, W. E.; CARR, B. R. Ovarian granulosa cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 228, n. 1–2, p. 67–78, 30 dez. 2004.

HIMSWORTH, C. G. et al. Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 13, n. 6, p. 349–359, jun. 2013.

HOYER, P. B. et al. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 91–99, fev. 2001.

HUYNH, P. N. et al. Long-term effects of triptolide on spermatogenesis, epididymal sperm function, and fertility in male rats. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 5, p. 689–699, out. 2000.

JACKSON, A. E. et al. The effects of ethylene dimethane sulphonate (EDS) on rat Leydig cells: evidence to support a connective tissue origin of Leydig cells. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 425–437, set. 1986.

JACOB, J.; BUCKLE, A. Use of Anticoagulant Rodenticides in Different Applications Around the World. In: VAN DEN BRINK, N. W. et al. (Eds.). . **Anticoagulant Rodenticides and Wildlife**. Emerging Topics in Ecotoxicology. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 11–43.

JARZAB, B. et al. Adrenergic influences on sexual differentiation of the rat brain. **Monographs in Neural Sciences**, v. 12, p. 191–196, 1986.

KAPPELER, C. J.; HOYER, P. B. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 1, p. 57–62, fev. 2012.

KERR, J. B.; DONACHIE, K.; ROMMERTS, F. F. Selective destruction and regeneration of rat Leydig cells in vivo. A new method for the study of seminiferous tubular-interstitial tissue interaction. **Cell and Tissue Research**, v. 242, n. 1, p. 145–156, 1985.

KIM, J. M.; LUO, L.; ZIRKIN, B. R. Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, p. 1846–1853, maio 2000.

KLINEFELTER, G. R. et al. Multiple effects of ethane dimethanesulfonate on the epididymis of adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 105, n. 2, p. 271–287, 1 set. 1990.

KLINEFELTER, G. R. et al. The ethane dimethanesulfonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 4, p. 318–327, ago. 1994.

KUDWA, A. E. et al. Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior. **Neuroscience**, v. 138, n. 3, p. 921–928, 2006.

LEE, E.-H. et al. Gene expression analysis of toxicological pathways in TM3 leydig cell lines treated with Ethane dimethanesulfonate. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 213–223, jun. 2012.

LEVY, J. et al. **Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs.** Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18167099/>>. Acesso em: 18 set. 2020.

LIU, J. et al. Triptolide induces adverse effect on reproductive parameters of female Sprague-Dawley rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 1–7, jan. 2011.

LIU, T. et al. Where are the theca cells from: the mechanism of theca cells derivation and differentiation. **Chinese Medical Journal**, v. 133, n. 14, p. 1711–1718, 20 jul. 2020.

LOPES, K. R. F.; SILVA, A. R. Castração química de mamíferos machos: revisão. p. 5, 2014.

MARTINEZ-ARGUELLES, D. B. et al. Fetal origin of endocrine dysfunction in the adult: the phthalate model. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, p. 5–17, set. 2013.

MASON, G.; LITTIN, K. The humaneness of rodent pest control. **Animal Welfare**, v. 12, 1 fev. 2003.

MCCARTHY, M. M.; DE VRIES, G. J.; FORGER, N. G. Sexual Differentiation of the Brain: Mode, Mechanisms, and Meaning. In: PFAFF, D. W. et al. (Eds.). . **Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 1707–1746.

MEERBURG, B. G.; BROM, F. W. A.; KIJLSTRA, A. The ethics of rodent control. **Pest Management Science**, v. 64, n. 12, p. 1205–1211, dez. 2008.

MIHALCA, A. D.; SÁNDOR, A. D. The role of rodents in the ecology of Ixodes ricinus and associated pathogens in Central and Eastern Europe. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, 1 out. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância, Prevenção e Controle de Zoonoses: Normas Técnicas e Operacionais**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, , 2016.

MORAIS, I. L. A. **Controle de Animais Sinantrópicos em Estabelecimentos de Assistência à Saúde: Proposta de Norma Técnica**. Dissertação de Mestrado—São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2007.

MORRISON, L. J.; MARCINKIEWICZ, J. L. Tumor necrosis factor alpha enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 450–457, fev. 2002.

NANTERMET, P. V. et al. Androgenic Induction of Growth and Differentiation in the Rodent Uterus Involves the Modulation of Estrogen-Regulated Genetic Pathways. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 564–578, 1 fev. 2005.

OJEDA, S.; SKINNER, M. Puberty in the Rat. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l.] Elsevier, 2006. v. 2p. 2061–2126.

PATRÃO, M. T. C. C.; SILVA, E. J. R.; AVELLAR, M. C. W. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 8, p. 934–945, nov. 2009.

PHOENIX, C. H. et al. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinology**, v. 65, p. 369–382, set. 1959.

POTTER, S. J.; KUMAR, D. L.; DEFALCO, T. Origin and Differentiation of Androgen-Producing Cells in the Gonads. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 58, p. 101–134, 2016.

RAMIREZ, V. D.; MCCANN, S. M. Inhibitory effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats. **Endocrinology**, v. 76, p. 412–417, mar. 1965.

REYNOLDS, L. P. et al. Developmental Programming of Fetal Growth and Development. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 35, n. 2, p. 229–247, jul. 2019.

RICHARDS, J. S. et al. Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 1, p. 1–20, 5 out. 2017.

ROBAIRE B, H. L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: Structure, functions, and their regulation. In: **The Physiology Of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 999–1080.

ROMMERTS, F. F. G. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and action. In: NIESCHLAG, E.; BEHRE, H. M. (Eds.). . **Testosterone: Action • Deficiency • Substitution**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990. p. 1–22.

ROSENFELD, C. S. Brain Sexual Differentiation and Requirement of SRY: Why or Why Not? **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 632, 2017.

SALES, V. M.; FERGUSON-SMITH, A. C.; PATTI, M.-E. Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 559–571, 7 mar. 2017.

SALILEW-WONDIM, D. et al. Polycystic ovarian syndrome is accompanied by repression of gene signatures associated with biosynthesis and metabolism of steroids, cholesterol and lipids. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, 13 abr. 2015.

SCHMAHL, J. et al. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 1, p. 65–73, jan. 2000.

SCHOENWOLF, S. et al. Desenvolvimento do Sistema Genital. In: **Larsen Embriologia Humana**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2015. p. 604–655.

SENESTECH. **ContraPestSenestech**, 2020. Disponível em: <<https://senestech.com/contrapest/>>. Acesso em: 1 nov. 2020

SHETH, A. R. et al. Negative feedback of secretion of follicle-stimulating hormone by the pituitary gland of developing male rats. **The Journal of Endocrinology**, v. 87, n. 3, p. 401–407, dez. 1980.

SINGLA, N. et al. Potential of triptolide in reproductive management of the house rat, *Rattus rattus*. **Integrative Zoology**, v. 8, n. 3, p. 260–276, set. 2013.

SMART, J. L. et al. 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**, v. 28, n. 2, p. 121–128, fev. 1990.

SPRINGER, L. N. et al. Involvement of Apoptosis in 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Induced Ovotoxicity in Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 394–401, 1 ago. 1996.

SU, D.-M. et al. Influence of fetal Leydig cells on the development of adult Leydig cell population in rats. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 223–231, jun. 2018.

SVECHNIKOV, K. et al. Endocrine disruptors and Leydig cell function. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, 2010.

TARKA-LEEDS, D. K. et al. Effects of gestational exposure to ethane dimethanesulfonate in CD-1 mice: microtia and preliminary hearing tests. **Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 383–390, ago. 2003a.

TARKA-LEEDS, D. K. et al. Gestational exposure to ethane dimethanesulfonate permanently alters reproductive competence in the CD-1 mouse. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 3, p. 959–967, set. 2003b.

TAYLOR, M. F. et al. Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a Fas-mediated process. **Endocrinology**, v. 140, n. 8, p. 3797–3804, ago. 1999.

TEERDS, K. J. et al. Proliferation and differentiation of possible Leydig cell precursors after destruction of the existing Leydig cells with ethane dimethyl sulphonate: the role of LH/human chorionic gonadotrophin. **The Journal of Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 689–696, set. 1989.

TOBET, S. A. et al. Aromatase activity in the perinatal rat forebrain: effects of age, sex and intrauterine position. **Brain Research**, v. 355, n. 2, p. 171–178, dez. 1985.

VAINIO, S. et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 405–409, 4 fev. 1999.

WARD, I. L. et al. Androgen threshold to activate copulation differs in male rats prenatally exposed to alcohol, stress, or both factors. **Hormones and Behavior**, v. 36, n. 2, p. 129–140, out. 1999.

WATERMAN, M. R.; KEENEY, D. S. Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype. **Hormone Research**, v. 38, n. 5–6, p. 217–221, 1992.

WEIHUA, Z. et al. Involvement of androgen receptor in 17beta-estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 616–623, ago. 2002.

WELSH, M.; SUZUKI, H.; YAMADA, G. The Masculinization Programming Window. In: HIORT, O.; AHMED, S. F. (Eds.). . **Endocrine Development**. Basel: S. KARGER AG, 2014. v. 27p. 17–27.

WEN, Q.; CHENG, C. Y.; LIU, Y.-X. Development, function and fate of fetal Leydig cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 59, p. 89–98, 2016.

WITMER, G. W. et al. Compromised fertility in free feeding of wild-caught norway rats (*Rattus norvegicus*) with a liquid bait containing 4-vinylcyclohexene diepoxide and triptolide. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 48, n. 1, p. 80–90, mar. 2017.

YAMANOUCHI, K.; ARIA, Y. Heterotypical sexual behavior in male rats: individual difference in lordosis responses. **Endocrinologia Japonica**, v. 23, n. 2, p. 179–182, abr. 1976.