

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS 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

Introdução	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
Justificativa	32
Objetivos	33
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>.....	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
Conclusão	88
Referências Bibliográficas	89
Anexos	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).

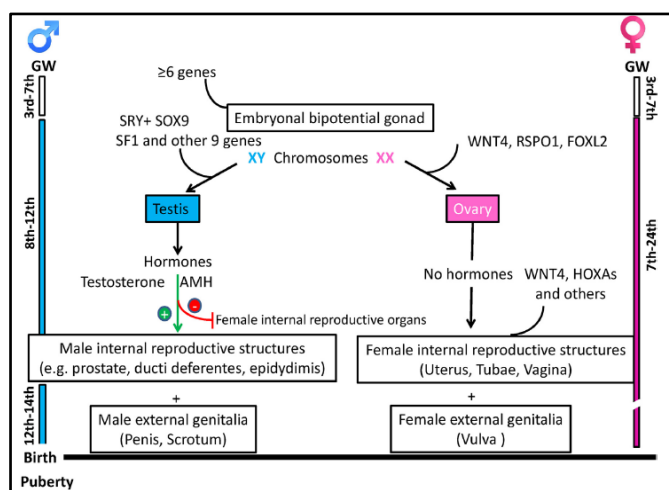


Figura 1. Desenho esquemático dos eventos da diferenciação sexual em humanos contendo os genes envolvidos no processo. Adaptado de Bianson-Lauber A, Chaboissier MC (2015)

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 do 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 na 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 a 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).

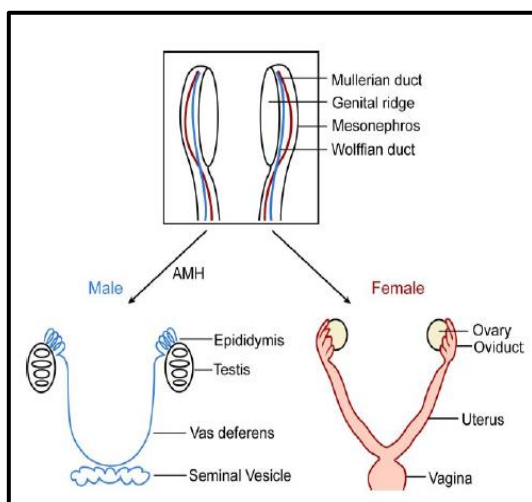


Figura 2. Desenho esquemático do desenvolvimento e diferenciação do sistema de ductos genitais (Wilhelm D, Palmer S, Koopman P, 2007)

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-

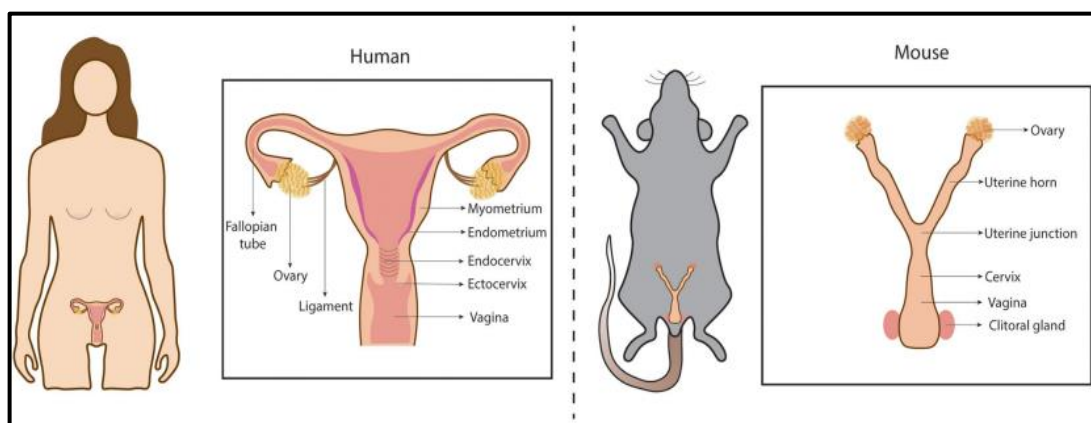


Figura 3. Anatomia do Sistema Genital Feminino (SGF). A- Desenho esquemático do SGF humano. B. Desenho esquemático do SGF de rato (Chumduri C, Turco MY, 2021).

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 protrusas 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 Foliculogênese (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).

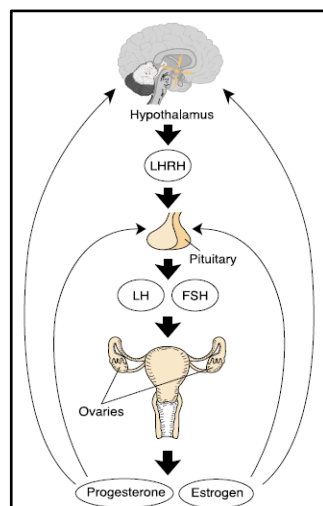


Figura 4. O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (Emanuele MA, Wezeman F, Emanuele NV, 2002)

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).

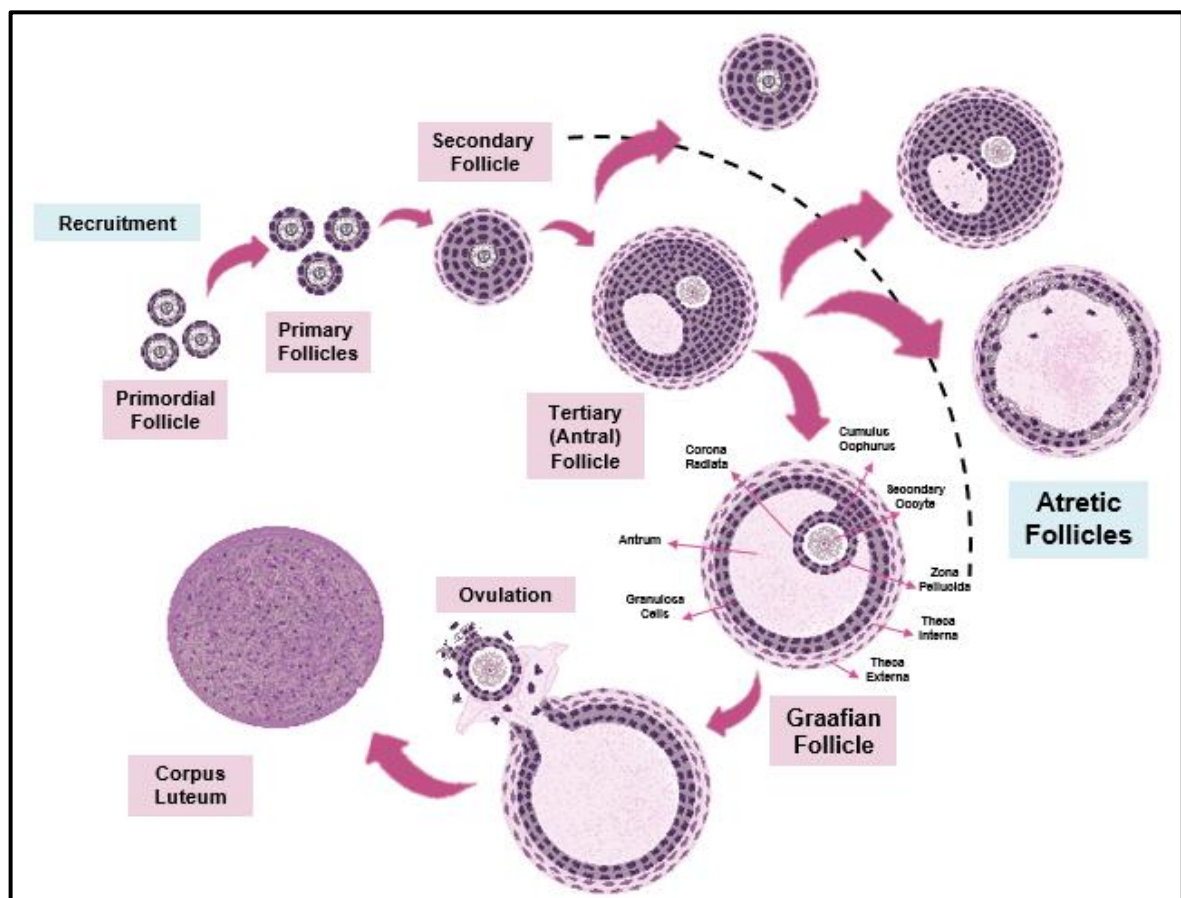


Figura 5. Foliculogênese. O processo de Foliculogênese iniciando-se com o recrutamento de folículos primordiais, evolução a folículos primários, folículos secundários, folículos antrais e ovulação. A autora.

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 bicornio, 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

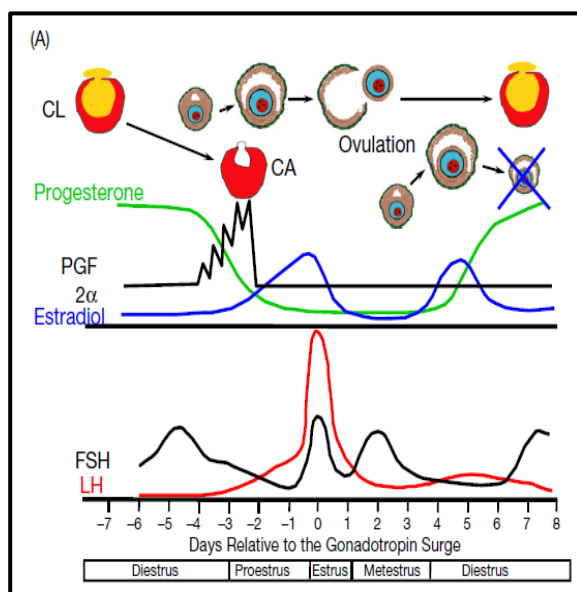


Figura 6. O ciclo estral e suas fases (Adaptado de Nowak, RA (2018). *Estrous and Menstrual Cycles*. Encyclopedia of Reproduction: Elsevier).

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-

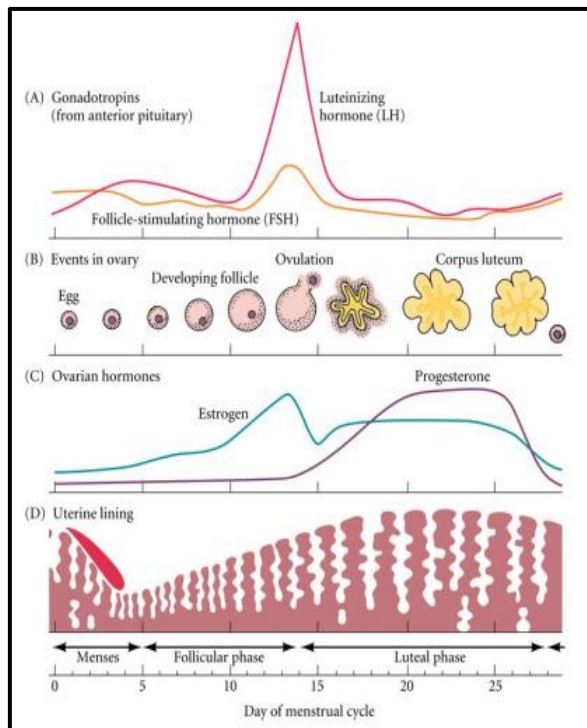


Figura 7. O ciclo menstrual e suas fases (Adaptado de Gilbert SF (2013). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc.)

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).

2. O problema das zoonoses causadas por ratos

Anualmente cerca de um milhão de casos e 53800 mortes ocorrem em decorrência de leptospirose (Costa F *et al.*, 2015). De incidência comum principalmente em áreas tropicais e países em desenvolvimento, como o Sudeste e o Sul da Ásia, Oceania, Caribe, América Latina (Caribe, Andes e regiões tropicais) e Leste da África Subsaariana, não é uma doença restrita a essas áreas, constituindo um problema global (Bharti AR *et al.*, 2003; Le Turnier P, Epelboin, L, 2018). No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, no período de 2007 e 2019 foram registrados 48670 casos confirmados e 4287 óbitos (Ministério da Saúde, 2020; Ministério da Saúde, 2018). No Brasil, recebe status de endêmica e, assim como em outros países, observa-se um aumento de incidência em períodos chuvosos quando torna-se epidêmica. Comunidades de baixo poder aquisitivo e desprovidas de saneamento básico são especialmente afetadas por esta zoonose (Khalil H *et al.*, 2021; Ministério da Saúde, 2018; Naing C *et al.*, 2019).

Seu principal vetor é o rato e sua transmissão para humanos se dá através da urina de roedores infectados (Figura 8). A presença ou o contato com estes animais é um dos fatores mais decisivos para a infecção pelas bactérias do gênero *Leptospira* (Ministério da Saúde, 2018), contato este que também pode ocorrer através da água e/ou lama contaminadas, inclusive em atividades recreacionais em que há exposição à água fresca, como natação, canoagem, dentre outras (Le Turnier P, Epelboin, L, 2018; Naing C *et al.*, 2019).

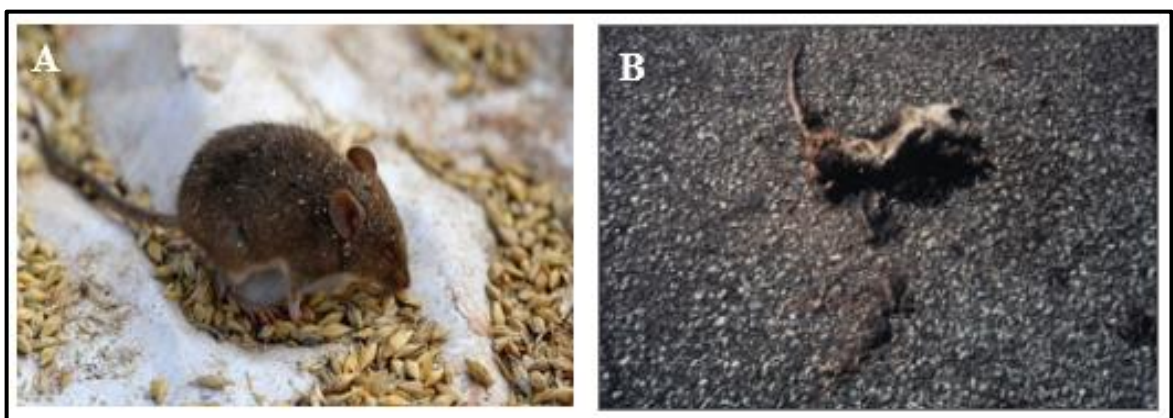


Figura 8. Ratos-domésticos – Mamíferos urbanos reservatórios de leptospirose. A. Camundongos entre grãos em infestação na Austrália (BBC News Brasil, 2021). B. Rato morto em um beco em Baltimore, EUA. Todos os ratos locais estavam infectados por leptospirose e eram fonte de infecção para casos humanos esporádicos (Adaptado de Bharti AR *et al.*, 2003).

Considerados pragas urbanas, estes roedores são responsáveis por infestações em muitas cidades ao redor do mundo: Nova York, Madri e São Paulo são algumas das metrópoles que frequentemente lutam contra infestações destes roedores (Afzal I *et al*, 2020; CDC, 2012; Diz FA, Conceição GMS, 2021; Uria IT, Mahiques JM, Gras LM, 2013; Reino G, Gomes P, 2021). Tais infestações podem ser desesperadoras: Recentemente algumas cidades do estado de Nova Gales do Sul, na Austrália, passaram por uma grande infestação de ratos-domésticos (camundongos), muito noticiada pela mídia, que provocou danos a plantações e instalações (Figura 9), levando a prejuízos materiais e emocionais por parte da população (New York Times, 2021; BBC News Brasil, 2021; McCosker M, Thompson V, 2021).



Figura 9. Infestação de ratos-domésticos em Nova Gales do Sul. A. Milhares de camundongos apareceram dia e noite em fazendas de Nova Gales do Sul. B. Ratos-domésticos destruíram trigo colhido (comparação antes e depois). C. Fios elétricos e eletrodomésticos foram destruídos pelos ratos (Adaptado de The New York Times, 2021).

É importante lembrar que esta zoonose, leptospirose, é apenas uma das doenças transmitidas por esses animais. Roedores são ainda responsáveis pela transmissão de hantavíroses, salmoneloses, febre por mordedura de rato, peste bubônica, febres hemorrágicas, dentre outras doenças (Gravinatti ML *et al*, 2020; Rahman T *et al*, 2020; Yan C *et al*, 2014). Portanto, o controle populacional desses animais sinantrópicos constitui uma medida profilática de extrema importância para o controle dessas doenças. Este controle ainda tem grande importância econômica, já que os ratos são causadores de prejuízos para setores como a agricultura e a pecuária, causando danos a plantações, infraestrutura, estocagem e transporte de alimentos e rações (Ministério da Saúde, 2002; Normile D, 2010), além de grande importância ambiental, já que ratos invasores podem causar a extinção de espécies de plantas nativas, além de afetar aves, répteis e invertebrados e causar mudanças funcionais em ecossistemas, principalmente em ilhas, onde esse controle é de extrema dificuldade e muitas vezes considerado impossível (Duron Q, Shiels AB, Vidal E, 2017).

3. Métodos de controle populacional

Atualmente, o controle populacional de ratos é feito através de métodos mecânicos (armadilhas ratoeiras), físicos (ultrassom e aparelhos eletromagnéticos), biológico (utilizando gatos) e químicos, com a utilização de raticidas e rodenticidas (venenos). Os raticidas podem ser classificados em agudos ou crônicos em relação à rapidez com que fazem efeito. Os raticidas agudos (Figura 10) provocam a morte do roedor em até vinte e quatro horas após sua ingestão enquanto que os raticidas crônicos possuem um tempo de ação maior do que vinte e quatro horas após a ingestão (Ministério da Saúde, 2002; Ministério da Saúde, 2016).

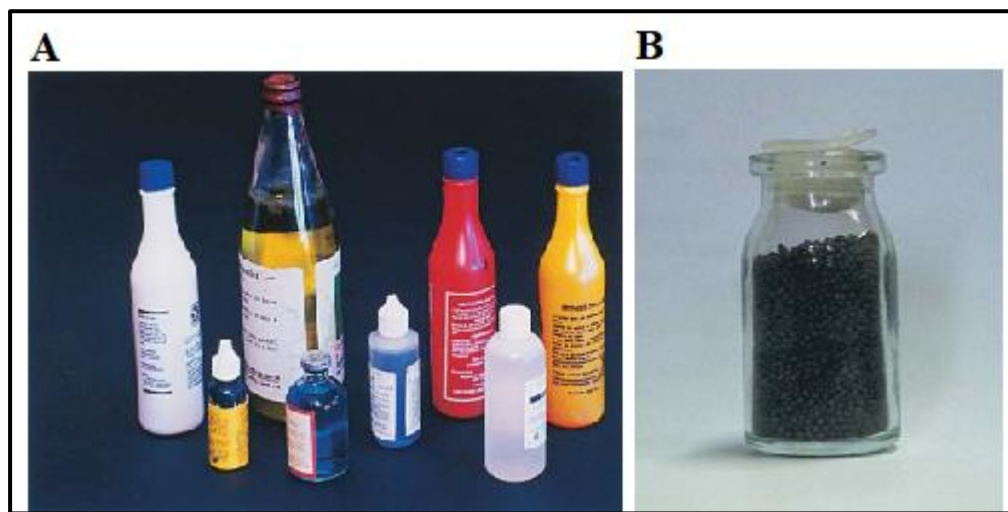


Figura 10. Raticidas Agudos. A. Raticidas líquidos, proibidos no Brasil. B. “Chumbinho”, inseticida agrícola indevidamente utilizado como raticida agudo (Adaptado de Ministério da Saúde, 2002).

Estricnina, arsênio, sulfato de tálio, fosfeto de zinco e fluoracetamida são exemplos de raticidas agudos: compostos tóxicos que atuam sobre o sistema nervoso central de maneira inespecífica. No Brasil, raticidas agudos foram proibidos em 1982 em decorrência de grande número de acidentes fatais com seres humanos. Portanto, os raticidas crônicos são os mais utilizados. De ação anticoagulante, em sua maioria, agem inibindo a síntese de protrombina, resultando em problemas de coagulação e morte por hemorragias internas (pulmonares e/ou mesentéricas). Idantiônicos e Hidroxicumarínicos (divididos entre hidroxicumarínicos de dose única e hidroxicumarínicos de dose múltipla) são classes de raticidas crônicos amplamente empregadas no país. No Brasil, somente são permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), rodenticidas anticoagulantes à base de hidroxicumarina, na forma de pó de contato (uso em tocas) (Figura 11), isca, isca granulada ou bloco impermeável (parafinado ou extrusado) (Ministério da Saúde, 2002; Ministério da Saúde, 2016).

A aplicação de venenos é uma abordagem que possui várias desvantagens e pontos negativos. O primeiro deles é o desbalanço populacional que podem ocasionar. A utilização desmedida desses venenos pode gerar desequilíbrios nos ecossistemas, pelo aumento não pretendido da população de roedores, através do chamado “Efeito Bumerangue” (Ministério da Saúde, 2002; Richardson JL *et al.*, 2019). O Efeito Bumerangue é um possível resultado de um processo de desratização realizado de maneira ineficiente (UFPeL, 2016; Ministério da Saúde, 2002).



Figura 11. Raticida em pó. Pó de contato colocado em trilha de roedor (Ministério da Saúde, 2002).

A colônia de ratos pode ser considerada como capaz de abrigar um determinado número “x” de animais, devido a fatores intrínsecos e extrínsecos, como a disponibilidade de alimento (principalmente). Para que o número de animais habitantes da colônia não exceda sua capacidade natural, existem mecanismos naturais de controle como, por exemplo, baixa fecundidade das fêmeas, períodos reduzidos ou inexistentes de receptibilidade sexual e, principalmente, canibalismo de recém-nascidos (UFPeL, 2016; Ministério da Saúde, 2002). Quando a intervenção acontece de forma mal planejada ou mal executada, ocorre a eliminação de apenas alguns animais da colônia, enquanto que outros permanecem nela, resultando num número de animais menor que o número limite “x” de animais comportados. Com isso, os mecanismos naturais de controle são suprimidos, as fêmeas tornam-se novamente sexualmente receptivas e não há mais canibalismo dos recém-nascidos (UFPeL, 2016; Ministério da Saúde, 2002).

Com o nascimento dos vários novos recém-nascidos, estes crescerão e excederão o número limite “x”. Haverá pressão da colônia, que unida, passará a tentar expulsar os novos membros excedentes para eliminar o risco de falta de alimento. Os novos indivíduos, então, passarão a lutar fisicamente entre si pelo lugar/direito de permanência na colônia. Os filhotes

mais fortes fisicamente vencerão a disputa, permanecendo na colônia, enquanto que os filhotes menores em tamanho e força, fugirão da colônia sob risco de serem mortos. Estes passarão a integrar colônias vizinhas ou novas colônias aumentando, assim, a população de ratos do local e resultando no Efeito Bumerangue (UFPel, 2016; Ministério da Saúde, 2002).

Dentre outros pontos negativos da utilização de venenos, destaca-se ainda sua possibilidade de levar ao envenenamento não intencional de animais não-alvo, seja de forma direta pela ingestão do veneno, ou indireta, pela ingestão do roedor envenenado (Mason GJ, Littin KE, 2003), além do fato de que tais compostos resultam na geração de carcaças desses roedores, que causam prejuízo às condições sanitárias dos locais, criando ambientes propícios para transmissão de outras doenças. Esta, ainda, constitui uma abordagem de controle não ética e desumana, já que causam mortes lentas e dolorosas, que podem demorar mais de 24 horas para acontecer, constituindo meios que causam sofrimento animal (Mason GJ, Littin KE, 2003).

A castração de animais é um dos métodos mais utilizados para o controle populacional de animais domésticos (Houlihan KE, 2017), além de ser bastante utilizada na pecuária, para melhorar a maciez e qualidade da carne (Nian Y *et al*, 2018; Li Y *et al*, 2020; Marti S *et al*, 2013). Embora a abordagem cirúrgica seja eficiente para estes animais, é inviável no controle em larga escala e impraticável para animais sinantrópicos como os roedores. Existe então a alternativa da castração química, que tem por obstáculo a escolha, disponibilidade e eficácia de fármacos a serem utilizados para esse propósito (Paranzini CS *et al*, 2018).

4. Dimetanossulfonato de Etano

O Dimetanossulfonato de Etano (EDS) é um diéster sulfônico alquilante (Figura 12), análogo ao busulfan (o dimetanossulfonato de butano, quimioterápico usado no tratamento de leucemias agudas e outras desordens não malignas, além de constituir regime preparativo para pacientes que passarão por transplante de medula óssea) (Buggia I *et al*, 1994; Molenaar R *et al*, 1985; Morris ID, Phillips DM, Bardin CW, 1986; Patel, R & Tadi, P, 2021), que apresenta efeitos citotóxicos às células de Leydig, células produtoras de testosterona, levando à depleção androgênica. Os mecanismos através dos quais o EDS age ainda não são completamente entendidos. O que se sabe é que parecem estar ligados a estresse oxidativo e apoptose das células de Leydig, com ativação de receptores FAS e caspase 3 (Ashby J *et al*, 2001; Morris ID, Phillips DM, Bardin CW, 1986; Taylor MF *et al*, 1999).

Este composto há décadas tem sido alvo de interesse dos pesquisadores em decorrência de sua alta especificidade às células de Leydig e por ser considerado relativamente não tóxico, ao contrário do que ocorre com outros sulfonatos alcanos, que são drogas antitumorais de

extensa toxicidade sistêmica (Edwards K, Jackson H, Jones AR *et al*, 1988; Rommerts FF, Teerds KJ, Hoogerbrugge JW, 1988; Smart JL *et al*, 1990).

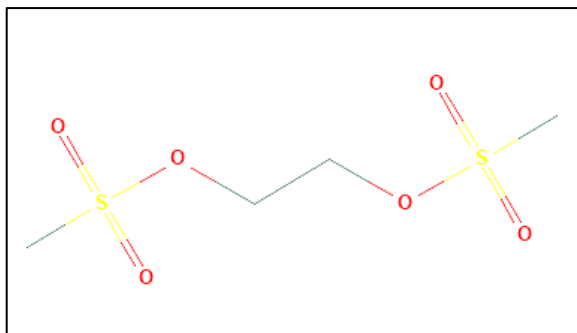


Figura 12. Fórmula da estrutura química do Dimetanossulfonato de Etano. PubChem [internet].

Os efeitos provocados pelo EDS são principalmente decorrentes à depleção androgênica provocada. Os andrógenos constituem uma classe de hormônios essenciais para o desenvolvimento do sistema reprodutor, produzidos a partir do colesterol. Têm papel de extrema importância durante o desenvolvimento sexual intrauterino (formação do trato reprodutivo masculino interno e externo), no amadurecimento do sistema reprodutor e seus órgãos (que ocorre durante a puberdade), além de grande importância no desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias e terciárias durante toda a vida adulta. São, ainda, necessários para o funcionamento normal do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada e para a espermatogênese (Bienenfeld A, 2019; Hiort O, 2002; Morris ID, Phillips DM, & Bardin CW, 1986; US EPA, 2011).

Em estudos nos quais foram tratados ratos machos com EDS (75mg/Kg) por via intraperitoneal, os danos às células de Leydig resultaram em supressão dos níveis séricos e testiculares de andrógenos dentro de um período máximo de 24 horas, com destruição das células de Leydig em até 48 horas. Testículos e órgãos acessórios reprodutores também apresentam perda de peso que persiste até que os níveis séricos androgênicos sejam restaurados ao normal (Morris ID, McCluckie JA, 1979; Smart JL *et al*, 1990). A exposição de ratos machos a EDS resulta ainda em redução da motilidade progressiva de espermatozoides, alterações na histologia do corpo e cauda proximal do epidídimo e diminuição de proteínas específicas dos espermatozoides da porção proximal da cauda do epidídimo, região na qual a habilidade fertilizante é adquirida (Dyson AL, Orgebin-Crist MC, 1973; Klinefelter GR *et al*, 1990).

As alterações androgênicas provocadas pelo EDS também induzem alterações nas células de Sertoli e peritubulares por significativa perda de receptores androgênicos, o que induz, ainda, aumento das células germinativas em apoptose (Atanassova N *et al*, 2006). Estudos realizados

em nosso Laboratório, os quais encontram-se atualmente em processo de patenteamento, confirmam ainda os efeitos do EDS sobre o sistema reprodutor masculino, apresentando prejuízos como diminuição da motilidade espermática, diminuição de peso de órgãos reprodutores e danos à concentração espermática, além de constatarem seu potencial como quimioesterilizante a ser empregado no controle populacional de roedores.

Esse químico tem se estabelecido como composto de escolha em estudos sobre a reprodução feminina, já que constitui um método de comprometimento da produção de andrógenos sem intervenção cirúrgica, além de possuir muitas aplicações devido à reversibilidade desse processo através da interrupção de sua administração e formação de novas células de Leydig ou através da administração de andrógenos (Chen H *et al*, 2015; Heng K *et al*, 2012; Jackson H *et al*, 1973; Morris ID & McCluckie JA, 1979).

Embora sejam bem conhecidos os efeitos deste composto sobre as células de Leydig, pouco se sabe sobre os efeitos do EDS sobre o sistema reprodutor feminino devido ao baixo número de estudos publicados onde tenha havido tratamento de ratas fêmeas com EDS. Em um deles houve administração de 50mg/Kg da droga a ratos machos e fêmeas durante o período de aleitamento através de injeção na nuca, onde foram observados efeitos negativos sobre os órgãos reprodutivos dos machos, como diminuição dos pesos do testículo e do epidídimo, atraso no crescimento em ambos os sexos e atraso na abertura vaginal de fêmeas, apresentando também menor peso corpóreo durante a avaliação desse parâmetro (Smart JL *et al*, 1990).

No sistema reprodutor feminino a função de prover andrógenos recai sobre as células da teca. A teca do folículo ovariano é uma camada ou envelope de tecido conectivo que envolve as células da granulosa. É subdividida em teca interna e teca externa. Enquanto a primeira contém células endócrinas, a teca externa é formada por células de tecido conectivo fibroso derivadas de células semelhantes a fibroblastos. Pelo fato de ser vascularizada, a teca apresenta grande importância na entrega de nutrientes para outras células (como as células da granulosa), na manutenção da integridade estrutural e na produção de andrógenos como testosterona, androstenediona e di-hidrotestosterona. A androstenediona, um destes andrógenos produzidos pela teca, é sintetizada pela sua porção interna, a teca interna, em resposta ao estímulo provocado pelo LH (hormônio luteinizante). Este andrógeno é convertido pelas células da granulosa, através da enzima aromatase em estradiol, portanto uma eventual ausência de andrógenos também resultaria em danos ao correto funcionamento do sistema reprodutor feminino (Richards JS *et al*, 2017; Richards JS, Hedin L, Caston L, 1986; Fortune JE, Armstrong DT, 1978).

Devido ao fato de que existem semelhanças morfofuncionais entre as células de Leydig e as células da teca dos folículos ovarianos (Potter SJ, Kumar DL, DeFalco T, 2016), surge a hipótese de que este composto também possa agir sobre estas células. Ambas as células, de Leydig (presentes nos testículos) e da teca (presentes nos ovários), são tipos críticos de células presentes no interstício gonadal, de função semelhante desempenhando papel chave ao prover andrógenos fundamentais para que os órgãos reprodutivos desempenhem suas funções (Potter SJ, Kumar DL, DeFalco T, 2016). Tais células também tem origem semelhante, se diferenciando no interstício das gônadas dos mamíferos, fora dos compartimentos que contêm as células germinativas no testículo (cordões testiculares e túbulos seminíferos) e no ovário (folículos), embora se desenvolvam em períodos diferentes. Enquanto que as células esteroideogênicas das gônadas masculinas, células de Leydig, surgem durante o desenvolvimento fetal, as células da teca não se diferenciam até estágios perinatais, quando o desenvolvimento folicular começa (Barsoum IB, Yao HH, 2010; Magoffin DA, 2005; Mannan MA, O'Shaughnessy PJ, 1991; Potter SJ, Kumar DL, DeFalco T, 2016).

As Células de Leydig Ovarianas, como atualmente são chamadas as Células do Hilo do Ovário - que se localizam no hilo do ovário ou no mesovário (quando localizadas ortopicamente) ou no estroma fimbrial das tubas uterinas, embaixo da cápsula ovariana (quando localizadas heterotopicamente), também são células muito semelhantes às células de Leydig dos testículos, apresentando características morfológicas e imonohistoquímicas semelhantes, além de também serem produtoras de testosterona (Carrasco-Juan JL *et al*, 2017; Carrasco-Juan JL *et al*, 2018), constituindo outro lugar de possível ação do EDS, além das células da teca. Portanto, a investigação dos efeitos desse composto sobre a reprodução feminina é necessária para melhor compreender o potencial e viabilidade do uso desta droga para a castração química e controle populacional de ratos e outros roedores.

4. O Diepóxido de 4-vinilciclohexeno

Outro composto químico de grande importância para estudo da inibição do potencial reprodutivo de fêmeas é o Diepóxido de 4-vinilciclohexeno, o VCD. O VCD (Figura 13) é um químico ocupacional amplamente usado como químico intermediário e/ou diluente reativo para resinas epóxi e diepóxidos. Sabe-se que este composto causa perda seletiva de folículos ovarianos nos estágios primordial e primário do desenvolvimento, via inibição direta da autofosforilação do receptor de sobrevivência c-kit, localizado na membrana plasmática dos ovócitos (Mark-Kappeler CJ, 2011; Brooks HL, Pollow DP, Hoyer PB, 2016).

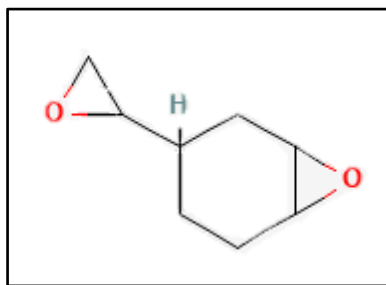


Figura 13. Fórmula da estrutura química do Diepóxido de 4-vinilciclohexeno. PubChem [internet].

O Receptor c-kit é um receptor de tirosina quinase essencial para proliferação, sobrevivência e migração de vários tipos celulares, dentre eles os precursores dos melanócitos, células tronco e células germinativas. A ligação do ligante de c-kit chamado Kit Ligand (KL), ou também fator de células tronco ou fator de crescimento multipotente, induz homodimerização do receptor e auto fosforilação dos domínios de tirosina-quinase livres. Quando o receptor é danificado, não funciona ou simplesmente não há ligação do KL no c-kit, não há autofosforilação. Essa ausência de fosforilação leva a defeitos na modulação de diferentes vias de sinalização (Yoshida H *et al*, 1997; Martins FS *et al*, 2008; Di Siena S *et al*, 2016; Figueiredo JR *et al*, 2018). Em ovários de roedoras, KL e c-kit são importantes para a sobrevivência, migração e proliferação de células germinativas primordiais, ativação de folículos primordiais, crescimento e sobrevivência do oócito, além de proliferação de células da granulosa. As células da granulosa expressam KL enquanto que o oócito e as células da teca expressam seus receptores c-kit, exemplificando a interligação funcional de tais estruturas que controla vários aspectos da formação, crescimento e desenvolvimento folicular (Figueiredo JR *et al*, 2018).

O sucesso na ovulação do ovócito depende da progressão apropriada do folículo por diferentes estágios do desenvolvimento, sendo que essa progressão do desenvolvimento folicular segue a ordem: Folículo Primordial, Folículo Primário, Folículo Secundário (ou Pré-Antral), Folículo Antral e Folículo de Graaf (somente para o folículo que contém o ovócito a ser ovulado). Os ovócitos contidos nos folículos iniciam seu processo de meiose antes do nascimento retornando-o a partir da puberdade e finalizando-o somente com a fecundação. As fêmeas dos mamíferos nascem com um número limitado de folículos primordiais e ovócitos (após o nascimento não são gerados novos ovócitos) e, portanto, compostos que destroem ovócitos ou a reserva folicular ovariana (como o VCD) levam à falência ovariana prematura (menopausa prematura, em mulheres) (Hoyer PB *et al.*, 2001; Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, 2013; Yoshida H *et al*, 1997; Cao LB *et al*, 2020). Atualmente, o VCD estabeleceu-se como modelo de estudo da menopausa, afinal compreende animais que ainda apresentam ovário (não foram submetidos à ooforectomia) e resulta na falência ovariana através

da depleção folicular, melhor se aproximando da progressão natural humana da perimenopausa para a menopausa (Brooks HL, Pollock DP, Hoyer PB, 2016).

Devido ao fato de que o EDS é ativo pela via oral (Jackson H, Craig AW, 1969), propõe-se a abordagem do tratamento através da adição do composto também à ração. O tratamento de fêmeas com EDS e VCD isolados e combinados através da técnica inovadora de adicionar estes compostos à ração permitirá avaliar e comparar efeitos dessas drogas sob esta forma de administração, sendo importante para avaliar seu potencial como alternativa aos métodos atuais de controle populacional de roedores. Espera-se que o presente trabalho possa disponibilizar um método de castração animal ético, acessível e de ampla aplicabilidade.

Justificativa

Este projeto justifica-se pela necessidade da criação de um método de controle populacional para roedores menos impactante aos ecossistemas, visto que as atuais alternativas (raticidas e rodenticidas) podem ter efeitos como desequilíbrio populacional de tais espécies, envenenamento acidental de animais não-alvo (seja diretamente, pela ingestão do veneno, ou indiretamente, pela ingestão das carcaças de animais envenenados), além de ser importante diminuir o sofrimento animal (venenos podem demorar até 24 horas para agir) e a contaminação ambiental com carcaças de ratos mortos.

Considerando que estudos prévios realizados no nosso Laboratório, nos quais o Dimetanossulfonato de Etano (EDS) foi administrado na ração a ratos Wistar machos, contribuem com a hipótese de que este composto químico tem aplicabilidade para este fim em ratos machos, é importante avaliar os efeitos do mesmo sobre as fêmeas da espécie. Há ainda interesse na avaliação dos efeitos do Diepóxido de 4-vinilciclohexeno, composto conhecidamente causador de morte celular em folículos primordiais e primários, adicionado à ração, para determinar qual dos compostos seria melhor utilizado para esse fim e se uma possível associação entre os compostos seria viável.

Objetivos

Objetivo Geral

O presente trabalho pretende investigar os possíveis efeitos causados pela administração por via oral (gavagem) do Dimetanossulfonato de Etano (EDS) e do Diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) sobre a função reprodutiva de ratas Wistar adultas e a possível aplicabilidade destes compostos na castração química da população feminina de roedores, visando seu controle populacional.

Objetivos Específicos

- ➔ Avaliar se a exposição de ratas fêmeas adultas ao EDS por via oral apresenta indícios de causar danos toxicológicos, como alterações no peso corpóreo.
- ➔ Avaliar se a exposição de ratas fêmeas adultas ao EDS pode causar prejuízos ao sistema reprodutor feminino, tais quais efeitos sobre o peso de órgãos reprodutores, sobre histologia e fisiologia dos ovários e útero, sobre a ciclicidade reprodutiva e sobre o comportamento sexual, bem como à reserva folicular ovariana.
- ➔ Avaliar se a exposição de ratas Wistar adultas ao EDS através da ração é eficaz em promover danos reprodutivos e se seu uso isolado ou associado ao VCD seriam potenciais alternativas para o controle populacional de roedores.

Capítulo 1

Este trabalho deu origem ao manuscrito “Reproductive effects of the exposure of adult female Wistar rats to ethane dimethanesulfonate associated or not to 4-vinylcyclohexene diepoxide: A new approach to rodents population control”, a ser submetido para publicação.

Reproductive effects of the exposure of adult female Wistar rats to ethane dimethanesulfonate associated or not to 4-vinylcyclohexene diepoxide: A new approach to rodents population control

Karolina da Silva Tonon¹, Gustavo Aurélio Chavari¹, Jorge Willian Franco de Barros¹, Mayara Silva Moura¹, Ana Flávia Quiarato Lozano¹, Janete Aparecida Anselmo Franci², Wilma De Grava Kempinas^{1*}

¹Department of Structural and Functional Biology (Area of Morphology), São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Botucatu, SP, Brazil.

²Department of Basic and Oral Biology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

***Corresponding author at:** Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Setor de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, 18618-689, Botucatu, SP, Brazil.

E-mail address: wilma.kempinas@unesp.br

Abstract

Each year, more than one million cases of leptospirosis are confirmed worldwide. The most indicated prophylaxis for preventing this type of zoonosis, that is transmitted by rats, is population control of these animals. Current methods used in this control, anticoagulant rodenticides, are non-humanized methods, therefore alternative methods are needed. Ethane Dimethanesulfonate (EDS) is a promising drug, causing androgen depletion through cytotoxicity to Leydig cells. Since these cells have morphofunctional similarities with theca cells of ovarian follicles, this work aimed to analyze the effects of EDS and 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD), compound that depletes primordial and primary ovarian follicles, in addition to testing their associated use, in order to assess its use as an alternative for rodent populational control. Adult female Wistar rats were allocated into 7 experimental groups (doses omitted due to patent processing): Control, the non-treated group, EDS G1, EDS G2, EDS R, VCD GAV, VCD R and EDS + VCD, which received these drugs orally, gavage or mixed in the chow, for 30 days. The significance level used was $p \leq 0.05$. EDS G2, EDS R and VCD GAV presented prolonged estrus and EDS G1 and VCD R, lower lordosis coefficients. AMH staining was compromised in VCD GAV and EDS R, along with lower height of uterine gland epithelium in the last group. In conclusion, EDS seems to have affected female reproductive physiology. Therefore, it seems to be a promising drug to chemical castration and rodent populational control. Further studies are encouraged to understand the effects of EDS in female reproduction.

Keywords: Ethane Dimethanesulfonate; 4-Vinylcyclohexene Diepoxide; Female Reproduction; Wistar Rats; Rat population control

1. Introduction

It is estimated that every year around a million new cases and 58900 deaths occur around the world as a result of leptospirosis. Commonly known to affect regions like the south and southeast Asia, Oceania, Latin America and Africa, this zoonosis is now considered a global infectious disease and public health treat due to infestations caused by its main urban reservoir: the rat (Bharti AR *et al.*, 2003; Costa F *et al.*, 2015; Le Turnier & Epelboin, 2019).

These rodents commonly inhabit places near human habitations with the purpose of feeding on human food or leftovers and, therefore, are considered synanthropic animals. They also can be linked to human transmission of other zoonosis such as salmonellosis, toxoplasmosis, hantaviruses, bubonic plague and hemorrhagic fevers and can infect people through direct or indirect contact (with its urine, for example) (Gravinatti ML *et al.*, 2020; Rahman T *et al.*, 2020; Yan C *et al.*, 2014). The incidence of this zoonotic diseases rises in rainy seasons and is especially harmful to communities that don't have basic sanitation and are afflicted by great floods. In addition, propagation of these diseases can also occur through exposure to pathogens in water recreational activities or sports, such as swimming, canyoning, canoeing, etc. (Khalil H *et al.*, 2021; Le Turnier P & Epelboin L, 2019; Naing C *et al.*, 2019).

Populational control of this rodents, then, is an effective prophylactic measure against the transmission of these zoonosis. This measure is well received in the economic area as well, because rats cause annual prejudices to agriculture (damaging crops and affecting food storage and transport) and livestock (affecting animal feed storage), as well as they damage infrastructure (Fisher P *et al.*, 2019; Normile D, 2010; Richardson JL *et al.*, 2019). This control is especially difficult, and often considered impossible, in the case of islands. In this locations, invasive rats also are known to cause extinction of native plant species, in addition to affecting birds, reptiles and invertebrates, causing changes in ecosystems (Duron Q *et al.*, 2017).

Currently, populational control of rats, when performed, is done through the use of rodenticides, mainly anticoagulants, approach that has multiple negative effects: It can generate

imbalances in ecosystems, by unintended increase in the rodent population, through an effect known as “Boomerang Effect” (Richardson JL *et al.*, 2019); Can cause poisoning of non-target animals, either directly by ingesting the poison, or indirectly, by ingesting the poisoned rodents and can generate carcasses of dead rats, which harm sanitary conditions of the places, creating favorable environments for transmission of other diseases. This type of approach to population control is also a non-humanized method, causing slow and painful deaths, constituting means that cause animal suffering (Mason G & Littin KE, 2003).

Surgical castration is an effective method for population control of domestic animals, in addition to its use in livestock, for improving quality and tenderness of meat, but impractical for synanthropic animals populational control. Chemical castration, on the other hand, presents obstacles regarding the choice of drug to be utilized and the route of administration (Houlihan KE, 2017; Li Y *et al.*, 2020; Marti S *et al.*, 2013; Nian Y *et al.*, 2018; Paranzini CS *et al.*, 2018).

Ethane Dimethanesulfonate (EDS) is a promising drug that could be applied for this purpose. It is an alkylating sulfonic compound analogous to the chemotherapeutic agent busulfan that acts, in males, by causing the apoptosis of Leydig cells, cells located in the testicular interstitium which have the function of producing testosterone, an androgen steroid hormone. The mechanisms throughout this drug acts are not fully understood. What is known is that they may be linked to oxidative stress, activation of FAS receptors and caspases 3 signaling leading to apoptosis (Ashby J *et al.*, 2001; Kim JM *et al.*, 2000; Morris ID *et al.*, 1986; Taylor MF *et al.*, 1999).

Due to the resulting androgenic depletion led by Leydig cells deaths, many are the effects observed on male reproduction, such as reduction of reproductive organs weight, reduction of progressive spermatozooids motility, damage to Sertoli cells by loss of androgenic receptors (resulting in increase in apoptosis of germ cells) and reduction of specific proteins in the cauda of the epididymis, region where the fertilizing ability is achieved (Atanassova N *et al.*, 2006; Dyson ALMB & Orgebin-Crist MC, 1973; Klinefelter GR *et al.*, 1990, 1994; Morris ID &

McCluckie JA, 1979; Smart JL *et al.*, 1990). Studies conducted in our Laboratory (Borges CS *et al.*, 2019, in process of patenting) confirm the effects of EDS in male reproduction, along with its potential as a chemical compound to be used for rodents populational control.

Although the effects of EDS in male reproduction are relatively well known, little is known about the effects of EDS in female reproduction. Due to the morphofunctional similarities between Leydig cells and theca cells of the ovarian follicles (Potter SJ *et al.*, 2016), our hypothesis is that this drug may act in these cells causing androgenic depletion.

The ovarian follicles theca cells constitute a layer of cells that surrounds the granulosa cells. It is divided in theca externa, the outer layer, and theca interna, the inner layer. While the theca externa is formed by fibrous connective tissue cells derived from fibroblast-like cells, the theca interna is formed by endocrine cells. Because of the fact that the layer of theca cells is vascularized, it has great importance in nutrient delivery to the granulosa cells. It has a role in maintenance of the structural integrity and is very important for hormone production, after all the theca interna produces androgens, such as testosterone, dihydrotestosterone and androstenedione (Richards JS *et al.*, 1986, 2018). Androstenedione produced as a result of luteinizing hormone (LH) stimulation, on the other hand, can be converted in 17β -estradiol and estrone in the granulosa cells by aromatase enzyme (Fortune JE & Armstrong DT, 1978; Young JM & McNeilly AS, 2010), so a potential lack of androgens may compromise female reproduction as well.

Another drug of great importance to the study of inhibition of the reproductive potential of females is 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD). VCD is a chemic compound produced as a metabolite of vinylcyclohexene (VCH). Both are produced in industrial reactions of production of polymers, flame retardants, resins and plasticizers and constitute occupational risk chemicals (Hernández-Ochoa I *et al.*, 2010). VCD is known to cause selective loss of primordial and primary ovarian follicles, through direct inhibition of autophosphorylation of c-kit survival receptor, located in the plasmatic membrane of oocytes (Brooks HL *et al.*, 2016;

Mark-Kappeler CJ *et al.*, 2011). Knowing that ovulation success is dependent of the right progression throughout the stages of folliculogenesis (primordial follicle, primary follicle, secondary or pre-antral follicle, tertiary or antral follicle and graafian follicle) and that females are born with a limited primordial follicles number, compounds like VCD may result in ovarian failure and early onset of menopause (Hernández-Ochoa I *et al.*, 2010; Hoyer PB *et al.*, 2001). In fact, this drug is currently used as an inductor of menopause in rats to produce models for menopause studies (Brooks HL *et al.*, 2016).

Due to the fact that EDS is orally active (Jackson H & Craig AW, 1969), we propose the addition of this compound, isolated or associated to VCD, in rodents chow to test this route and these drugs effects over female reproduction and if they have potential as an alternative to current populational control methods.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Adult female Wistar rats (90 days old) were obtained from the Central Biotherium, São Paulo State University (UNESP), *campus* Botucatu/SP, Brazil, and maintained under controlled conditions (12h of light/12h of darkness; average temperature of 23 °C) on the Small Mammal Biotherium of the Structural and Functional Biology Department, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, with food and water *ad libitum*. The animals were kept according to the Ethical Principles for Animal Experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation. The project was filed under protocol number 5658071220 with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the UNESP Institute of Biosciences, in Botucatu. *Due to covid-19 pandemics, delays occurred and the experiment only started with the arrival of the drugs. By then, the female Wistar rats were 114 days old and still viable adult rats.*

2.2. Experimental Design

The rats were divided in 7 experimental groups, each composed by 9 or 10 animals. The first group was called Control (n=10 rats) and received rodents chow with powdered bacon and vehicles (Control chow). The process of confection of the chows will be described in the next item. EDS G1 (n=9 rats) and EDS G2 (n=9 rats) received common rodents chow and ethane dimethanesufonate (EDS) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) orally (gavage). The first, EDS G1, received a dose 1 (doses not informed due to current patent request) of the compound and the second, EDS G2, received a dose 2, which is the double of the dose 1. These doses of EDS were chosen taking in consideration previous unpublished work of our Laboratory in which were observed reproductive effects of the drug in male rats. The next group, EDS R (n=10 rats), received EDS mixed in rodents chow with powdered bacon and vehicles (EDS chow). Group VCD (n=10 rats) received 4-vinycyclohexene diepoxide (VCD) diluted in corn oil orally, via gavage, in the dose 3 concentration. Group VCD R (n=10 rats) received this drug mixed with rodents chow, powdered bacon and vehicles (VCD chow). Finally, the last group, EDS + VCD (n=10 rats), received both drugs mixed in the chow (EDS + VCD chow).

The female Wistar rats received treatment daily for 30 days, an adaptation of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) protocol. OECD determines that for assessment of reproductive toxicity in female rats they should be treated for a period of at least two weeks, which allows the coverage of 3 or 4 estrous cycles (OECD, 2018). However, with the intent to cover a larger number of estrous cycles, we treated the female rats for 30 days. Daily, chow consumption and body weight were monitored (Figure 1). When the treatment ended, we started to monitor the estrous cyclicity of the rats for a 15 days period. Next, when the rats were in the estrous phase of the cycle, we evaluated the sexual behavior, as described below. Then, the rats that already were evaluated for sexual behavior were euthanized in the estrous phase. Finally, we conducted the immunohistochemistry assays, morphological analyses and hormonal dosages.

2.3. Chows Preparation

In this study we confectioned 4 types of rodents chow. For all of them we used *Presence Ratos e Camundongos* chow as a base (05.7883, Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda., Paulínia, São Paulo, Brazil) and powdered bacon (Empório Ideal, Botucatu, São Paulo, Brazil) to flavor the chow, making it more palatable. The chows were produced in collaboration with

the Experimental Research Facility (UNIPEX) of the Medical School (FMB) of the São Paulo State University (UNESP).

The process of confection of the chows begins by grinding with an electric grinder the chow we used as a base. Then, we added filtered water to the formed powder. Next, we mixed powdered bacon (25mg/Kg of chow), a mean of flavoring the chow and making it more palatable (as described in previous chow administered EDS studies of our Laboratory), and the drugs and vehicles of each type of chow (that was given to a specific experimental group). For the Control group, we created the Control Chow – that did not carry any type of drug, only the base chow, powdered bacon and the vehicles DMSO and corn oil. For the EDS R group, we created the EDS Chow – which was composed by base chow, powdered bacon, EDS diluted in DMSO and corn oil. To the VCD R group, the VCD Chow – which was composed by base chow, powdered bacon, VCD diluted in corn oil and the EDS vehicle DMSO. Finally, for the EDS + VCD group, the EDS + VCD chow – which was composed by base chow, powdered bacon, EDS diluted in DMSO and VCD diluted in corn oil.

Base chow, bacon powder, vehicles and drugs (if the case) were mixed in an automatic mixer. Then, the chows were shaped into pellets with a pelletizer and were left to dry for 2 days in a dryer. After this period, they were packed, labeled and were considered ready to use. Chow was maintained in the fridge at 4°C until the day of use.

2.4. Estrous Cycle Evaluation

When the treatment ended, all female Wistar rats were evaluated daily in regards of the cellular composition of the vaginal fluid collected, for a period of 15 consecutive days. The fluid was collected with an automatic micropipette. Delicately, we introduced 10µL of saline solution in the rat vagina, subsequently collecting the liquid, which was placed in a histological slide and analyzed under light microscopy (Laws SC *et al.*, 2000). Based on the predominance of cellular types, we determined in which phase of the estrous cycle the rat was. The phases are:

proestrus, estrous, metestrus and diestrus. The proestrus is characterized by predominancy of nucleated epithelial cells. Estrous, by the predominancy of keratinized epithelial cells. Metestrus is composed by a mix of the three types of cells (nucleated epithelial cells, keratinized epithelial cells and leucocytes) in relatively equal proportions. Diestrus, by the predominancy of leucocytes (Marcondes FK *et al.*, 2002). This procedure was used to determine the number of cycles, the length of the estrous cycle and of each of its phases along with its frequency.

2.5. Sexual Behavior Evaluation

After the evaluation of the estrous cycle, the females went through sexual behavior evaluation. After the confirmation of the sexually receptive phases by analysis under light microscopy of the vaginal smear and certifying the presence of cellular types consistent with end of proestrus or estrus phase, the female Wistar rats were placed in male rat's cages, one female in each cage with one sexually experient male rat. The male rats were allowed to perform 10 mounts. We monitored in how many of them the female rats performed lordosis, a typical female rat sexual behavior in which the female exposes the vagina in a dorsiflexion of the vertebral column (Maeda KI *et al.*, 2000). The number of lordosis was recorded and then we generated a lordosis coefficient for each rat, determined by the formula: (number of lordosis/10 mounts x 100) (Beach, 1976). This evaluation took place in the dark phase of the photoperiod and the lordosis were observed with the help of red lights.

2.6. Euthanasia and collection of biological material

It was standardized that the euthanasia of the female rats would occur in the estrous phase. When the analysis of the sexual behavior ended, the rats that entered in the estrous phase, after weighting, went through euthanasia by asphyxia in carbon dioxide, followed by decapitation. The blood from the cervical vases was collected for future hormonal dosage. Then, the internal organs which in here we called "vital" – liver, kidneys, adrenal glands, heart, lungs, brain,

pituitary gland and thyroids – and reproductive organs (ovaries and uterus) were removed, had the fat trimmed, were weighted, kept in Modified Davidson's Fluid (MDF) fixator for 24 hours and stored, after this period, in alcohol 70% until the confection of the histological slides.

2.7. Ovaries and Uteri Histomorphometry

After the harvest, the ovaries and uterus were immersed in Modified Davidson's Fluid (MDF), stored in alcohol 70%, histologically processed and included in Paraplast®. Three sections with 5µm of thickness were made of each organ, placed in histological slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E). During the histomorphometrical analyses of the ovaries, the corpora lutea and the ovarian follicles were counted. The ovarian follicles were also classified accordingly with the different stages of development, as described by Talsness CE *et al.*, 2005 and Guerra MT *et al.*, 2014. The uterus was evaluated by measuring the height of different regions: perimetrium, myometrium, endometrium, luminal epithelia and glandular epithelia, as described by E Silva PV *et al.*, 2016. Histological analyses were performed under light microscopy, with softwares Leica LASCore, version 4.12.0 and Image J 1.48.

2.8. Immunohistochemistry: Proliferating Cellular Nuclear Antigen (PCNA) and Anti-Mullerian Hormone (AMH)

Ovaries and uteri were submitted to processing and were included in Paraplast. Sections of 5µm of thickness were made and placed in histological slides to posterior immunostaining. The immunohistochemistry assays were performed as described by (Barros JWF *et al.*, 2018, 2020), with modifications. The slides were deparaffinized with xylol baths and hydrated with alcohol in crescent concentrations. After that, the slides were immersed in phosphate buffer (PBS, pH 7.4) and went through antigenic recovery, which was performed by immersing the slides in citrate buffer (pH 6.0) and heating it in the microwave oven for 20 minutes (10 minutes in full potency, 10 minutes in 70% potency). After some time cooling in room temperature and

washing in PBS twice, endogenous peroxidase was blocked by incubating the slides in hydrogen peroxide solution for 25 minutes. After 2 more baths with PBS, the next step was the unspecific blockade, that went thru by immersing the slides in Bovine Serum Albumine (BSA) 3% solution made with PBS for 30 minutes. The slides were finally incubated overnight with the primary anti-PCNA monoclonal antibody (PCNA PC10: sc-56, mouse monoclonal IgG₁, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) in 1:100 concentration or anti-MIS primary monoclonal antibody (MIS B-11: sc-166752, mouse monoclonal IgG₁, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) in 1:100 concentration. The next step was to wash the slides multiple times with PBS and incubate with secondary antibody (Goat Anti-Mouse peroxidase-labeled IgG, Catalog No. 474-1806, KPL Antibody) in 1:200 concentration for 90 minutes at 37°C in an incubator. After washing multiple times with PBS, the slides were submitted to DAB (diaminobenzidine, associated with hydrogen peroxide) revelation, for 5 (PCNA) or 10 (AMH) minutes. The reactions were stopped by distilled water, the markings were checked in the light microscope and counterstained with hematoxylin. The sections were dehydrated with alcohol (increasing concentrations) and were immerse in xylol. After covering the slides with coverslips and a period for drying, the analyses took place. They were performed under light microscopy with Leica LAS CORE software, version 4.12.0.

2.9. Immunohistochemistry Evaluation

PCNA and AMH were analyzed in both quantitative and qualitative ways. For quantitative evaluation, the stained ovarian follicles were counted and classified as primordial, primary, secondary, tertiary or atretic. According to the total of follicles marked, the percentual relative to each class of follicles was generated. Simultaneously, stained follicles were counted as marked and unstained follicles were counted as unmarked. Regarding marked and unmarked follicles, the percentage of follicles stained within each class of follicles was also calculated (for AMH evaluation). Qualitative evaluation was performed by assessing the immunostaining

intensity as “absent” (degree 0), “weak” (degree 1), “moderate” (degree 2) or “strong” (degree 3).

2.10. Hormonal Dosages

Blood samples were collected by rupture of cervical vases, then centrifuged at 2500rpm for 10 minutes at 4°C to obtain the serum. It was stored in Eppendorf tubes and frozen at -20°C until the analyses. Serum levels of FSH and LH were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with FineTest®’s ELISA kits: Rat FSH (Follicle Stimulating Hormone) and Rat LH (Luteinizing Hormone). All samples were analyzed in the same assay to avoid inter-assay variability.

2.11. Statistical Analysis

The results were evaluated by one-way ANOVA followed by Dunnett’s test, for parametric data and Kruskal-Wallis followed by Dunn’s test, for non-parametric data. Data derived from qualitative analyses of proportions were analyzed by Fisher’s exact test. Differences were considered significant when $p \leq 0,05$. Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism (version 8.0).

3. Results

Evaluation of the daily feed intake showed significant difference between groups treated with EDS (EDS G1, EDS G2, EDS R and EDS + VCD) and the control group (Figure 2). It was observed a decrease in consumption of feed in day 7 between the EDS G1 group and control group (statistical difference represented by the letter a), in days 1, 2, 7, 12, 15, 16, 17 between EDS G2 and control (represented by letter b), in days 1, 2, 3, 4, 7, 12 and 27 between EDS R and control (represented by letter c) and in days 12, 22, 24 and 27, between groups EDS+VCD and control.

There was no significant body weight difference among the treated groups and the control groups (Figure 3), although there were differences in body weight gain. In the first two weeks, all groups treated with EDS had significant decreases in weight gain compared with the control group (Figure 4). In weeks 3 and 4, only groups EDS G2, EDS R and EDS + VCD, presented significant decrease in body weight gain. Nonetheless, when evaluated the difference between the final weight and the initial weight, resulting in the final body weight gain, only group EDS G2 was statistically decreased.

The absolute organ weights were comparable among the groups (Table 1). However, when the relative organ weights were calculated (Table 2), liver and pituitary gland were different. Liver relative weight was increased in the EDS G1 group, when compared with control group. The same happened with pituitary gland weight, which was increased in animals from EDS + VCD group, when compared with control animals.

There were no observed significant differences between number of cycles, length of cycles or frequency of each of the estrous cycle phases (Table 3). However, it was noted that some rats had long estrus phases, which lasted more than 3 days. When the proportion of rats that had at least one estrus phase that lasted more than 3 consecutive days were analyzed by Fisher's exact test and statistical differences were found. The EDS G2 group had 11% of the rats (n=1) with more than 3 days of consecutive estrous; The EDS R group had 30% (n=3) of rats with prolonged estrous and VCD GAV had 10% (n=1).

Sexual behavior assessment showed significant differences between lordosis coefficients of groups EDS G1 and VCD R, when compared to the control group (Figure 5A). It was observed that many rats from treated groups were not fully receptive to the male mount. The proportions of rats with lordosis coefficients less than 80% (< 80%) were evaluated (Figure 5B) and significant differences were verified. Rats from groups: EDS G1 ($p < 0,001$), EDS G2, EDS R, VCD R and EDS + VCD were significantly different from the control group, with bigger proportions of rats that had lordosis coefficients less than 80%.

There were no significant differences between the groups when the histomorphometry of the ovaries (ovarian follicles count) was evaluated (Figure 6), although a presence of large ovarian cysts was noted in rats from VCD GAV and VCD R group. The uterine histomorphometry assessment showed smaller glandular epithelium for EDS R group, when compared to the control group (Figure 7).

PCNA quantitative analysis (Figure 8) indicated that, although there were no statistical differences between the percentage from the total of follicles stained belonging to each class (Figure 9-A), the VCD GAV group had a smaller percentage of total marked follicles when compared to the control group (Figure 9-B). When analyzing the PCNA staining in a qualitative way (Figure 9-C) were not observed significant differences regarding degree of staining although it is important to mention that one rat from VCD GAV group showed no staining of any follicle.

AMH staining analysis (Figure 10) indicated no differences in the percentage from the total of follicles stained belonging to each class either (Figure 11-A). However, both the groups EDS R and VCD GAV showed a smaller percentage of total stained follicles, when compared to control group (Figure 11-B). In fact, one rat of EDS R group presented no AMH staining in any ovarian follicle. The VCD GAV group and EDS G2 group also presented a smaller percentage of marked tertiary follicles (Figure 11-C). VCD GAV group, still, presented less intensity of AMH staining of secondary and tertiary follicles, when compared to control group (Figure 12).

Finally, serum hormonal dosages of FSH and LH serum levels were not significantly different, although four out of six rats from VCD GAV group showed higher FSH levels, indicating a tendency of higher levels of VCD for this group (Figure 13). A summary of the results can be found in Table 4.

4. Discussion

Ethane Dimethanesulfonate is a drug of choice in male reproductive studies. This is mainly due to the fact that it constitutes a way of compromising androgen production without surgical intervention. In fact, that technique has even more applications due the reversibility of this process, by interruption of administration of the drug and allowing regeneration of Leydig cells or by administration of androgens (Chen H *et al.*, 2015; Heng K *et al.*, 2012; Jackson H *et al.*, 1973; Morris ID & McCluckie JA, 1979).

When it comes to female reproduction, little is known about this compound. As EDS effects in males are so clear, available articles found in literature commonly have males as object of study. Rat dams are also treated with EDS with intention to investigate the effects of EDS in male puppies (Tarka-Leeds DK *et al.*, 2003). It was found only one published study that intended to investigate effects of EDS in both male and female puppies treated during the suckling period and, in this case, delayed female puberty onset was observed (Smart JL *et al.*, 1990). Therefore, we intended to address EDS effects in adult female rats, along with its oral administration, as well as its potential as a chemical castration compound to be applied in rodents populational control.

In the present study, it was observed a reduction in chow consumption in rats from experimental groups containing EDS. This reduction may have occurred as a result of loss of appetite due to lower levels of leptin, which may have occurred. This loss is believed to happen because there is a correlation between lower levels of testosterone and higher levels of leptin (Barbieri RL, 2014; Behre HM *et al.*, 1997). EDS may have caused an increase in leptin levels by reducing circulating androgens levels, diminishing appetite. This difference occurred in specific days and was more common in the first half of the treatment period than in the last half, therefore there are signs that this is a transient effect as the rats normalized the consumption, maybe due to adaptation to the compound.

This reduction in feed intake did not reflect in significant total body weight changes, although rats from groups treated with EDS did not gain weight. In fact, they lost a small amount of weight. From the third to the fourth week, this loss starts to show evidence of being a transient effect as rats treated with smaller doses of this compound reduced weight loss. Rats from EDS G1 group didn't lose weight and rats from EDS R group lost less weight. In the final assessment, when evaluating the final weight in comparison with initial weight, only rats from EDS G2 group, which received a higher dose of this compound, lost weight.

Increased relative weights of liver from EDS G1 may indicate that this drug may have had some hepatotoxicity effects maybe as a result of adaptative processes such as hypertrophy and/or hyperplasia or increases in fat, water or glycogen accumulation, that generated an increase in weight (Cattley RC & Cullen JM, 2013; Hall AP *et al.*, 2012). Pituitary glands from EDS+VCD group also appear to be affected by the treatment with these drugs, showing higher relative weights, when compared to control group, maybe due to hypertrophy or hyperplasia of the cells, in an attempt to increase gonadotrophin secretion to compensate a potential androgen decrease and stimulate androgen production.

EDS also showed signs of impact in female physiology. EDS G2, EDS R (and VCD GAV group) showed a higher proportion of persisting estrus, when compared with control group, which indicates that female physiology was affected. Persisting estrus is a sign of irregularity of the cycle associated with subfertility (Cruz G *et al.*, 2017). In fact, two rats from EDS groups (one from EDS R and one from EDS G2) presented more than 10 consecutive days of estrus, indicating that these rats were extensively affected by the drug. EDS presented yet another sign of reproductive physiological disruption: rats from groups EDS G1 and EDS+VCD presented lower lordosis coefficient and all EDS treated groups had significant proportions (result also seen in VCD R rats), when compared to control, of rats with lordosis coefficients below 80%. This data indicates that the females in the end of proestrus or in estrus, the period of the cycle that they are considered sexually receptive (Maeda KI *et al.*, 2000), were not receptive,

corroborating with the hypothesis that reproductive physiology was compromised. Both estrous cycle and sexual behavior are highly dependent of androgens/estrogens stimuli (Hutchinson, 1995; Jennings KJ & de Lecea L, 2020; Maeda *et al.*, 2000), therefore a potential lack of androgens induced by EDS may have affected normal reproductive physiology.

Although VCD produces loss in primordial and primary follicles (Figure 14) numbers when administered intraperitoneally or subcutaneously (Brooks HL *et al.*, 2016; Carolino ROG *et al.*, 2019; Özel F *et al.*, 2020), in this study, VCD administrated orally and in a lower concentration, didn't result in significant losses of smaller follicles. This effect was also observed in other orally administered studies. In one study, VCD was combined with triptolide, a drug that causes growing follicles depletion, to create liquid bate. No statistical significances were observed in primordial and primary follicles numbers between control and treated group as well (Siers SR *et al.*, 2017).

In other study, mice treated orally with VCD showed some difference in this number. Difference that was mostly seen in higher doses of the compound (dose-dependent) (Hinds LA *et al.*, 2014), event that also happened in another study with rats treated with much higher doses (500mg/Kg) of the compound. However, in this study, these doses showed clear evidence, seen in all rats, of causing carcinogenicity of the stomach mucosal layer (Schmuki *et al.*, 2011). We believe that VCD administered orally and in smaller doses has some of its effects reduced by liver metabolism and first pass effect (Herman T & Santos C, 2021), resulting in smaller concentrations of the drug in the target site of action (ovaries). The presence of ovarian cysts, noted in this study in VCD treated rats, has already been reported by Naz RK, 2004. It seems to be the result of the depletion of ovarian follicles and higher FSH levels generated by this depletion.

In our quantitative analysis of PCNA, we expected to count primordial follicles using PCNA immunostaining (Picut CA *et al.*, 2008). However, it was noticed that primordial follicles were not marked by immunostaining or had very weak immunostaining. This was also

observed by Muskhelishvili L *et al.*, 2005. According to them, primordial follicles present lower levels of PCNA and, therefore, are hard to visualize. There is a technique called “Heat induced epitope retrieval” (HIER) that allows much more strong staining of primordial follicles. However, it uses a 6-fold higher concentration of primary antibody (Muskhelishvili L *et al.*, 2005) and, unfortunately, it was not possible to perform. So, we counted only follicles that were stained by PCNA.

VCD GAV treatment resulted in a smaller percentage of follicles, in general, immunostained with PCNA, which is a nuclear protein with important role in cell cycle regulation that can modulate growth factors and other growth stimuli by binding to cyclin D, another important cell cycle regulator (Oktay K *et al.*, 1995). This result, therefore, may indicate that granulosa cellular proliferation in these follicles was disrupted by VCD.

A smaller number of follicles, in general, was stained by Anti-Mullerian Hormone (AMH) immunostaining in VCD GAV group, as well as a smaller percentage of tertiary follicles. Weaker intensity of staining in secondary and tertiary follicles was also seen in AMH qualitative assessment for this group, result that corroborates with results obtained by other studies, in which VCD appear to have influenced negatively AMH expression (Carolino ROG *et al.*, 2019; Mark-Kappeler *et al.*, 2010). VCD GAV also showed a tendency of increase in FSH, as seen in other studies with VCD treated rats (intraperitoneally) (Mayer LP *et al.*, 2002). This result might be related to AMH lower levels, which relate to higher FSH levels (Visser JA *et al.*, 2006) and follicular damage.

EDS G2 also presented decreased percentage of tertiary follicles marked with AMH and EDS R showed significantly lower percentage of follicles, in general, marked by AMH, indicating that treatment with this drug may also have reduced AMH expression in ovarian follicles.

AMH, also known as Mullerian-Inhibiting Substance (MIS), is used as a marker of ovarian reserve. It is expressed in granulosa cells of some primary follicles, but specially by

secondary and small pre-antral (tertiary) follicles not destined to dominance, reflecting the remaining ovarian follicle pool (Huang J *et al.*, 2015; Stubbs SA *et al.*, 2005; Visser JA *et al.*, 2006). AMH appears to influence ovarian follicle's sensibility to FSH, inhibiting it. Follicles with lower AMH expression show lower threshold to FSH and higher sensibility to this gonadotrophin, allowing then to grow and go through ovulation in the next estrous cycle. This process may have a role in initial recruitment and selection for dominance (Henes M *et al.*, 2018; Huang J *et al.*, 2015; Stubbs SA *et al.*, 2005; Visser JA *et al.*, 2006). A reduction in AMH may also be a sign that the ovarian follicle pool is going to be exhausted in a faster than usual rate. Female rats with higher levels of serum AMH are associated with larger ovarian follicles pools and ovarian reserve (Visser JA *et al.*, 2006), therefore both drugs, EDS and VCD, by having negatively influenced AMH expression (EDS in a lower level), seem to impact ovarian reserve and show signs of faster exhaustion of follicular pool and, as AMH is also a marker for ovarian aging (de Vet A *et al.*, 2002), ovarian aging.

It is also known that, although in males AMH expression, that in immunohistochemistry staining is isolated to Sertoli cells in the testicles, has a negative correlation to androgen levels (lower testosterone, higher AMH expression) (Rey R *et al.*, 1993), in females this effect seems to be contrary. Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) present higher androgens levels and higher AMH levels than controls (Laven JS *et al.*, 2004; Mulders AG *et al.*, 2004; Wiweko B *et al.*, 2014). It is known that AMH inhibits aromatase enzyme action (Sacchi S *et al.*, 2016) and, therefore, prejudices androgens conversion to estrogens, which leads to higher levels of testosterone. So, in females, higher levels of testosterone may be associated with higher levels of AMH (Visser JA *et al.*, 2006). Lower levels of AMH, then, are associated with lower androgens levels, which may indicate that EDS was capable of reducing androgens concentrations in EDS R group, therefore, reducing AMH expression.

This result corroborates with the reduction in uterine glandular epithelium height seen in EDS R group. Glandular epithelium is highly sensitive to estrogens. These hormones are highly

mitogenic to uterine epithelium and rises in its concentrations are associated with proliferation of uterine glandular epithelium (Cooke PS *et al.*, 2013; Finn CA & Martin L, 1969). Therefore, a potential decrease in androgens caused by EDS may affect estrogens production, as androgens are precursors of estrogens (Fortune JE & Armstrong DT, 1978; Young JM & McNeilly AS, 2010) and impact glandular height by lowering it. Uterine glands are essential for pregnancy, secreting bioactive substances important for uterine receptivity and blastocyst implantation (Kelleher AM *et al.*, 2016), hence uterine glandular morphology deficits may interfere in glandular function, affecting uterine receptivity and implantation and compromising fertility (Cooke PS *et al.*, 2013).

Changes were not observed in LH measures between treated groups and control. This may be due to the fact that in the time that blood serum was collected, during euthanasia, the rats were already at least 15 days without receiving treatment with EDS, therefore serum hormonal levels may have returned to physiological levels. Another hypothesis is that EDS may compromise female reproductive physiology by impairing normal function of hormonal receptors, such as androgen receptors (AR). Although the role of the AR in female reproduction is still unclear, its abnormal expression, binding or function is linked to disruption in female reproduction. AR is expressed in females in the hypothalamus, pituitary and ovaries (in the oocyte, the granulosa and theca cells). Androgen Receptors Knockout (ARKO) female mice have defective folliculogenesis, developing premature ovarian failure and subfertility (Hu YC *et al.*, 2004; Sen A & Hammes SR, 2010; Shiina H *et al.*, 2006; Walters KA *et al.*, 2007).

Although our work has shown some evidence of EDS induced effects in female reproductive physiology, it was not possible to perform a fertility test at this time, which we think would help us understand if implantation was indeed compromised by lower uterine glands epithelium or if EDS could cause damage to fertility in general. Hormonal dosages of androgens and estrogens, would also be elucidative, although at the time being we could not perform these assays. The approach though the application of the compounds in the chow also

has its limiting points: When applied in the ambient, there is no way to determine the amount of chow, and of the compounds, the rats will consume. Effects observed in the wild rat could also differ from the ones observed in laboratory rats, which are typically more sensitive than wild ones. Still, many are its positive points.

In conclusion, EDS appear to affect rat female reproductive physiology, by inducing prolonged estrus and irregularity in estrous cycle, along with reducing sexual receptivity. It may also have impacted AMH reserves and uterine glandular epithelium and, subsequently, fertility, due to possible androgens deficits or impairment in androgens receptors expression. VCD, in this study, also caused prolonged estrous, negative effects in sexual behavior as well as deficits in AMH expression in the follicles and impairment in PCNA expressions in granulosa its cells proliferation. However, VCD ovarian availability may have been diminished by first pass effect. The association of the drugs appears to also have affected the pituitary gland along with the effects in sexual behavior. EDS seems to have potential as a candidate drug to chemical castration and rodents populational control agent and its isolated use mixed in the chow seems to be more effective in causing female reproductive tract disturbances than its alternative VCD association. However, EDS effects appear to be much more subtle in females than in males. New studies are encouraged to better understand EDS effects in females. We hope to contribute to the creation of a humanized, accessible and highly applicable rodent populational control method.

5. Declaration of Interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

6. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge José Eduardo Bozano, from the Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), for his excellent technical support; Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos, from the Experimental Research Facility (UNIPEX) of the Botucatu Medical Faculty (FMB), São Paulo State University (UNESP), for the collaboration with the chows confection; The FMB itself, for the disposition to collaboration; Dr. Janete Aparecida Anselmo Franci, for the VCD supply. They are also grateful to the Graduate Program in General and Applied Biology of the Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP); to Institute of Biosciences and UNESP, for the infrastructure and supplies; to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) [Grant numbers 88887.509943/2020-00 and 88887.625919/2021-00] and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [Grant numbers 312118/2017-1, 133089/2018-5 and 408173/2018-1] for the funding.

7. References

- Ashby J, Lefevre PA, 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/RTPH.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. https://journals.viamedica.pl/folia_histochemica_cytobiologica/article/view/4571
- Barbieri RL. (2014). The Endocrinology of the Menstrual Cycle. *Methods in Molecular Biology*, 1154, 145–169. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0659-8_7
- Barros JWF, Borges CS, Missassi G, Pacheco TL, & Kempinas WG. (2018). Impact of intrauterine exposure to betamethasone on the testes and epididymides of prepubertal rats. *Chemico-Biological Interactions*, 291, 202–211. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2018.06.030>
- Barros JWF, Tonon KS, Borges CS, Silva PV, Lozano AFQ, Pacheco TL, Anselmo-Franci JA, & Kempinas WG. (2020). Short- and long-term effects on reproductive parameters of female Wistar rats after exposure to rosuvastatin starting in pre-puberty. *Current Research in Toxicology*, 1, 149–160. <https://doi.org/10.1016/J.CRTOX.2020.11.002>
- Beach, F. A. (1976). Sexual Attractivity, Proceptivity, and Receptivity in Female Mammals. *HORMONES AND BEHAVIOR*, 7, 105–138.
- Behre HM, Simoni M, & Nieschlag E. (1997). Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clinical Endocrinology*, 47(2), 237–240. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2265.1997.2681067.X>
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, & Vinetz JM. (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)

- Brooks HL, Pollow DP, & Hoyer PB. (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>
- Carolino ROG, Barros PT, Kalil B, & Anselmo-Franci J. (2019). Endocrine profile of the VCD-induced perimenopausal model rat. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226874>
- Cattley RC, & Cullen JM. (2013). Liver and Gall Bladder. In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (pp. 1509–1566). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00045-5>
- 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>
- Cooke PS, Spencer TE, Bartol FF, & Hayashi K. (2013). Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 547. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAT031>
- 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0003898>
- Cruz G, Fernandois D, & Paredes AH. (2017). Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 153(2), R59–R68. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>
- de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, & Fauser BC. (2002). Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertility and Sterility*, 77(2), 357–362. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02993-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02993-4)

- Duron Q, Shiels AB, & 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 ALMB, & Orgebin-Crist MC. (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>
- E Silva PV, Silva RF, Borges CS, Cavariani MM, Francia CCA, Júnior FB, & Kempinas WG. (2016). Sexual differentiation and reproductive development of female rat offspring after paternal exposure to the anti-tumor pharmaceutical cisplatin. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 60, 112–122. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2016.02.005>
- Finn CA, & Martin L. (1969). HORMONE SECRETION DURING EARLY PREGNANCY IN THE MOUSE. *Journal of Endocrinology*, 45(1), 57–65. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.0450057>
- Fisher P, Campbell KJ, Howald GR, & Warburton B. (2019). Anticoagulant Rodenticides, Islands and Animal Welfare Accountancy. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/ANI9110919>
- Fortune JE, & Armstrong DT. (1978). Hormonal Control of 17 β -Estradiol Biosynthesis in Proestrous Rat Follicles: Estradiol Production by Isolated Theca Versus Granulosa. *Endocrinology*, 102(1), 227–235. <https://doi.org/10.1210/ENDO-102-1-227>
- Gravinatti ML, Barbosa CM, Soares RM, & Gregori F. (2020). Synanthropic rodents as virus reservoirs and transmitters. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0486-2019>
- Guerra MT, Silva RF, Luchiari HR, Sanabria M, & Kempinas WG. (2014). Perinatal Androgenic Exposure and Reproductive Health Effects Female Rat Offspring. *J Toxicol Environ Health A*, 77(7), 375–389. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.874881>
- Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, Harada T, Kaufmann W, Knippel A, Küttler K, Malarkey DE, Maronpot RR, Nishikawa A, Nolte T, Schulte A, Strauss V, & York MJ. (2012). Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes—Conclusions

- from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*, 40(7), 971–994. <https://doi.org/10.1177/0192623312448935>
- Henes M, Engler T, Taran FA, Brucker S, Rall K, Janz B, & Lawrenz B. (2018). Ovarian cyst removal influences ovarian reserve dependent on histology, size and type of operation. *Women's Health*, 14, 1–5. <https://doi.org/10.1177/1745506518778992>
- 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>
- Herman, T., & Santos C. (2021). *First Pass Effect*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31869143/>
- Hernández-Ochoa I, Paulose T, & Flaws JA. (2010). Ovarian Toxicology. In *Comprehensive Toxicology, Second Edition* (Vol. 11, pp. 381–398). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01123-4>
- Hinds, L. A., Henry, S., Sharma, S., Leung, L., Dyer, C., & Mayer, L. (2014). Effects of Oral Uptake of the Chemosterilant 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in Wild House Mice, *Mus domesticus*. *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference*, 26(26). <https://doi.org/10.5070/V426110589>
- Houlihan KE. (2017). A literature review on the welfare implications of gonadectomy of dogs. [Http://Dx.Doi.Org/10.2460/Javma.250.10.1155](http://Dx.Doi.Org/10.2460/Javma.250.10.1155), 250(10), 1155–1166. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.250.10.1155>
- Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, Thompson KE, & Sipes IG. (2001). Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 91–99. <https://doi.org/10.1080/019262301301418892>
- Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao HT, Tsai MY, & Chang C. (2004). Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11209–11214. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0404372101>
- Huang J, Wang X, Li Z, Ma R, & Xiao W. (2015). Effects of GnRH agonists on the expression of developmental follicular anti-mullerian hormone in varying follicular stages in cyclic

- mice in vivo. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4305–4313. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3993>
- Hutchinson, K. A. (1995). Androgens and sexuality. *The American Journal of Medicine*, 98(1), S111–S115. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)80068-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)80068-0)
- Jackson H, & Craig AW. (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>
- Jennings KJ, & de Lecea L. (2020). Mini-Review Neural and Hormonal Control of Sexual Behavior. *Endocrinology*, 161(10), 1–13. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa150>
- Kelleher AM, Burns GW, Behura S, Wu G, & Spencer TE. (2016). Uterine glands impact uterine receptivity, luminal fluid homeostasis and blastocyst implantation. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep38078>
- Khalil H, Santana R, Oliveira D, PalmaF, Lustosa R, EyreMT, Carvalho-Pereira T, Reis MG, Ko AI, Diggle PJ, Lopez YA, 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>
- Kim JM, Luo L, & Zirkin BR. (2000). Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology*, 141(5), 1846–1853. <https://doi.org/10.1210/ENDO.141.5.7444>
- Klinefelter GR, Laskey JW, Perreault SD, Ferrell J, Jeffay S, Suarez J, & Roberts N. (1994). The Ethane Dimethanesulfonate-Induced Decrease in the Fertilizing Ability of Cauda Epididymal Sperm Is Independent of the Testis. *Journal of Andrology*, 15(4), 318–327. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.1994.TB00458.X>
- Klinefelter GR, Laskey JW, Roberts NR, Slott V, & Suarez JD. (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)

- Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, & Fauser BC. (2004). Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(1), 318–323. <https://doi.org/10.1210/JC.2003-030932>
- Laws SC, Ferrell JM, Stoker TE, Schmid J, & Cooper RL. (2000). The effects of atrazine on female wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 58(2), 366–376. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/58.2.366>
- Le Turnier P, & Epelboin L. (2019). Mise au point sur la leptospirose. *La Revue de Médecine 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0235218>
- Maeda KI, Ohkura S, & Tsukamura H. (2000). Physiology of Reproduction. *The Laboratory Rat*, 145–176. <https://doi.org/10.1016/B978-012426400-7.50048-0>
- Marcondes FK, Bianchi FJ, & Tanno AP. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 62(4A), 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
- Mark-Kappeler, C. J., Sen, N., Keating, A. F., Sipes, I. G., & Hoyer, P. B. (2010). Distribution and responsiveness of rat anti-Müllerian hormone during ovarian development and VCD-induced ovotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.024>
- Mark-Kappeler CJ, sen N, Lukefahr A, McKee L, Sipes IG, Konhilas J, & Hoyer PB. (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 CE, 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>
- Mason G, & Littin KE. (2003). *THE HUMANENESS OF RODENT PEST CONTROL*.
- Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG, & Hoyer PB. (2002). Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*, 16(6), 775–781. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00048-5)
- Morris ID, & McCluckie JA. (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 ID, Phillips DM, & Bardin CW. (1986). Ethylene dimethanesulfonate destroys Leydig cells in the rat testis. *Endocrinology*, 118(2), 709–719. <https://doi.org/10.1210/ENDO-118-2-709>
- Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, de Jong FH, Themmen AP, & Fauser BC. (2004). Changes in anti-Müllerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(9), 2036–2042. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEH373>
- Muskhelishvili L, Wingard SK, & Latendresse JR. (2005). Proliferating Cell Nuclear Antigen—A Marker for Ovarian Follicle Counts. *Toxicologic Pathology*, 33(3), 365–368. <https://doi.org/10.1080/01926230590930164>
- Naz R.K. (2004). *Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems*. CRC Press.
- Naing C, Reid S, Aye SN, Htet NT, & Ambu S. (2019). Risk factors for human leptospirosis following flooding: A meta-analysis of observational studies. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0217643>
- Nian Y, Allen P, Harrison SM, & Kerry JP. (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>
- OECD (2018), *Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185371-en>.
- Oktay K, Schenken RS, & Nelson JF. (1995). Proliferating Cell Nuclear Antigen Marks the Initiation of Follicular Growth in the Rat'. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 53, 295–301. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/53/2/295/2761645>
- Özel F, Kiray M, Göker A, Aydemir S, & Mıçılı SC. (2020). Protective effect of alpha lipoic acid on 4-vinylcyclohexene diepoxide induced primary ovarian failure in female rats. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(2), 293–300. <https://doi.org/10.1016/J.TJOG.2020.01.020>
- Paranzini CS, Sousa AK, Cardoso GS, Perencin FM, Trautwein LGC, Bracarense APFRL, & Martins MIM. (2018). Effects of chemical castration using 20% CaCl₂ 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>
- Picut CA, Swanson CL, Scully KL, Roseman VC, Parker RF, & Remick AK. (2008). Ovarian follicle counts using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and semi-automated image analysis in rats. *Toxicologic Pathology*, 36(5), 674–679. <https://doi.org/10.1177/0192623308317428>
- Potter SJ, Kumar DL, & 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
- Rahman T, Sobur A, Islam S, Ievy D, Hossain J, Zowalaty MEE, Rahman AMMT, & Ashour HM. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9), 1–34. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091405>
- Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL, & Josso N. (1993). Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal

- and precocious pubertal development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77(5), 1220–1226. <https://doi.org/10.1210/JCEM.77.5.8077315>
- Richards JS, 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 JS, Ren YA, Candelaria N, Adams JE, & 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>
- Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, Marsella T, Tagliasacchi D, Maggi E, Argento C, Tirelli A, Giulini S, & la Marca A. (2016). The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(1), 95. <https://doi.org/10.1007/S10815-015-0615-Y>
- Schmuki, S., Redding, C., Collins, M., Chase, K., Skiles, J., Pyzyna, B., Blome, A., Bush, M., Blenck, C., Christensen, M., Bennett, A., Allred, R., Dyer, C., & Mayer, L. (2011). Oral Exposure to 4-Vinylcyclohexene Diepoxide Induces Follicular Depletion Without Systemic Pathology in the Rat a Year after Dosing. *Biology of Reproduction*, 85(Suppl_1), 285. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/85.s1.285>
- sen A, & Hammes SR. (2010). Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(7), 1393–1403. <https://doi.org/10.1210/ME.2010-0006>
- Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, YoshikawaH, & Kato S. (2006). Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), 224–229. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506736102>

- Siers SR, Pyzyna BR, Mayer L, Dyer C, Leinbach IL, Sugihara RT, & Witmer GW. (2017). Evaluation of ContraPest fertility control on black rats Laboratory Evaluation of the Effectiveness of the Fertility Control Bait ContraPest ® on Wild-captured Black Rats (*Rattus rattus*). *Unpublished Report QA-2570. USDA, APHIS, WS, National Wildlife Research Center. Hilo, HI.*
https://www.researchgate.net/publication/323846449_Evaluation_of_ContraPest_fertility_control_on_black_rats_Laboratory_Evaluation_of_the_Effectiveness_of_the_Fertility_Control_Bait_ContraPest_R_on_Wild-captured_Black_Rats_Rattus_rattus
- Smart JL, Massey RF, Lendon RG, & Morris ID. (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*, 28(2), 121–128.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(90\)90019-J](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90019-J)
- Stubbs SA, Hardy K, da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Themmen APN, Visser JA, Groome NP, & Franks S. (2005). Anti-müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(10), 5536–5543.
<https://doi.org/10.1210/jc.2005-0907>
- Talsness CE, Shakibaei M, Kuriyama SN, Grande SW, Sterner-Kock A, Schnitker P, de Souza C, Grote K, & Chahoud I. (2005). Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicology Letters*, 157(3), 189–202. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2005.02.001>
- Tarka-Leeds DK, Suarez JD, Roberts NL, Rogers JM, Hardy MF, & Klinefelter GR. (2003). Gestational Exposure to Ethane Dimethanesulfonate Permanently Alters Reproductive Competence in the CD-1 Mouse. *Biology of Reproduction*, 69(3), 959–967.
<https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.103.017343>
- Taylor MF, de Boer-Brouwer M, Woolveridge I, Teerds KJ, & Morris ID. (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>

- U.S. E.P. Agency. (2011). *Standard Evaluation Procedure (SEP) ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING PROGRAM*.
- Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, & Themmen APN. (2006). Anti-Müllerian hormone: A new marker for ovarian function. In *Reproduction* (Vol. 131, Issue 1, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1530/rep.1.00529>
- Walters KA, Allan CM, Jimenez M, Lim PR, Davey RA, Zajac JD, Illingworth P, & Handelsman DJ. (2007). Female mice haploinsufficient for an inactivated androgen receptor (AR) exhibit age-dependent defects that resemble the AR null phenotype of dysfunctional late follicle development, ovulation, and fertility. *Endocrinology*, 148(8), 3674–3684. <https://doi.org/10.1210/EN.2007-0248>
- Wiweko B, Maidarti M, Priangga MD, Shafira N, Fernando D, Sumapraja K, Natadisastra M, & Hestiantoro A. (2014). Anti-mullerian hormone as a diagnostic and prognostic tool for PCOS patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(10), 1311. <https://doi.org/10.1007/S10815-014-0300-6>
- Yan C, Liang LJ, Zhang BB, lou ZL, Zhang HF, Shen X, Wu YQ, Wang ZM, Tang RX, Fu LL, & Zheng KY. (2014). Prevalence and genotyping of *Toxoplasma gondii* in naturally-infected synanthropic rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*) in eastern China. *Parasites & Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0591-6>
- Young JM, & McNeilly AS. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(4), 489–504. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0094>

Table 1. Absolute Organs Weights (mg)

	Control	EDS G1	EDS G2	EDS R	VCD GAV	VCD R	EDS+VCD
Brain	1965.18 ± 20.05	1913.45 ± 31.53	1932.29 ± 23.48	1943.98 ± 12.55	1995.33 ± 27.72	1955.65 ± 19.88	1930.47 ± 20.92
Pituitary	14.03 ± 0.41	12.65 ± 1.34	13.76 ± 1.10	15 ± 0.77	14.95 ± 0.85	14.61 ± 0.91	15.4 ± 0.82
Thyroids	17.2 ± 1.04	20.54 ± 0.84	19.11 ± 1.39	18.27 ± 1.04	19.77 ± 1.62	20.25 ± 2.09	19.82 ± 1.12
Heart	1004 ± 45.62	1070 ± 50.61	1002 ± 29.4	952.4 ± 22.55	1061 ± 37.89	1050 ± 37.06	959.5 ± 24.98
Lungs	1478 ± 78.74	1444 ± 50.6	1384 ± 35.69	1412 ± 54.44	1561 ± 73.21	1546 ± 95.56	1502 ± 72.35
Liver	8970 ± 354.7	10067 ± 361.7	9086 ± 177.2	8928 ± 283.6	8714 ± 342.8	8532 ± 255.1	9129 ± 390.6
Adrenal							
G.	89.59 ± 5.02	92.36 ± 4.83	78.94 ± 4.21	88.24 ± 3.04	88.13 ± 4.51	90.6 ± 4.24	85.55 ± 3.94
Kidneys	2052 ± 69.64	2166 ± 79.16	2078 ± 69.45	2072 ± 62.35	2033 ± 76.06	2044 ± 58.21	2106 ± 66.85
Ovaries	72.97 ± 4.30	72.16 ± 4.67	63.92 ± 3.57	66.23 ± 2.82	71.87 ± 3.17	75.75 ± 3.36	72.75 ± 4.58
Uterus	587.3 ± 38.67	498.3 ± 35.5	549.5 ± 39.56	553 ± 50.73	525.9 ± 40.37	559.6 ± 38.37	592.6 ± 55.21

Results expressed by mean ± S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test

Table 2. Relative Organs Weights (mg/100g body weight)

	Control	EDS G1	EDS G2	EDS R	VCD GAV	VCD R	EDS+VCD
Brain	699.3 (668.3 - 740.10)	704.9 (700.9 - 767.5)	726.9 (671 - 770.8)	710.4 (694.6 - 739.5)	739.4 (706.6 - 757)	722.6 (675.9 - 759.6)	728.5 (665.7 - 744.3)
Pituitary	4.95 (4.66 - 5.43)	5.2 (3.64 - 5.40)	5.46 (4.38 - 5.71)	5.69 (5.31 - 6.28)	5.33 (4.72 - 6.31)	5.38 (4.44 - 5.90)	5.90 (5.47 - 6.32) *
Thyroids	6.18 (5.29 - 6.71)	7.40 (6.55 - 8.33)	7.17 (6.05 - 8.51)	6.77 (5.66 - 7.72)	7.45 (5.85 - 8.48)	6.96 (5.96 - 7.61)	7.13 (6.48 - 7.33)
Heart	360.4 (311.6 - 389.3)	393 (360.4 - 429.2)	381.8 (334.0 - 413.3)	351.9 (338.8 - 370.6)	385.4 (349.0 - 418.4)	380.5 (367.0 - 405.8)	357.7 (338.9 - 404.0)
Lungs	509.5 (460.3 - 555.5)	561.3 (476.1 - 614.4)	511.1 (488.4 - 545.3)	511.9 (485.1 - 551.7)	579.7 (503.6 - 636.4)	544.4 (486.6 - 656.4)	557.2 (511.5 - 601.6)
Liver	3261 (2945 - 3395)	3730 (3457 - 4079) *	3350 (3227 - 3717)	3337 (3156 - 3440)	3154 (2890 - 3325)	3194 (2969 - 3220)	3434 (3097 - 3532)
Adrenal G.	29.67 (28.00 - 36.27)	34.17 (31.07 - 41.19)	29.97 (27.54 - 32.52)	32.55 (29.13 - 35.42)	31.17 (27.59 - 36.49)	32.68 (29.17 - 37.3)	31.54 (27.9 - 35.35)
Kidneys	739.5 (668.9 - 763.2)	806 (749.7 - 877.8)	755.8 (699.1 - 884.7)	779.3 (730.1 - 805.1)	732.1 (683 - 796.1)	748.6 (729.4 - 768.9)	780.2 (742.8 - 804.2)
Ovaries	26.49 (23.17 - 29.62)	26.69 (23.28 - 34.12)	25.56 (18.95 - 27.79)	24.61 (22.76 - 26.75)	26.58 (24.52 - 28.62)	26.76 (23.42 - 31.53)	26.56 (24.56 - 29.05)
Uterus	203.8 (170.3 - 260.4)	196.6 (151.6 - 219.1)	207.2 (168.3 - 238.4)	181.4 (170.1 - 226.9)	178.6 (161.0 - 217.8)	200.6 (175 - 237.3)	193.5 (168.2 - 222.3)

Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn. * $p \leq 0.05$ compared to control group

Table 3. Estrous Cycle

	Control	EDS G1	EDS G2	EDS R	VCD GAV	VCD R	EDS+VCD
Number of cycles	3.00 (2.75 - 3.00)	3.00 (3.00 - 3.00)	3.00 (2.50 - 3.00)	3.00 (1.75 - 3.25)	2.00 (2.00 - 3.25)	3.00 (2.75 - 4.00)	3.00 (2.00 - 4.00)
Length of cycles (days)	3.83 (3.58 - 4.12)	3.66 (3.33 - 4.16)	4.00 (3.68 - 4.25)	4.00 (3.20 - 5.00)	4.41 (3.62 - 5.12)	3.66 (3.10 - 4.75)	4.00 (3.43 - 4.62)
Frequency (%)							
<i>Proestrus</i>	20.00 (13.33 - 26.67)	20.00 (13.33 - 26.67)	20.00 (13.33 - 23.33)	16.67 (6.66 - 20)	13.33 (11.67 - 28.33)	13.33 (6.66 - 26.67)	16.67 (11.67 - 26.67)
<i>Estrus</i>	40.00 (33.33 - 40.00)	33.30 (30.00 - 40.00)	40.00 (33.33 - 50.00)	40 (20.00 - 60.00)	36.67 (25.00 - 46.67)	40.00 (33.33 - 48.33)	40.00 (31.67 - 41.67)
<i>Metestrus</i>	20.00 (11.67 - 28.33)	20.00 (16.67 - 26.67)	20.00 (13.33 - 33.33)	20 (18.33 - 40.00)	23.33 (11.67 - 28.33)	26.67 (18.33 - 28.33)	26.67 (20.00 - 33.33)
<i>Diestrus</i>	20.00 (18.33 - 28.33)	26.67 (16.67 - 26.67)	20.00 (6.67 - 20.00)	20.00 (5.00 - 28.33)	23.33 (6.67 - 35.00)	20.00 (5.00 - 33.33)	16.67 (6.67 - 33.33)
<i>Persistent estrus (estrus > 3 days)[†]</i>	0	0	11 ***	30 ****	10 **	0	0

Results expressed by median ± interquartile range. Kruskal-Wallis' test followed by Dunn's test. [†]Proportions of persistent estrus (estrus > 3 days) analyzed by Fisher's exact test. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 compared to control group

Table 4. Summary of the results

	EDS G1	EDS G2	EDS R	VCD GAV	VCD R	EDS+VCD
Chow Consumption	↓	↓	↓	-	-	↓
Body Weights						
Body Weights	-	-	-	-	-	-
Body Weight Gain (Weak 1)	↓	↓	↓	-	-	↓
Body Weight Gain (Final)	-	↓	-	-	-	-
Organs Weights						
Absolute Body Weights	-	-	-	-	-	-
Relative Organ Weights	↑ Liver	-	-	-	-	↑ Pituitary
Estrous Cycle						
Length, Number and Frequency of phases	-	-	-	-	-	-
Persistent Estrus (Estrus >3 days)	-	✓	✓	✓	-	-
Sexual Behavior						
Lordosis Coefficient	↓	-	-	-	↓	-
Lordosis Coefficient <80%	✓	✓	✓	-	✓	✓
Histopatological Evaluation						
Ovaries	-	-	-	-	-	-
Uteri	-	-	↓ Glandular Epithelium	-	-	-
Immunohistochemical Evaluation						
PCNA quantitative	-	-	-	↓ number follicles stained	-	-
PCNA qualitative	-	-	-	-	-	-
AMH quantitative	-	-	↓ number follicles stained	↓ number follicles stained	-	-
AMH qualitative	-	-	-	↓staining	-	-

Results obtained comparing the experimental groups with the control group. Meaning of the symbols: ↓ = Decrease; ↑ = Increase; - = Absence of differences; ✓ = Presence of differences;

Figure Subtitles

Figure 1. Experimental Design. Schematic figure of the project's steps.

Figure 2. Evolution of daily intake of feed. Results expressed by mean $\pm$ SEM. ANOVA followed by Dunnett's test. Letters represent statistical differences, $p \leq 0.05$, between: a = control x EDS 25; b = control x EDS 50; c = control x EDS R; d = control x EDS + VCD.

Figure 3. A. Initial body weight. B. Daily body weight evolution (g). Results expressed by mean $\pm$ SEM. ANOVA followed by Dunnett's test. $p > 0.05$

Figure 4. Body weight gain per week. Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ when compared with the control group

Figure 5. Sexual behavior. (A) Evaluation represented by the lordosis coefficient (n=8-10/group). Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test $*p \leq 0.05$ when compared with the control group. (B) Proportions of rats with lordosis coefficient $< 80\%$. Fisher's exact test $*p \leq 0.05$, $***p < 0.001$ when compared with the control group.

Figure 6. Histological evaluation of the rats' ovaries in the estrous phase. (A-I) Different types of ovarian follicles – (A) Primordial follicle; (B) Primary follicle; (C) Primary Follicle becoming Secondary; (D-E) Secondary (Pre-Antral) Follicles; (F-G) Tertiary (Antral) Follicles; (H) Corpus Luteum; (I) Atretic Follicle; Black Arrows = Primordial Follicles; Yellow arrow = Mitotic division of the granulosa cells; Pink arrow = Pyknotic granulosa cells detaching from the granulosa layer of the atretic follicle. Arrow heads = Antral cavities and fluid retention. (J-

P) Representative histological aspect of ovaries. * = ovarian cysts. (Q) Histomorphometric analysis, represented by ovarian follicles count (n=8-10/group). Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. $p>0.05$

Figure 7. Histological evaluation of the rats' uteri in the estrous phase. (A-G) Representative histological aspect of uteri. (H-N) Representative histological aspect of the glandular epithelium. Black arrows = differences in glandular uterine epithelium. (O) Uterine histomorphometric analysis (n=8-10/group). Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. $*p\leq 0.05$

Figure 8. PCNA Immunohistochemistry. (A-G) Representative of the histological aspect of PCNA immunohistochemistry in the ovaries. (H-N) Representative aspect of the follicles stained by PCNA.

Figure 9. PCNA Immunohistochemistry evaluation. (A-B) Quantitative analysis (n=5/group). (A) Percentage of the total of follicles marked belonging to each class of follicle (B) Percentage of follicles marked and unmarked by PCNA. (C) PCNA qualitative analysis by staining degree, described by "absent" (0), "weak" (1), "moderate" (2) or "strong" (3) (n=5/group). Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. $*p\leq 0.05$

Figure 10. AMH Immunohistochemistry. (A-G) Representative of the histological aspect of AMH immunohistochemistry in the ovaries. (H-N) Representative aspect of the follicles stained by AMH.

Figure 11. Quantitative analysis of AMH Immunohistochemistry (n=5/group). (A) Percentage of the total of follicles marked belonging to each class of follicle. (B) Percentage of follicles

marked and unmarked by AMH. (C) Percentage of follicles in each class marked by AMH. Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$

Figure 12. Qualitative analysis of AMH Immunohistochemistry (n=5/group). (A-H) Classification of follicles by staining degree. (A-B) Follicles considered unstained (Absent staining or Degree 0). (C-D) Follicles considered weakly stained (Weak staining or Degree 1). (E-F) Follicles considered moderately stained (Moderate staining or Degree 2). (G-H) Follicles considered strongly stained (Strong staining or Degree 3). (I) AMH qualitative analysis by staining degree, described by “absent” (0), “weak” (1), “moderate” (2) or “strong” (3). Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 13. Serum levels of FSH (n=6/group) and LH (n=8/group) of the female rats during estrous phase. Results expressed by median $\pm$ interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test.

Figures

Figure 1

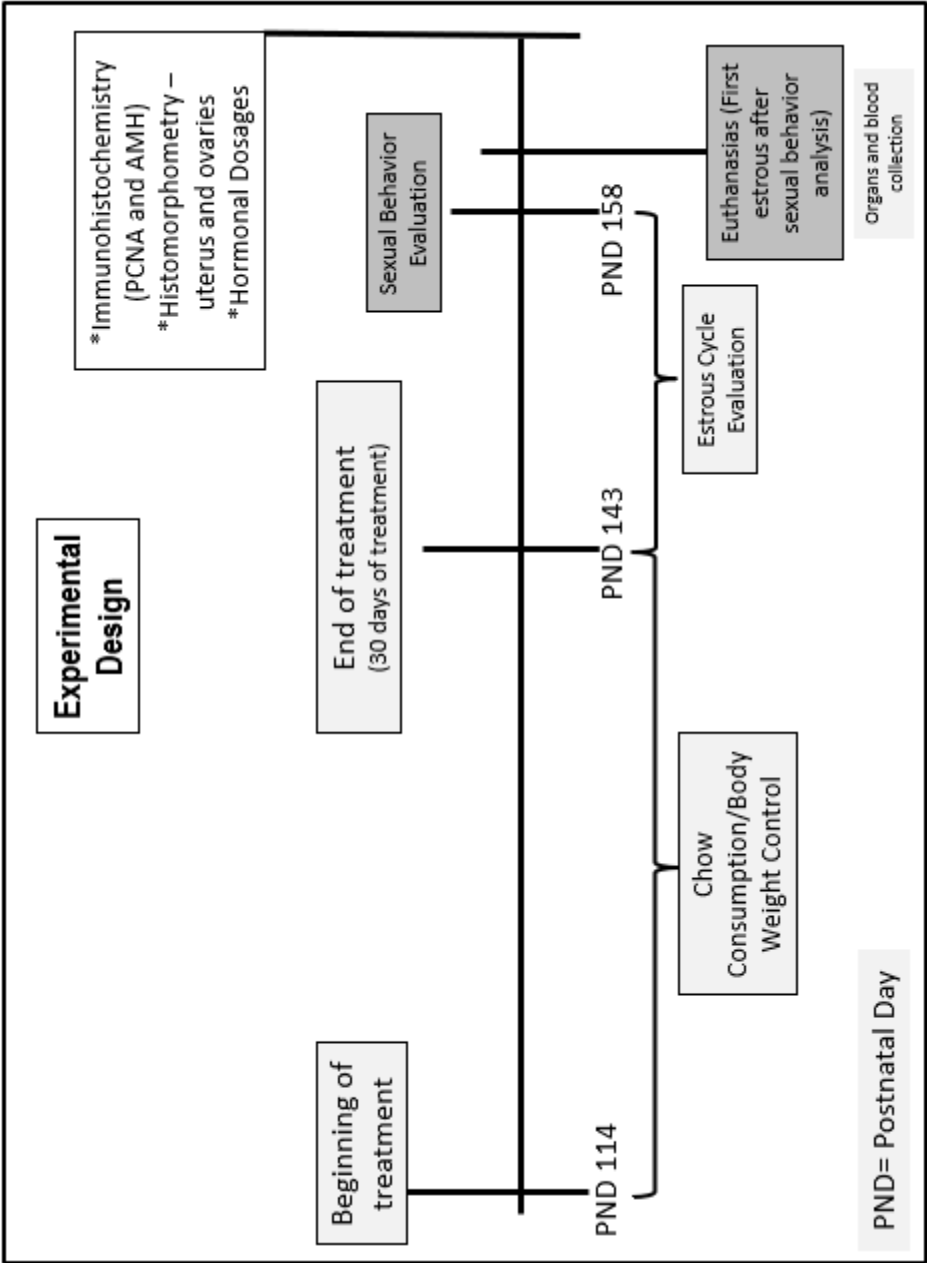


Figure 2.

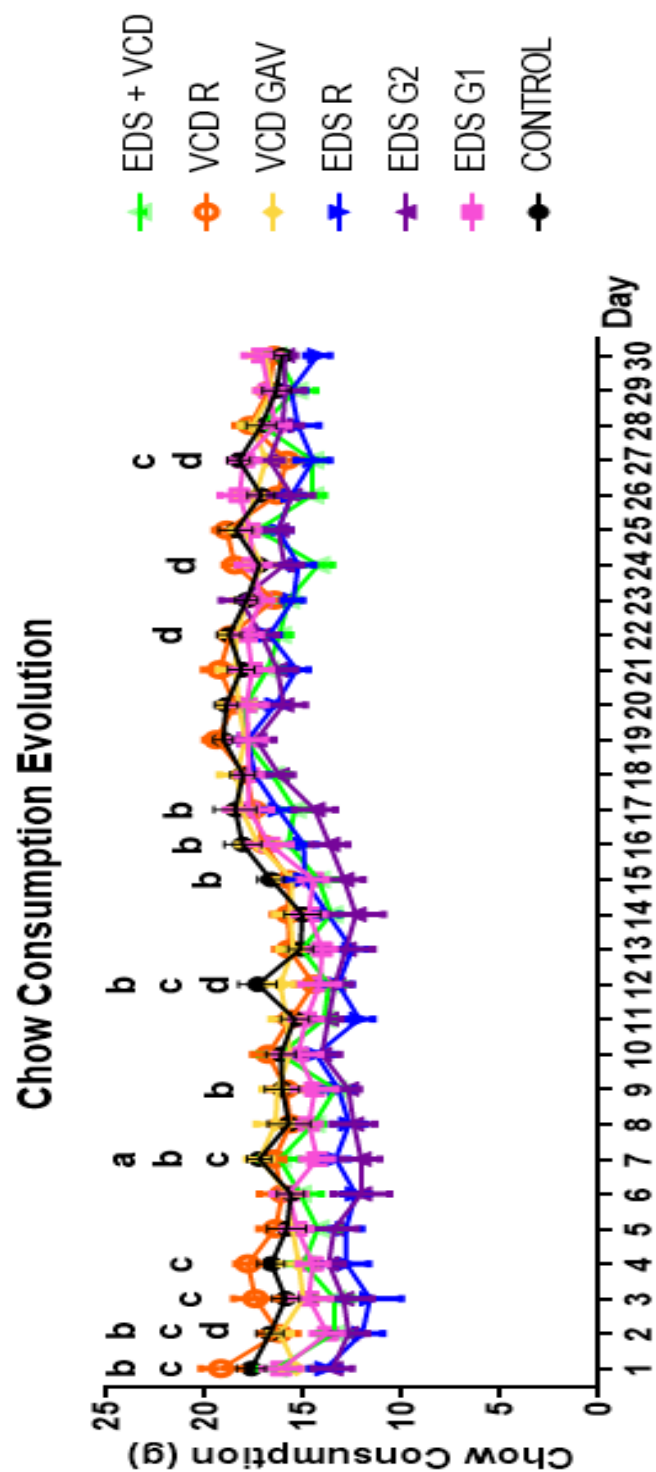


Figure 3.

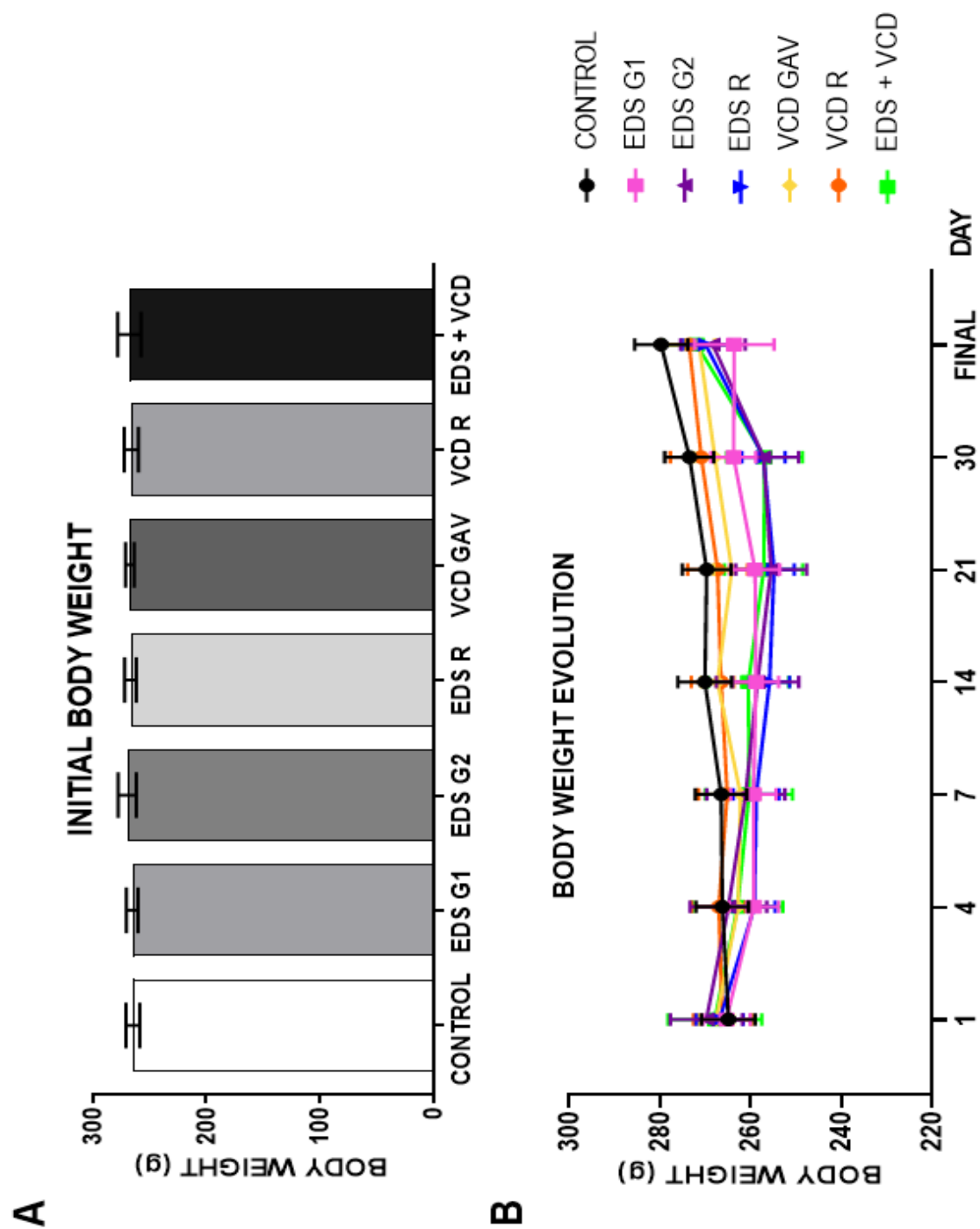


Figure 4.

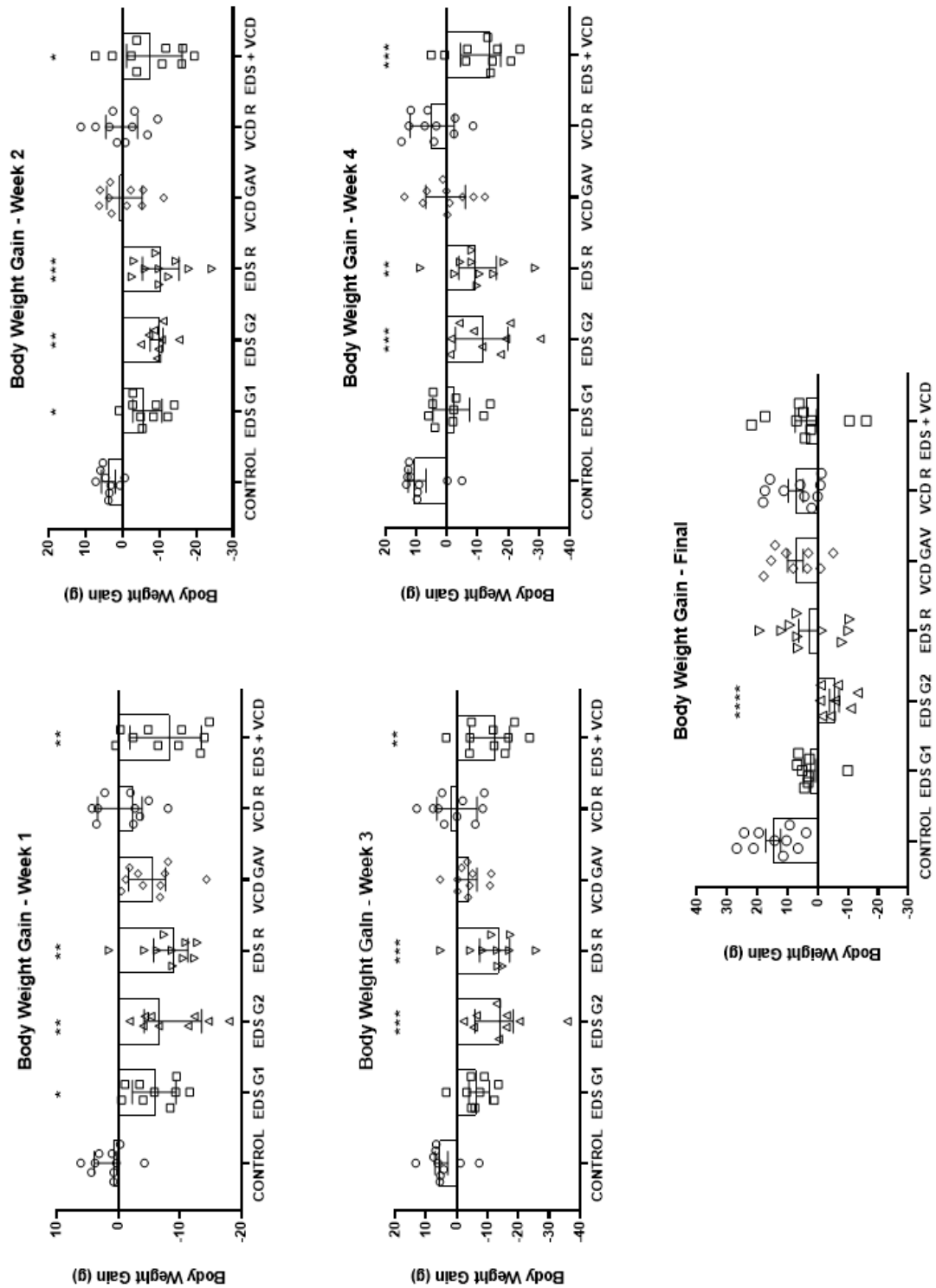


Figure 5.

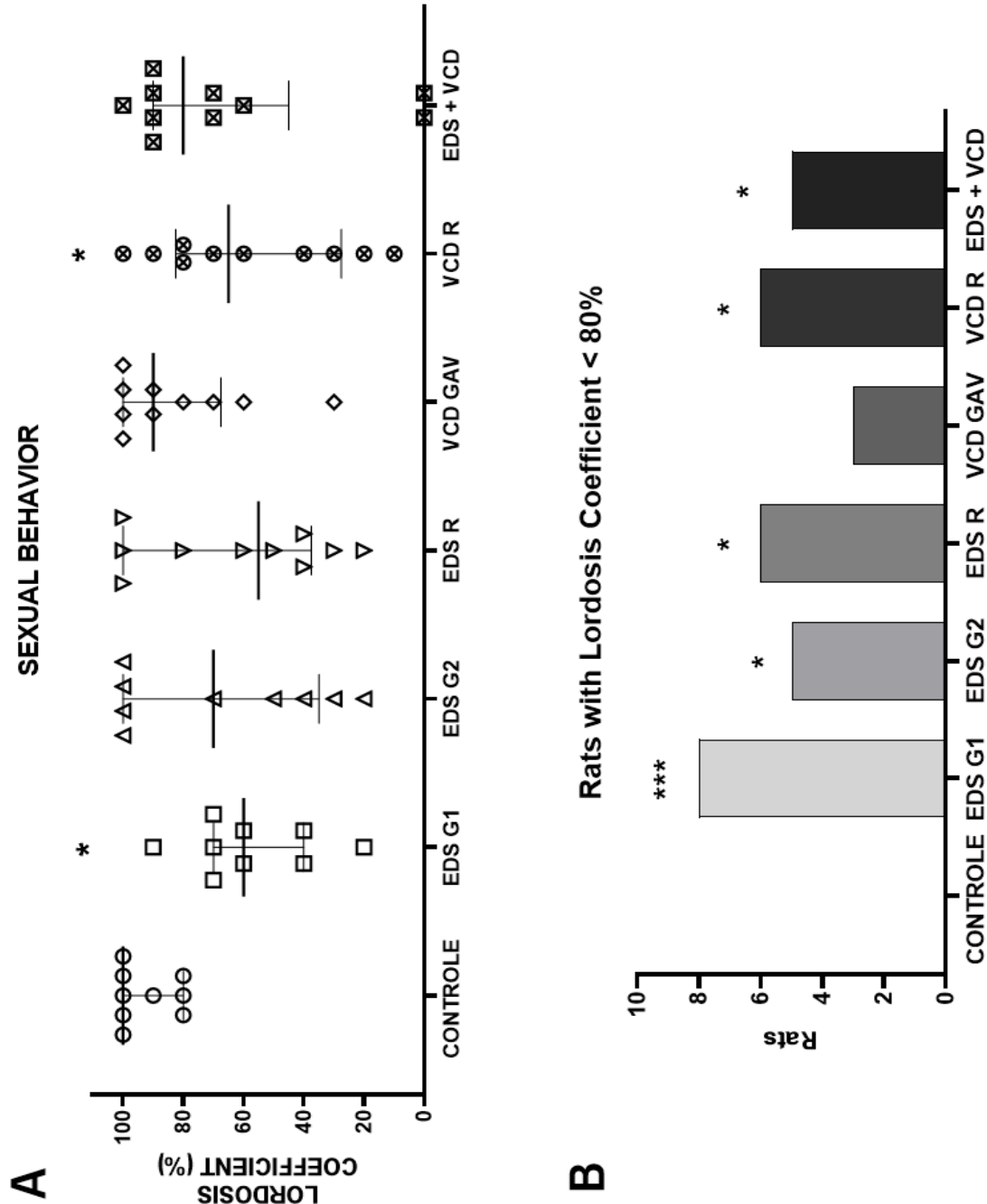
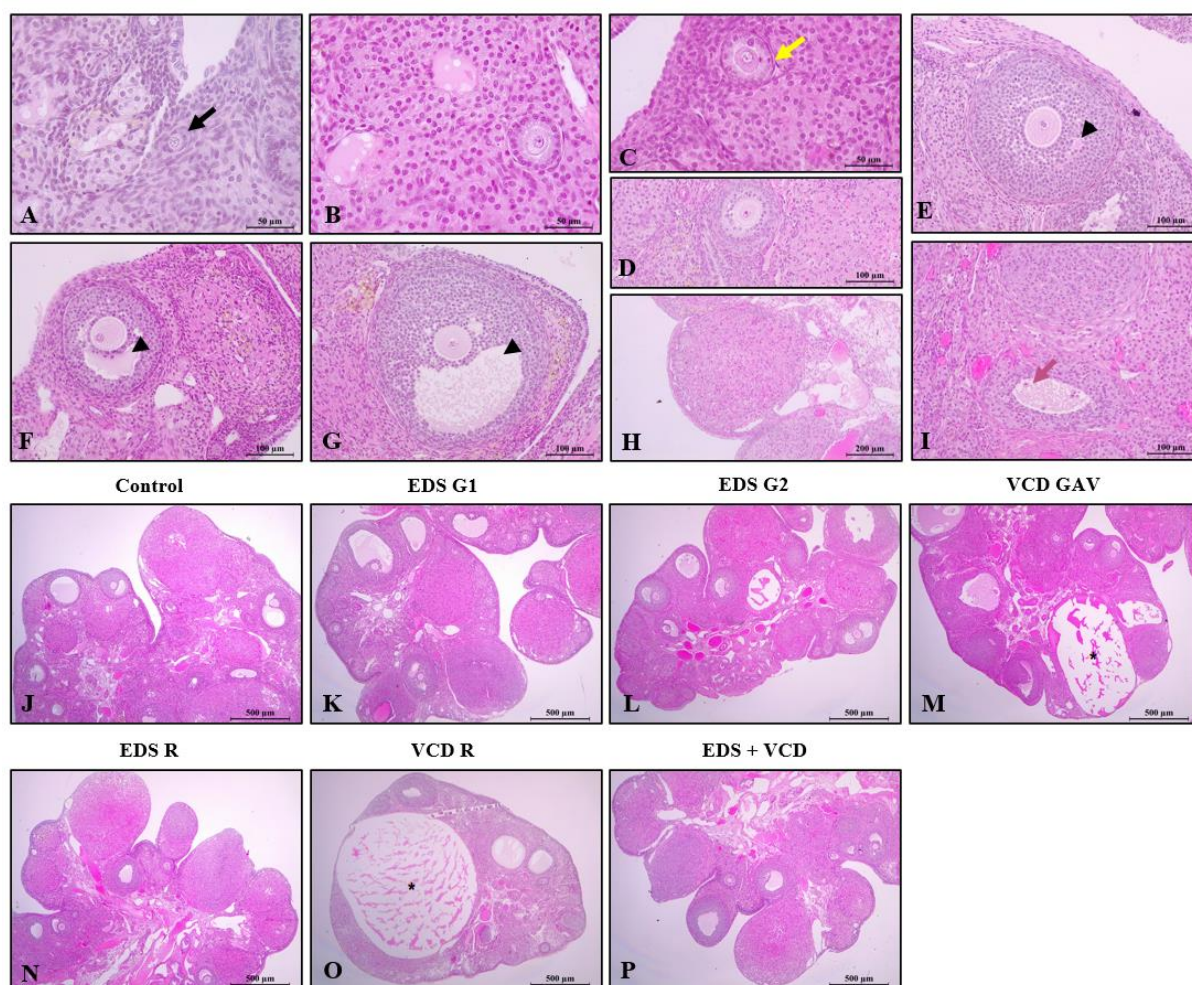


Figure 6.



Q

Ovarian Follicles Count

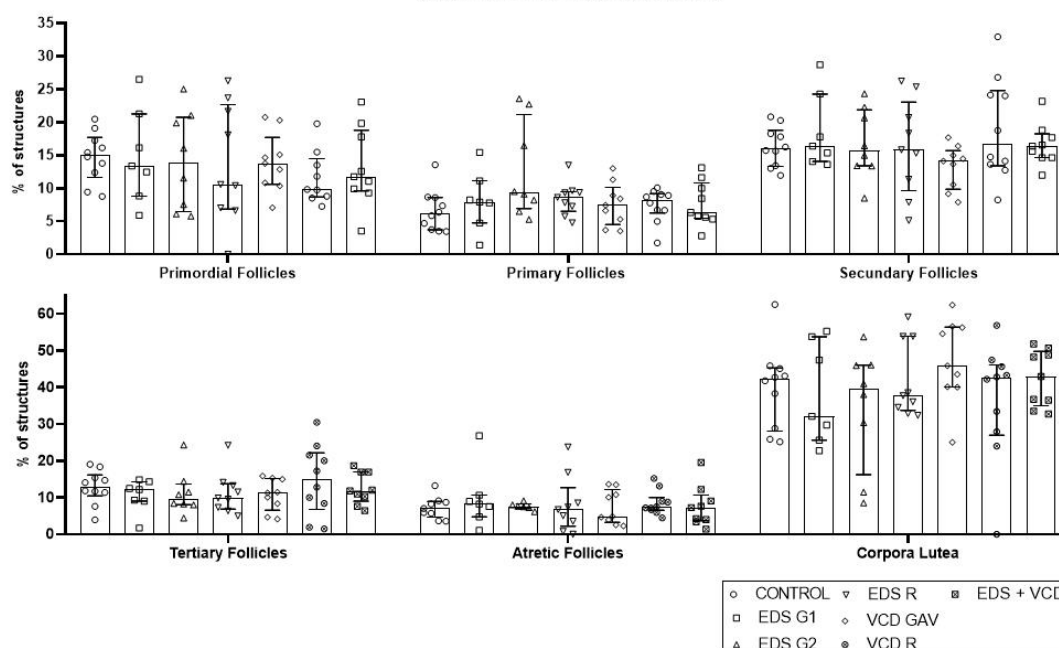


Figure 7

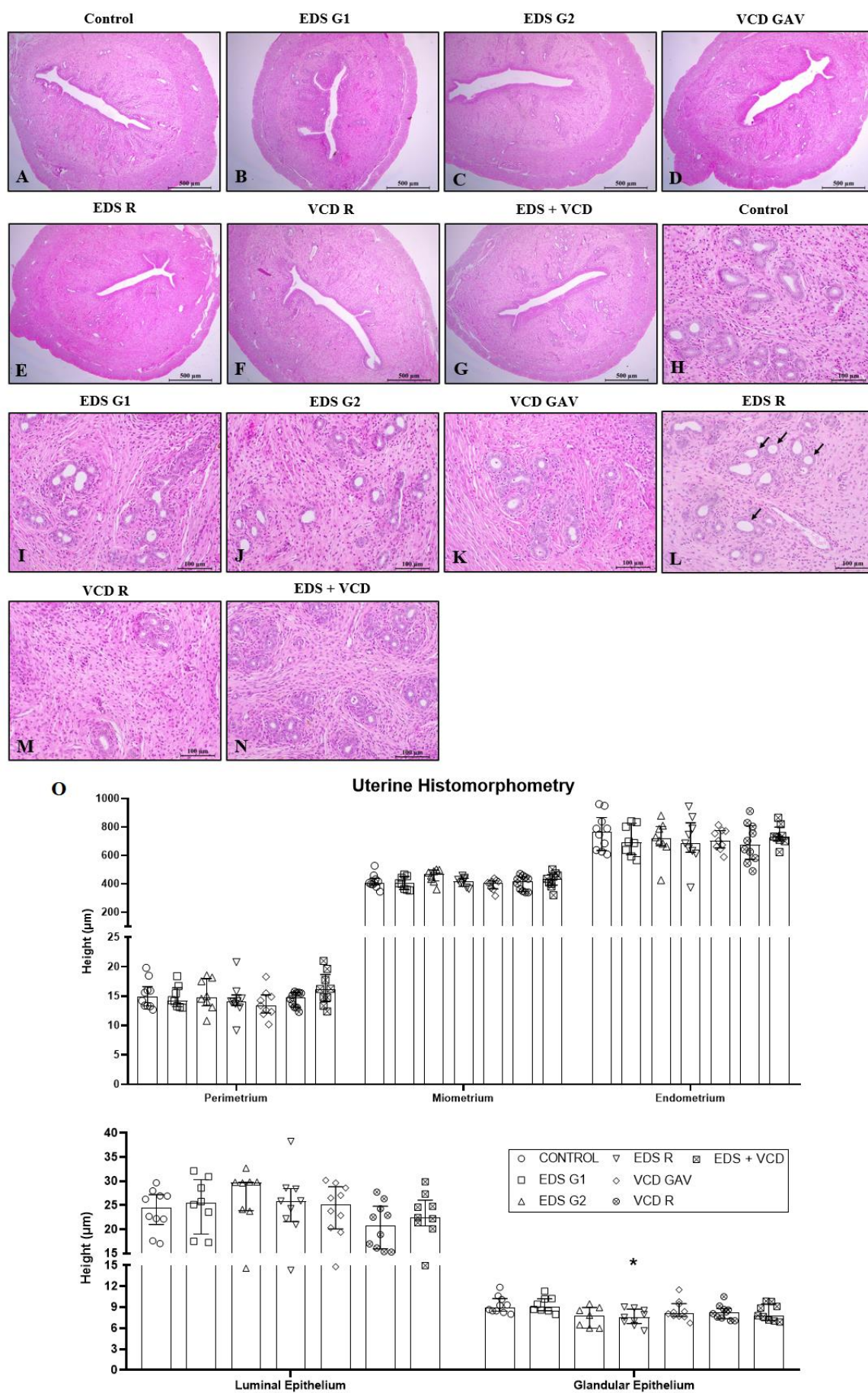


Figure 8

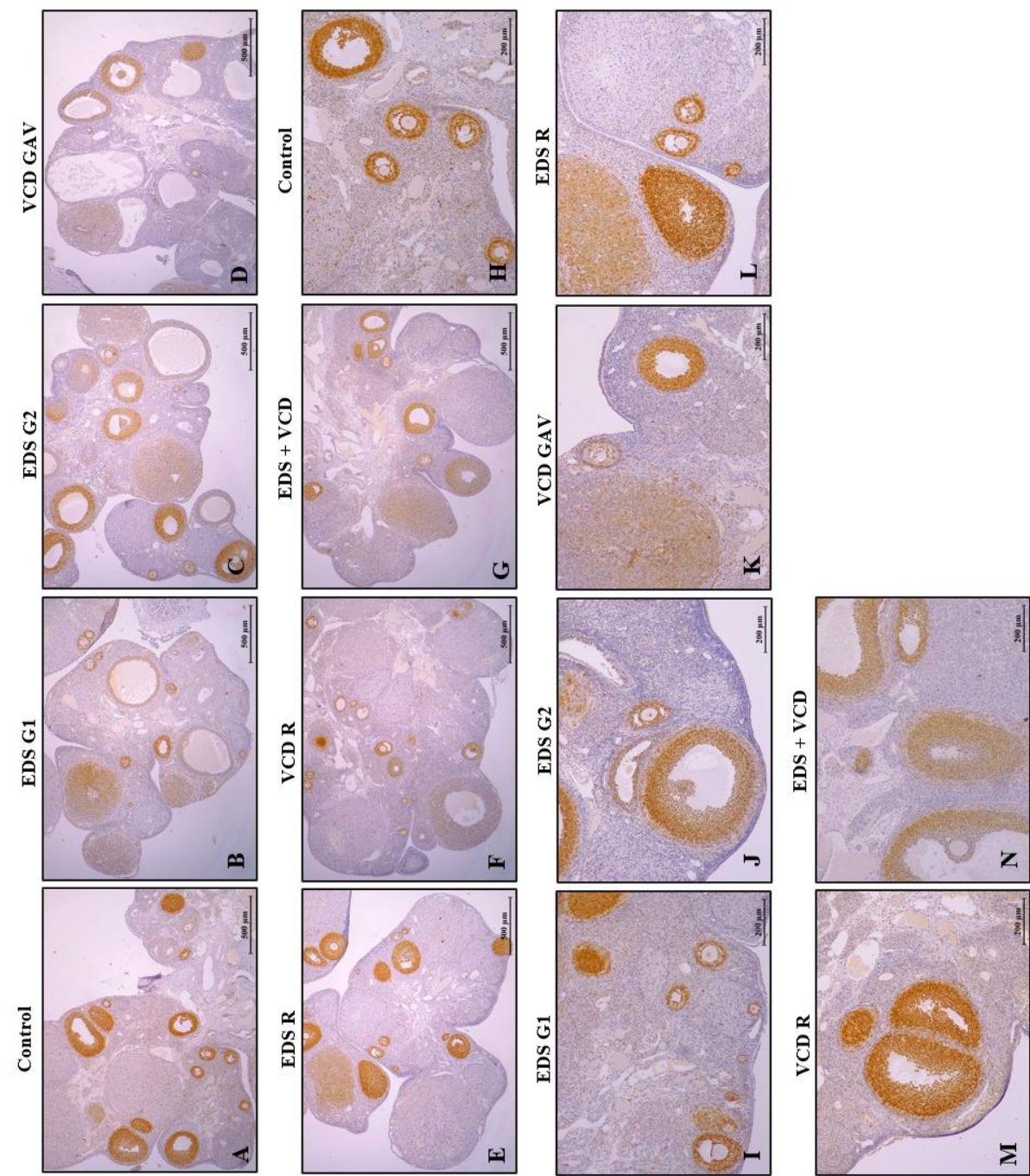


Figure 9.

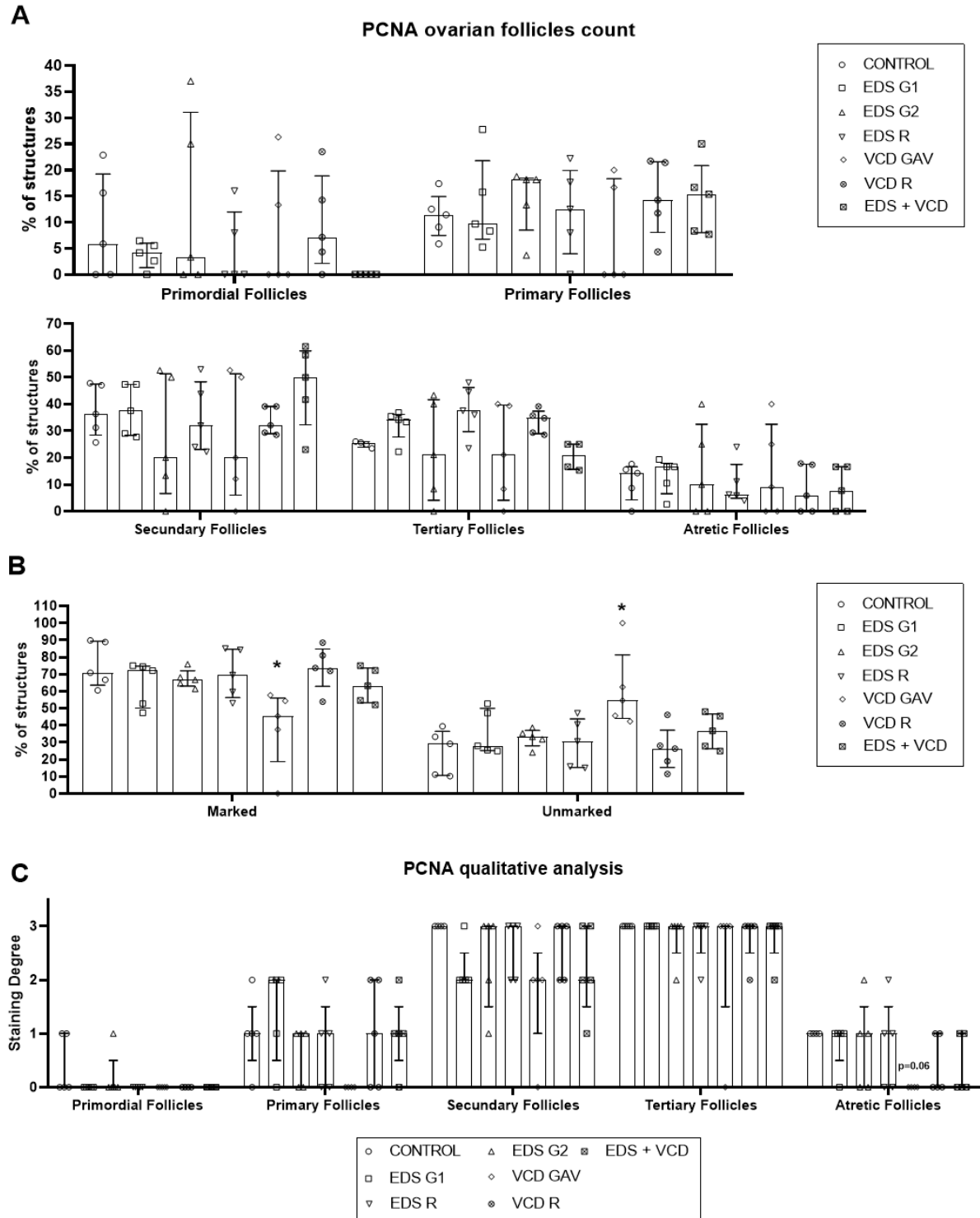


Figure 10

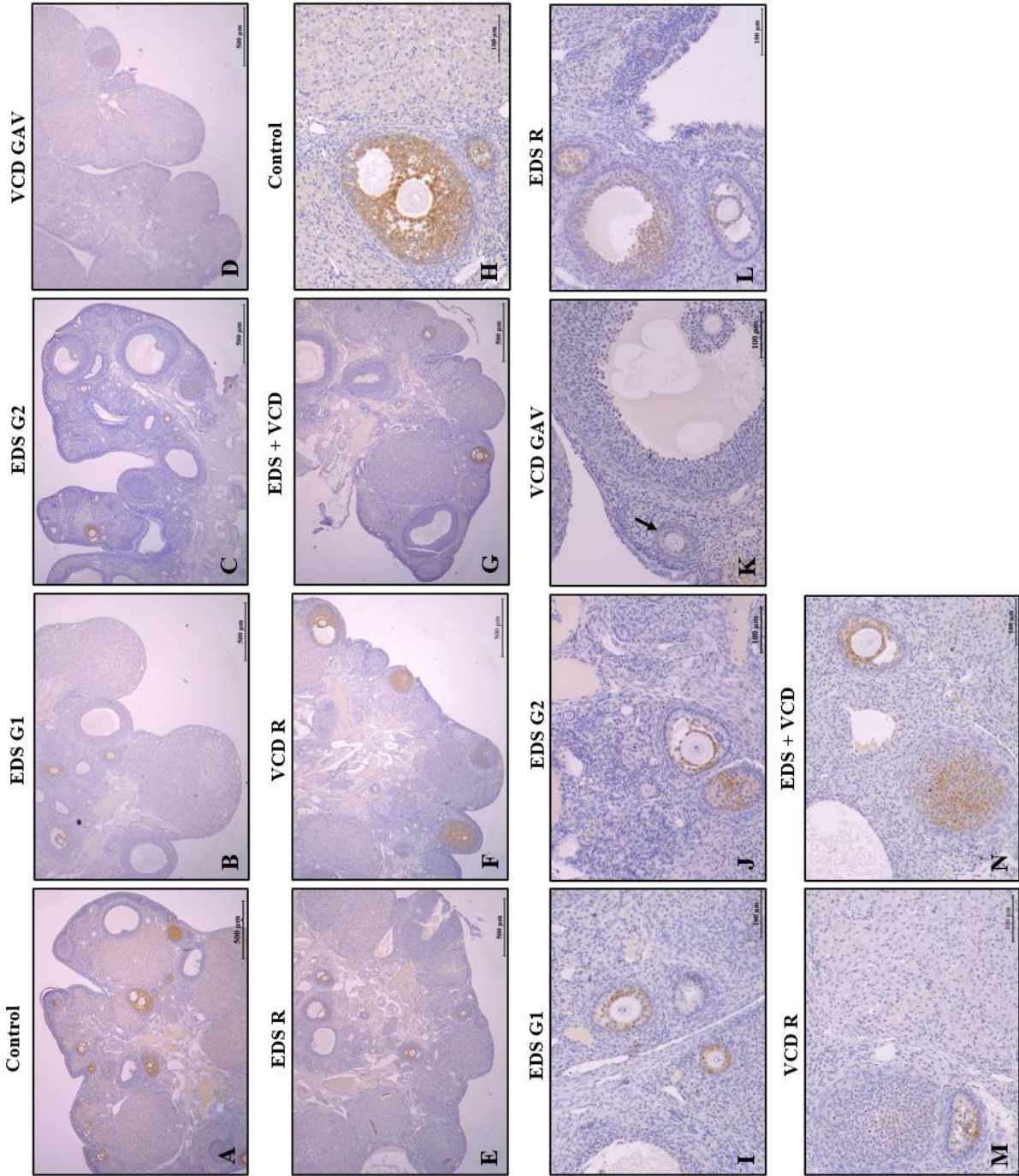


Figure 11.

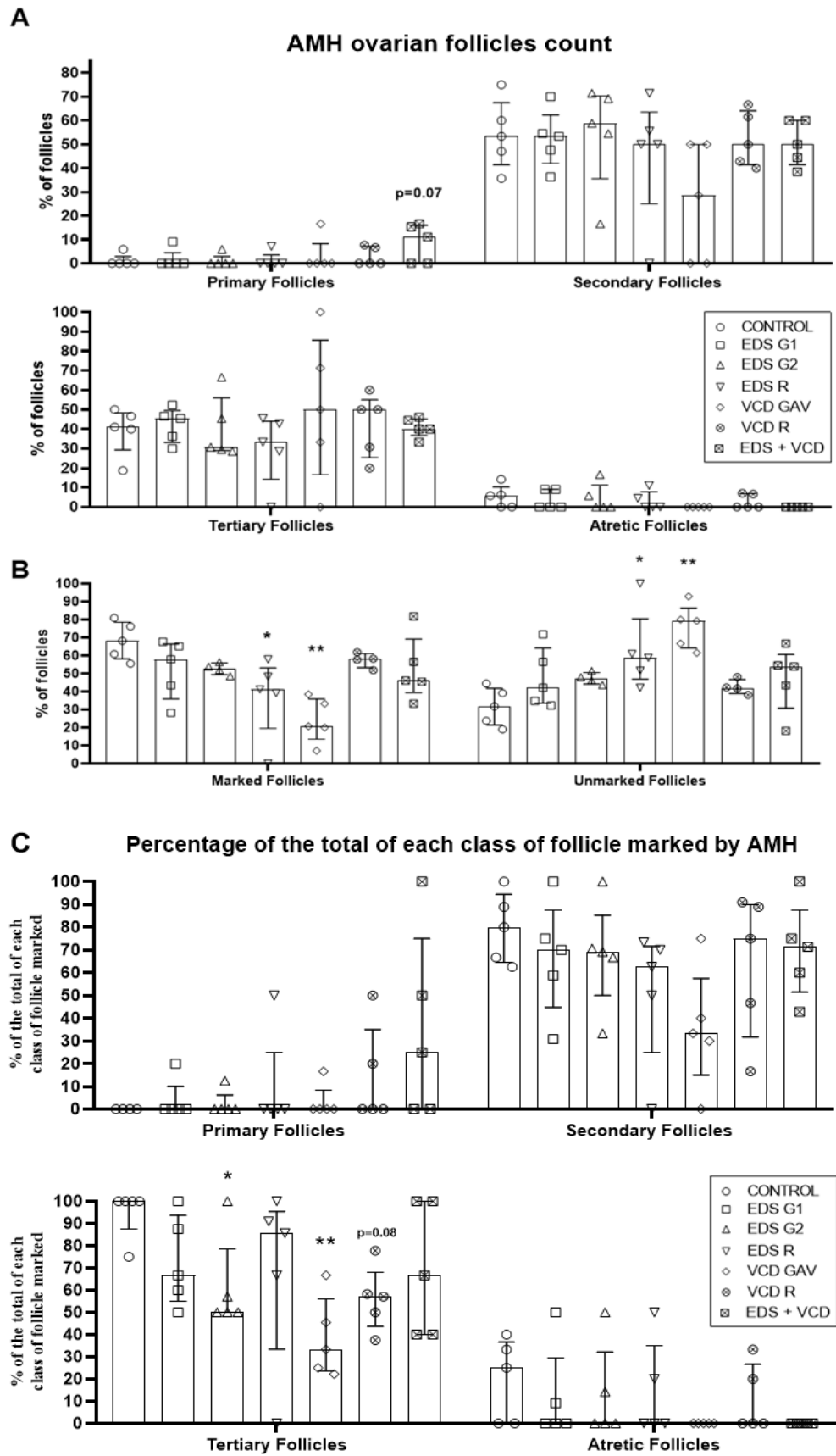


Figure 12

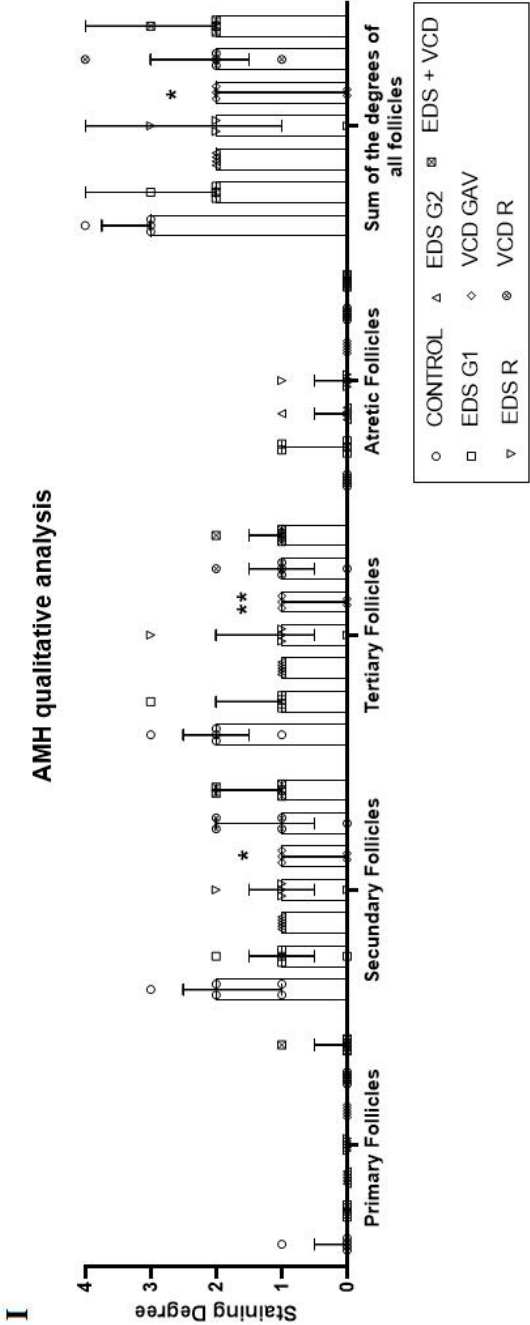
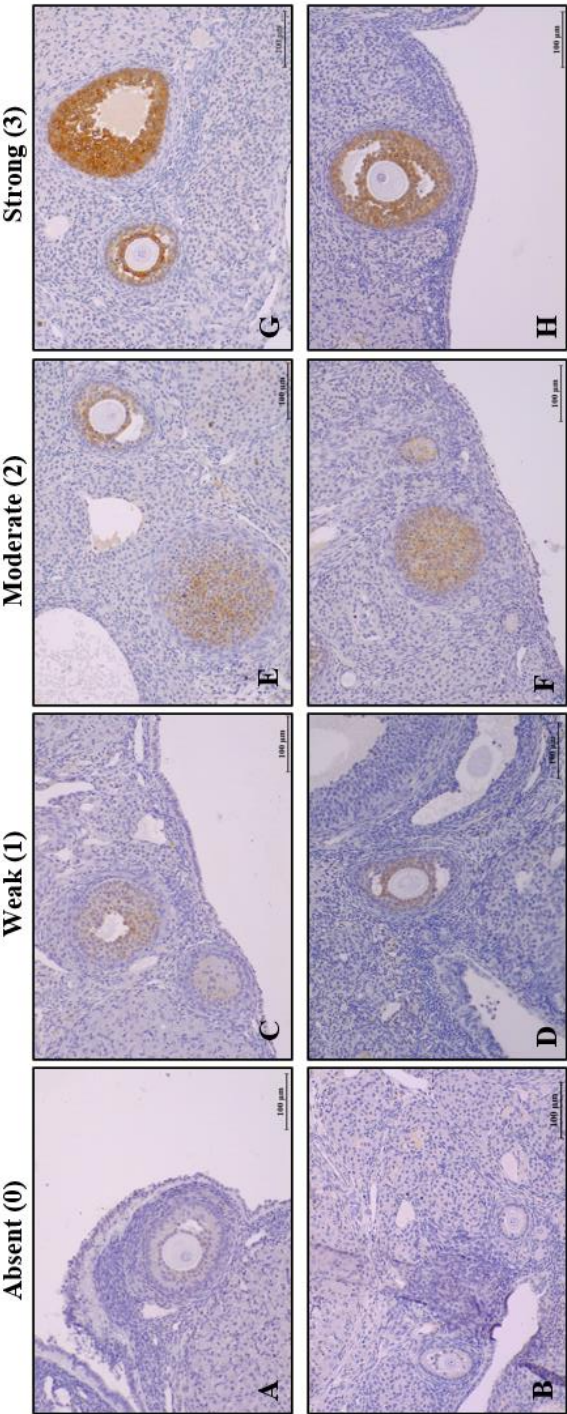
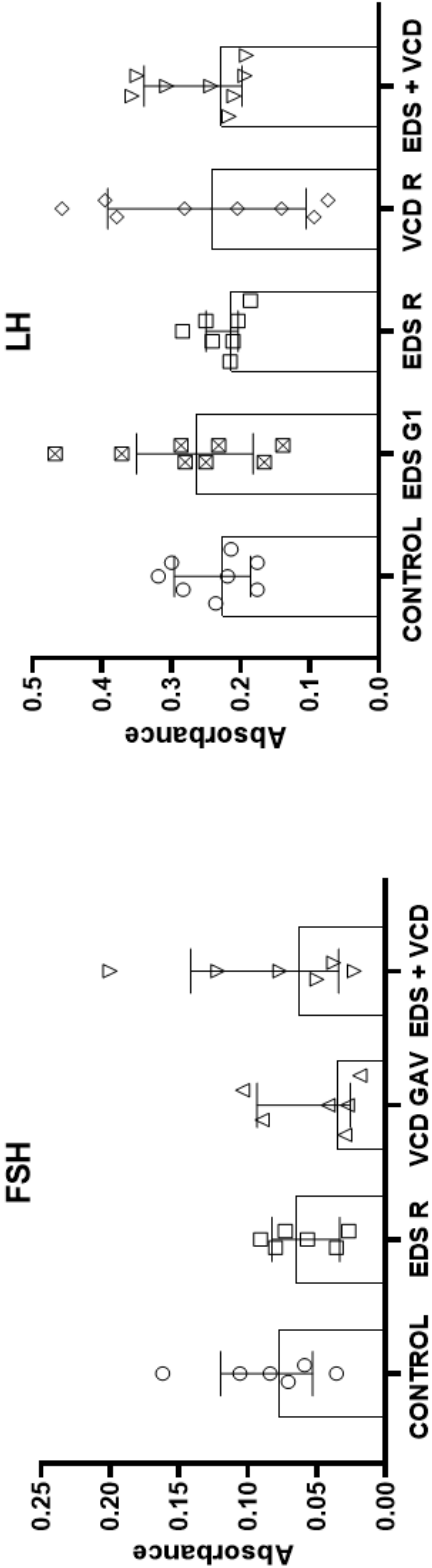


Figure 13



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/rtph.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.semcdb.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., & Paumgarten, 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. 13th 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% CaCl₂ 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

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

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 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>

Anexos

Anexo I - Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Bioética



Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências de Botucatu

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR AO ETANO DIMETANOSULFONATO ASSOCIADO OU NÃO AO DIEPÓXIDO DE 4-VINILCICLOHEXENO: UMA NOVA ABORDAGEM PARA O CONTROLE POPULACIONAL DE ROEDORES", protocolada sob o CEUA nº 5658071220 (do *IBB/UNESP*), sob a responsabilidade de **Wilma de Grava Kempinas** e equipe; Karolína da Silva Tonon; Gustavo Aurélio Chavari - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 18/12/2020.

We certify that the proposal "REPRODUCTIVE EFFECTS OF THE EXPOSURE OF FEMALE WISTAR RATS TO ETHANE DIMETHANOSULPHONATE ASSOCIATED OR NOT TO 4-VINYLCYCLOHEXEN DIEPOXIDE: A NEW APPROACH TO THE RODENTS POPULATION CONTROL", utilizing 70 Heterogenics rats (70 females), protocol number CEUA 5658071220 (do *IBB/UNESP*), under the responsibility of **Wilma de Grava Kempinas** and team; Karolína da Silva Tonon; Gustavo Aurélio Chavari - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 12/18/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 02/2021 a 02/2022

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Biotério Central da UNESP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

Sexo: **Fêmeas**

Idade: **90 a 150 dias**

N: **70**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 350 g**

Local do experimento: Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Setor de Morfologia) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB - UNESP)

Botucatu, 18 de dezembro de 2020

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Bruno César Schimming
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista