

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO GEL INTRAVAGINAL COM 4-VINILCICLOHEXENO DIEPÓXIDO  
SOBRE OS OVÁRIOS DE RATAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ENDREO ALAN PAIL DOS SANTOS**

Uruguaiana, Rio Grande do Sul, 2020

**ENDREO ALAN PAIL DOS SANTOS**

**EFEITO DO GEL INTRAVAGINAL COM 4-VINILCICLOHEXENO DIEPÓXIDO  
SOBRE OS OVÁRIOS DE RATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Ligia de Arruda Mestieri

**Uruguaiiana  
2020**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

d56e dos Santos, Endreo Alan Pail  
Efeito do gel intravaginal com 4-vinilciclohexeno diepóxido sobre os ovários de ratas / Endreo Alan Pail dos Santos.  
64 p.  
  
Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2020.  
"Orientação: Maria Lígia de Arruda Mestieri".  
  
1. Químicoesterilização . 2. Castração Química. 3. Ovotoxicidade. 4. Atresia Folicular. 5. 4-vinilciclohexeno diepóxido. I. Título.

**ENDREO ALAN PAIL DOS SANTOS**

**EFEITO DO GEL INTRAVAGINAL COM 4-VINILCICLOHEXENO  
DIEPÓXIDO SOBRE OS OVÁRIOS DE RATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal.


Dissertação defendida e aprovada em: 17/12/2020

Banca examinadora:



---

Prof.ª. Dra. Maria Ligia de Arruda Mestieri  
Orientadora  
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori  
Universidade Federal de Pelotas – UFPel



---

Prof.ª. Dra. Francieli Weber Santos Cibir  
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Dedico este trabalho e também conquista aos meus pais que nunca mediram esforços para me apoiar e ajudar, durante toda minha trajetória. Às minhas avós, Dona Eva (*in memoriam*) e Dona Gelci (*in memoriam*), que sempre me ajudaram e estiveram presentes, incentivando e servindo como exemplo de caráter, determinação, dedicação e amor.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me permitir a vida, guiar minhas escolhas e caminhos. Obrigado pelos ensinamentos e proteção.

À minha família, que mesmo longe sempre esteve presente. Vocês são minha fonte de amor, alegria e inspiração. Nada seria possível sem o exemplo e o apoio de cada um. Em especial aos meus pais, que apesar das adversidades, sempre me ajudaram e incentivaram da melhor forma possível. Me faltam palavras para descrever minha gratidão.

À minha namorada Ana Funguetto, que esteve ao meu lado nesta etapa, contribuindo e dando suporte para seguir em frente. Muito obrigado pela paciência, dedicação e amor! Aos nossos “filhos de quatro patas”, em especial ao George que está sempre presente, inclusive nas longas horas de estudos, transmitindo amor incondicional. À toda família da Ana pelo carinho, amor e acolhimento durante esses anos, amenizando a distância de casa. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

À minha orientadora Maria Lígia de Arruda Mestieri, por todos ensinamentos, pela orientação durante esses anos todos e por servir de inspiração. Muito obrigado pelas oportunidades concedidas, por confiar, permitir e contribuir para meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos colegas que sempre estiveram presentes e tornaram essa trajetória prazerosa, descontraída e repleta de conhecimentos e descobertas. Em especial, a Etiele Maldonado que sempre somou, dividimos tarefas árduas, aprendemos muitas coisas juntos, você tem uma parcela incalculável neste trabalho, muito obrigado pelo companheirismo e dedicação. Aos alunos e funcionários da UNIPAMPA que de alguma forma, estiveram presentes e, também permitiram essa conquista.

Aos laboratórios e profs. da UNIPAMPA que permitiram a realização deste trabalho: Biotech e professora Fran por contribuir para realização deste trabalho e também servir de inspiração, desde a iniciação científica em Bioquímica; ao LabFar pelo empenho em contribuir com conhecimento e o desenvolvimento deste projeto, em especial, a professora Sandra; ao LPV-UNIPAMPA e professora Maria Elisa que, com muita paciência, transmitiu seu conhecimento e abriu as portas do laboratório para realização deste trabalho; à profa. Fernanda Barbosa Lima da UFSC por nos conceder o 4-VCD e ao Igor Kniphoff pelo transporte.

À CAPES pelo suporte para realização deste trabalho.

Daqui a vinte anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então solte suas amarras. Afaste-se do porto seguro. Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra.

Mark Twain

## RESUMO

A superpopulação de cães e gatos errantes gera prejuízos a saúde pública, biodiversidade e aos próprios animais que sobrevivem sem condições de bem-estar. Para o controle reprodutivo, o método mais comumente empregado é a esterilização, sendo as opções cirúrgicas (orquiectomia e ovariectomia) as mais aplicadas. Porém, o método é ineficiente para o controle populacional em massa de animais errantes. Assim, métodos alternativos, menos invasivos vêm sendo estudados. Nesse interim, a esterilização química demonstra-se como alternativa promissora, mas com limitação de ter uso praticamente exclusivo em machos. Sabe-se que para o controle populacional eficaz, os métodos devem ser úteis em ambos os sexos. Neste contexto, o composto químico 4-vinilciclohexeno diepóxido (4-VCD), vem sendo utilizado em roedoras para induzir a perda de folículos ovarianos e mimetizar a menopausa humana. O composto apresenta ovotoxicidade seletiva, acelerando o processo de atresia em folículos primordiais e primários, culminando em falha ovariana prematura. Para tal, o composto é utilizado pela via intraperitoneal, considerada invasiva e passível de complicações. Vislumbrando a utilização do 4-VCD para o controle populacional de fêmeas errantes (cadelas e gatas) é necessário o estudo de uma via menos invasiva e eficaz. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do 4-VCD sobre os ovários e seu potencial quimioesterilizante, por meio de inoculação de gel intravaginal em modelos experimentais. Para tal, foram utilizadas 20 ratas Wistar, adultas, igual e aleatoriamente divididas em dois grupos, de acordo com o tratamento recebido: controle e tratadas com gel contendo 4-vinilciclohexeno diepóxido. O grupo controle recebeu 0,2mL de gel à base de quitosana e o grupo tratamento recebeu o mesmo gel, contendo 4-vinilciclohexeno diepóxido na dose de 160 mg/kg. As inoculações foram diárias por 15 dias consecutivos. As ratas foram avaliadas diariamente por citologia vaginal até a eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia em dois momentos distintos (metade do grupo em cada): após 16 dias do início do tratamento (M1) ou após 30 dias (M2). Os ovários foram colhidos, preparados e avaliados à luz da microscopia óptica para contagem de folículos primordiais e primários e sua classificação em atrésicos ou saudáveis. Irregularidades no ciclo estral das ratas foram notadas no grupo tratado, com prolongamento nas fases de diestro em M1 e M2; em M2, observou-se ainda prolongamento da fase de estro. No grupo tratado com 4-VCD houve diminuição no número de ciclos estrais em relação ao controle. A avaliação folicular revelou aumento na proporção de folículos primordiais atrésicos no grupo tratado em comparação ao grupo controle nos dois momentos de avaliação. Em contrapartida, no grupo controle notou-se maior proporção



de folículos primordiais saudáveis, quando comparado ao grupo tratamento, nos dois momentos. Na contagem global de folículos em M2, o grupo tratado apresentou maior média de folículos primordiais atresícos comparado ao grupo controle. Deste modo, foi possível observar ação ovotóxica do 4-VCD pela via intravaginal em meio gel de quitosana. Contudo, o tratamento por 15 dias com gel intravaginal composto por 4-VCD na dose de 160 mg/kg não promoveu falha ovariana durante o período de experimento. Estudos futuros devem ser realizados com intuito de determinar tempo de exposição e dose ideal, suficiente para promover infertilidade em ratas.

Palavras-chave: 4-Vinilciclohexeno diepóxido. Quimioesterilização. Castração química. Ovotoxicidade. Atresia folicular.

## ABSTRACT

The overpopulation of stray dogs and cats damages public health, biodiversity, and the animals themselves that survive without conditions of well-being. For reproductive control, the most commonly used method is sterilization, with surgical options (orchietomy and ovariectomy) being the most applied. However, the method is inefficient for mass population control of stray animals. Thus, alternative and less invasive methods have been studied. Therefore, chemical sterilization shows it self as a promising alternative, but with the limitation of having practically exclusive use in males. It is known that for effective population control, the methods must be useful in both sexes. In this context, the chemical compound 4-vinylcyclohexene diepoxide (4-VCD), has been used in rodents to induce loss of ovarian follicles and mimic human menopause. The compound shows selective ovotoxicity, accelerating the atresia process in primordial and primary follicles, culminating in premature ovarian failure. For this, the compound is used by the intraperitoneal route, considered invasive and prone to complications. In order to use the 4-VCD for the population control of wandering females (bitches and cats) it is necessary to study a less invasive and effective route. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of 4-VCD on the ovaries and their chemosterilizing potential, through inoculation of intravaginal gel in experimental models. For this purpose, 20 adult Wistar rats were used, equally and randomly divided into two groups, according to the treatment received: control and treated with gel containing 4-VCD. The control group received 0.2 mL of chitosan-based gel and the treatment group received the same gel, containing 4-VCD at a dose of 160 mg/kg. The inoculations were daily for 15 consecutive days. The rats were evaluated daily by vaginal cytology until euthanasia. The animals were euthanized at two different times (half of the group each): 16 days after the start of treatment (M1) or after 30 days (M2). The ovaries were collected, prepared, and assessed under light microscopy to count primordial and primary follicles and their classification into healthy or atretic. Irregularities in the estrous cycle of rats were noted in the treated group, with prolongation in the diestrus phases in M1 and M2; in M2, prolongation of the estrus phase was also observed. In the group treated with 4-VCD, there was a decrease in the number of estrous cycles compared to the control. The follicular evaluation revealed an increase in the proportion of primordial atresia follicles in the treated group compared to the control group at both times of evaluation. In contrast, in the control group, there was a higher proportion of healthy primordial follicles, when compared to the treatment group, at both times. In the global follicle

count in M2, the treated group had a higher mean of primordial atretic follicles compared to the control group. Thus, it was possible to observe the ovotoxic action of 4-VCD through the intravaginal route in chitosan gel. However, treatment for 15 days with intravaginal gel composed of 4-VCD at a dose of 160 mg/kg did not promote ovarian failure during the experiment period. Future studies should be carried out in order to determine the exposure time and ideal dose, sufficient to promote infertility in rats.

Keywords: 4-vinylcyclohexene diepoxide. Chemosterilization. Chemical castration. Ovotoxicity. Follicular atresia.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

**Figura 1:** Via de sinalização KITL/c-KIT nos folículos primordiais e primários. O ligante KIT (KITL), presente nas células da granulosa liga-se ao seu receptor KIT (c-KIT) na membrana do oócito. Essa interação promove autofosforilação do KIT, ativando a via de sinalização da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K). A PI3K ativa, sinaliza para a proteína quinase dependente de fosfoinositídeos-1 (PDK-1), que fosforila e ativa a proteína quinase AKT (pAKT). A pAKT se transloca para o núcleo e ativa vias importantes inibindo a apoptose e promovendo sobrevivência celular. .... 22

**Figura 2:** Fotomicrografias do lavado/citologia vaginal não corados de ratas no proestro, estro, metaestro e diestro, observado em microscópio óptico, com lentes objetivas de 10 e 40x. Para tal, são avaliados as proporções de três tipos celulares para definir o estágio do ciclo estral. Cada fase do ciclo estral está identificada na imagem: Proestro - notar predomínio de células epiteliais; Estro - apresenta predomínio de células cornificadas; Metaestro - mesma proporção de células cornificadas, epiteliais e leucócitos; Diestro - predomínio de leucócitos. .... 26

### Artigo Científico

**Figura 1:** Fotomicrografia de secções de ovários (magnificação de 40x) corados com hematoxilina e eosina. A) Amostra do grupo controle, em M1. Nota-se pequenos folículos primordiais saudáveis agrupados na região cortical do tecido ovariano (seta). Notar disposição das células da granulosa com formato achatado (ponta de seta) circundando o oócito. Contorno nuclear do oócito bem delimitado e com formato circular (\*). B) Amostra do grupo 4-VCD em M1. Folículo primordial atresico, notar encolhimento do oócito e células da granulosa com perda de contato com o estroma ovariano (seta). Ainda, nota-se núcleo do oócito contraído e formato irregular (\*). C) Amostra do grupo controle em M1. Notar folículo primário saudável (seta), circundado por uma camada de células da granulosa em formato cuboidal. O folículo

apresenta disposição uniforme das células da granulosa, assim como, núcleo em formato circular e contornos regulares (\*). D) Amostra do grupo 4-VCD em M1. Notar folículo primário atrésico (seta), com citoplasma do oócito com aspecto granular e perda de contato focal entre células da granulosa e oócito (ponta de seta). Notar contorno nuclear irregular com encolhimento do mesmo (\*). ..... 38

**Figura 2:** Imagem de duas ratas durante o processo de exploração macroscópica e coleta de tecidos para análise. Imagens A, B e C rata grupo tratamento em M1. Imagens D e E rata controle em M1. Ambos animais estavam em mesma fase de ciclo estral. A) Rata apresentando exsudato serosanguinolento na vulva e região perineal (seta), no 15º dia de inoculação de gel intravaginal; B) Rata apresentando secreção sanguinolenta na vulva pelo segundo dia consecutivo, 16º dia de experimento (M1); C) Corpo e corno uterino direito de rata no momento de eutanásia e exploração macroscópica em M1, apresentando estruturas com aspectos císticos (setas), vasos congestionados, assim como, tecido com regiões edemaciadas; D) Rata em M1, momentos antes da eutanásia. Apresentando região perineal livre de exsudatos e com aparência saudável (seta); E) Corpo e cornos uterinos saudáveis macroscopicamente de rata do grupo controle em M1. ....41

## LISTA DE TABELAS

### Artigo Científico

- Tabela 1:** Comparação do número de dias de cada fase do ciclo estral e no número de ciclos estrais no GC e grupo tratado com 4-VCD em dois momentos distintos (M1= dia 16; M2= dia 30). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, n = 5. .... 37
- Tabela 2:** Comparação da contagem global de pequenos folículos pré-antrais saudáveis e atrésicos no GC e grupo tratado com 4-VCD em dois momentos distintos (M1= dia 16; M2= dia 30). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, n = 5. .... 39
- Tabela 3:** Comparação da proporção de pequenos folículos pré-antrais saudáveis e atrésicos no GC e grupo tratado com 4- VCD em dois momentos distintos (M1= dia 16; M2= dia 30). Os valores são expressos em número de folículos fase/total de folículos contabilizados por grupo em cada momento e em percentagem, n = 5. .... 40

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>2.1 Esterilização química em cães e gatos</b> .....	18
<b>2.2 4-Vinilciclohexeno diepóxido</b> .....	19
<b>2.3 4-Vinilciclohexeno diepóxido: mecanismo de ação e toxicidade ovariana</b> .....	21
<b>2.4 4-Vinilciclohexeno diepóxido: posologia e vias de administração</b> .....	22
<b>2.5 Citologia vaginal, contagem folicular e função ovariana</b> .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	28
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	28
<b>4 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	29
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>7 ANEXOS</b> .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com WORLD VETERINARY ASSOCIATION (2016), o número de cães abandonados no mundo ultrapassa os 200 milhões, sendo considerado problema global (LEOCI et al., 2019). Na América do Sul, estima-se que tenham mais de 20 cães de rua para cada 100 pessoas (KARTAL; ROWAN, 2018). Ainda assim, acredita-se que esses números estejam subestimados, visto que, não há informações confiáveis a respeito do número total de cães e gatos errantes (OTRANTO et al., 2017). Essa superpopulação gera riscos à saúde pública devido à veiculação de zoonoses e aos próprios animais, que sobrevivem sem condições de bem-estar (BECK, 1975; DOHERTY et al., 2017; MASSEI et al., 2017; SEIMENIS; TABBAA, 2014). Nos EUA, três a quatro milhões de cães e gatos são sacrificados anualmente como uma das medidas de controle populacional de animais errantes (OTRANTO et al., 2017).

A esterilização dos animais além de ser um método humanitário, é a principal medida de controle populacional de animais errantes, sendo as opções cirúrgicas (ovariohisterectomia e orquiectomia), as mais aplicadas (CATHEY et al., 2010; JANA; SAMANTA, 2007; MOGHEISEH, et al., 2017). Embora a esterilização cirúrgica tenha contribuído para redução da população de animais errantes, é ineficaz para esse fim, devido à dificuldade de realização em massa (DIAS et al., 2015; GRIFFIN, 2013; HEKMAN, 2020). Assim, métodos alternativos, como a quimioesterilização, estão sendo desenvolvidos, priorizando menor invasividade e custos, assim como, passíveis de uso em grande escala com segurança (CATHEY et al., 2010; HEKMAN, 2020; JANA; SAMANTA, 2006).

Diversas substâncias quimioesterilizantes vem sendo estudadas ao longo dos anos, e percebe-se que, a maioria dos estudos são em animais do gênero masculino e com aplicação diretamente nas gônadas, mais acessíveis a esse tipo de administração que os ovários (CATHEY et al., 2010; CAVALIERI, 2017; LEOCI et al., 2019; PAKSOY et al., 2018).

Em fêmeas, embora existam poucos estudos envolvendo quimioesterilização, um composto químico chamado 4-vinilciclohexeno diepóxido (4-VCD), vem sendo utilizado experimentalmente há décadas para promover falência ovariana em ratas, como modelo experimental de menopausa humana (HOYER et al., 2001; REIS et al., 2014). O químico atua induzindo apoptose dos pequenos folículos pré-antrais ovarianos (folículos primordiais e primários) (KAO et al., 1999; VAN KEMPEN et al., 2011). Porém, a via de administração mais



utilizada em roedores é intraperitoneal (IP), considerada invasiva e passível de complicações, como lesões iatrogênicas em órgãos abdominais (MUHAMMED, 2009).

Devido as características ovotóxicas do 4-VCD, o aprofundamento dos estudos relacionados à sua aplicação como quimioesterilizante é importante. Vislumbrando sua utilização para controle populacional de cães e gatos, é necessário que a via de administração seja menos invasiva e mais segura do que a atualmente utilizada, que permita ainda, absorção do composto químico e sua ação ovotóxica. Neste sentido, este estudo tem o objetivo de avaliar o efeito do uso de gel intravaginal contendo 4-VCD em ratas sobre os folículos ovarianos e ciclo estral.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Esterilização química em cães e gatos

O controle da fertilidade pode ser obtido através de esterilização cirúrgica, química e contracepção (KUTZLER; WOOD, 2006; MASSEI, 2013; MUNSON, 2006). No caso de esterilização química ou quimioesterilização, são utilizados compostos que atuam inibindo a síntese de gametas, hormônios gonadais ou impeçam o transporte de gametas, promovendo esterilização permanente ou temporária (BROWN, 2003; CAVALIERI, 2017; FAHIM et al., 1993). Quando comparados aos métodos cirúrgicos, apresentam vantagens como: baixo custo, fácil aplicação, não necessitam de anestesia geral e uso passível em grande escala (CATHEY et al., 2010; CAVALIERI, 2017; JANA; SAMANTA, 2011; KATHERINE; LINDA, 2013; LEOCI et al., 2014).

Nesse contexto, a quimioesterilização vem sendo estudada como alternativa à castração cirúrgica visando o controle populacional de animais errantes pois, os métodos cirúrgicos necessitam de estrutura clínica, equipe qualificada, são demorados, necessitam maiores cuidados pós-operatórios e possuem custo elevado para aplicação em grande escala (BROWN, 2003; KUTZLER; WOOD, 2006). Além disso, muitos proprietários optam por evitar a castração cirúrgica por diversos motivos, tornando-se um tabu em algumas culturas e sociedades (ACC & D, 2013; FAO, 2014; SOTO et al., 2005). Nesse interim, especula-se que a quimioesterilização possa também ser uma alternativa a estes proprietários.

Em pequenos animais, o emprego da esterilização química vem sendo estudado e reportado desde as décadas de 1960-70, por meio de compostos químicos esclerosantes (CHATTERJEE; KAR, 1968; KOGER, 1978; PINEDA; FAULKNER, 1974; PINEDA; HEPLER, 1981; PINEDA et al., 1977; THOMPSON, 1976). Desde então, diversos compostos têm sido utilizados como quimioesterilizantes, como: cloreto de cádmio (CHATTERJEE & KAR, 1968), digluconato de clorexidina (PINEDA; HEPLER, 1981), gluconato de zinco (FAHIM et al., 1993; MOGHEISEH et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2012), cloreto de cálcio (JANA; SAMANTA, 2007; KOGER, 1978), glicerol (IMMEGART; THRELFALL, 2000) dentre outros.

Ao longo dos anos, muitos compostos demonstraram que seus efeitos tóxicos sobrepuseram os benefícios e deixaram de ser usados. Assim, a busca de novas opções de quimioesterilizante é bem-vinda.

Dos compostos estudados, substâncias contendo  $\text{CaCl}_2$  ou zinco destacaram-se e receberam mais estudos experimentais (CAVALIERI, 2017; RAFATMAH, 2019). O primeiro quimioesterilizante a cumprir os critérios de segurança e eficácia para uso em pequenos animais, foi composto de zinco, aprovado para uso comercial em 2003 e, atualmente, é o esterilizante químico mais utilizado (ACC & D, 2013; HEKAMN, 2020; PURSWELL & JÖCHLE, 2010). O  $\text{CaCl}_2$  apesar de apresentar-se promissor quimioesterilizante para cães e gatos (JANA; SAMANTA, 2007, 2011; PARANZINI et al., 2018), poucos estudos de eficácia e segurança foram realizados para seu uso (HEKMAN, 2020).

Apesar de os estudos com quimioesterilizantes estarem avançados, a maioria das substâncias tem ação esclerosante, que não possuem toxicidade específica, sendo necessária a aplicação direta nas gônadas (ACC & D, 2013; CAVALIERI, 2017). Porém, a facilidade de acesso às gônadas difere entre os gêneros e, a localização intra-abdominal dos ovários, apresenta enormes desafios para esse tipo de administração (CAVALIERI, 2017; HEKMAN, 2020; MOGHEISEH et al., 2017). Em vista do fácil acesso aos testículos, estudos em animais do gênero masculino estão avançados, no entanto, ainda são esparsos em fêmeas (CATHEY et al., 2010; CAVALIERI, 2017; MASSEI; MILLER, 2013). Contudo, acredita-se que o controle populacional só seja efetivo se for realizado em ambos os gêneros (BROWN, 2003).

Dentre os raros estudos em fêmeas, cita-se que em cadelas, foi reportada a administração de cloreto de cádmio (PATRA et al., 1990) e gluconato de zinco (MOGHEISEH et al., 2017), porém, foi necessário acesso cirúrgico para exposição e aplicação nos ovários. Ainda assim, a aplicabilidade de um quimioesterilizante pela via intraovariana é questionável e parece ainda ser difícil em programas de esterilização em massa.

Contudo, sabe-se que as gônadas são também acessíveis por meio da circulação sistêmica (ADEDARA et al., 2017; HEKMAN, 2020; MAYER et al., 2002; PAKSOY et al., 2018). Nesse contexto, o 4-VCD, composto químico considerado ovotóxico seletivo, é utilizado em roedores, como modelo experimental indutor de menopausa humana, com administração IP (KAO et al., 1999; MAYER et al., 2002). Devido o composto promover falha ovariana prematura (FOP) por ação ovotóxica seletiva em pequenos folículos pré-antrais, não requer aplicação direta nas gônadas. Sua ação ovotóxica já foi reportada em diferentes espécies e vias de administração, porém, nota-se que a via e a dose, influenciam no seu potencial ovotóxico (APPT et al., 2006, 2008; MUHAMMED et al., 2009).

## **2.2 4-Vinilciclohexeno diepóxido**

O 4-VCD é um químico industrial utilizado como diluente reativo na produção de resinas epóxi, é metabólito do vinilciclohexeno, o qual, é subproduto na indústria de borracha sintética (DEVINE et al., 2001; IARC, 1994; RAPPAPORT et al., 1977). Foi detectada presença de ambos compostos no ambiente industrial (BURROUGHS, 1977; NTP, 1986, 1989), e com intuito de avaliar potenciais riscos químicos ocupacionais à trabalhadores industriais expostos à estes compostos, foram realizados estudos experimentais em roedores (COLLINS et al., 1987; TNP, 1986, 1989).

Curiosamente, ao ser investigado possível carcinogenicidade e toxicidade dos dois compostos, foi notado atrofia uterina e ovariana (caracterizada pela diminuição da população de folículos ovarianos e corpos lúteos) em roedores (COLLINS et al., 1987; TNP, 1986, 1989). Devido as fêmeas mamíferas possuem número finito de folículos primordiais, compostos químicos que atuem destruindo esses folículos podem causar esterilização (HOYER; SIPES, 1996; MAYER et al., 2002; RAJAPAKSA et al., 2007). Sendo assim, o 4-VCD passou a ser estudado, visto que, havia potencial risco de exposição de mulheres ao composto químico no ambiente industrial, representando potencial risco ocupacional (KAO et al., 1999).

Estudos em roedores, demonstraram que o 4-VCD possui ação ovotóxica seletiva, promovendo dano direto aos folículos primordiais e primários, acelerando o processo natural de atresia ovariana que ocorre por apoptose, culminando em FOP (KAO et al., 1999; KAPPELER; HOYER, 2012; MAYER et al., 2002; SPRINGER et al., 1996). Conforme os folículos primordiais e primários se esgotam, ocorre diminuição na população de folículos para recrutamento, desenvolvimento e ovulação resultando em falência ovariana, infertilidade e interrupção do ciclo estral (BROOKS et al., 2016; LOHFF et al., 2005; MAYER et al., 2002, 2004).

Em roedores, foi visto que após indução da FOP com 4-VCD, a produção de hormônios esteroides ovarianos não diminuem abruptamente e o tecido residual, mantém capacidade esteroidogênica, mimetizando assim, as flutuações hormonais que ocorrem na menopausa humana (CAROLINO et al., 2019; LOHFF et al., 2005; MAYER et al., 2002; PESTANA-OLIVEIRA et al., 2018). À vista disso, ao longo dos anos o composto tem sido utilizado em roedores e primatas, como modelos experimentais de menopausa humana e investigar afecções relacionadas e possíveis intervenções terapêuticas (APPT et al., 2006, 2010; CAO et al., 2020; CAROLINO et al., 2019; KONHILAS et al., 2020; MAYER et al., 2004, 2005).

Para mimetizar a menopausa em roedores, o 4-VCD é administrado em doses baixas (80 ou 160 mg/kg via IP por 15 ou 30 dias em ratas e camundongas). Nessa posologia, demonstra

especificidade pelo tecido ovariano, não causando toxicidade a outros tecidos (BROOKS et al., 2016; LOHFF et al., 2005; MAYER et al., 2004, 2005; WRIGHT et al., 2008).

A ação ovotóxica do composto já foi reportada em diferentes espécies animais, como: macacas (*Macaca fascicularis*) (APPT et al., 2006), hamsters siberianos (*Phodopus sungorus*) e sírios (*Mesocricetus auratus*) (ROOSA et al., 2015a, b), modelos experimentais de roedores (ratas e camundongas) (KAO et al., 1999; MAYER et al., 2002), ratas e camundongas de rua (capturadas) (BURD, 2004; HINDS et al., 2014; PYZYNA et al., 2016; WITMER et al., 2017), entre outras. Recentemente, 4-VCD vem sendo utilizado associado a outro composto com intuito de controlar a população de pragas urbanas, sendo efetivo para o controle da fertilidade e populacional de roedores de rua (WITMER et al., 2017).

### **2.3 4-Vinilciclohexeno diepóxido: mecanismo de ação e toxicidade ovariana**

Com intuito de produzir oócitos maduros para fertilização, folículos ovarianos são ativados a partir da população de folículos primordiais e se desenvolvem para primários, secundários, terciários e pré-ovulatório (LIU et al., 2006). O desenvolvimento e maturação do oócito ocorrem dentro dos folículos ovarianos e, para que a ovulação seja bem-sucedida, é necessário que o folículo passe por todos os estágios de desenvolvimento (HIRSHFIELD, 1991; HOYER; SIPES, 1996). Contudo, a maioria deles não chega até a ovulação e, aproximadamente 99% sofre um processo natural de atresia folicular, via morte celular programada chamada de apoptose (HOYER et al., 2001; MAYER et al., 2004). Ao longo da vida reprodutiva da fêmea, os folículos continuam a crescer, amadurecer, ovular ou sofrer atresia, de forma cíclica, até o fim da vida reprodutiva, quando se esgotam os folículos ovarianos (HOYER; SIPES, 1996; MAYER et al., 2004; RICHARDS, 1980).

O folículo primordial é o estágio mais imaturo do desenvolvimento, sabe-se que ao nascimento a fêmea mamífera possui número finito deles, e os oócitos contidos nesses folículos não podem mais ser gerados (HIRSHFIELD, 1991; MAYER et al., 2002, 2004). Assim, a ativação do folículo primordial e a foliculogênese são mecanismos básicos e necessários para o desenvolvimento de oócitos maduros e função reprodutiva (HUTT et al., 2006).

Para o desenvolvimento e ativação de pequenos folículos pré-antrais (primordiais e primários) a interação entre oócito e células da granulosa são de extrema importância para a ativação dos fatores de crescimento folicular, em especial, o ligante do receptor KIT (KITL). O KITL é um fator de crescimento produzido nas células da granulosa que se conecta ao seu receptor na membrana do oócito, desencadeando uma série de respostas celulares por vias de

sinalização para inibição de apoptose e promoção de sobrevivência celular (Figura 1) (KAPPELER; HOYER, 2012; KAWASHIMA; KAWAMURA, 2018). Por sua vez, o 4-VCD atua comprometendo a ligação do KITL e seu receptor KIT, inibindo a via de sinalização KITL/c-KIT, com isso, ocorre a expressão de proteínas pró-apoptóticas, promovendo morte celular e perda de folículos primordiais e primários (FERNANDEZ et al., 2008; KAPPELER; HOYER, 2012). Outros mecanismos de ovotoxicidade relacionados ao 4-VCD parecem existir, sendo proposto a relação com o estresse oxidativo, resultante do desequilíbrio entre geração de compostos oxidantes e a atuação do sistema de defesa antioxidante (ABOLAJI et al., 2016) porém, não foram completamente elucidados.

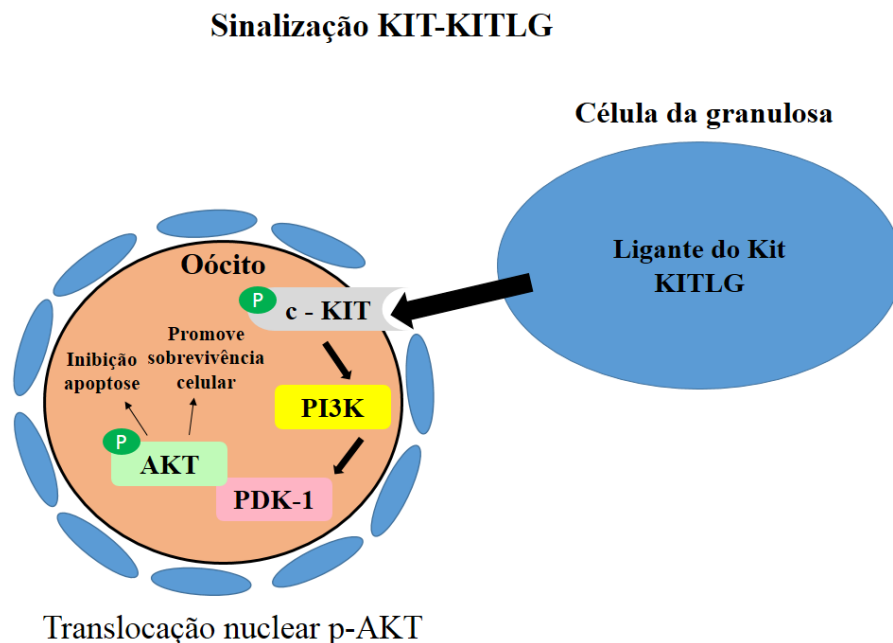


FIGURA 1- Via de sinalização KITL/c-KIT nos folículos primordiais e primários. O ligante KIT (KITL), presente nas células da granulosa liga-se ao seu receptor KIT (c-KIT) na membrana do oócito. Essa interação promove autofosforilação do KIT, ativando a via de sinalização da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K). A PI3K ativa, sinaliza para a proteína quinase dependente de fosfoinositídeos-1 (PDK-1), que fosforila e ativa a proteína quinase AKT (pAKT). A pAKT se transloca para o núcleo e ativa vias importantes inibindo a apoptose e promovendo sobrevivência celular. (Adaptado de KAPPELER; HOYER, 2012).

#### 2.4 4-Vinilciclohexeno diepóxido: posologia e vias de administração

Como qualquer droga, os efeitos colaterais do 4-VCD dependem da dose, frequência, duração do tratamento e via de administração (HOYER et al., 2001; MAYER et al., 2002; ROMERO-ALESHIRE et al., 2009; MUHAMMED et al., 2009). Appt et al. (2006) em um estudo experimental com macacas observaram que o 4-VCD administrado via intramuscular na dose de 80 mg/kg por 15 dias consecutivos não demonstrou efeito ovotóxico enquanto que, nas doses de 160 e 250 mg/kg, a ovotoxicidade aumentou proporcionalmente às dosagens. Sabe-se

que em ratas uma única administração de 4-VCD na dose de 1000 mg/kg via oral, pode ser letal (CHHABRA et al., 1990; ABOLAJI et al., 2016). Já foi relatada ocorrência de tumores ovarianos e de glândulas adrenais em protocolos com administração via oral e doses acima de 800 mg/kg diárias por 24 meses de administração (NTP, 1986, 1989). Contudo, o surgimento de tumores, lesões e efeitos adversos da utilização do 4-VCD são fatos associados à longa exposição ao composto, altas doses e dependentes também da via de administração (ABOLAJI et al., 2016; APPT et al., 2006, 2008; CHHABRA et al., 1990; MUHAMMED et al., 2009; VAN KEMPEN et al., 2011).

De acordo com Brooks et al. (2016), para o 4-VCD ocasionar ovotoxicidade seletiva e promover a FOP, a dose total de exposição animal necessária é cerca de 900 vezes menor que a dose observada para induzir efeitos carcinogênicos ou tóxicos como observado nos estudos de NTP (1986, 1989). A ação ovotóxica do composto já foi reportada em doses menores, como de 40 mg/kg via IP por 30 dias consecutivos (MUHAMMED et al., 2009). Contudo, para indução da FOP, o 4-VCD vem sendo utilizado via IP ou subcutânea, na dose de 80 à 160 mg/kg por 15 ou 30 dias consecutivos (BROOKS et al., 2016; CAROLINO et al., 2019; MAYER et al., 2002; REIS et al., 2014). Nessas doses, frequência e tempo de uso, o 4-VCD é suficiente para promover a FOP, mas não altera as enzimas indicadoras de lesão hepática (ALT e AST), ou marcadores de apoptose no fígado (HU et al., 2001; MAYER et al., 2004; MUHAMMED et al., 2009). Segundo Mayer et al. (2004), o modelo de FOP induzido com 4-VCD não afeta o tecido hepático, avaliado por meio de histopatologia. Em consonância, Wright et al. (2008), não observou efeitos toxicológicos ou patológicos, a curto e longo prazo nas avaliações de rins, glândulas adrenais e pituitária, baço, fígado, pulmões, coração, cérebro e intestinos.

A utilização do 4-VCD pela via oral em ratas na dose de 500 mg/kg por 15 ou 30 dias consecutivos de tratamento, promoveu ovotoxicidade, culminando em diminuição na população de folículos, sem evidências de efeitos adversos, avaliados em até um ano após o término do tratamento (SCHMUKI et al., 2011). No entanto, Muhammed et al. (2009), utilizou o 4-VCD na dose de 160 mg/kg via intramuscular e IP culminaram em efeitos clínicos adversos como letargia, dificuldade de locomoção e dispneia. Nesse mesmo estudo, ao ser realizado necropsia, foi detectado necrose e hemorragia no local da injeção intramuscular, assim como, peritonite difusa nos animais que receberam via IP.

Assim, tanto a dose, quanto a via de administração, parecem influenciar na toxicidade do 4-VCD (APPT et al., 2006, 2008, 2010; BURD, 2014; HINDS et al., 2014; MUHAMMED et al., 2009). A via clássica de uso do composto em animais experimentais é IP, contudo, é uma

via que apresenta riscos por ser muito invasiva e, dependendo da espécie a ser administrada inviabiliza a continuidade do tratamento (MUHAMMED et al., 2009).

Appt et al. (2006) reportaram ovotoxicidade induzida pelo 4-VCD após tratamento via intramuscular por 15 dias consecutivos em macacas (*Macaca fascicularis*). Porém, as doses efetivas foram de 160 e 250 mg/kg, enquanto a dose de 80 mg/kg não surtiu efeito ovotóxico. Apesar do efeito ovotóxico, foi notado inflamação no local de administração do composto, que após oito meses do tratamento persistiu, com área firme de tecido cicatricial local (APPT et al., 2006). Em outro momento, o mesmo protocolo de Appt et al. (2006) foi utilizado porém, o estudo não demonstrou reprodutibilidade, e o insucesso foi atribuído à via de administração e suas complicações (APPT, 2008).

Pela via oral, o uso do 4-VCD já demonstrou ser eficaz em promover ovotoxicidade e comprometer a fertilidade em roedores (ABOLAJI et al., 2016; SCHMUKI et al., 2011; WITMER et al., 2017), porém, no estudo de Burd (2014) notou-se que o 4-VCD via oral foi ineficiente em promover ovotoxicidade no gambá Nova Zelândia. A inefetividade do composto foi relacionada à acidez do pH estomacal dessa espécie. De forma semelhante, Hinds et al. (2014) reportaram a utilização de 4-VCD via oral em camundongas (*Mus domesticus*) capturadas na natureza, visando o controle populacional de pragas. Neste estudo, foi observado ovotoxicidade dose-dependente apenas de folículos primordiais, sendo ineficiente em promover esterilidade e o insucesso foi atribuído a via de administração, dose e tempo de exposição. Assim, além de demonstrar diferentes resultados com diferentes vias de administração, acredita-se que por via oral de 4-VCD exija dose aproximadamente três vezes superior do que a da via IP (HINDS et al., 2014; SCHMUKI et al., 2011).

Contudo, para controle populacional de pragas urbanas e rurais, como ratos de rua (vida livre), foi criado uma isca líquida quimioesterilizante a base de 4-VCD e triptólido chamada de ContraPest®, é disponibilizado como alimento (via oral) e colocada em caixas para livre acesso dos roedores (WITMER et al., 2017). O ContraPest® é eficiente em controlar a fertilidade e com isso, a população de roedores, sendo considerado mais seguro e eficaz que os venenos tradicionais (DYER; MAYER, 2014; WITMER et al., 2017). O composto triptólido prejudica a espermatogênese em machos e o 4-VCD atua comprometendo a fertilidade das fêmeas (PYZYNA et al., 2016; SIERS et al., 2017). Quanto à segurança do produto, é formulado de maneira que não apresenta riscos à saúde humana e outros animais, devido meia-vida curta (5 minutos na corrente sanguínea), não se acumula nos tecidos de animais tratados, é excretado de forma inativa na urina e não persiste no meio ambiente (DYER; MAYER, 2014; SALYERS, 1995). Assim, compreende-se que formulações inovadoras podem viabilizar a utilização do 4-



VCD, melhorando a absorção do composto, diminuindo sua toxicidade, riscos de contato e facilitando a administração.

## **2.5 Citologia vaginal, contagem folicular e função ovariana**

As ratas são poliéstricas, têm ovulação espontânea e os ciclos estrais normalmente são regulares e sucessivos (PACCOLA et al., 2018). O ciclo estral das ratas tem duração média de 4 a 5 dias, é caracterizado por diferentes estágios, sendo eles: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (diestro II) (BHARDWAJ; SARAF, 2014; MARCONDES et al., 2002). Os hormônios esteroides sexuais produzidos no ovário determinam os diferentes estágios do ciclo estral e são, fundamentais para a manutenção da função reprodutiva (BINDER et al., 2015; MCLEAN et al., 2012). As mudanças nos diferentes estágios do ciclo refletem principalmente as mudanças nos níveis de estradiol e progesterona, secretados pelos folículos ovarianos e corpos lúteos, respectivamente (BINDER et al., 2015; MCLEAN et al., 2012). O proestro inclui o crescimento de folículos e mudanças nos tecidos vaginais e uterinos, no estro ocorre a ovulação, metaestro e diestro correspondem a fase lútea (BHARDWAJ; SARAF, 2014).

O epitélio da mucosa vaginal é altamente sensível aos hormônios esteroides produzidos nos ovários, o estrogênio estimula proliferação e queratinização do epitélio escamoso do lúmen. A progesterona exerce efeito contrário sobre esse tecido, diminuindo a quantidade de células queratinizadas (LI; DAVIS, 2007). Essas mudanças na mucosa vaginal são usadas para estimar os diferentes estágios do ciclo estral e avaliar a função reprodutiva da fêmea, pois a citologia vaginal além de retratar a função ovariana, está relacionada concentrações circulantes de esteroides sexuais e gonadotrofinas (BINDER et al., 2015; GOLDMAN et al., 2007; PACOLLA et al., 2018). Além disso, é uma análise rápida e prática. Em roedores, a citologia vaginal é usada como marcador da ciclicidade reprodutiva (GOLDMAN et al., 2007; HOYER; SIPES, 1996).

As fases do ciclo são determinadas pela proporção de tipos celulares: células epiteliais (nucleadas), cornificadas (anucleadas) e leucócitos, observados na citologia vaginal após coloração ou à fresco (Figura 2) (CORA et al., 2015; GOLDMAN et al., 2007; MARCONDES et al., 2002). Para tal, o proestro é caracterizado pelo predomínio de células epiteliais (nucleadas), a fase de estro é marcada pela queratinização do epitélio, com o predomínio de células cornificadas (anucleadas). O metaestro consiste na mesma proporção celular de leucócitos, células epiteliais (nucleadas) e cornificadas (anucleadas) diferentemente da fase de

diestro, que apresenta o predomínio de leucócitos (MARCONDES et al., 2002; GOLDMAN et al., 2007).

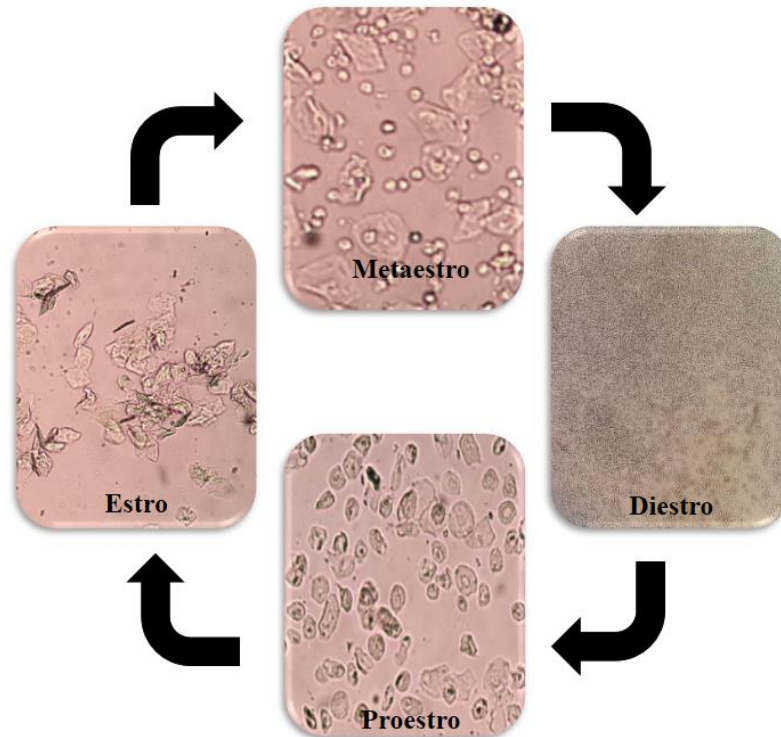


FIGURA 2 – Fotomicrografias do lavado/citologia vaginal não corados de ratas no proestro, estro, metaestro e diestro, observado em microscópio óptico, com lentes objetivas de 10 e 40x. Para tal, são avaliados as proporções de três tipos celulares para definir o estágio do ciclo estral. Cada fase do ciclo estral está identificada na imagem: Proestro - notar predomínio de células epiteliais; Estro - apresenta predomínio de células cornificadas; Metaestro - mesma proporção de células cornificadas, epiteliais e leucócitos; Diestro - predomínio de leucócitos.

Sabe-se que compostos tóxicos para os folículos ovarianos podem promover danos perceptíveis na ciclicidade (GOLDMAN et al., 2007). O 4-VCD por ser tóxico aos pequenos folículos pré-antrais e resultar na depleção folicular, acaba afetando a ciclicidade em ratas (FLAWS et al., 1994; MAYER et al., 2002) e camundongas (LOHFF et al., 2005), ocasionando fases prolongadas do ciclo estral e posteriormente, a interrupção do ciclo (MAYER et al., 2002). A insuficiência ovariana causada pelo 4-VCD caracterizada por depleção na população folicular, pode ser avaliada por meio de contagem folicular e análise do ciclo estral (BROOKS et al., 2016; HAAS et al., 2007; MAYER et al., 2002).

A quantificação da população de folículos ovarianos em diferentes estágios do desenvolvimento fornece informações relevantes sobre a função do ovário, principalmente a relação entre foliculogênese e fatores que a regulam, tornando-se ferramenta chave para monitorar a função ovariana (MYERS et al., 2004). A avaliação folicular por cortes histológicos do ovário, permite análise quantitativa (contagem folicular) e qualitativa (sua classificação em

saudáveis ou atrésicos) dos folículos, indicando o potencial reprodutivo do animal (KAO et al., 1999; MYERS et al., 2004; USLU et al., 2017).

Alterações sutis já foram detectadas no ciclo estral de ratas tratadas com 4-VCD nos primeiros 30 dias de tratamento na dose de 80 mg/kg, via IP (FLAWS et al., 1994), período em que é observado de forma significativa a diminuição da população de folículos primordiais e primários (MAYER et al., 2002). Foi reportado que o início da perda da população de folículos primordiais e primários de forma significativa em ratas tratadas com 4-VCD, foi com 12 dias de tratamento (KAO et al., 1999), mesmo período em que Flaws et al. (1994) notaram de maneira precoce, irregularidades no ciclo estral de ratas tratadas com o composto. Em consonância Lee et al. (2017) detectou ciclo estral prolongado, por persistir a fase de diestro em ratas tratadas com 4-VCD com dose de 40 mg/kg no início do tratamento, mesmo período em que nota-se o início da depleção de folículos primordiais e primários (SPRINGER et al., 1996; MAYER et al., 2002).

Embora esses achados sejam relevantes, Mayer et al. (2002) reportaram que a falência ovariana total ocorre aproximadamente com 360 dias após o início do tratamento com 4-VCD, até então, uma sequência de eventos é necessária. Mayer et al. (2002) reportaram a dinâmica da falência ovariana desencadeada pelo 4-VCD, de forma sequencial, ocorre a diminuição na população de pequenos folículos pré-antrais e, posteriormente, diminui a população de folículos antrais. Sendo assim, diminui o número de folículos que sintetizam  $17\beta$ -estradiol, resultando em aumento das concentrações de FSH circulante, refletindo alterações no ciclo estral (MAYER et al., 2002). Assim sendo, nota-se a importância da associação das duas ferramentas para levantar informações e analisar a função reprodutiva da fêmea.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do gel intravaginal contendo 4-VCD sobre os ovários de ratas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Comparar quantitativa e qualitativamente os folículos primordiais e primários entre os grupos tratado e controle;

Comparar a ciclicidade ovariana entre os grupos durante e após o tratamento;

Descrever quaisquer achados eventuais relacionados ao tratamento com o 4-VCD;

Determinar se o gel contendo 4-vinilciclohexeno diepoxido, na posologia adotada, tem ação quimioesterilizante.

#### **4 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados em forma de artigo. As seções Material e Métodos, Resultados e Discussão dos Resultados encontram-se no próprio manuscrito. O artigo será submetido para revista *Theriogenology*, após tradução, possíveis correções e normatização de acordo com a revista.

**Influência do 4-vinilciclohexeno diepóxido via intravaginal sobre os folículos ovarianos e ciclo estral de ratas**

Endreo Alan Pail dos Santos<sup>a</sup>, Etiele Maldonado Gomes<sup>a</sup>, Sandra Haas<sup>b</sup>, Maria Elisa Trost<sup>c</sup>, Francielli Weber Santos Cibirin<sup>d</sup>, Ana Claudia Funguetto Ribeiro<sup>b</sup> & Maria Ligia de Arruda Mestieri<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Aluno Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa-HUVet, Uruguaiana, RS, Brasil, CEP 97500-970

<sup>b</sup>Laboratório de Farmacologia-LABFAR, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil, CEP 97500-970

<sup>c</sup>Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Pampa-HUVet, Uruguaiana, RS, Brasil, CEP 97500-970

<sup>d</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil, CEP 97500-970

<sup>e</sup>Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, Universidade Federal do Pampa- HUVet, Uruguaiana, RS, Brasil, CEP 97500-970

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do 4-vinilciclohexeno diepóxido sobre os ovários e seu potencial quimioesterilizante, por inoculação de gel intravaginal em ratas. Foram utilizadas 20 ratas Wistar, aleatoriamente divididas em dois grupos (n=10/grupo): controle e tratamento. O grupo controle recebeu 0,2 mL de gel à base de quitosana e o tratamento recebeu mesmo gel, contendo 4-vinilciclohexeno diepóxido (160 mg/kg), por 15 dias. As ratas foram avaliadas diariamente por citologia vaginal até eutanásia. Os animais foram eutanasiados em dois momentos (n=5/grupo): 16 (M1) e 30 (M2) dias após início do tratamento. Os ovários foram coletados, preparados e avaliados por microscopia óptica para contagem de folículos primordiais e primários e sua classificação. No grupo tratado com 4-vinilciclohexeno diepóxido, notou-se prolongamento da fase de diestro (M1 e M2), bem como, prolongamento da fase de estro (M2), após inoculações do gel intravaginal. Ainda, no grupo tratado, houve diminuição no número de ciclos estrais em relação ao grupo controle (M1 e M2). Na contagem folicular, notou-se maior média de folículos primordiais atrésicos no grupo tratado em M2. A avaliação folicular em M1 e M2, revelou maior proporção de folículos primordiais saudáveis no grupo controle, assim como, aumento na proporção de folículos primordiais atrésicos no grupo tratado. Portanto, foi possível observar a ação ovotóxica do gel de quitosana contendo 4-vinilciclohexeno diepóxido, via intravaginal, pelo aumento da população e proporção de folículos primordiais atrésicos e da interferência no ciclo estral, sugerindo que períodos mais longos de exposição possam promover esterilidade em ratas.

Palavras-chave: 4-vinilciclohexeno diepóxido. Quimioesterilização. Castração química. Ovotoxicidade. Atresia folicular.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of 4-vinylcyclohexene diepoxide on ovaries and their chemosterilizing action, by intravaginal gel inoculation in rats. Twenty Wistar rats were randomly divided into two groups (n=10/group): control and treatment. The control group received 0.2 mL of chitosan-based gel and the treatment group received chitosan-based gel containing 4-vinylcyclohexene diepoxide (160 mg/kg), for 15 days. The rats were evaluated daily by vaginal cytology until euthanasia. The animals were euthanized in two moments (n=5/group): 16 (M1) and 30 (M2) days after starting treatment. The ovaries were collected, prepared and evaluated by optical microscopy to count and classify primordial and primary follicles. In the group treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide, prolongation of diestrus phase (M1 e M2) and, of estrus phase (M2), were noted, after inoculations of intravaginal gel. Moreover, in the treated group, there was a decrease in the number of estrous cycles compared to the control group (M1 e M2). In the follicular count, there was a higher mean of primordial atretic follicles in the treated group (M2). Follicular evaluation showed a higher proportion of healthy primordial follicles in the control group (M1 and M2), with an increase in the proportion of primordial atretic follicles in the treated group. Herein, was possible to observe the ovotoxic effect of chitosan-based gel containing 4-vinylcyclohexene diepoxide, intravaginally, by increase in population and proportion of primordial atretic follicles and interference in the estrous cycle, suggesting that longer periods of exposure may promote sterility in female rats.

Keywords: 4-vinylcyclohexene diepoxide. Chemosterilization. Chemical castration. Ovotoxicity. Follicular atresia.



## INTRODUÇÃO

O 4-vinilciclohexeno diepóxido (4-VCD), é um composto químico que promove ovotoxicidade seletiva de folículos primordiais e primários, acelerando o processo natural de atresia folicular e com isso, a esterilidade (KAO et al., 1999; MAYER et al., 2002; SPRINGER et al., 1996). A injeção intraperitoneal (IP) diária de 4-VCD na dose de 160 mg/kg por 15 dias em ratas e camundongas é utilizada na promoção de falha ovariana, como modelo experimental da menopausa humana (CAROLINO et al., 2019; HOYER; MAYER, 2009; MAYER et al., 2004; REIS et al., 2014).

A ação ovotóxica do 4-VCD foi reportada em diferentes espécies e já foi obtida por diferentes vias além da intraperitoneal: intramuscular em primatas (APPT et al., 2006), oral para controle populacional de roedores selvagens/vida livre (BURD, 2014; PYZYNA et al., 2016; WITMER et al., 2017) e subcutânea em ratas Wistar e Sprague Dawley (ARIKAWA et al., 2019; REIS et al., 2014). Apesar de o 4-VCD apresentar grande potencial ovotóxico, nota-se que a eficácia quimioesterilizante é influenciada pela via de administração (BURD, 2014) e vias como oral e intramuscular apresentaram relatos de complicações ou baixa eficácia. Ainda a via IP é considerada invasiva, podendo ter complicações como perfuração de órgãos abdominais, peritonite química, aderências, hemorragias e infecções (MUHAMMAD et al., 2009; TURNER et al., 2011).

Assim, com vistas à expansão dos estudos no efeito ovotóxico do 4-VCD e vislumbrando sua futura aplicação ao controle populacional de outras espécies, o desenvolvimento de formulação que permita absorção e efeito ovotóxico do agente, por via menos invasiva e mais segura é importante. O presente trabalho visa avaliar o efeito do uso de gel intravaginal contendo 4-VCD em ratas sobre os folículos ovarianos e ciclo estral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizadas 20 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Santa Maria, Brasil. As ratas foram aclimatadas pelo período de 15 dias e mantidas em caixas adequadas à espécie (5 animais/caixa), com ração e água *ad libitum*, ambiente climatizado ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas cada). Durante o período de aclimação, os animais foram condicionados à manipulação e colheita de citologia vaginal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA sob protocolo 020/2018.

### Gel intravaginal

O gel de quitosana 2,5 % (p/v)<sup>1</sup> foi preparado a partir de mistura manual, com gral e pistilo, de quitosana e água destilada acidificada com ácido láctico 1%<sup>2</sup>. O homogeneizado foi deixado em repouso por, aproximadamente 12h, sob refrigeração. Para o grupo tratamento, o composto químico 4-VCD foi incorporado vagarosamente, com gral e pistilo, ao gel base, resultando na concentração final de 160 mg/g de 4-VCD<sup>3</sup>.

### Grupos experimentais

Os animais foram igual e aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais, de acordo com o tratamento recebido: controle (GC) e tratamento com gel de 4-VCD; e momento de eutanásia: 16 (M1) ou 30 (M2) dias após início do tratamento. Previamente ao estudo, foi investigado a volumetria vaginal adequada para inoculação intravaginal de gel à base de quitosana para que não houvesse extravasamento do mesmo, sendo este, estabelecido como 0,2 mL (dados não mostrados). Diariamente as ratas foram submetidas à inoculação intravaginal em mesmo horário pela manhã de 0,2 mL de gel durante 15 dias. Os animais do grupo controle

---

<sup>1</sup> Quitosana (médio peso molecular, grau de desacetilação 87.5 % - Sigma-Aldrich);

<sup>2</sup> Ácido láctico (grau de pureza 85-90 % - Vetec);

<sup>3</sup> 4-VCD (SigmaAldrich - St. Louis, MO, EUA).

receberam 0,2 mL de gel à base de quitosana sem nenhum princípio ativo e os animais do grupo tratamento, 0,2 mL de gel à base de quitosana na dose 160 mg/kg de 4-VCD (~ 32 mg/rata).

### **Avaliação do ciclo estral**

As ratas foram submetidas à avaliação do ciclo estral, diariamente, desde o primeiro dia do início dos tratamentos. Para isso, eram realizados lavados vaginais em mesmo horário, previamente a inoculação do gel. Os lavados eram feitos por meio de colocação e resgate de 10 µl de solução salina e imediata avaliação citológica por meio de microscopia óptica (40x) de acordo com protocolo e classificação estabelecido por Goldman et al., (2007) e Marcondes et al., (2002). Os estágios do ciclo estral foram classificados como proestro, estro e diestro (1 e 2) com base na predominância dos tipos celulares (GOLDMAN et al., 2007). Para cada grupo, foram contabilizados e somados o número de dias em cada fase do ciclo estral de cada rata, para posterior determinação da média. Os dados foram comparados entre o GC e 4-VCD em M1 e M2. O número de ciclos estrais de cada rata/grupo foram somados e, determinada a média de ciclos/grupo e comparados entre o GC e 4-VCD nos dois momentos do estudo (M1 e M2). O ciclo estral foi classificado quanto ao seu período de extensão de acordo com Goldman et al. (2007), e episódios consecutivos de  $\geq 4$  dias de diestro e  $\geq 3$  dias de estro foram considerados anormais/ciclos irregulares.

### **Contagem folicular**

Após eutanásia, os ovários coletados foram fixados em formalina 10%, processados e emblocados em parafina. As lâminas foram montadas em cortes de 3,5 µm de espessura com intervalos de 40 µm entre cada, evitando contagem múltiplas do mesmo folículo (BERNAL et al., 2010). As três primeiras lâminas de cada ovário foram avaliadas. Em cada lâmina os folículos (primordiais e primários) contendo núcleo no oócito eram classificados em primordiais (oócitos cercados por uma única camada de células da granulosa achatadas) e primários (oócitos cercados por uma única camada de células cuboidais) (BERNAL et al., 2010; PAIXAO et al., 2016; SPRINGER et al., 1996). A qualidade folicular foi avaliada de acordo com Kao et al. (1999) e Springer et al. (1996), para classificação em folículos atrésicos ou saudáveis. Todas lâminas foram analisadas com microscópio óptico (40 e 100x) por três avaliadores em consenso, de forma cega. O número de folículos primordiais e primários saudáveis e atrésicos foram contabilizados e somados em cada rata/grupo, esses valores foram

somados e estabelecido a média de cada grupo. Com isso, os GC e 4-VCD foram comparados em M1 e M2.

### **Eutanásia**

Para a colheita dos ovários, os animais foram submetidos à eutanásia em dois momentos distintos: M1 no 16º dia de experimento, 24h após última inoculação do gel intravaginal, com 10 animais (sendo cinco ratas do GC e cinco do grupo 4-VCD); e M2, no 30º dia de experimento, ou seja, 15 dias após o término do tratamento, também com 10 animais (sendo cinco ratas do GC e cinco do grupo 4-VCD). A eutanásia foi realizada com sobredosagem de propofol IP e, após anestesia, cloreto de potássio IV. Após a realização das eutanásias, os ovários foram colhidos para contagem folicular.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos dos diferentes estágios de cada fase e número de ciclos estrais assim como, o número de folículos primordiais e primários saudáveis e atrésicos foram analisados estatisticamente por meio de GraphPad Prism version 5.00 (Graphpad Software, San Diego, EUA) e expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As comparações foram realizadas entre os GC e 4-VCD de acordo com o momento da eutanásia (M1 e M2). As diferenças entre GC e 4-VCD foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Devido ao número de amostras por grupo ser relativamente pequeno, os dados foram analisados por meio de teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Para cada grupo, em cada momento (M1 e M2), foram computados o número total de folículos, determinada a proporção (percentagem) para cada fase folicular e feito de proporções por meio do Minitab Inc. (Software, versão 18.1). Para o teste de proporção, considerou-se como base o intervalo de confiança de 95%, as diferenças significativas foram consideradas quando  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Efeitos do 4-VCD na análise do ciclo estral

Em M1, o grupo 4-VCD apresentou menores fases de proestro e maiores fases de diestro ( $P < 0,05$ ) em relação ao GC (Tabela 1). O número de ciclos estrais foi menor no grupo 4-VCD quando comparado ao GC ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). Das ratas do grupo 4-VCD em M1, 100% delas apresentaram ciclo estral anormal, com prolongamento da fase de diestro (dados não mostrados).

Tabela 1 - Comparação do número de dias de cada fase do ciclo estral e do número de ciclos estrais no GC e grupo tratado com 4-VCD em dois momentos distintos (M1= dia 16; M2= dia 30). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, n = 5.

Momento	Grupos	Proestro	Estro	Diestro	Nº de ciclo estral
M1	GC	5,400 $\pm$ 1,673	4,600 $\pm$ 1,673	5,000 $\pm$ 0,7071	2,600 $\pm$ 0,5477
	4-VCD	1,400 $\pm$ 1,140	2,800 $\pm$ 1,304	10,80 $\pm$ 1,304	1,000 $\pm$ 1,000
	<b>P valor</b>	0,0119*	0,1105	0,0112*	0,0290*
M2	GC	7,000 $\pm$ 1,581	9,600 $\pm$ 2,302	13,40 $\pm$ 2,966	4,600 $\pm$ 1,817
	4-VCD	3,000 $\pm$ 0,7071	7,800 $\pm$ 2,387	19,20 $\pm$ 3,768*	2,400 $\pm$ 0,8944
	<b>P valor</b>	0,0079*	0,2463	0,0362*	0,0459*

\*  $P < 0,05$ . A significância estatística foi determinada por meio do teste Mann-Whitney.

Em M2 notou-se diminuição da fase de proestro e aumento do número de dias em diestro do grupo 4-VCD quando comparado ao GC ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). No mesmo momento (M2), o grupo 4-VCD apresentou número significativamente ( $P < 0,05$ ) menor de ciclos estrais quando comparado ao grupo controle (Tabela 1). Ainda, uma rata do GC apresentou ciclo estral anormal, com prolongamento do diestro (durante o período de tratamento). Já no grupo 4-VCD, 100% das ratas apresentaram ciclo estral classificado como anormal, com prolongamento da fase de diestro durante o tratamento, e quatro apresentaram estro alongado nos 15 após o tratamento (dados não mostrados).

### Contagem folicular

Em M1, com relação à contagem global de folículos primordiais e primários saudáveis e atresícos (Figura 1), não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre o GC e o grupo 4-VCD (Tabela 2). Todavia, foi detectado diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre GC e grupo 4-VCD

com relação às proporções de folículos primordiais saudáveis e atresicos (Tabela 3). Neste momento, notou-se maior proporção de folículos primordiais saudáveis no GC quando comparado ao grupo 4-VCD ( $P = 0,004$ ; sendo, 21% de folículos primordiais saudáveis GC e 9% de folículos primordiais saudáveis grupo 4-VCD). Em mesmo momento, notou-se maior proporção de folículos primordiais atresicos no grupo 4-VCD em relação ao GC ( $P = 0,039$ ; sendo, 35% de folículos primordiais atresicos GC e 46% de folículos primordiais atresicos grupo 4-VCD).

Com relação à comparação entre proporção de folículos primários saudáveis e atresicos, não foi detectada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 3).

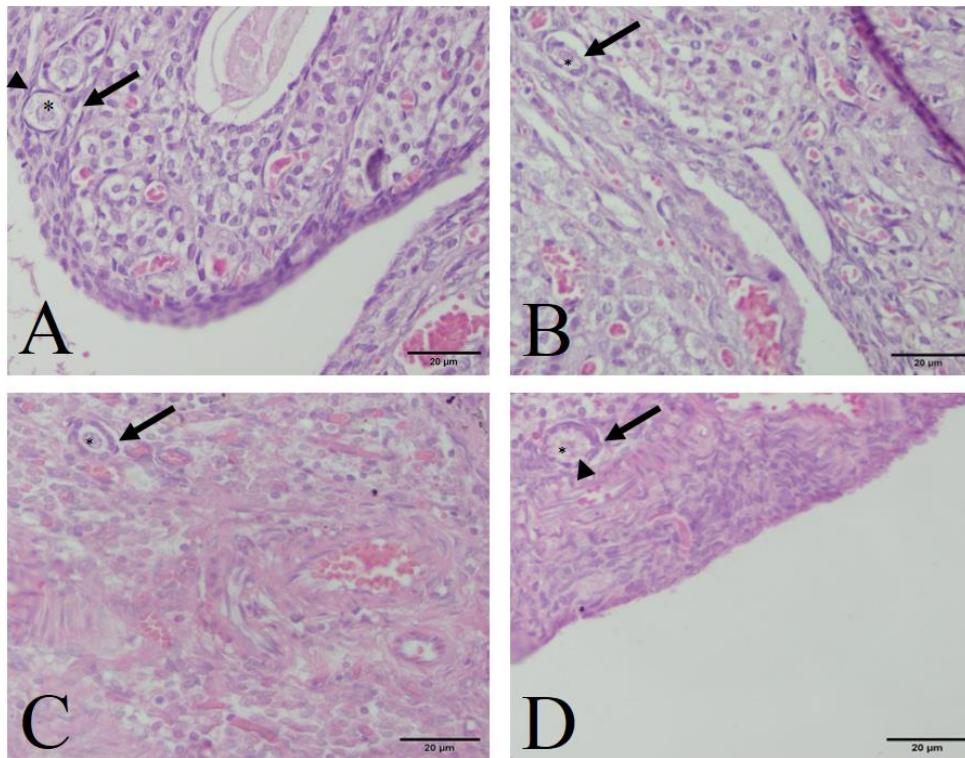


FIGURA 1 - Fotomicrografia de seções de ovários (magnificação de 40x) corados com hematoxilina e eosina. A) Amostra do grupo controle, em M1. Nota-se pequenos folículos primordiais saudáveis agrupados na região cortical do tecido ovariano (seta). Notar disposição das células da granulosa com formato achatado (ponta de seta) circundando o oócito. Contorno nuclear do oócito bem delimitado e com formato circular (\*). B) Amostra do grupo 4-VCD em M1. Folículo primordial atresico, notar encolhimento do oócito e células da granulosa com perda de contato com o estroma ovariano (seta). Ainda, nota-se núcleo do oócito contraído e formato irregular (\*). C) Amostra do grupo controle em M1. Notar folículo primário saudável (seta), circundado por uma camada de células da granulosa em formato cuboidal. O folículo apresenta disposição uniforme das células da granulosa, assim como, núcleo em formato circular e contornos regulares (\*). D) Amostra do grupo 4-VCD em M1. Notar folículo primário atresico (seta), com citoplasma do oócito com aspecto granular e perda de contato focal entre células da granulosa e oócito (ponta de seta). Notar contorno nuclear irregular com encolhimento do mesmo (\*).

Tabela 2 - Comparação da contagem global de pequenos folículos pré-antrais saudáveis e atrésicos no GC e grupo tratado com 4-VCD em dois momentos distintos (M1= dia 16; M2= dia 30). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, n = 5.

<b>Tempo</b>	<b>Grupos</b>	<b>Primordiais</b>	<b>Primários</b>	<b>Primordiais Atrésicos</b>	<b>Primários Atrésicos</b>
<b>M1</b>	<b>GC</b>	5,600 $\pm$ 3,209	1,400 $\pm$ 2,074	9,200 $\pm$ 5,357	10,20 $\pm$ 5,167
	<b>4-VCD</b>	2,400 $\pm$ 2,074	1,000 $\pm$ 1,000	11,40 $\pm$ 4,879	10,20 $\pm$ 7,294
	<b>P valor</b>	0,1161	1,0000	0,4633	0,8340
<b>M2</b>	<b>GC</b>	5,000 $\pm$ 3,464	1,000 $\pm$ 1,225	7,800 $\pm$ 1,095	12,80 $\pm$ 8,983
	<b>4-VCD</b>	2,600 $\pm$ 2,793	0,4000 $\pm$ 0,8944	13,80 $\pm$ 5,762	14,80 $\pm$ 7,563
	<b>P valor</b>	0,3398	0,3447	0,0112*	0,6905

\*  $P < 0,05$ . A significância estatística foi determinada por meio do teste Mann-Whitney.

Em M2, o número de folículos primordiais saudáveis, primários atrésicos e saudáveis não apresentou diferença estatística ( $P > 0,05$ ) comparando GC e grupo 4-VCD. Notou-se que, o número de folículos primordiais atrésicos foi maior no grupo 4-VCD comparado ao GC, com diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2). Foi observado que o GC apresentou maior proporção de folículos primordiais saudáveis ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo 4-VCD ( $P = 0,004$ ; sendo, 19% de folículos primordiais saudáveis GC e 8% de folículos primordiais saudáveis grupo 4-VCD) (Tabela 3).

Nesse mesmo momento, a proporção de folículos primordiais atrésicos foi maior no grupo 4-VCD comparado ao GC ( $P = 0,005$ ; sendo, 29% de folículos primordiais atrésicos GC e 44% de folículos primordiais atrésicos grupo 4-VCD) (Tabela 3). Com relação à proporção de folículos primários saudáveis e atrésicos, não foi detectado diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ) na comparação entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da proporção de pequenos folículos pré-antrais saudáveis e atrésicos no GC e grupo tratado com 4-VCD em dois momentos distintos (M1= dia 16; M2= dia 30). Os valores são expressos em número de folículos fase/total de folículos contabilizados por grupo em cada momento e em percentagem, n = 5.

	M1		M2	
	Controle	4-VCD	Controle	4-VCD
<b>Primordiais Saudáveis</b>	28/132	12/125	25/133	13/158
<b>%</b>	21%	9%	19%	8%
<b>P Valor</b>	0,004*		0,004*	
<b>Primordiais Atrésicos</b>	46/132	57/125	39/133	69/158
<b>%</b>	35%	46%	29%	44%
<b>P Valor</b>	0,039*		0,005*	
<b>Primários Saudáveis</b>	7/132	5/125	5/133	2/158
<b>%</b>	5%	4%	4%	1%
<b>P Valor</b>	0,31		0,092	
<b>Primários Atrésicos</b>	51/132	51/125	64/133	74/158
<b>%</b>	39%	41%	48%	47%
<b>P Valor</b>	0,362		0,587	

\*  $P < 0,05$ . A significância estatística foi determinada por meio do teste das proporção.

### Outros achados

No GC, o gel intravaginal à base de quitosana, foi utilizado no volume de 0,2mL, volume suficiente para preenchimento de toda cavidade vaginal das ratas sem ser notado extravasamento do mesmo, nem sinais de inflamação (eritema, edema, dor e rubor), em 100% das ratas do GC (10/10). Entre 22-24 horas após a aplicação do gel, foram realizadas citologia vaginal, não havendo interferências do gel para realização das análises.

No grupo 4-VCD, uma rata apresentou no 15º dia de inoculação de gel intravaginal, a presença de exsudato serosanguinolento (Figura 2A) na vulva, sem mais alterações clínicas ou comportamentais. No 16º dia de experimento, dia de eutanásia em M1, a mesma, apresentou exsudato sanguinolento (Figura 2B). Vale ressaltar que o exsudato não tinha odor. Essa rata foi submetida à eutanásia com as demais ratas do mesmo grupo em M1. Após eutanásia, durante a exploração abdominal de maneira macroscópica, foi notado no corpo e corno uterino direito a presença de estruturas com aspectos císticos (Figura 2C). O corpo e corno uterino direito apresentavam-se edemaciados, com vasos congestionados e aspecto hemorrágico. Entre as demais ratas do experimento, nenhuma apresentou alterações dignas de nota.



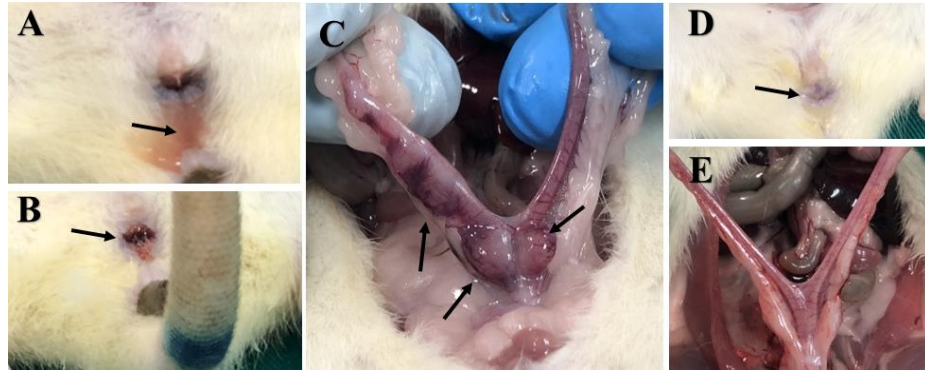


FIGURA 2 - Imagem de duas ratas durante o processo de exploração macroscópica e coleta de tecidos para análise. Imagens A, B e C rata grupo tratamento em M1. Imagens D e E rata controle em M1. Ambos animais estavam em mesma fase de ciclo estral. A) Rata apresentando exsudato serosanguinolento na vulva e região perineal (seta), no 15º dia de inoculação de gel intravaginal; B) Rata apresentando secreção sanguinolenta na vulva pelo segundo dia consecutivo, 16º dia de experimento (M1); C) Corpo e corno uterino direito de rata no momento de eutanásia e exploração macroscópica em M1, apresentando estruturas com aspectos císticos (setas), vasos congestionados, assim como, tecido com regiões edemaciadas; D) Rata em M1, momentos antes da eutanásia. Apresentando região perineal livre de exsudatos e com aparência saudável (seta); E) Corpo e cornos uterinos saudáveis macroscopicamente de rata do grupo controle em M1.

## DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que a utilização do 4-VCD via IP em roedoras, promoveu ovotoxicidade seletiva, depleção folicular, falha ovariana pré-matura e alterações no ciclo estral (FLAWS et al., 1994; KAO et al., 1999; MAYER et al., 2002). O início da ovotoxicidade foi evidenciado após 10 dias de tratamento com o 4-VCD via IP (SPRINGER et al., 1996), detectado pelo aumento na população de folículos primordiais atrésicos e, a partir do 12º dia de tratamento, é detectado diminuição significativa na contagem de folículos primordiais e primários saudáveis (KAO et al., 1999; SPRINGER et al., 1996). No presente estudo, ao avaliar a ovotoxicidade do 4-VCD por uma via menos invasiva que a IP, notou-se que o uso do 4-VCD intravaginal, utilizando gel de quitosana como veículo, promoveu toxicidade apenas aos folículos primordiais e afetou o ciclo estral de ratas tratadas. Contudo, não promoveu esterilidade durante o período de estudo, sugerindo que a ação do 4-VCD pela via intravaginal não ocorra em mesma intensidade que pela via IP, porém, mostrou-se ser promissora, tendo em vista, a quimioesterilização.

Primeiramente, a quitosana é um polímero natural e foi escolhido para o desenvolvimento do gel, por apresentar boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e fácil absorção (VALENTA, 2005). Para inoculação, o gel intravaginal contendo 4-VCD a base de quitosana foi facilmente expelido e aplicado, com volume de administração de 0,2mL, mostrando boa característica muco-adesiva e retenção local. Essas características enaltecem sua utilização já que, o gel a base de quitosana (carga positiva) realiza interações eletrostáticas com o muco vaginal (carga negativa), assim, permitindo boa muco-adesão e permanência local garantindo liberação do fármaco (ANDERSEN et al., 2015; ŞENYİĞİT et al., 2014). Além disso, o gel possui propriedades antibacterianas (LUDWIG, 2005). Ainda, 24 horas após a aplicação do composto, foi possível realizar lavados vaginais sem resíduos do gel ou interferências na análise citológica vaginal. Em vista disso, o gel a base de quitosana aparentou ser um meio adequado de entrega do 4-VCD pela via intravaginal.

Com relação às observações relacionadas ao ciclo estral, sabe-se que ratas tratadas com compostos nocivos ao aparelho reprodutor, podem apresentar períodos de estro ou diestro alongados em cada ciclo ( $\geq 4$  dias de diestro e  $\geq 3$  dias de estro), ocasionando ciclos estrais de longa duração (GOLDMAN et al., 2007). No presente estudo, a avaliação do ciclo estral mostrou que as ratas do grupo 4-VCD nos dois momentos (M1 e M2) apresentaram ciclo

classificado como anormal, com maior número de dias em diestro. Com isso, foi notado prolongamento do ciclo estral e menor número de ciclos em relação ao GC. Esses achados corroboram com achados de trabalhos que, utilizaram 4-VCD em doses de 40 e 80 mg/kg via IP em ratas que apresentaram irregularidades no ciclo estral no início do tratamento, caracterizado pelo prolongamento de dias em fase de diestro e assim, também menor número de ciclos estrais em determinado período (FLAWS et al., 1994; LEE et al., 2017; TRAN et al., 2018). Essas alterações passam a ser observadas nos primeiros 30 dias de tratamento, a partir do terceiro ciclo estral (FLAWS et al., 1994; LEE et al., 2017). A longo prazo, Mayer et al. (2002) observaram que a ciclicidade é interrompida com 360 dias após o início do tratamento com 4-VCD, após o esgotamento de folículos antrais. No presente estudo, devido ao curto período de avaliação proposta, não foi possível determinar se a mesma evolução aconteceria com o uso do 4-VCD em gel intravaginal, mesmo assim, já foi possível perceber a interferência na ciclicidade mesmo com um período de avaliação curta, justificando estudos futuros que incluam avaliação a longo prazo.

Ainda, notou-se que, uma das ratas pertencente ao grupo 4-VCD (1/10), manifestou sinais de inflamação no útero e vagina em M1, notados macroscopicamente durante a coleta de dados. É sabido que insultos à mucosa vaginal podem desencadear resposta inflamatória local, e leucócitos podem ser encontrados nos lavados vaginais em até 48 horas após o evento, e assim, mimetizar a fase de diestro e confundir a avaliação da citologia vaginal por até 14 dias (GOLDMAN et al., 2007; MCLEAN et al., 2012; SARWAL et al., 2019; YANO et al., 2010). Embora sinais claros de inflamação vaginal não tenham sido evidenciados nos demais animais do grupo tratado (9/10), possível interferência do gel contendo 4-VCD na resposta inflamatória local não foi totalmente excluída, podendo ter inferido nas análises do ciclo estral em M1. O 4-VCD possui características corrosivas que causam insultos aos tecidos de inoculação; casos de inflamação de mucosas, pele, músculos e outros órgãos já foram observados (APPT et al., 2006, 2008; CHHABRA et al., 1990; DYER et al., 2013; MARONPOT, 1987; MUHAMMAD et al., 2009; WEIL et al., 1963). Porém, para confirmar essa hipótese, estudos mais aprofundados que incluam avaliação histopatológica dos tecidos envolvidos são necessários para maiores conclusões. Todavia, é importante ressaltar que 80% das ratas do grupo 4-VCD mantiveram os ciclos irregulares em M2 após a suspensão das inoculações do gel, caracterizados por períodos de estro prolongado e menor número de ciclos estrais.

Curiosamente, as irregularidades no ciclo estral detectadas no início do tratamento com 4-VCD parecem estar relacionadas ao início da ovotoxicidade do 4-VCD aos pequenos folículos pré-antrais. Visto que, o prolongamento de fases do ciclo estral ocorre paralelamente

a diminuição da população de folículos saudáveis e o aumento do número de folículos atrésicos (FLAWS et al., 1994; KAO et al., 1999; LEE et al., 2017; SPRINGER et al., 1996; TRAN et al., 2018).

Sabe-se que os danos foliculares causados pelo 4-VCD em ratas, iniciam após 10 dias de administração IP na dose de 80 mg/kg, constatados pela degradação de DNA do oócito, sem que haja ainda, perda significativa no número de folículos primordiais e primários (SPRINGER et al., 1996); e com 12 a 15 dias de tratamento IP com o 4-VCD na dose citada, é detectada a diminuição significativa na contagem global de folículos primordiais e primários (KAO et al., 1999; SPRINGER et al., 1996). Porém, no presente trabalho observou-se que um dia após o término do tratamento intravaginal com 4-VCD (M1) não foi possível detectar diferença significativa no número de folículos saudáveis ou atrésicos entre os grupos. No entanto, nesse momento, a proporção de folículos primordiais saudáveis foi maior no GC, assim como, a proporção de folículos primordiais atrésicos foi maior no grupo 4-VCD. Assim, esses achados corroboram os de outros artigos (KAO et al., 1999; MAYER et al., 2002), nos quais o 4-VCD foi capaz de promover diminuição na população de folículos saudáveis, aumentando a atresia folicular. Embora os resultados apontem ação ovotóxica do 4-VCD em M1, os dados sugerem que pela via intravaginal a ovotoxicidade do composto não ocorre com a mesma intensidade ou velocidade que se observa pela via IP (FLAWS et al., 1994; KAO et al., 1999; SPRINGER et al., 1996).

Diferentemente ao observado em M1, em M2 notou-se no grupo 4-VCD aumento significativo no número de folículos primordiais atrésicos. Todavia, não foi observado diferença no número de folículos primordiais e primários saudáveis assim como, no número de folículos primários atrésicos. Esses achados vão de encontro aos dados da literatura sobre o início da ovotoxicidade induzida pelo 4-VCD. De acordo com Kao et al. (1999), a fase inicial de dano folicular induzida pelo composto, é notada pelo aumento da população de folículos atrésicos para posteriormente, ser notado diminuição no número de folículos saudáveis. Sendo assim, acredita-se que, para que houvesse diminuição significativa no número de folículos saudáveis, seria necessário maior dosagem e/ou tempo de exposição ao composto. Não obstante, Hinds et al. (2014) ao utilizarem o 4-VCD via oral, em diferentes doses (150 – 450 mg/kg) por cinco dias em camundongas, não notaram ovotoxicidade, atribuindo a ineficiência do composto ao tempo de exposição curto e doses consideradas baixas para essa via. Em paralelo, Abolaji et al. (2016), ao empregarem o 4-VCD em ratas pela via oral, nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg evidenciaram ovotoxicidade do 4-VCD, no entanto, a exposição ao composto foi de 28 dias. Reiterando os achados em M1, em M2 constatou-se que no grupo 4-

VCD, de forma significativa, maior proporção de folículos primordiais atrésicos e menor proporção de folículos primordiais saudáveis foi observada em relação ao GC, evidenciando ação ovotóxica do composto pela via intravaginal.

Apesar de o 4-VCD apresentar caráter ovotóxico por diferentes vias, doses (CAROLINO et al., 2019; FLAWS et al., 1994; KAO et al., 1999; MUHAMMAD et al., 2009; SPRINGER et al., 1996) e também associado a outros compostos químicos (DYER; MAYER, 2014; PYZYNA et al., 2016). No entanto, a via de inoculação pode influenciar no seu mecanismo de ação (BURD, 2014; HINDS et al., 2014). De acordo com os achados do presente trabalho, a via intravaginal para administração do 4-VCD mostrou sinais de ovotoxicidade, mas não houve dano total nos folículos primordiais, nos grupos avaliados. Sabe-se que para que ocorra a quimioesterilização e a fertilidade seja comprometida, é necessário que toda população de folículos primordiais seja afetada (KAO et al., 1999; MAYER et al., 2002, 2004; WITMER et al., 2017). Como os folículos em crescimento e antrais são recrutados a partir de folículos primordiais e primários, sua população só será afetada quando os pequenos folículos pré-antrais começarem a diminuir significativamente (KAO et al., 1999; MAYER et al., 2002).

De acordo com Hinds et al. (2012 apud DYER et al., 2013), são necessárias até 30 doses repetidas de 4-VCD via oral para que o mesmo, afete a fertilidade de ratas. Já no estudo de Reis et al. (2014), a administração de 4-VCD na dose de 160 mg/kg por 15 dias consecutivos via subcutânea em ratas, diminuiu significativamente a população de folículos antrais saudáveis. Entretanto, a ovotoxicidade induzida pelo 4-VCD aos folículos primordiais ocorre em uma taxa constante, em resposta à dosagem diária/repetida, entre 10 à 30 dias, não sendo um evento único (FLAWS et al., 1994; KAO et al., 1999; SPRINGER et al., 1996), na dose de 80 mg/kg via IP. Por conta disso, é possível que a exposição mais longa (superior a 15 dias) ao 4-VCD via intravaginal seja necessário para que haja atresia ovariana e, esterilidade. Estudos futuros devem ser realizados com intuito de determinar se tempo mais prolongado de exposição e/ou dose maior de 4-VCD pela via intravaginal, conseguirão promover infertilidade em ratas, mas o presente estudo mostra indícios importantes que essa via apresenta potencial para ser melhor estudada.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados, notou-se que a administração de gel intravaginal composto de 4-VCD na dose de 160 mg/kg por 15 dias consecutivos, promoveu toxicidade aos folículos primordiais, assim como, afetou o ciclo estral de ratas tratadas. No entanto, não foi suficiente para promover esterilidade durante o período de avaliação, ainda assim, o gel intravaginal contendo 4-VCD mostrou-se ser promissor para estudos futuros, que incluam doses maiores e/ou maiores períodos de inoculação.

## REFERÊNCIAS

- ABOLAJI, A.O. et al. Evidence of oxidative damage and reproductive dysfunction accompanying 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure in female Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 66, p. 10-19, 2016.
- ANDERSEN, T. et al. Chitosan in mucoadhesive drug delivery: Focus on local vaginal therapy. **Marine drugs**, v. 13, n. 1, p. 222-236, 2015.
- APPT, S.E. et al. Destruction of primordial ovarian follicles in adult cynomolgus macaques after exposure to 4-vinylcyclohexene diepoxide: a nonhuman primate model of the menopausal transition. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 4, p. 1210-1216, 2006.
- APPT, S.E. Peer review and reflection continues forever. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 4, p. 1034-1035, 2008.
- ARIKAWA, A.P. et al. L-arginine supplementation reduces blood pressure and plasma lipid levels in an animal model of perimenopause induced by 4-Vinylcyclohexene diepoxide. **Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 118-128, 2019.
- BERNAL, A.B. et al. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15558, 2010.
- BURD, A.M. **In vivo and in vitro studies of 4-vinylcyclohexene diepoxide in wild-caught female brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) and Norway rats (*Rattus norvegicus*) and its potential as a fertility control agent**. 2014. 161f. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Lincoln, Christchurch, 2014.
- CAROLINO, R.O.G. et al. Endocrine profile of the VCD-induced perimenopausal model rat. **Plos one**, v. 14, n. 12, p. e0226874, 2019.
- CHHABRA, R.S.; ELWELL, M.R.; PETERS, A.N.D.A. Toxicity of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide after 13 weeks of dermal or oral exposure in rats and mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 14, n. 4, p. 745-751, 1990.

DYER, C.A. et al. Accelerated follicle depletion in vitro and in vivo in Sprague-Dawley rats using the combination of 4-vinylcyclohexene diepoxide and triptolide. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 4s, p. S9-S17, 2013.

DYER, C.; MAYER, L. Sprague Dawley female rat consumption of a liquid bait containing vinylcyclohexene diepoxide and triptolide leads to subfertility. In: Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, n. 26., p. 386-390, 2014, Waikolaa. **26th Vertebrate Pest Conference**. Davis: University of California, Agriculture and Natural Resources, 2014.

FLAWS, J.A. et al. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. **Reproductive Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 509-514, 1994.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

HINDS, L.A. et al. Effects of Oral Uptake of the Chemosterilant 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in Wild House Mice, *Mus domesticus*. In: Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, n. 26., p. 380-385, 2014, Waikolaa. **26th Vertebrate Pest Conference**. Davis: University of California, Agriculture and Natural Resources, 2014.

HOYER, P.B.; MAYER, L.P. **Animal model for perimenopause and menopause and methods of inducing ovarian failure**. U.S. Patent n. 7,638,678, 29 dez. 2009.

KAO, S.W.; SIPES, I.G.; HOYER, P.B. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 67-75, 1999.

LEE, J.H. et al. Parabens accelerate ovarian dysfunction in a 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian failure model. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 2, p. 161, 2017.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595-1639, 2005.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.



MARONPOT, R.R. Ovarian toxicity and carcinogenicity in eight recent National Toxicology Program studies. **Environmental health perspectives**, v. 73, p. 125-130, 1987.

MCLEAN, A.C. et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 67, p. e4389, 2012.

MAYER, L.P. et al. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 775-781, 2002.

MAYER, L.P. et al. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 1, p. 130-138, 2004.

MUHAMMAD, F.S. et al. Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult Sprague–Dawley rats: ovarian, clinical, and pathologic outcomes. **Comparative medicine**, v. 59, n. 1, p. 46-59, 2009.

PAIXAO, L. et al. Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 7, n. 4, p. 384-390, 2016.

PYZYNA, B. et al. Free Ranging Wild-Caught Norway Rats Have Reduced Fecundity after Consuming Liquid Oral Fertility Bait Containing 4-Vinylcyclohexene Diepoxide and Triptolide. In: Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, n. 27., p. 314-316, 2016, Newport Beach. **27th Vertebrate Pest Conference**. Davis: University of California, Agriculture and Natural Resources, 2016.

REIS, F.M.C.V. et al. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 49, p. 130-140, 2014.

SARWAL, A. et al. Novel and effectual delivery of an antifungal agent for the treatment of persistent vulvovaginal candidiasis. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 49, n. 1, p. 135-147, 2019.

ŞENYİĞİT, Z.A. et al. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 2, p. 139-156, 2014.

SPRINGER, L.N. et al. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 394-401, 1996.

- TRAN, D.N. et al. Depletion of follicles accelerated by combined exposure to phthalates and 4-vinylcyclohexene diepoxide, leading to premature ovarian failure in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 80, p. 60-67, 2018.
- TURNER, P.V. et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.
- VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1692-1712, 2005.
- WEIL, C.S. et al. Experimental carcinogenicity and acute toxicity of representative epoxides. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 24, n. 4, p. 305-325, 1963.
- WITMER, G.W. et al. Compromised fertility in free feeding of wild-caught Norway rats (*Rattus norvegicus*) with a liquid bait containing 4-vinylcyclohexene diepoxide and triptolide. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48, n. 1, p. 80-90, 2017.
- YANO, J. et al. Epithelial cell-derived S100 calcium-binding proteins as key mediators in the hallmark acute neutrophil response during *Candida* vaginitis. **Infection and immunity**, v. 78, n. 12, p. 5126-5137, 2010.

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente trabalho, a via intravaginal demonstrou ser alternativa eficaz como via de administração pouco invasiva do 4-VCD, havendo evidências de ação ovotóxica do composto sobre os ovários de ratas tratadas. Os efeitos ovotóxicos do composto pela via intravaginal na dose de 160 mg/kg por 15 dias consecutivos, foram notados pelo aumento na população e proporção de folículos primordiais atrésicos, bem como, prolongamento do ciclo estral no grupo tratado. Porém, apesar de neste estudo não ter sido observada falência ovariana, o composto demonstrou promissora ação ovotóxica. Ainda, acredita-se que futuros estudos devem ser realizados avaliando a melhor dose e/ou tempo de exposição para total eficácia do composto pela via intravaginal, assim como, sua toxicidade sistêmica e segurança.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABOLAJI, A.O. et al. Evidence of oxidative damage and reproductive dysfunction accompanying 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure in female Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 66, p. 10-19, 2016.
- ADEDARA, I.A. et al. 4-Vinylcyclohexene diepoxide disrupts sperm characteristics, endocrine balance and redox status in testes and epididymis of rats. **Redox Report**, v. 22, n. 6, p. 388-398, 2017.
- ALLIANCE FOR CONTRACEPTION IN DOGS AND CATS (ACC & D). Contraception and fertility control in dogs and cats: a report of the Alliance for Contraception in Dogs & Cats. 2013.
- ANDERSEN, T. et al. Chitosan in mucoadhesive drug delivery: Focus on local vaginal therapy. **Marine drugs**, v. 13, n. 1, p. 222-236, 2015.
- APPT, S.E. et al. Destruction of primordial ovarian follicles in adult cynomolgus macaques after exposure to 4-vinylcyclohexene diepoxide: a nonhuman primate model of the menopausal transition. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 4, p. 1210-1216, 2006.
- APPT, S.E. Peer review and reflection continues forever. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 4, p. 1034-1035, 2008.
- APPT, S.E. et al. Experimental induction of reduced ovarian reserve in a nonhuman primate model (*Macaca fascicularis*). **Comparative medicine**, v. 60, n. 5, p. 380-388, 2010.
- ARIKAWA, A.P. et al. L-arginine supplementation reduces blood pressure and plasma lipid levels in an animal model of perimenopause induced by 4-Vinylcyclohexene diepoxide. **Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 118-128, 2019.
- BECK, A.M. The public health implications of urban dogs. **American Journal of Public Health**, v. 65, n. 12, p. 1315-1318, 1975.
- BERNAL, A.B. et al. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15558, 2010.

BROOKS, H.L.; POLLOW, D.P.; HOYER, P.B. The VCD mouse model of menopause and perimenopause for the study of sex differences in cardiovascular disease and the metabolic syndrome. **Physiology**, v. 31, n. 4, p. 250-257, 2016.

BROWN, G. Advances in reproductive control technology. In: **13th National Urban Animal Management Conference, Caloundra, Queensland**. 2003. p. 107-9.

BHARDWAJ, J.K.; SARAF, P. Influence of toxic chemicals on female reproduction: a review. **Cell Biol: Res Ther** 3, v. 1, p. 2, 2014.

BINDER, A.K. et al. Steroid receptors in the uterus and ovary. In: KNOBIL, E.; NEILL'S, J.D. **Physiology of reproduction**, 4th edn. Elsevier, San Francisco, p. 1099-1193, 2015.

BURD, A.M. **In vivo and in vitro studies of 4-vinylcyclohexene diepoxide in wild-caught female brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) and Norway rats (*Rattus norvegicus*) and its potential as a fertility control agent**. 2014. 161f. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Lincoln, Christchurch, 2014.

BURROUGHS, G.E. **Health Hazard Evaluation Determination Report No. 77-1-426**, Firestone Synthetic Rubber Company, Akron, Ohio. 1977.

CAO, L.B. et al. Hormone-Like Effects of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide on Follicular Development. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 587, 2020.

CAROLINO, R.O.G. et al. Endocrine profile of the VCD-induced perimenopausal model rat. **Plos one**, v. 14, n. 12, p. e0226874, 2019.

CATHEY, M. et al. Nonsurgical methods of contraception in dogs and cats: Where are we now. **Vet. Med**, v. 105, p. 12-17, 2010.

CAVALIERI, J. Chemical sterilisation of animals: A review of the use of zinc-and CaCl<sub>2</sub> based solutions in male and female animals and factors likely to improve responses to treatment. **Animal reproduction science**, v. 181, p. 1-8, 2017.

CHATTERJEE, S.N.; KAR, A.B. Chemical sterilization of stray dogs. **The Indian veterinary journal**, v. 45, n. 8, p. 649, 1968.

CHHABRA, R.S.; ELWELL, M.R.; PETERS, A.N.D.A. Toxicity of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide after 13 weeks of dermal or oral exposure in rats and mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 14, n. 4, p. 745-751, 1990.

COLLINS, J.J.; MANUS, A.G. Toxicological evaluation of 4-vinylcyclohexene. I. Prechronic (14-day) and subchronic (13-week) gavage studies in fischer 344 rats and B6C3F1 mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 21, n. 4, p. 493-505, 1987.

CORA, M.C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. **Toxicologic pathology**, v. 43, n. 6, p. 776-793, 2015.

DEVINE, P.J.; SIPES, I.G.; HOYER, P.B. Effect of 4-vinylcyclohexene diepoxide dosing in rats on GSH levels in liver and ovaries. **Toxicological Sciences**, v. 62, n. 2, p. 315-320, 2001.

DIAS, R.A. et al. Dog and cat management through sterilization: implications for population dynamics and veterinary public policies. **Preventive veterinary medicine**, v. 122, n. 1-2, p. 154-163, 2015.

DOHERTY, T.S. et al. The global impacts of domestic dogs on threatened vertebrates. **Biological conservation**, v. 210, p. 56-59, 2017.

DYER, C.A. et al. Accelerated follicle depletion in vitro and in vivo in Sprague-Dawley rats using the combination of 4-vinylcyclohexene diepoxide and triptolide. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 4s, p. S9-S17, 2013.

DYER, C.; MAYER, L. Sprague Dawley female rat consumption of a liquid bait containing vinylcyclohexene diepoxide and triptolide leads to subfertility. In: Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, n. 26., p. 386-390, 2014, Waikolaa. **26th Vertebrate Pest Conference**. Davis: University of California, Agriculture and Natural Resources, 2014.

FAHIM, M.S. et al. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. **Contraception**, v. 47, n. 1, p. 107-122, 1993.

FAO. Dog population management. Report of the FAO/WSPA/IZSAM expert meeting–Banna, Italy, 14-19 March 2011. **Animal Production and Health Report. No. 6. Rome**, 2014.

FERNANDEZ, S.M. et al. Involvement of the KIT/KITL signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 2, p. 318-327, 2008.

FLAWS, J.A. et al. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. **Reproductive Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 509-514, 1994.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GRIFFIN, B. Nonsurgical Sterilization of Cats and Dogs. In: MILLER, L.; ZAWISTOWSKI, S. **Shelter Medicine for Veterinarians and Staff**, 2ed. John Wiley & Sons, Ames, p. 689-696, 2013.

HAAS, J.R.; CHRISTIAN, P.J.; HOYER, P.B. Effects of impending ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide on fertility in C57BL/6 female mice. **Comparative medicine**, v. 57, n. 5, p. 443-449, 2007.

HEKMAN, J. Non-surgical Contraception: The State of the Field. In: WHITE, Sara. **High-Quality, High-Volume Spay and Neuter and Other Shelter Surgeries**. Ed. J p. 521-528, 2020.

HINDS, L.A. et al. Effects of Oral Uptake of the Chemosterilant 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in Wild House Mice, *Mus domesticus*. In: Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, n. 26., p. 380-385, 2014, Waikolaa. **26th Vertebrate Pest Conference**. Davis: University of California, Agriculture and Natural Resources, 2014.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. In: JEON, K.W.; FRIEDLANDER. **International review of cytology**. Elsevier Academic Press, v.124, p. 43-101, 1991.

HOYER, P.B.; SIPES, I.G. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 36, n. 1, p. 307-331, 1996.

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

HOYER, P.B.; MAYER, L.P. **Animal model for perimenopause and menopause and methods of inducing ovarian failure**. U.S. Patent n. 7,638,678, 29 dez. 2009.

HU, X. et al. Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 87-93, 2001.

HUTT, K.J.; MCLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. **Molecular human reproduction**, v. 12, n. 2, p. 61-69, 2006.

IMMEGART, H.M.; THRELFALL, W.R. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. **American journal of veterinary research**, v. 61, n. 5, p. 544-549, 2000.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some industrial chemicals. **IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, v. 60, 1994.

JANA, K.; SAMANTA, P.K. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. **Contraception**, v. 73, n. 3, p. 289-300, 2006.

JANA, K.; SAMANTA, P.K. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75, n. 5, p. 390-400, 2007.

JANA, K.; SAMANTA, P.K. Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. **BMC veterinary research**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2011

KAO, S.W.; SIPES, I.G.; HOYER, P.B. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 67-75, 1999.

KAPPELER, C.J.; HOYER, P.B. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 58, n. 1, p. 57-62, 2012.

KARTAL, T.; ROWAN, A.N. Stray dog population management. **Field manual for small animal medicine**, p. 15-28, 2018.



KATHERINE, M.; LINDA, R. Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats. **Portland: Alliance for Conception in Cats and Dogs. Hal**, p. 19-24, 2013.

KAWASHIMA, I.; KAWAMURA, K. Regulation of follicle growth through hormonal factors and mechanical cues mediated by Hippo signaling pathway. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 64, n. 1, p. 3-11, 2018.

KOGER, L.M. Calcium chloride castration. **Mod Vet Pract**, v. 59, n. 2, p. 119-21, 1978.

KONHILAS, J.P. et al. Using 4-vinylcyclohexene diepoxide as a model of menopause for cardiovascular disease. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 318, n. 6, p. H1461-H1473, 2020.

KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 514-525, 2006.

LEE, J.H. et al. Parabens accelerate ovarian dysfunction in a 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian failure model. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 2, p. 161, 2017.

LEOCI, R. et al. Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2014.

LEOCI, R. et al. Effects of intratesticular vs intraepididymal calcium chloride sterilant on testicular morphology and fertility in dogs. **Theriogenology**, v. 127, p. 153-160, 2019.

LI, S.; DAVIS, B. Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 3, p. 246-252, 2007.

LIU, K. et al. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Developmental biology**, v. 299, n. 1, p. 1-11, 2006.

LOHFF, J.C. et al. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. **Comparative medicine**, v. 55, n. 6, p. 523-527, 2005.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595-1639, 2005.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARONPOT, R.R. Ovarian toxicity and carcinogenicity in eight recent National Toxicology Program studies. **Environmental health perspectives**, v. 73, p. 125-130, 1987.

MASSEI, G. 13 Fertility Control in Dogs. In: **Dogs, Zoonoses and Public Health**, p. 259, 2013.

MASSEI, G. et al. Free-roaming dogs in Nepal: Demographics, health and public knowledge, attitudes and practices. **Zoonoses and public health**, v. 64, n. 1, p. 29-40, 2017.

MAYER, L.P. et al. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 775-781, 2002.

MAYER, L.P. et al. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 1, p. 130-138, 2004.

MAYER, L.P. et al. Atherosclerotic lesion development in a novel ovary-intact mouse model of perimenopause. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 9, p. 1910-1916, 2005.

MCLEAN, A.C. et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 67, p. e4389, 2012.

MOGHEISEH, A. et al. Ultrasonographic and histopathologic changes following injection of neutral zinc gluconate in dog's ovaries. **Comparative Clinical Pathology**, v. 26, n. 5, p. 1093-1098, 2017.

MUHAMMAD, F.S. et al. Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult Sprague–Dawley rats: ovarian, clinical, and pathologic outcomes. **Comparative medicine**, v. 59, n. 1, p. 46-59, 2009.

MUNSON, L. Contraception in felids. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 126-134, 2006.

MYERS, M. et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 569-580, 2004.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP) et al. Toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinylcyclohexene in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). US Department of Health and Human Services. **Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, Technical Report**, n. 303, p. 1-190, 1986.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM et al. Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Vinyl-1-cyclohexene Diepoxide (CAS No. 106-87-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Dermal Studies). **National Toxicology Program technical report series**, v. 362, p. 1-249, 1989.

OLIVEIRA, E.C.S et al. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a zinc gluconate-based solution. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1056-1063, 2012.

OTRANTO, D. et al. Zoonotic parasites of sheltered and stray dogs in the era of the global economic and political crisis. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 10, p. 813-825, 2017.

PACCOLA, C.C. et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction (AR)**, v. 10, n. 4, p. 677-683, 2018.

PAIXAO, L. et al. Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 7, n. 4, p. 384-390, 2016.

PAKSOY, Z. et al. The effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on the testes of dogs. **Veterinarski arhiv**, v. 88, n. 6, p. 807-822, 2018.

PARANZINI, C.S. et al. Effects of chemical castration using 20% CaCl<sub>2</sub> with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. **Theriogenology**, v. 106, p. 253-258, 2018.

PATRA, S.P. et al. A new approach for intraovarian injection of cadmium chloride to perform mass sterilization in adult bitches. **Indian Journal of Animal Health**, v. 29, n. 2, p. 115-117, 1990.

PESTANA-OLIVEIRA, N. et al. Effects of estrogen therapy on the serotonergic system in an animal model of perimenopause induced by 4-vinylcyclohexen diepoxide (VCD). **eNeuro**, v. 5, n. 1, 2018.

PINEDA, M.H.; FAULKNER, L.C. Immunologic control of reproduction in dogs. **Canine practice**, v. 1, n. 2, p. 11, 1974.

PINEDA, M.H. et al. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. **American journal of veterinary research**, v. 38, n. 6, p. 831, 1977.

PINEDA, M.H.; HEPLER, D.I. Chemical vasectomy in dogs. Long-term study. **Theriogenology**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 1981.

PURSWELL, B.J.; JÖCHLE, W. Targets and historical approaches to non-surgical sterilization in dogs and cats. In: **ACC&D 4th International Symposium on Non-Surgical Methods of Pet Population Control. Dallas, TX: Alliance for Contraception in Cats & Dogs. 2010.**

PYZYNA, B. et al. Liquid fertility management bait uptake by urban rats within New York City subway refuse rooms. In: Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, n. 26., p. 375-379, 2014, Waikoloa. **26th Vertebrate Pest Conference. Davis: University of California, Agriculture and Natural Resources, 2014.**

PYZYNA, B. et al. Free Ranging Wild-Caught Norway Rats Have Reduced Fecundity after Consuming Liquid Oral Fertility Bait Containing 4-Vinylcyclohexene Diepoxide and Triptolide. In: Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, n. 27., p. 314-316, 2016, Newport Beach. **27th Vertebrate Pest Conference. Davis: University of California, Agriculture and Natural Resources, 2016.**

RAFATMAH, D.; MOGHEISEH, A.; ESHGHI, D. Chemical sterilization with intratesticular administration of zinc gluconate in adult dogs: a preliminary report. **Basic and clinical andrology**, v. 29, n. 1, p. 12, 2019.

RAJAPAKSA, K.S. et al. Involvement of CYP 2E1 enzyme in ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene and its metabolites. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 221, n. 2, p. 215-221, 2007.

RAPPAPORT, S.M.; FRASER, D.A. Air sampling and analysis in a rubber vulcanization area. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 38, n. 5, p. 205-210, 1977.

REIS, F.M.C.V. et al. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 49, p. 130-140, 2014.

RICHARDS, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 51-89, 1980.

ROMERO-ALESHIRE, M.J. et al. Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 3, p. R587-R592, 2009.

ROOSA, K.A.; MUKAI, M.; PLACE, N.J. 4-Vinylcyclohexene diepoxide reduces fertility in female Siberian hamsters when treated during their reproductively active and quiescent states. **Reproductive Toxicology**, v. 51, p. 40-46, 2015a.

ROOSA, K.A.; PLACE, N.J. Mate preference for dominant vs. subordinate males in young female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) following chemically-accelerated ovarian follicle depletion. **Physiology & behavior**, v. 152, p. 41-46, 2015b.

SALYERS, K.L. **Disposition and metabolism of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in female Fischer 344 rats and B6C3F (1) mice.** 1995. 112f. Tese (Doutorado em reprodução-Programa de pós-graduação em farmacologia e toxicologia) – Universidade do Arizona, Tucson, 1995.

SARWAL, A. et al. Novel and effectual delivery of an antifungal agent for the treatment of persistent vulvovaginal candidiasis. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 49, n. 1, p. 135-147, 2019.

SCHMUKI, S. et al. Oral Exposure to 4-Vinylcyclohexene Diepoxide Induces Follicular Depletion Without Systemic Pathology in the Rat a Year after Dosing. **Biology of reproduction**, v. 85, p. 285, 2011.

SEIMENIS, A. et al. Stray animal populations and public health in the South Mediterranean and the Middle East regions. **Veterinaria italiana**, v. 50, n. 2, p. 131-136, 2014.

ŞENYİĞİT, Z.A. et al. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 2, p. 139-156, 2014.

SIERS, S.R. et al. Laboratory Evaluation of the Effectiveness of the Fertility Control Bait ContraPest® on Wild-captured Black Rats (*Rattus rattus*). Evaluation of ContraPest fertility control on black rats (QA-2570 Final Report). **National Wildlife Research Center**, p. 1-9, 2017.

SOTO, F.R.M. et al. Adoption of shelter dogs in a Brazilian community: assessing the caretaker profile. **Journal of applied animal welfare science**, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2005.

SPRINGER, L.N. et al. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 394-401, 1996.

THOMPSON, L.H. Induced sterility for coyote control: effect of cadmium chloride on potential fertility of the male *canis familiaris*. **Science Of Biology Journal**, v. 2, n. 2, p. 42, 1976.

TRAN, D.N. et al. Depletion of follicles accelerated by combined exposure to phthalates and 4-vinylcyclohexene diepoxide, leading to premature ovarian failure in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 80, p. 60-67, 2018.

TURNER, P.V. et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.

USLU, B. et al. Quantifying growing versus non-growing ovarian follicles in the mouse. **Journal of ovarian research**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1692-1712, 2005.

VAN KEMPEN, T.A. et al. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause. **Brain research**, v. 1379, p. 176-187, 2011.

WEIL, C.S. et al. Experimental carcinogenicity and acute toxicity of representative epoxides. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 24, n. 4, p. 305-325, 1963.

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


WORLD VETERINARY ASSOCIATION. **Owned and unowned free-roaming dogs**. 2016. Disponível: <<http://www.favamember.org/wva-factsheet-animal-welfare-issues-ownedunowned-free-roaming-dogs/>>. Acesso em: 10 out. 2020.

WRIGHT, L.E. et al. Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 8, p. 1296-1303, 2008.

YANO, J. et al. Epithelial cell-derived S100 calcium-binding proteins as key mediators in the hallmark acute neutrophil response during *Candida* vaginitis. **Infection and immunity**, v. 78, n. 12, p. 5126-5137, 2010.

## 7 ANEXOS

A- Licença de Projeto pela Comissão de Ética da Universidade Federal do Pampa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



**CEUA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais

**Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55)3911-0200. E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: 020/2018

Título: Esterilização química em ratos.

Data da aprovação: 12/06/2018

Período de vigência do projeto: 12/06/2020

Pesquisadores(a): Maria Lígia de Arruda Mistieri

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 984317763

E-mail: [mariamistieri@unipampa.edu.br](mailto:mariamistieri@unipampa.edu.br)

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	68
Peso/Idade	200 g / 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFSM



**Prof. Dr. Vanusa Manfredini**  
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA