



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Alice Santos da Silva

**Exposição de camundongos fêmeas ao piriproxifeno da pré-puberdade até a
maturidade sexual: efeitos sobre o sistema genital e a fertilidade feminina**

Florianópolis-SC

2023

Alice Santos da Silva

Exposição de camundongos fêmeas ao piriproxifeno da pré-puberdade até a maturidade sexual: efeitos sobre o sistema genital e a fertilidade feminina

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Adan Araújo Leite

Florianópolis-SC

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva , Alice Santos da

Exposição de camundongos fêmeas ao piriproxifeno da pré puberdade até a maturidade sexual : efeitos sobre o sistema genital e a fertilidade feminina / Alice Santos da Silva ; orientador, Gabriel Adan Araújo Leite, 2023.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Desreguladores endócrinos. 3. Inseticidas. 4. Camundongos. 5. Toxicidade reprodutiva. I. Leite, Gabriel Adan Araújo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Alice Santos da Silva

Exposição de camundongos fêmeas ao piriproxifeno da pré-puberdade até a maturidade sexual: efeitos sobre o sistema genital e a fertilidade feminina

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 31 de outubro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

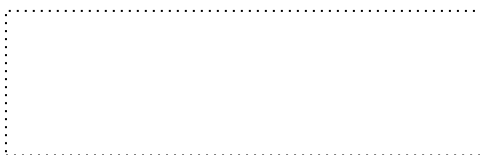
Profa. Dra. Arielle Cristina Arena

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Botucatu

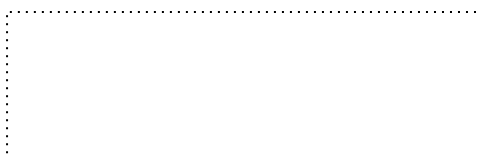
Profa. Dra. Norma Machado da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Gabriel Adan Araújo Leite

Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedicatória

Ao meu avô Gelson de Oliveira Santos (*in memoriam*), meu maior exemplo de resiliência, bondade e integridade. Dedico este trabalho também ao meu marido e meus pais, por todo o apoio e suporte. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, por me guiar e amparar nos momentos que pensei não conseguir. Por me dar forças para continuar, por todo seu amor por mim, pelas bênçãos e oportunidades.

Ao meu marido Renan Diego, por compartilhar a vida ao meu lado. Obrigada por ser meu apoio, meu porto seguro e por me ajudar. É uma grande benção ser sua esposa!

Ao meu pai José Arimathéia, por ter me apresentado a ciência e por ter me ajudado a trilhar esse caminho. À minha mãe, por sempre ter acreditado em mim, por me incentivar e apoiar. Aos meus pais, por tudo que fizeram e fazem por mim.

À Marie, Lisa e Laurinha, por serem minhas pequenas companheiras e por me trazerem tanta felicidade com seus miados e latidos.

Aos meus avós Alice, Jurandir, Joana e Gelson (*in memoriam*), por todos os ensinamentos e pelo exemplo de vida. A todos da minha família, pelo apoio e carinho.

À minha tia Loneide e família, pelo apoio, conselhos e por sempre torcerem por mim.

À minha sogra Rosirene e esposo Valdirino, cunhado Robes, concunhada Célia, sobrinhos João Guilherme, Ana Clara e Carlos Eduardo, e sogro José Angelo, pelo carinho, apoio e por me acolherem.

À minha melhor amiga Yohanna, por me apoiar e mesmo de longe estar tão presente na minha vida. Obrigada por me escutar, me animar e acreditar em mim.

Às amigas que a biomedicina me deu, Ana Carla, Andressa Lourenço e Catarina. Carla e Andressa pelo companheirismo, momentos de estudo e diversão juntas. Catarina por sempre deixar o ambiente leve e alegre. Obrigada meninas, vocês têm um lugar especial no meu coração.

Ao querido casal, Ana Paula e Mathias, pela amizade, conselhos, histórias e pelos melhores passeios por Florianópolis. Obrigada pelo carinho com minha família.

À minha amiga Tainara, por ter sido uma grande companheira de experimento, por tanta ajuda, a pessoa que foi meu braço direito nesse projeto. Obrigada pelos momentos de descontração.

À Andressa França, obrigada pela ajuda no experimento, pelas conversas e risadas. Juntamente com a Tainara, por deixar o laboratório mais leve, pelos desabafos e as muitas gargalhadas.

A todos amigos que torcem por mim e sempre me apoiam. Em especial, minha prima e primeira amiga Érika, por sempre torcer por mim. Também, à Bárbara, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gabriel Leite, pela confiança, oportunidade, pelas conversas sobre ciência, pelos ensinamentos nesses dois anos. Obrigada pela paciência ao me orientar, pela didática e por contribuir com meu crescimento científico através de seus conselhos, correções e experiência. Agradeço também pela oportunidade de poder contribuir com a orientação do IC Henrique, me guiando nos primeiros passos de uma tarefa tão importante dentro da carreira científica.

Aos membros do Laretox. Ao IC Henrique, pela ajuda no projeto e pelo apoio. Agradeço especialmente a Jennyfer, pela proatividade em me ajudar, pela amizade e conversas.

Ao laboratório FisiTox, orientado pelo Prof. Dr. Gustavo Volpato, pela base que me ensinaram na iniciação científica. Serei sempre grata pelos aprendizados e oportunidade.

A todos os professores que tive durante todos esses anos de estudo, obrigada por serem uma inspiração e por todo o ensinamento.

Aos animais utilizados nesse trabalho, aqui representados pela Pitiquinha, Piratinha e Bravinha. Sem eles, essa pesquisa não seria possível.

À UFSC e PPGBCD pela oportunidade de estudo e crescimento profissional.

Ao LAMEB, em especial, às técnicas Maysa e Elis, por me conduzirem no manuseio dos equipamentos e por me acalmarem quando algo dava errado.

À Capes e CNPq pelo apoio financeiro durante a elaboração desse trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a beleza libertadora do intelecto para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer. ”

(Albert Einstein)

RESUMO

O piriproxifeno (PPF) é um inseticida utilizado na agricultura e tem seu uso permitido em caixas d'água potável destinadas ao consumo humano. Entretanto, alguns estudos mostram que este pode atuar como desregulador endócrino e causar toxicidade reprodutiva e sistêmica em organismos-não alvo. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do PPF na reprodução e na fertilidade de camundongos fêmeas expostas desde a pré-puberdade à maturidade sexual. Para isso, foram utilizados camundongos fêmeas *Swiss* tratadas por via oral. No primeiro experimento, as fêmeas foram tratadas do dia pós-natal (DPN) 23 até o DPN 75, após serem distribuídas em três grupos experimentais: controle (veículo), PPF 0,1 mg/Kg e PPF 1 mg/Kg. Os animais foram acompanhados quanto à idade da instalação da puberdade, massa corporal, consumo de água e ração durante o experimento, e no período do DPN 60 ao DPN 75, o ciclo estral foi avaliado quanto à sua regularidade. No DPN 75, um subgrupo (n=10/grupo), na fase de estro, foi submetido à eutanásia, quando foram coletados e pesados órgãos vitais e reprodutores. A tireoide, ovário e útero foram avaliados quanto à histopatologia e morfometria. O outro subgrupo (n=10/grupo) foi destinado ao acasalamento natural para avaliação da performance reprodutiva, bem como para análise de sua prole quanto a presença de anomalias congênitas e aos parâmetros biométricos fetais. No segundo experimento, foi realizado o ensaio uterotrófico e pesagem de órgãos, no qual, fêmeas no DPN 18 receberam tratamento por injeção subcutânea, pelo período de três dias consecutivos e foram divididas em cinco grupos experimentais (n=7/grupo): controle negativo (veículo), controle positivo (17 β -estradiol) e PPF nas doses de 0,01 mg/ Kg, 0,1 mg/Kg ou 1 mg/kg. Após vinte e quatro horas da última injeção, foi realizada a laparotomia, coletados e pesados o útero com e sem fluido, ovários, tubas uterinas, rim, adrenal e fígado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O tratamento com PPF diminuiu a massa da tireoide e a massa do epitélio glandular e de coloide deste órgão na maior dose, além de ter aumentado a massa relativa do fígado em ambas as doses. No grupo PPF 1 mg/Kg houve um aumento de tecido intersticial na região cortical e medular do ovário e, no útero, foi observado uma redução das projeções do endométrio em direção ao lúmen, além de menor proporção de fibras de colágeno nessa camada, tornando o estroma mais edematoso. Além disso, a espessura do estroma endometrial mostrou-se reduzida em ambas as doses. Houve, ainda, redução de 30% na taxa de prenhez dos grupos expostos a ambas as doses do praguicida, além de aumento da morte fetal no grupo exposto a dose de 0,1 mg/Kg. Em relação ao ensaio uterotrófico, como esperado, o tratamento com 17 β -estradiol causou aumento da massa do útero com e sem fluido, embora o PPF não tenha apresentado atividade estrogênica no teste. Os demais parâmetros mostraram-se similares entre os grupos experimentais. Conclui-se que o PPF pode provocar toxicidade sistêmica e reprodutiva em camundongos fêmeas, apresentando uma ação androgênica em função do aumento de tecido intersticial ovariano e dos efeitos encontrados no útero, bem como pode reduzir a taxa de prenhez e aumentar a morte fetal, possivelmente por reduzir a viabilidade dos gametas femininos. Esse estudo sugere que o inseticida em questão pode representar um risco reprodutivo para as mulheres que estão expostas de forma crônica a este composto desde a infância e adolescência.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; Inseticidas; Camundongos, Toxicidade reprodutiva.

ABSTRACT

Pyriproxyfen (PPF) is an insecticide used in agriculture, which is approved for use in drinking water tanks for human consumption. However, some studies show that it may act as an endocrine disruptor and cause reproductive and systemic toxicity in non-target organisms. The aim of this study was to evaluate the effects of PPF on reproduction and fertility in female mice exposed to this pesticide from pre-puberty to sexual maturity. Then, female Swiss mice were treated orally, by gavage. In the first experiment, females were treated from postnatal day (PND) 23 to PND 75, after they were distributed into three experimental groups: control (vehicle), PPF 0.1 mg/Kg and PPF 1 mg/Kg. The animals were monitored for age of puberty onset, body mass, water and food consumption during the experiment, and from PND 60 to PND 75, the estrous cycle regularity was assessed. On PND 75, a subgroup (n=10/group) in the estrus phase was euthanized, when vital and reproductive organs were collected and weighed. The thyroid, ovary and uterus were evaluated for histopathology and morphometry. The other subgroup (n=10/group) was assigned to natural mating to evaluate reproductive performance, as well as to analyze their offspring in terms of congenital anomalies and fetal biometer parameter. In the second experiment it was performed the uterotrophic assay and weighing of organs, in which females on PND 18 received treatments by subcutaneous injection over a period of three days and were divided into five groups (n= 7/group): negative control (vehicle), positive control (17 β -estradiol) and PPF at the doses of 0.01 mg/ Kg, 0.1 mg/Kg and 1 mg/kg. Twenty-four hours after the last injection, laparotomy was performed and the uterus with and without fluid, ovaries, oviducts, kidneys, adrenal glands and liver were collected and weighed. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The treatment with PPF decreased thyroid mass and the mass of glandular epithelium and colloid in this organ at the higher dose, and increased liver mass in both treated groups. In the PPF 1 mg/Kg group, there was an increase in interstitial tissue in the cortical and medullary regions of the ovary and, in the uterus, there was a reduction in the projections of the endometrium towards the lumen, as well as a lower proportion of collagen fibers in this layer, making endometrial stroma more edematous. Moreover, the thickness of endometrial stroma showed a reduction in both doses. There was a diminution of 30% in the pregnancy rate of the treated groups, as well as an increase in fetal death in the 0.1 mg/Kg PPF group. In the uterotrophic assay, as expected, treatment with 17 β -estradiol caused an increase in the mass of the uterus with and without fluid, although PPF did not show estrogenic activity in the test. The other parameters were similar among the experimental groups. In summary, PPF provoked systemic and reproductive toxicity in female mice, demonstrating an androgenic action due to the augmentation of ovarian interstitial tissue and the impairment observed in the uterus, in addition to reduce the pregnancy rate and increase fetal death, possibly due to its effects on reducing oocytes viability. This study suggests that this insecticide may represent a reproductive risk for women who are exposed cronically to this compound from infancy and adolescence.

Keywords: Endocrine disruptors; Insecticides; Female mice; Reproductive toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GD	<i>Gestacional day</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HHG	Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
IRAC	<i>Insecticide Resistance Action Committee</i>
KNDy	Kispeptina, neurocinina B e dinorfina
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LH	Hormônio luteinizante
OECD	<i>Organization for Economic and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PND	<i>Post-natal day</i>
PPF	Piriproxifeno
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
Os praguicidas e suas classificações	1
O inseticida piriproxifeno	2
Da pré-puberdade à maturidade sexual	3
Desreguladores endócrinos e seus efeitos no sistema genital feminino.	7
2. OBJETIVOS	9
Objetivo geral	9
Objetivos específicos	9
3. CAPÍTULO 1.....	10
4. DISCUSSÃO	53
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina	69
ANEXO B – Emenda de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina	70

1. INTRODUÇÃO

OS PRAGUICIDAS E SUAS CLASSIFICAÇÕES

Na última metade do século XIX, o crescimento da economia mundial levou ao aumento progressivo na geração e utilização de produtos químicos destinados à agricultura (De *et al.*, 2014; Zhang, 2018). Em 2020, a utilização de praguicidas a nível global foi de aproximadamente 2,7 milhões de toneladas (*Food and Agriculture Organization- FAO*, 2022). No Brasil, a quantidade de praguicidas cresceu nos últimos 30 anos, colocando o país entre os três maiores países consumidores destes compostos (Rezende-Teixeira *et al.*, 2022). Em 2021, foram vendidas 720,87 toneladas de ingredientes ativos de praguicidas no país, o que representou um aumento de 5,03% em relação a 2020 (IBAMA, 2020).

Os praguicidas são agrupados de acordo com suas classes químicas, grupos funcionais, modo de ação, toxicidade e também quanto às espécies-alvo, podendo ser incluídos em mais de uma classe (Prieto Garcia *et al.*, 2012). Em termos de organismo-alvo, os praguicidas podem ser divididos em inseticidas, fungicidas, herbicidas e rodenticidas, e em relação à classe química de seus componentes, são classificados em inorgânicos (tais como cobre, enxofre e sulfato de cobre) e orgânicos (como organofosforados, piretróides, análogos hormonais e metabólitos destes praguicidas orgânicos) (Alavanja *et al.*, 2004; Tudi *et al.*, 2021).

Os inseticidas são usados para o combate de mosquitos vetores de doenças como malária e dengue, bem como, podem ser utilizados em *sprays*, para eliminar insetos no ambiente doméstico e em jardins (Kim *et al.*, 2017). Contudo, a agricultura é o maior utilizador de praguicidas, com 85% da produção mundial, para controlar pragas que acometem as plantações (Kim *et al.*, 2017).

De acordo com o modo de ação, os inseticidas químicos são classificados em três categorias (Rani *et al.*, 2021). Eles podem atuar no sistema nervoso, tendo como principais alvos, a acetilcolinesterase, os receptores nicotínicos e os canais de cloreto e sódio (Casida; Durkin, 2013). Essa classe de inseticidas neurotóxicos é a mais utilizada, sendo que os organofosforados ou metilcarbamatos correspondem à 59,6%

do total em quantidade e custo menor, quando comparado aos outros inseticidas (Casida; Bryant, 2017).

Outra categoria são os inseticidas interruptores da fosforilação oxidativa ou da cadeia transportadora de elétrons (Rani *et al.*, 2021). Essa classe pode atuar dificultando o transporte de elétrons, como também, bloquear os complexos responsáveis pelo transporte do elétron na mitocôndria, tendo como consequência a interrupção da síntese de ATP e morte do organismo-alvo (*Insecticide Resistance Action Committee- IRAC*, 2020; Rani *et al.*, 2021).

A terceira classe de inseticidas, segundo o modo de ação, abrange aqueles que interferem no crescimento e desenvolvimento do organismo-alvo (IRAC, 2020). Esses eventos são controlados pelos hormônios juvenil e ecdisteróides, que regulam a ecdise e metamorfose, e na vida adulta, regulam a maturidade reprodutiva (Jindra; Palli; Riddiford, 2012). Dessa forma, os reguladores de crescimento de insetos mimetizam esses hormônios e conseqüentemente bloqueiam a metamorfose (Jindra *et al.*, 2012). Dentre os inseticidas representantes dessa classe estão o fenoxicarbe, o metopreno e o piriproxifeno (Dhadialla *et al.*, 1998; Jindra; Bittova, 2020).

O INSETICIDA PIRIPROXIFENO

O piriproxifeno (PPF) é um larvicida utilizado na agricultura e horticultura, para o combate de cochonilhas, mosca-branca, lagarta, pulgões e larvas (Sullivan; Goh, 2008). Por ser considerado de baixa toxicidade para mamíferos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aprovou a utilização do PPF na água potável, para controlar principalmente a população de mosquitos vetores de doenças humanas, no qual, a dose recomendada nas caixas d'água deve ser menor que 0,01 mg/L (*World Health Organization-WHO*, 2008).

De acordo com a nomenclatura, o piriproxifeno (C₂₀H₁₉NO₃) possui o nome químico 4-fenoxifenil (RS)-2-(2-piridiloxi)propil éter e massa molecular relativa de 321,37 g/mol (WHO, 2008). Suas propriedades físico-químicas são caracterizadas pelo ponto de ebulição, 45-47 °C e densidade 0,367 mg/L a 25 °C, além de apresentar baixa solubilidade, alto coeficiente de partição e ser altamente hidrofóbico (Sullivan; Goh, 2008; WHO, 2008). Como característica, o PPF é um larvicida que atua no

sistema endócrino e mimetiza o hormônio juvenil, assim, irá controlar os estágios imaturos do inseto, impedindo que a metamorfose aconteça (Maoz *et al.*, 2017). Além disso, causa alterações morfológicas e funcionais no adulto, como inibição da reprodução (Maoz *et al.*, 2017).

A meia-vida desse composto em sistemas aeróbicos de água e sedimentos de lago varia entre 16 e 21 dias (Sullivan; Goh, 2008). Em ratos, o piriproxifeno é lentamente absorvido, com pico de concentração plasmática 8 horas após administração oral, contudo, 90% do composto é rapidamente eliminado pelas fezes e apenas 4-11% através da urina (WHO, 2008). Em relação à metabolização do PPF, sua principal via de biotransformação é a 4'-hidroxilação, podendo ocorrer a hidroxilação do anel piridínico, a clivagem do éter e a conjugação (WHO, 2008).

De acordo com a OMS, a toxicidade oral aguda do PPF é baixa, com LD₅₀ de 5000 mg/Kg de massa corporal em camundongos e ratos (WHO, 2008). Em relação ao NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level* - Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis), dois estudos realizados em cães, com duração de 1 ano, mostraram que o NOAEL global foi de 10 mg/Kg de massa corporal por dia (WHO, 2008). Com isso, a partir desse valor do NOAEL, aplicou-se um fator de correção de 100, tendo como resultado a dose diária máxima permitida de 0,1 mg/Kg (WHO, 2008).

Desde 2014, o Ministério da Saúde, seguindo as recomendações da OMS, adotou o uso do PPF na dose de 0,01 mg/L em reservatórios de água potável para combater o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor de doenças como dengue, chikungunya e Zika vírus (DIVE, 2014; WHO, 2008). De acordo com o boletim epidemiológico, em 2021, foram distribuídas entre 30 a 40 toneladas de PPF para os estados, para tratamento dos criadouros de mosquitos vetores (Ministério da Saúde, 2021a; 2021b).

DA PRÉ-PUBERDADE À MATURIDADE SEXUAL

A puberdade em humanos é um processo complexo que resulta na aquisição da maturidade psicofísica e da capacidade reprodutiva (Spaziani *et al.*, 2021). As mudanças psico-neuro-endócrinas iniciam-se no final da infância e terminam com a completa maturação sexual, resultando no dimorfismo sexual e na produção de

gametas (Spaziani *et al.*, 2021). A idade de início da puberdade feminina, em humanos, ocorre entre oito e treze anos, podendo a faixa etária variar entre os indivíduos devido às diferentes populações étnicas, o padrão familiar e o ambiente que a pessoa está inserida (Abreu; Kaiser, 2016; Manotas *et al.*, 2022).

No ser humano, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) é ativado em três períodos específicos do desenvolvimento: durante a vida fetal, com um pico na metade da gestação; após o nascimento, entre a primeira semana e os seis meses de vida, ficando quiescente durante a infância; e o último período, durante a instalação da puberdade, quando é reativado (Spaziani *et al.*, 2021).

Anterior à puberdade ocorre a maturação da zona reticulada do córtex das glândulas adrenais que começam a secretar dehidroepiandrosterona (DHEA) e sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), posteriormente convertidos em testosterona e estradiol (Motta-mena; Puts, 2017). Esse evento é conhecido como adrenação, caracterizado clinicamente pela mudança de odor corporal, acne e crescimento de pelos axilares e pubianos (WOOD *et al.*, 2019). O córtex da adrenal e as gônadas são as fontes primárias de hormônios esteroides (Witchel *et al.*, 2020).

A ativação do eixo HHG nesse período provoca a liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, que impulsionará a hipófise a produzir e secretar o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), os quais estimulam a produção gonadal de esteroides, como estrogênio e progesterona (Oyola; Handa, 2017; Spaziani *et al.*, 2021). Estes, por sua vez, são responsáveis pelas características sexuais secundárias (Vijayakumar *et al.*, 2018). A regulação da secreção cíclica de FSH e de LH é essencial para a maturação sexual e aquisição da função reprodutiva feminina (Stamatiades; Kaiser, 2018).

Diferentes fatores hipotalâmicos influenciam a secreção de GnRH, entre eles, os neuromoduladores kisspeptina, neurocinina B e dinorfina (KNDy) são os maiores envolvidos no ajuste da geração de pulsos de GnRH (Livadas; Chrousos, 2019). Esses neurônios neurosecretores exibem interconexões pelas quais a neurocinina B estimula, enquanto a dinorfina inibe a liberação de kisspeptina, que conseqüentemente promove a pulsatilidade do GnRH (Velasco *et al.*, 2023).

Na mulher, o efeito da kisspeptina é variável e depende da fase do ciclo menstrual (Skorupskaite *et al.*, 2014). Além disso, os hormônios sexuais possuem

inter-relações com a kisspeptina, sendo que o estrogênio e a progesterona modulam a atividade dos neurônios kisspeptina, que por sua vez, medeiam o *feedback* positivo e negativo desses hormônios (Harter *et al.*, 2018; Skorupskaite *et al.*, 2014).

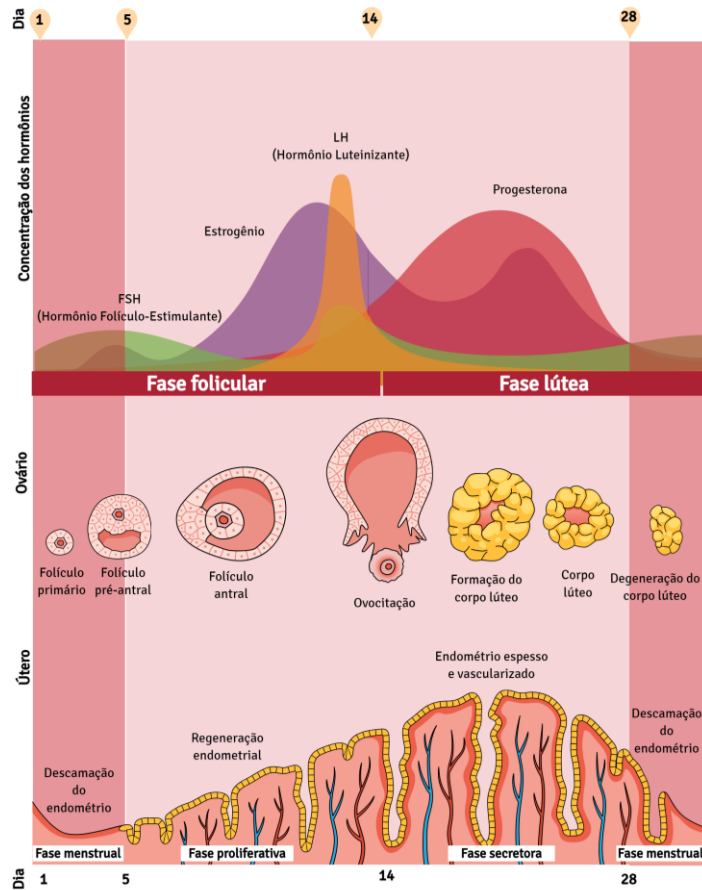
Os hormônios sexuais são responsáveis pelas manifestações físicas da puberdade, entre os quais, em mulheres, o desenvolvimento das mamas (telarca) é considerado o primeiro sinal e a primeira menstruação (menarca) o marcador final desse evento (Abreu; Kaiser, 2016; Spaziani *et al.*, 2021; Villamor; Jansen, 2016). Em roedores fêmeas, a abertura vaginal é tipicamente a primeira mudança física observada, seguida da presença do primeiro estro, que é constatado através da citologia do lavado vaginal (Laffan *et al.*, 2018). Nesses animais, a idade que ocorre a instação da puberdade varia de acordo com a espécie, em camundongos fêmeas acontece entre 23 e 40 dias pós-natal e, em ratas entre 28 e 65 dias pós-natal (Laffan *et al.*, 2018; Tinsley & Kirkwood, 2010).

Os hormônios esteroides ovarianos são os principais mediadores dos mecanismos de *feedback* no sistema hipotálamo-hipófise (Messinis *et al.*, 2014). O ciclo de *feedback* altamente coordenado que ocorre no eixo HHG resulta na ovocitação, no final da fase folicular, e na menstruação, na fase menstrual (Itriyeva, 2022). A duração média do ciclo menstrual é de 25 a 30 dias, dividido nas fases proliferativa, secretora e menstrual (Abo *et al.*, 2022). O ciclo reprodutivo de roedores é denominado como ciclo estral e possui quatro fases: proestro, correspondente à fase proliferativa; estro, indicativo de ovocitação; e metaestro e diestro, equivalentes à fase secretora (Ajayi; Akhigbe, 2020).

Os principais hormônios que regem o ciclo menstrual são o estrogênio e a progesterona, secretados pelos ovários (Abo *et al.*, 2022). Durante a fase menstrual, no primeiro momento, ocorre a menstruação, caracterizada como a descamação da camada funcional do endométrio, e na fase proliferativa, há reparo e proliferação do estroma endometrial sob estímulo de estrogênio, cuja concentração aumenta nesse período, atingindo seu pico próximo da ovocitação (Itriyeva, 2022). Na fase secretora, a progesterona, produzida pelo corpo lúteo, estimula a secreção das glândulas uterinas e, de maneira geral, prepara o útero para uma possível gestação (Bulletti *et al.*, 2022). Caso não ocorra a gravidez, o corpo lúteo degenera e os níveis de

progesterona e estrogênio declinam, ocorrendo a menstruação e o reinício do ciclo menstrual (Figura 1) (Hammer *et al.*, 2020).

Figura 1. Concentração dos hormônios hipofisários e gonadais durante as fases do ciclo menstrual.



Fonte: Adaptado pela autora – *Mind the Graph*. (2023).

Como visto anteriormente, a puberdade é um período crítico do desenvolvimento que requer eventos cruciais para que a maturação sexual ocorra de maneira adequada (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2021). Desse modo, o período puberal é altamente vulnerável à fatores externos, como os desreguladores endócrinos, que podem comprometer essa sequência de eventos que resultam na aquisição da capacidade reprodutiva (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2021; Sakali *et al.*, 2021). Como consequência, a exposição a esses compostos pode alterar as funções reprodutivas por meio de diferentes mecanismos, interferindo na progressão da puberdade e

promovendo prejuízos reprodutivos na maturidade sexual feminina. (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2021).

DESREGULADORES ENDÓCRINOS E SEUS EFEITOS NO SISTEMA GENITAL FEMININO.

Os desreguladores endócrinos são substâncias químicas exógenas capazes de interferir negativamente na ação hormonal e em processos metabólicos (You; Song, 2021). Eles podem agir mimetizando ou bloqueando hormônios endógenos, afetando a ativação, síntese, secreção e ligação de hormônios, causando danos aos tecidos e órgãos (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2021; You; Song, 2021). Dentre as substâncias com potenciais efeitos de desregulação endócrina, estão alguns produtos químicos industriais, plastificantes, metais pesados, fármacos, fitoestrógenos e os praguicidas (Yilmaz *et al.*, 2019).

Apesar de sua relevância para a agricultura e combate de mosquitos vetores de doenças, os inseticidas possuem a desvantagem de causar danos a organismos não-alvo (Kim *et al.*, 2017). A exposição aos praguicidas pode ser danosa para a saúde de humanos e de outros organismos, e seu risco está relacionado tanto com a toxicidade dos ingredientes quanto ao nível de exposição (Kim *et al.*, 2017). Diversas doenças são associadas à exposição a praguicidas, incluindo câncer, asma, leucemia, alergias e desregulação hormonal (Kim *et al.*, 2017; Rani *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2020).

Os praguicidas também podem provocar disfunções reprodutivas em homens e mulheres, como infertilidade, diminuição da qualidade espermática, danos no ovário, e ainda podem afetar o desenvolvimento embrio-fetal, causando anomalias congênitas (Kumar *et al.*, 2019). Os inseticidas afetam o sistema genital feminino de diversas maneiras, causando alterações nos níveis de hormônios sexuais, declínio da fertilidade e distúrbios menstruais (Sharma *et al.*, 2020). Diante disso, pesquisas em organismos-modelo contribuem para o entendimento dos danos provocados por esses praguicidas (Maharajan *et al.*, 2020; Shahid; Saher, 2020).

Em diferentes modelos animais, o PPF causou toxicidade reprodutiva. Esse larvicida altera a homeostase de hormônios sexuais e provoca mudanças

histopatológicas nas gônadas feminina e masculina de peixes-zebra (*Danio rerio*) (Maharajan *et al.*, 2020). O PPF pode gerar alterações histopatológicas e morfométricas nos testículos dos peixes, induzir estresse oxidativo e provocar sobrecarga de Ca^{2+} nas gônadas, causando toxicidade testicular e interrupção da espermatogênese (De Oliveira *et al.*, 2021). Além disso, em fêmeas, o PPF também induz o estresse oxidativo nos ovários, inibe a maturação folicular e aumenta a atresia, comprometendo a reprodução (De Oliveira *et al.*, 2022).

O metabólito 4'-OH-PPF afeta a atividade da tireoide de *Xenopus laevis*, sendo um antagonista do hormônio tireoidiano T3, conseqüentemente, a exposição ao metabólito afeta o desenvolvimento dos compartimentos cerebrais do modelo animal estudado (Vancamp *et al.*, 2021). Além disso, quando expostas ao 4'-OH-PPF, células-tronco neurais derivadas da zona subventricular de camundongos apresentam proliferação diminuída e aumento de apoptose (Vancamp *et al.*, 2021).

Em roedores, a administração do PPF provoca diminuição da massa corporal, além de afetar a espermatogênese, com diminuição de espermatozoides, redução no número de células de Leydig e degeneração na túnica albugínea (Shahid *et al.*, 2019). Além disso, esse inseticida pode diminuir o ganho de massa materno e aumentar a duração da prenhez (Shahid; Saher, 2020). Em relação aos fetos, após exposição *in utero*, pode ocorrer aumento de morte fetal e alterações histopatológicas no fígado, rim, coração e cérebro (Shahid; Saher, 2020).

Sendo assim, o PPF é utilizado na agricultura e na água de consumo, expondo os seres humanos a esse agente durante diferentes etapas da vida. Embora sejam escassos na literatura científica estudos que avaliem os efeitos do PPF na reprodução e no desenvolvimento, há indícios de que o PPF atue como um possível desregulador endócrino, podendo interferir na reprodução feminina e no desenvolvimento embrio-fetal. Considerando que os seres humanos estão expostos ao PPF através da dieta em diferentes etapas da vida e que estudos sugerem que este inseticida possa atuar como um desregulador endócrino, esse estudo buscou apontar os possíveis riscos da exposição ao PPF para a saúde reprodutiva feminina, quando utilizado em doses ambientalmente relevantes desde a pré-puberdade até a vida adulta.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos do PPF na reprodução e fertilidade de camundongos fêmeas expostas desde a pré-puberdade até a fase adulta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o desenvolvimento reprodutivo pós-natal de camundongos fêmeas expostas ao piriproxifeno da pré-puberdade a maturidade sexual.
- Avaliar a condição de saúde geral e os efeitos sistêmicos nas fêmeas tratadas com PPF desde a pré-puberdade.
- Analisar a fertilidade e a performance reprodutiva de fêmeas expostas ao PPF da pré-puberdade a vida adulta.

3. CAPÍTULO 1

FEMALE MICE EXPOSED TO PYRIPROXYFEN SINCE PRE-PUBERTY SHOWED REPRODUCTIVE IMPAIRMENT DURING SEXUAL MATURITY AND INCREASED FETAL DEATH IN THEIR OFFSPRING

Alice Santos da Silva ^{a,b}, Tainara Fernandes de Mello ^a, Henrique Frederico Enz Fagá ^a, Jennyfer Karen Knorst ^a, Fátima Regina Mena Barreto Silva ^c, Gabriel Adan Araújo Leite ^{a,d*}

^a Laboratório de Reprodução e Toxicologia (Laretox), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^c Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^d Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Gabriel Adan Araújo Leite. Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFSC; Rua João Pio Duarte Silva, 241, Córrego Grande. CEP: 88040-900 - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail address: gabriel.leite@ufsc.br/ gabriel_adan_1990@hotmail.com (G.A.A. Leite).

The manuscript will be submitted to the journal Toxicology, ISSN 1879-3185 | 0300-483X, Impact Factor 4.5 / 2022, Qualis/CAPES A2.

Abstract

Pyriproxyfen (PPF) is an insecticide used in agriculture, which is approved for use in drinking water tanks for human consumption. However, some studies show that it may act as an endocrine disruptor and cause reproductive and systemic toxicity in non-target organisms. The aim of this study was to evaluate the effects of PPF on reproduction and fertility in female mice exposed to this pesticide from pre-puberty to sexual maturity. Then, female Swiss mice were treated orally, by gavage. In the first experiment, females were treated from postnatal day (PND) 23 to PND 75, after they were distributed into three experimental groups: control (vehicle), PPF 0.1 mg/Kg and PPF 1 mg/Kg. The animals were monitored for age of puberty onset, body mass, water and food consumption during the experiment, and from PND 60 to PND 75, the estrous cycle regularity was assessed. On PND 75, a subgroup (n=10/group) in the estrus phase was euthanized, when vital and reproductive organs were collected and weighed. The thyroid, ovary and uterus were evaluated for histopathology and morphometry. The other subgroup (n=10/group) was assigned to natural mating to evaluate reproductive performance, as well as to analyze their offspring in terms of congenital anomalies and fetal biometer parameter. In the second experiment it was performed the uterotrophic assay and weighing of organs, in which females on PND 18 received treatments by subcutaneous injection over a period of three days and were divided into five groups (n= 7/group): negative control (vehicle), positive control (17 β -estradiol) and PPF at the doses of 0.01 mg/ Kg, 0.1 mg/Kg and 1 mg/kg. Twenty-four hours after the last injection, laparotomy was performed and the uterus with and without fluid, ovaries, oviducts, kidneys, adrenal glands and liver were collected and weighed. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The treatment with PPF decreased thyroid mass and the mass of glandular epithelium and colloid in this organ at the higher dose, and increased liver mass in both treated groups. In the PPF 1 mg/Kg group, there was an increase in interstitial tissue in the cortical and medullary regions of the ovary and, in the uterus, there was a reduction in the projections of the endometrium towards the lumen, as well as a lower proportion of collagen fibers in this layer, making endometrial stroma more edematous. Moreover, the thickness of endometrial stroma showed a reduction in both doses. There was a

diminution of 30% in the pregnancy rate of the treated groups, as well as an increase in fetal death in the 0.1 mg/Kg PPF group. In the uterotrophic assay, as expected, treatment with 17 β -estradiol caused an increase in the mass of the uterus with and without fluid, although PPF did not show estrogenic activity in the test. The other parameters were similar among the experimental groups. In summary, PPF provoked systemic and reproductive toxicity in female mice, demonstrating an androgenic action due to the augmentation of ovarian interstitial tissue and the impairment observed in the uterus, in addition to reduce the pregnancy rate and increase fetal death, possibly due to its effects on reducing oocytes viability. This study suggests that this insecticide may represent a reproductive risk for women who are exposed cronically to this compound from infancy and adolescence.

Keywords: Endocrine disruptors; Female reproduction; Fertility; Insecticides; Mice; Reproductive toxicity.

1. Introduction

Pyriproxyfen (4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether) (PPF) is a larvicide used in agriculture and horticulture to combat the California red scale insects, silverleaf whitefly, cutworms, aphids and bollworm (Sullivan and Goh, 2008). Because it is previously considered of low toxicity for mammals, the World Health Organization (WHO) approved the use of PPF in drinking water, in which the maximum tolerable concentration in water tanks should be less than 0.01 mg/L (WHO, 2008). Then, this pesticide is mainly used to control disease-vector mosquitoes such as *Aedes aegypti* (WHO, 2008). PPF acts on the endocrine system and mimics the juvenile hormone, controlling the immature stages of the insect, and preventing metamorphosis from happening (Maoz et al., 2017). In addition, it causes morphological and functional changes in adults, such as inhibition of reproduction (Maoz et al., 2017).

According to the WHO studies, PPF has a LD₅₀ of 5000 mg/Kg of body mass in mice and rats (WHO, 2008). Regarding the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), two studies carried out on dogs, lasting 1 year, showed that the overall NOAEL was 10 mg/Kg of body mass per day (WHO, 2008). Therefore, an uncertainty factor of 100 was applied to this NOAEL value, resulting in a maximum permitted daily dose of 0.1 mg/Kg (WHO, 2008).

Since 2014, the Brazilian Ministry of Health, following WHO recommendations, adopted the use of PPF at a dose of 0.01 mg/L in drinking water reservoirs to combat *Aedes* mosquitoes. According to the epidemiological bulletin, in 2021, about 30 to 45 tons of PPF were distributed to the Brazilian states, to combat the breeding sites of these disease-vector mosquitoes (Ministério da Saúde, 2021a; Ministério da Saúde, 2021b).

Despite their relevance in agriculture and in controlling disease-vector mosquitoes, pesticides have been shown to provoke harmful effects on non-target organisms, such as aquatic organisms, birds, domestic animals, and humans (Kim et al., 2017; Sharma et al., 2020). Insecticides can affect the female genital system in different manners, causing alterations in sex hormone levels, declining female fertility, generating menstrual disorders, causing ovarian damage, and increasing the rates of congenital anomalies by affecting embryonic and fetal development (Kumar et al., 2019; Sharma et al., 2020). In light of this,

researches performed on model organisms, such as the mouse and zebrafish, contribute to understanding the damages caused by these pesticides and the possible adverse effects on humans and animals (Maharajan et al., 2020; Shahid and Saher, 2020).

In different animal models, PPF has been shown to cause reproductive toxicity. This larvicide disrupts the homeostasis of sex hormones and induces histopathological changes in the female and male gonads of zebrafish exposed to 1, 10 and 100 µg/L it for 21 days (Maharajan et al., 2020). Moreover, it can induce oxidative stress and impair follicle maturation in zebrafish at the doses of 10^{-12} , 10^{-9} or 10^{-6} M, increasing the rate of early stages and decreasing the later stages of follicle maturation (Oliveira et al., 2022).

Furthermore, a metabolite of PPF, named 4'-OH-PPF, may affect the thyroid activity in *Xenopus laevis*, by acting as a thyroid hormone T3 antagonist; consequently, exposure to this metabolite affects the development of cerebral compartments in this animal model (Vancamp et al., 2021). In rodents, during pregnancy, this insecticide at the doses of 30, 100, 300, and 1000 mg/kg reduced maternal weight gain and increased the duration of gestation (Shahid and Saher, 2020). In this same study, there were augmented fetal mortality and histopathological alterations in the liver, kidney, heart, and brain of the fetuses (Shahid and Saher, 2020).

Considering that PPF may present reproductive toxicity and act as a potential endocrine disruptor, and that humans are exposed to this pesticide through their feeding during various life stages, this study aimed to highlight the potential risks of PPF exposure for female reproductive health by using the mouse as the experimental model, and administering environmentally relevant doses of this pesticide since pre-puberty.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The procedures and handling of the mice were carried out following with the guidelines provided by the National Council for Animal Control and Experimentation (CONCEA) and by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (protocol number 1963200721). The

animals were maintained under controlled temperature (23 ± 1 °C) and photoperiod (12h light/dark cycle) at the Biotherium of Embryology (Room 110C/1st floor/Biological Sciences Center/UFSC). Filtered water and standard rodent chow were offered *ad libitum* during the experiments.

2.2. First Experiment

2.2.1. Experimental design

Female Swiss mice were randomly distributed in three experimental groups (n=20 *per* group): control group, *i.e.*, animals that received vehicle (975 μ L of 0.9% saline solution + 25 μ L of dimethyl sulfoxide); and PPF-treated groups at the doses of 0.1 or 1 mg/Kg, whose animals received PPF diluted in the vehicle at the respective doses (Figure 1). The treatments were daily performed by gavage from postnatal day (PND) 23 to PND 75. On alternated days, the animal body mass was evaluated to monitor the mass gain and growth of the females. In addition, water intake and food consumption were monitored throughout the experiment.

The PPF doses used in this study were obtained using the dose conversion methodology between different species, based on the body surface area of the species, humans and mice (Reagan-Shaw et al., 2008). Thus, the doses administered to the mice are equivalent to the maximum acceptable dose of PPF allowed by WHO for human daily intake (0.1 mg/Kg of human body mass) and a dose 10 times lower than the maximum level allowed by WHO (Truong et al., 2016; WHOPES 2017).

2.2.2. Puberty onset

From PND 23 the females were daily evaluated to identify the complete vaginal opening and first estrus, which are considered physical signs of puberty onset in females (Hubrecht and Kirkwood, 2010). When vaginal opening occurred, the mice were weighed and evaluated about the day of first estrus through the content of cells in the vaginal smears, in which the presence of cornified cells allowed the identification of this phase of the estrous cycle (Marcondes et al., 2002). On the day of the first estrus, the females were also weighed.

2.2.3. *Estrous cyclicity*

From PND 60 to PND 75, the cellular composition of the vaginal smears was daily examined to determine the phase of the estrous cycle and its regularity. Proestrus was characterized by the predominance of nucleated epithelial cells; estrus was determined by the abundance of cornified epithelial cells; metestrus was identified by a similar distribution of nucleated and cornified epithelial cells, and leukocytes; and diestrus was characterized by the predominance of leukocytes (Marcondes et al., 2002). The data obtained were used to estimate the frequency (in days) of proestrus, estrus, metestrus, and diestrus, the duration of the estrous cycle, and the number of cycles during the period evaluated (Leite et al., 2018).

2.2.4. *Euthanasia and organ masses*

After PND 75, one subgroup (n=10 *per* group) was euthanized, in the estrus phase, by isoflurane inhalation followed by cervical dislocation and, subsequently, reproductive organs such as ovaries, oviducts, and uterus were collected and weighed. To assess signs of systemic toxicity, vital organs such as kidneys, adrenals glands, liver, thyroid, brain, and pituitary gland were removed and weighed.

2.2.5. *Histological procedures and histomorphometric analyses*

The thyroids, left ovaries, and uterine horns were collected and fixed in modified Davidson's fixative solution, embedded in paraffin, and sectioned in three non-serial transverse sections (n=6/group) with a thickness of 4 μm , with a spacing of 35 μm . For uterine sectioning, it was used the medial region of the organ. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) to assess ovarian, uterine, and thyroid general morphology under microscopy. Moreover, thyroids were stained with Periodic Acid-Schiff (PAS) and hematoxylin to highlight colloid content inside the follicles. The uteri were also stained with Picrosirius Red and hematoxylin to identify the collagen fibers content and with toluidine blue for mast cell count. The ovaries were also stained with toluidine blue and used for mast cell quantification.

Ovarian follicles were counted and classified concerning the different maturation stages, taking into consideration the structure and number of granulosa cell layers of the different follicular types. The classification of ovarian follicles was performed as described by Borgeest *et al.*, 2002 (Borgeest *et al.*, 2002) and Talness *et al.*, 2005 (Talsness *et al.*, 2005). Corpora lutea were identified by the presence of large and acidophilic lutein cells, as well as by their vascularization (Westwood, 2008).

Regarding the uterine morphological evaluation, the structure of the different layers of the organ was analyzed, including perimetrium, myometrium, and endometrium (endometrial stroma, uterine glands, and luminal uterine epithelium) (Leite *et al.*, 2018).

For morphometric analysis, the ovary, uterus, and thyroid slides were photodocumented under an Olympus BX 41 optical microscope with an attached 3.3 megapixels digital camera, and measurements were performed on a personal computer using ImageJ software. The left ovary area was measured to obtain the number of ovarian follicles and corpora lutea *per ovary area* (mm²).

Furthermore, the quantity of ovarian interstitial tissue was assessed through degrees, considering the presence and abundance of this tissue in the cortical and medullary regions of the organ, as follows: 0 - indicates absence of interstitial tissue, 1 - represents a small amount of this tissue, 2 - indicates moderate quantity of ovarian interstitial tissue, and 3 - represents a large quantity of this tissue. After classification for the presence and distribution of interstitial tissue in each ovarian section (three sections *per animal*), the average grade *per animal* was calculated, following the same approach as performed by Leite *et al.* (2014) to estimate the degree of seminiferous epithelium development (Leite *et al.*, 2014).

In addition, in the uterus, morphometric assessments were performed to measure the thickness of the perimetrium, myometrium, endometrial stroma, luminal uterine epithelium, and total area of the lumen. Moreover, a stereological evaluation of uteri stained with Picrosirius Red and hematoxylin, and thyroid stained with PAS and hematoxylin was performed to determine the frequency of the different compartments of these organs. In the uteri, the following compartments were considered, focusing on myometrium and endometrium stroma: circular myometrium layer, longitudinal myometrium layer, connective

tissue between the myometrium layers, collagen fiber in the myometrium, endometrium stromal cells, uterine glands, and collagen fibers in the endometrium stroma. For the thyroid, stereological assessment considered the follicular epithelium, colloid content, parafollicular cells, and the remaining interstitial components of the organ.

2.2.6. Reproductive performance and fetal evaluations

From PND 75, the other subgroup (n=10/group) was used for the assessment of reproductive performance and fetal parameters (Figure 1). Thus, when proestrus was identified, the females were placed for mating with untreated males and on the following morning after mating, the presence of a vaginal plug or the presence of sperm in the vaginal smear was considered to confirm pregnancy, and this day was considered as gestational day (GD) 0. The body mass gain was daily monitored and maternal mass gain was calculated by the difference between body masses observed on GD 0 and GD 18. Water intake and food consumption were also monitored during gestational days.

On GD 18, females were weighed and euthanized by isoflurane inhalation followed by cervical dislocation. Then, the gravid ovaries and uterus were removed and weighed. In addition, gravidic corpora lutea, implantation sites, resorptions, and the number of live and dead fetuses were counted. Fetal and placental masses were also measured in an analytical balance. From these results, the following indexes were obtained: pregnancy rate = number of pregnant females/number of inseminated females x 100; fertility potential (implantation efficiency) = implantation sites/corpora lutea x 100; pre-implantation loss rate: number of corpora lutea - number of implantations/number of corpora lutea x 100; post-implantation loss rate = number of implantations - number of live fetuses/number of implantations x 100; sex ratio = number of male fetuses/number of female fetuses x 100.

After being removed on GD 18, the fetuses were fixed in 70% alcohol. Then, they were externally examined, with the use of a Zeiss stereomicroscope, for the position and shape of the eyes and mouth, height of ear implantation, cranial contour, presence and appearance of forelimbs and hind limbs, anal perforation, aspect of the tail and neural tube defects such as spina bifida (Damasceno et al., 2008).

Furthermore, fetal biometric parameters such as the relative anogenital distance, craniocaudal distance, and cephalic circumference were obtained. The relative anogenital distance was calculated, as follows: anogenital distance/cube root of body mass [$\text{mm/g}^{1/3}$] (Guerra et al., 2023). Cephalic circumference was calculated after obtaining the biparietal and fronto-occipital distances. For the obtainment of these measurements, a digital pachymeter was used.

2.3. *Second experiment*

2.3.1. *Uterotrophic assay, body mass and organ masses*

In parallel to the other experiment, the uterotrophic assay was performed as previously reported (Padilla-Banks et al., 2001). Female mice on PND 18 were randomly distributed into five experimental groups ($n=7/\text{group}$): negative control, whose animals received vehicle (corn oil); PPF at the doses of 0.01, 0.1, or 1 mg/Kg diluted in vehicle; and positive control, whose animals received 17 β -estradiol at the dose of 0.5 mg/Kg diluted in vehicle (Figure 1). The treatments were performed subcutaneously for three days. Twenty-four hours after the last administration, the mice were euthanized by isoflurane inhalation followed by cervical dislocation. Then, the uterus with and without fluid were collected and weighted to assess the estrogenic activity of PPF. Additionally, ovaries, oviducts, adrenal glands, kidneys, and liver were collected and weighed to evaluate the possible toxic effects of PPF in these organs.

2.4. *Statistical analysis*

The data were tested for normality and homoscedasticity by the Shapiro-Wilk test. Two-way ANOVA accompanied by Tukey's *post-hoc* test was used to evaluate data with monitoring throughout the experiment, such as body mass gain, and water and food intake. The other data were evaluated by One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test if the data presented normality and homoscedasticity. However, when these characteristics of the data were not confirmed, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc* test was used. The Fisher exact test was used to assess the frequency of external congenital anomalies. Statistical assessments were performed in the statistical program

GraphPad Prism® version 8 and the differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

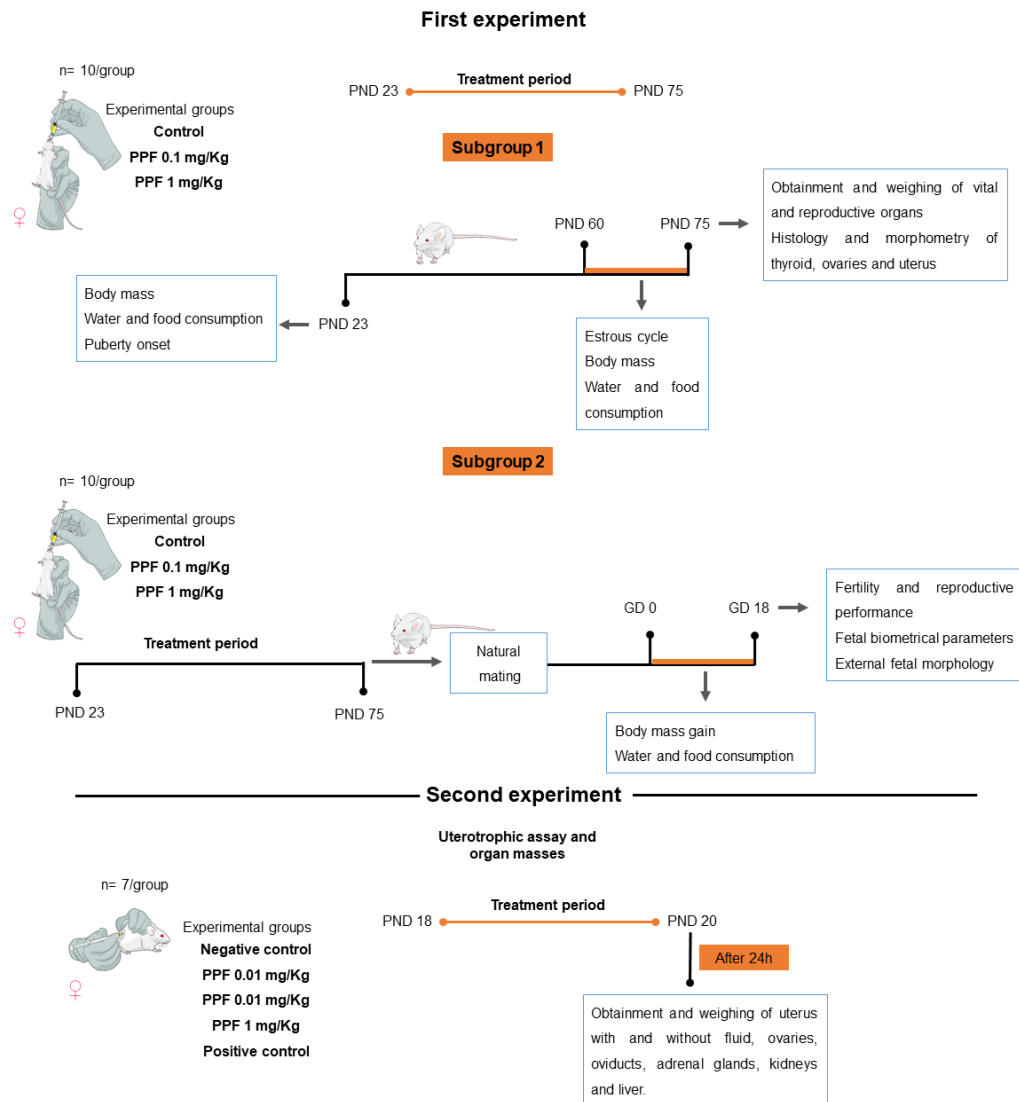


Figure 1. Experimental design of the two experiments. Created by the author: Developed at Mind the Graph and Power Point.

3. Results

A synthetic description of main results obtained in both experiments, after female mice were exposed to the different treatments, is shown in Figure 2.

Parameter	Differences among the groups
First experiment	
Treatment from PND 23 to PND 75	
Vaginal opening	=
Body mass at the day of vaginal opening	=
First estrus	=
Body mass at the day of first estrus	=
Estrous cycle	=
Absolut organ masses	Thyroid – ↓ 1mg/Kg
Relative organ masses	Liver – ↑ 0.1 mg/Kg and 1mg/Kg
Body mass	=
Water intake	=
Food consumption	=
Ovarian mast cells	=
Total ovarian area	=
Primordial/primary follicles	=
Preantral follicles	=
Antral follicles	=
Atretic follicles	=
Corpora lutea	=
Ovarian histopathology	Interstitial tissue in the medullar and cortical regions – ↑ 1 mg/Kg
Perimetrium	=
Myometrium	=
Endometrial stroma	↓ 0.1 mg/Kg and 1mg/Kg
Luminal epithelium	=
Luminal area	=
Myometrial collagen fibers	=
Endometrial collagen fibers	↓ 1mg/Kg
Uterine histopathology	Endometrial projections – ↓ 1mg/Kg
Thyroid stereology	Glandular epithelium and colloid masses – ↓ 1mg/Kg
Fertility and reproductive performance	
Body mass gain	=
Water intake	=
Food consumption	=
Fertility rates	Fetal death – ↑ 0.1 mg/Kg
Fetal biometric parameters	=
External fetal morphology	=
Uterotrophic assay	
Body mass	=
Uterus mass with fluid	↑ Positive control
Uterus mass without fluid	↑ Positive control
Organ masses	=

Figure 2. Description of the main results obtained in the experiments. No differences among the groups are indicated by the symbol of equal (=).

3.1. First experiment: Female reproductive parameters

The age of puberty onset was not affected by PPF exposure. Females showed similar age and body mass on the day of vaginal opening and first estrus (Figures 3 and 4). About the regularity of the estrous cycle, the length and number of cycles showed no differences among the groups (Table 1). In addition, the frequency of each phase of the estrous cycle showed a similar distribution among the groups (Figure 5).

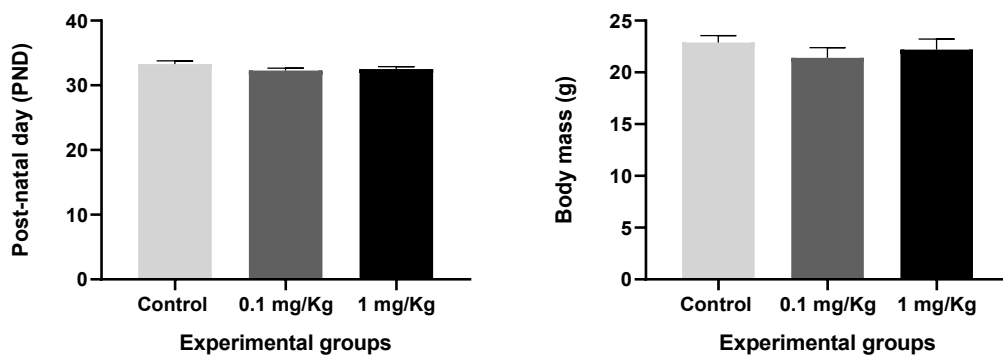


Figure 3. Age and body mass at the day of vaginal opening. Values expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

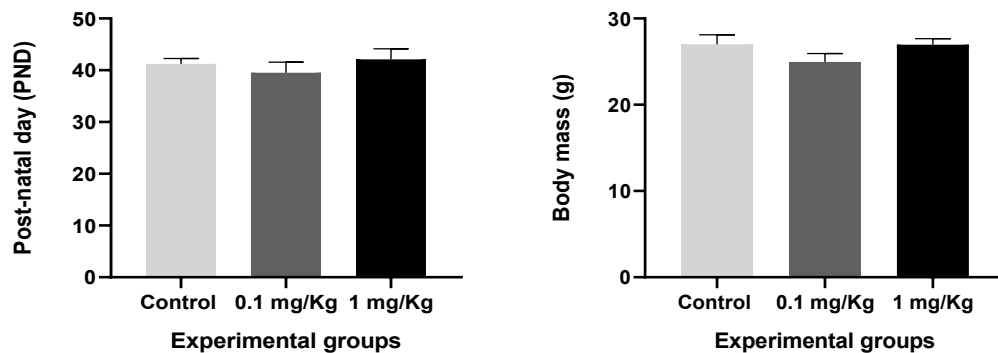


Figure 4. Age and body mass at the day of the first estrus. Values expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

4.

Table 1. Estrous ciclicity in the animals from the experimental groups.

	Experimental Groups (n=20/group)		
	Control	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg
Estrous cycle length (days)	4.44 ± 0.18	4.65 ± 0.25	4.94 ± 0.30
Number of estrous cycles	2.73 ± 0.00	3.20 ± 0.18	3.14 ± 0.17

Values expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

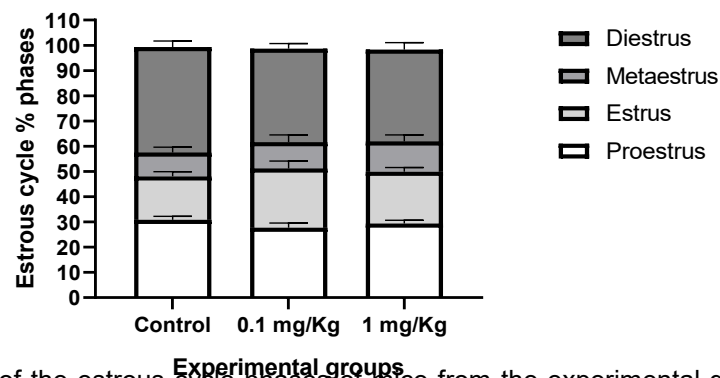


Figure 5. Frequency of the estrous cycle phases of mice from the experimental groups. Values expressed as median and interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test. $p > 0.05$.

Considering the evaluations performed from pre-puberty until sexual maturity, such as body mass gain and water and food ingestion, there were no differences among the experimental groups for these parameters ($p > 0.05$) (Figures 6 and 7).

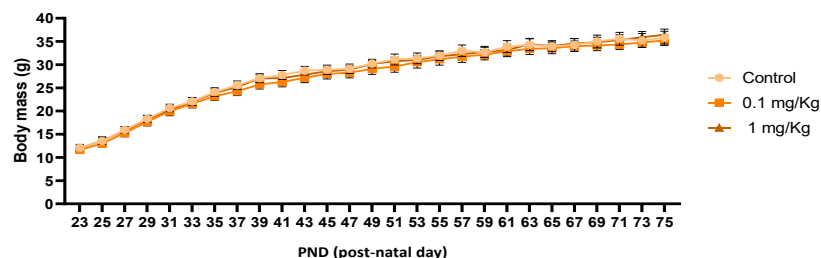


Figure 6. Body mass gain in females from the experimental groups since pre-puberty until sexual maturity. Values expressed as mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

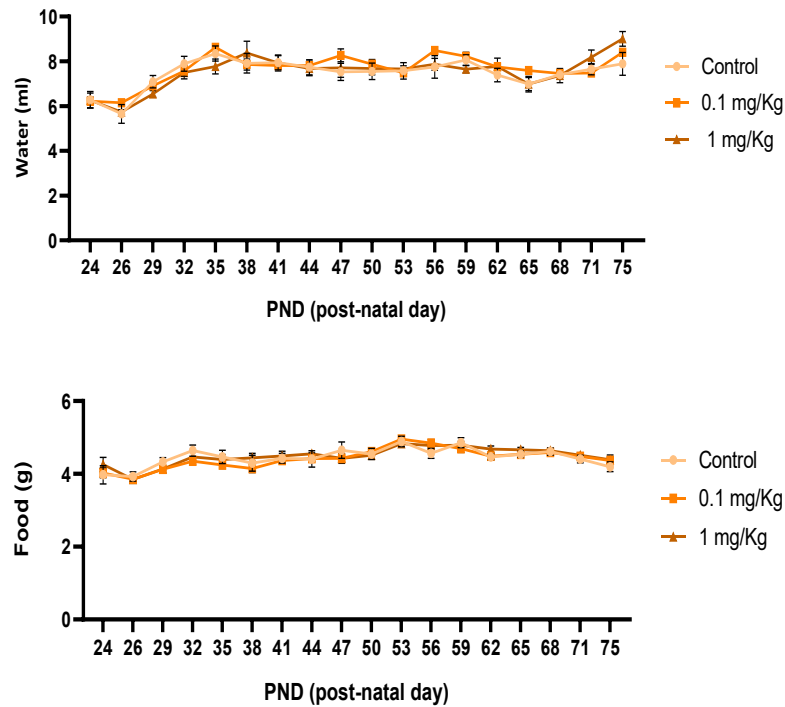


Figure 7. Water and food ingestion in the animals from the experimental groups since pre-puberty until sexual maturity. Values expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

Regarding the vital organ masses, PPF caused a decrease in absolute thyroid mass at the higher dose, when compared to controls, and an increase in relative liver mass at both doses ($p < 0.05$). However, the absolute and relative masses of the other organs showed to be similar among the experimental groups ($p > 0.05$) (Tables 2 and 3).

Table 2. Vital organ masses of females from the experimental groups at the first estrus after PND 75.

	Experimental Groups (n=10/group)		
	Control	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg
Final body mass (g)	35.88 ± 1.43	35.20 ± 0.70	35.60 ± 1.18
Brain (mg)	450.10 ± 10.82	446.10 ± 12.21	478.90 ± 10.86
Brain (mg/g BM)	1.26 ± 0.03	1.27 ± 0.03	1.36 ± 0.04
Pituitary (mg)	3.57 ± 0.48	3.70 ± 0.54	3.00 ± 0.00
Pituitary (mg/g BM)	9.99 ± 1.10	10.50 ± 1.54	8.13 ± 0.39
Thyroid (mg)	3.60 ± 0.37 ^a	2.89 ± 0.26 ^{ab}	2.50 ± 0.22 ^b
Thyroid (mg/g BM)	10.10 ± 1.00	9.26 ± 1.16	7.06 ± 0.60
Heart (mg)	128.50 ± 4.41	127.40 ± 3.61	130.60 ± 5.12
Heart (mg/g BM)	360.30 ± 11.33	354.70 ± 8.93	366.60 ± 5.98
Lung (mg)	196.60 ± 6.00	194.00 ± 4.55	190.60 ± 6.99
Lung (mg/g BM)	550.80 ± 12.68	551.70 ± 11.00	536.30 ± 14.05
Liver (g)	1.40 ± 0.08	1.48 ± 0.03	1.50 ± 0.08
Liver (g/g BM)	3.98 ± 0.10 ^a	4.20 ± 0.08 ^b	4.21 ± 0.10 ^b
Adrenal gland (mg)	7.20 ± 0.57	7.60 ± 0.34	7.90 ± 0.90
Adrenal gland (mg/g BM)	20.09 ± 1.48	21.61 ± 0.92	22.26 ± 2.31
Kidney (mg)	187.70 ± 6.46	194.90 ± 3.76	200.10 ± 7.98
Kidney (mg/g BM)	524.30 ± 5.26	550.00 ± 15.84	562.40 ± 14.69

Values expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p < 0.05$. Different letters indicate statistically significant differences among the groups. $p > 0.05$. BM = body mass.

Table 3. Reproductive organ masses of mice from the experimental groups in the first estrus after PND 75.

	Experimental groups (n=10/group)		
	Control	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg
Ovaries (mg)	12.56 ± 0.93	15.90 ± 1.31	14.60 ± 0.97
Ovaries (mg/g BM)	38.79 ± 4.42	45.52 ± 4.11	40.83 ± 2.02
Oviducts (mg)	9.78 ± 0.36	11.90 ± 0.95	10.00 ± 1.01
Oviducts (mg/g BM)	27.04 ± 1.31	33.93 ± 2.80	27.91 ± 2.54
Uterus (mg)	167.90 ± 7.68	160.20 ± 5.00	171.90 ± 4.33
Uterus (mg/g BM)	469.40 ± 20.75	454.60 ± 11.30	488.20 ± 21.86

Values expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$. BM = body mass.

Ovarian morphometric parameters such as total ovarian area, quantification of follicles at different stages of maturation and atresia, and the number of corpora lutea were similar among the experimental groups (Figure 8). However, ovarian histopathological evaluation exhibited an increase of interstitial tissue in the gonadal cortex and medulla of the mice treated with PPF 1 mg/Kg, when compared to the other groups (Figure 9).

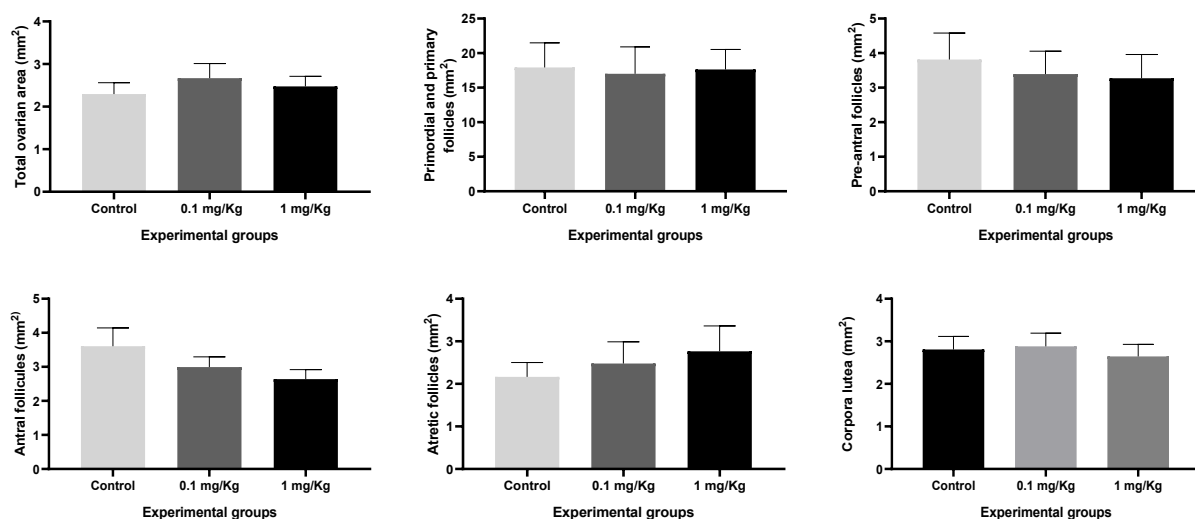


Figure 8. Quantification of follicles and corpora lutea in the ovary of the animals of the experimental groups in the first estrus phase after PND 75. Values expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

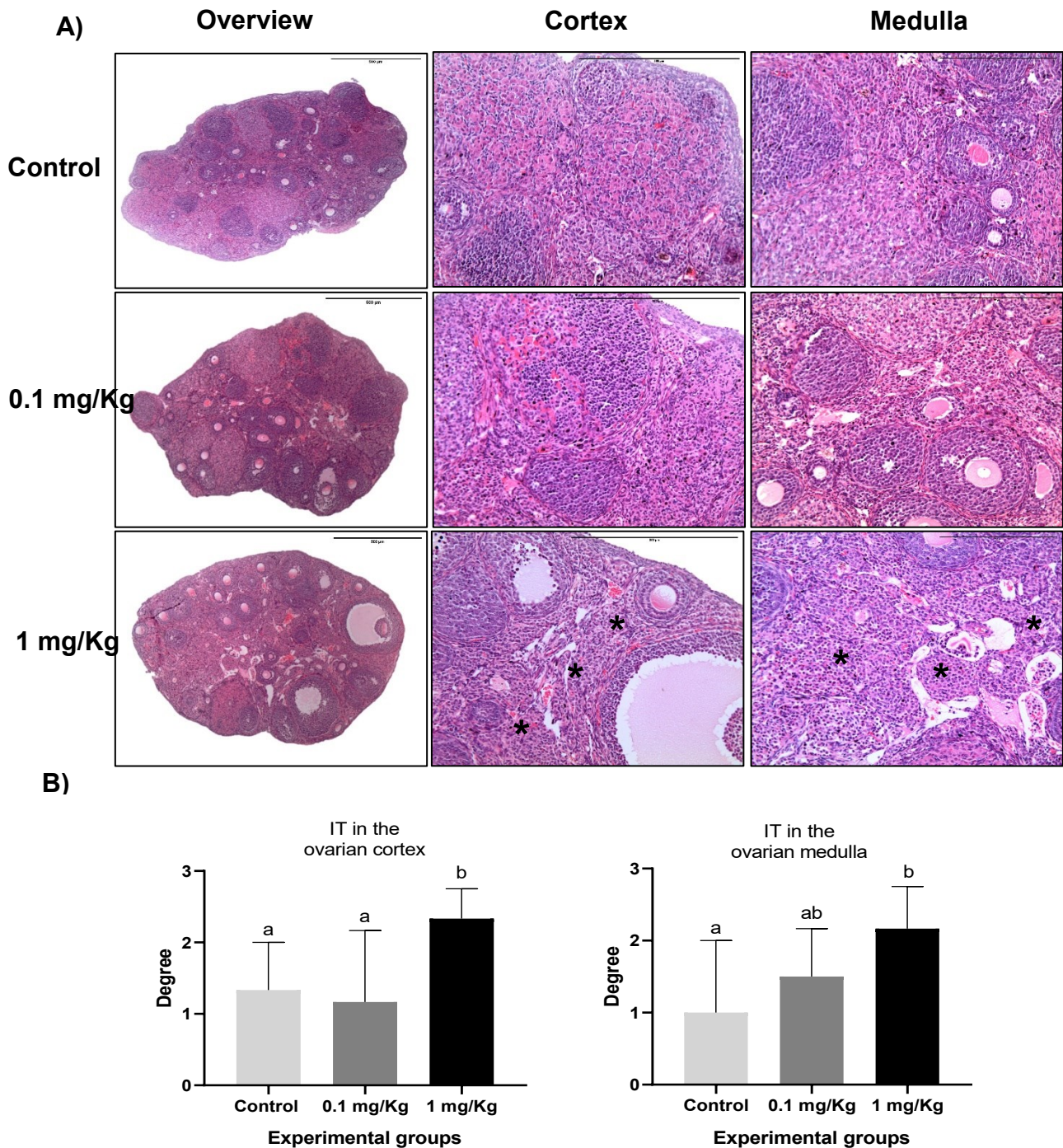


Figure 9. A: Photomicrographs of ovaries from females of the experimental groups in the first estrus after PND 75. Note the increased interstitial tissue in the cortex and medulla region of the ovary (asterisks) of mice exposed to the 1 mg/Kg of PPF. Hematoxylin and eosin (HE). Scale = 500 μ m in the first column and 250 μ m in the second and third columns. B: Degree of interstitial tissue (IT) in the ovarian cortex and medulla. Values expressed as median and interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test. Different letters indicate statistical differences among the groups. $p < 0.05$.

In the uterine histopathology, there was a reduction in the endometrial projections towards the lumen and a diminution in the proportion of collagen fibers in the group exposed to PPF 1 mg/Kg, in comparison to the other two groups (Figures 10 and 11). Additionally, morphometric assessment demonstrated a reduction in endometrial stroma in both experimental groups in comparison to the control group ($p < 0.05$) (Figure 10). However, the other uterine morphometric parameters were comparable among the groups (Figure 10).

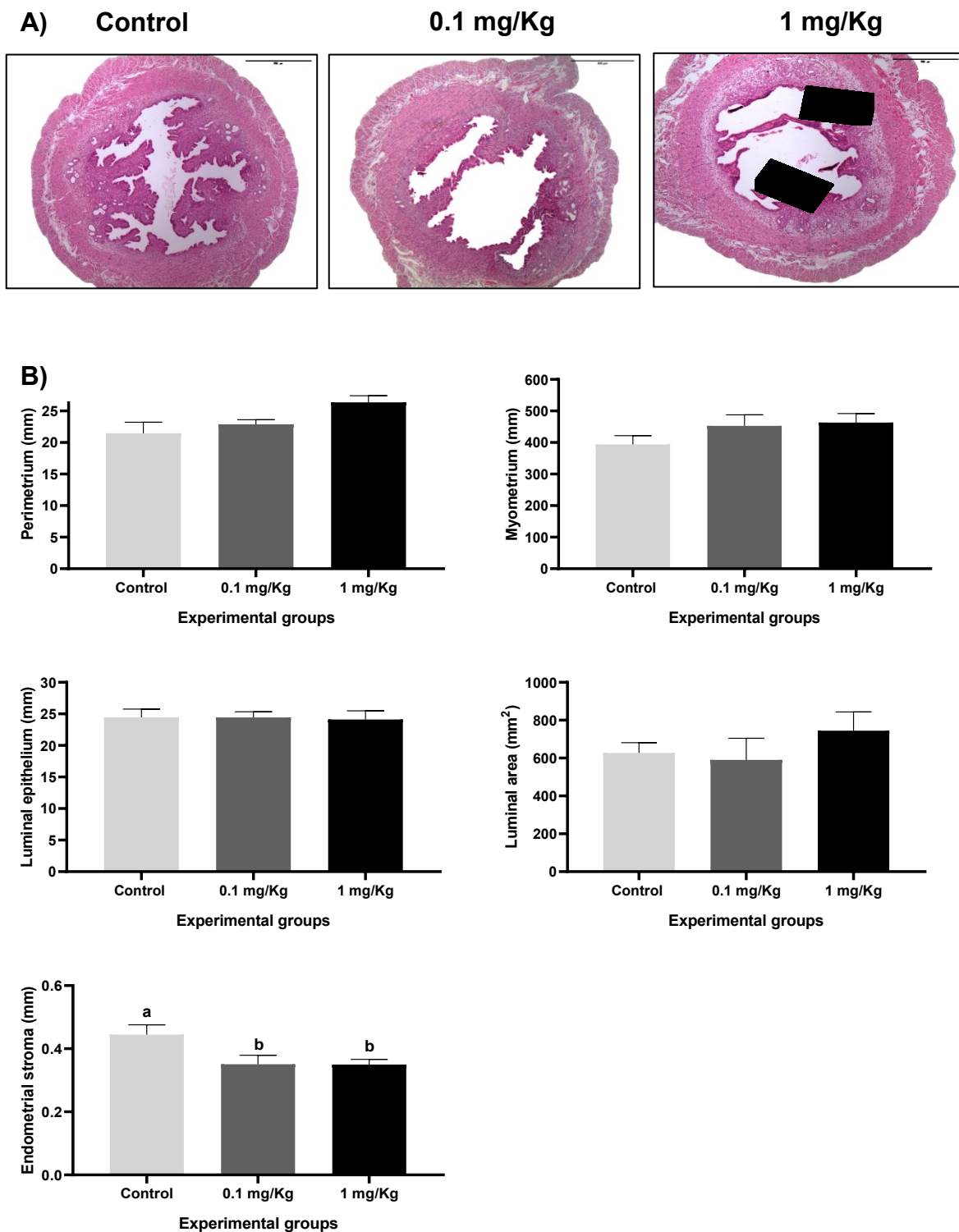
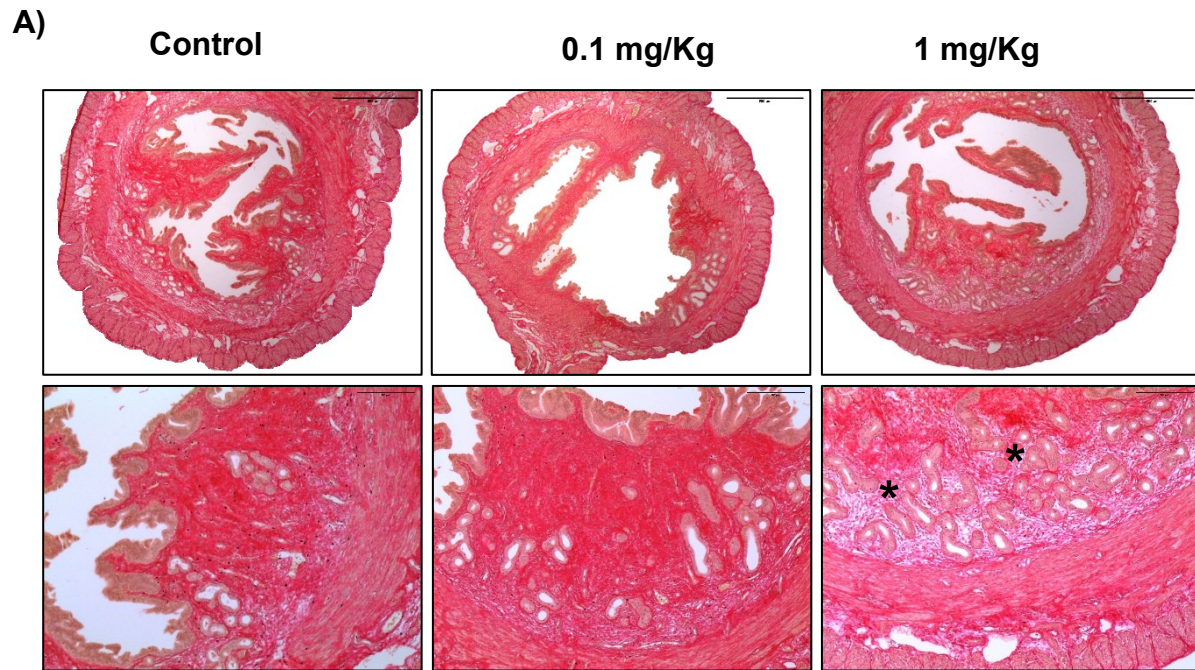
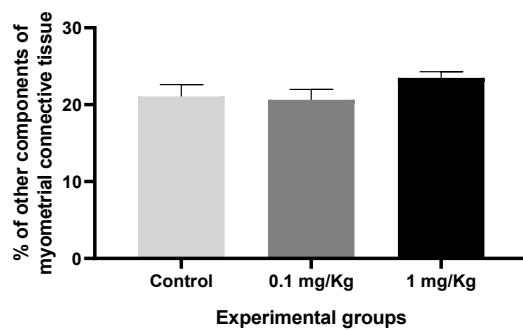
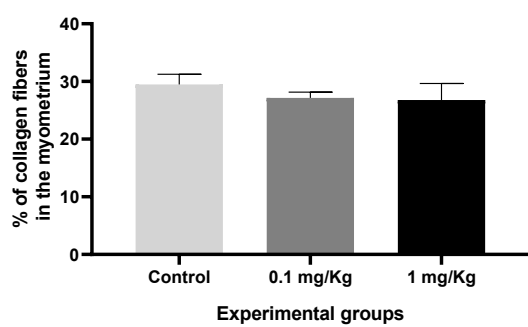
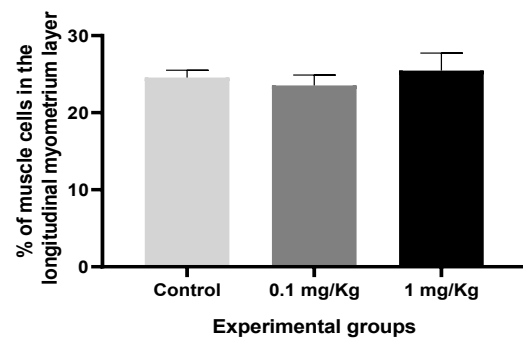
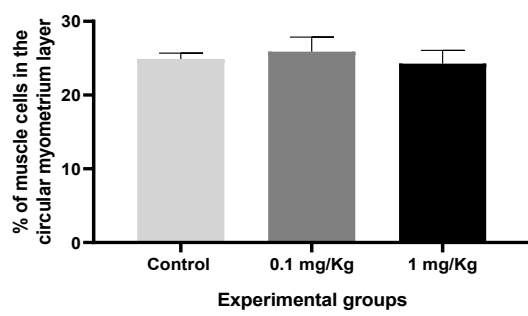


Figure 10. A. Uterine photomicrographs of animals from the experimental groups in the first estrus after PND 75. Note the decrease of endometrial projections towards the lumen (arrows) in females exposed to the higher dose of PPF. Hematoxylin and eosin (HE). Scale = 500 μ m. B. Uterine morphometry of the animals of the experimental groups in the first estrus phase after PND 75. Values expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Different letters indicate statistical differences among the groups. $p < 0.05$.



B)



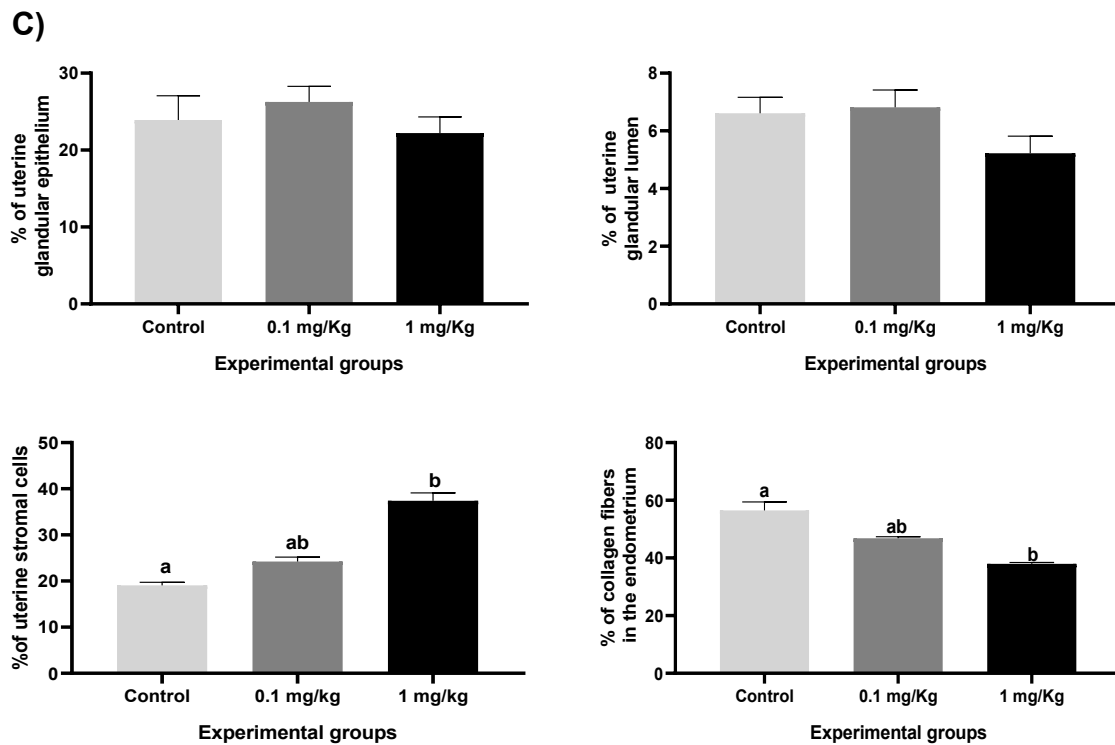


Figure 11. A. Uterine photomicrographs of animals from the experimental groups in the first estrus after PND 75. Note the decrease in the content of collagen fibers in the endometrium stroma (asterisks) of females exposed to 1 mg/Kg of PPF. Picrosirius red and hematoxylin (PSR-H). Scale = 500 μ m in the first line and 200 μ m in the second line. B and C: Proportion of different cells and tissues and collagen fibers in the myometrium and endometrial stroma of animals of the experimental groups in the first estrus after PND 75. Values expressed as median and interquartile range. Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test. Different letters indicate statistical differences among the groups. $p < 0.05$.

The quantification of mast cells performed in the cortex and medulla of the ovary and the uterine myometrium and endometrium stroma were similar among the experimental groups (Table 5). Furthermore, Figure 12 shows representative photomicrographs of ovaries and uteri stained with toluidine blue and mast cells identified in these organs, whose cell population was greater in the uterus than in the ovary, in both experimental groups.

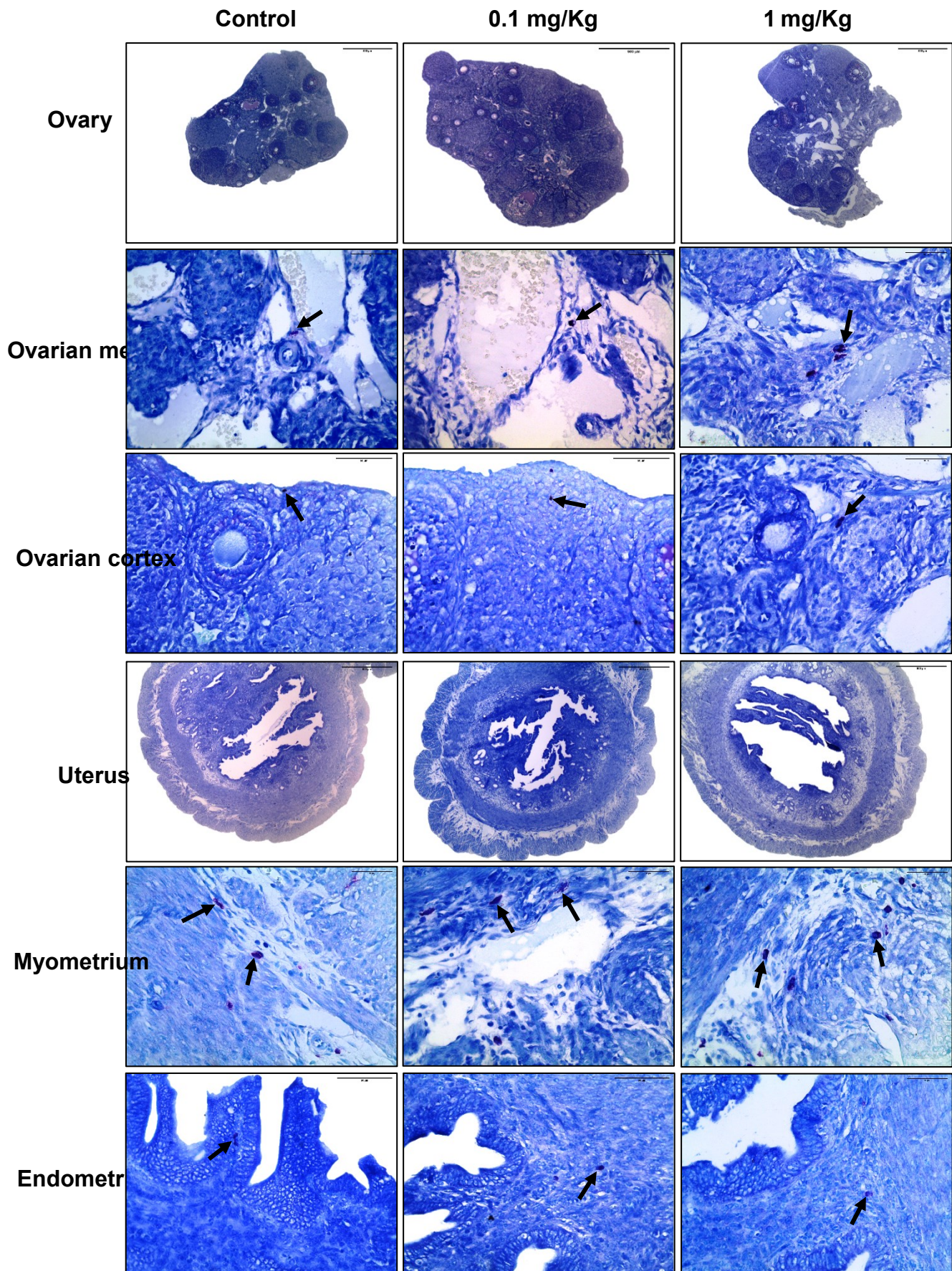


Figure 12. Photomicrographs of ovaries and uteri from females of the experimental groups stained with toluidine blue. Second and third lines are detailing mast cells (arrows) identified in the ovarian cortex and medulla, respectively. Fifth and sixth lines show mast cells (arrows) in myometrium and endometrial stroma. Scale = 500 μ m in the first and fourth lines and 50 μ m in the second, third, fifth and sixth lines.

Table 4. Quantification of mast cells in the ovary and uterus of females from the experimental groups in the first estrus after PND 75.

	Experimental Groups (n=6)		
	Control	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg
Ovarian cortex	1.00 \pm 0.35	0.94 \pm 0.34	0.27 \pm 0.12
Ovarian medulla	0.05 \pm 0.05	0.11 \pm 0.11	0.22 \pm 0.16
Myometrium	103.20 \pm 9.64	110.90 \pm 14.60	148.60 \pm 20.20
Endometrium	5.50 \pm 1.69	2.67 \pm 0.56	3.78 \pm 1.20

Values expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

Concerning thyroid histology, both experimental groups showed similar follicular epithelium structures with colloid inside them, as well as similar interstitial tissue with parafollicular cells (Figure 13). However, thyroid stereology showed a reduced mass of glandular epithelium and colloid in the group exposed to the higher dose of PPF, in comparison to the other groups ($p < 0.05$) (Table 5).

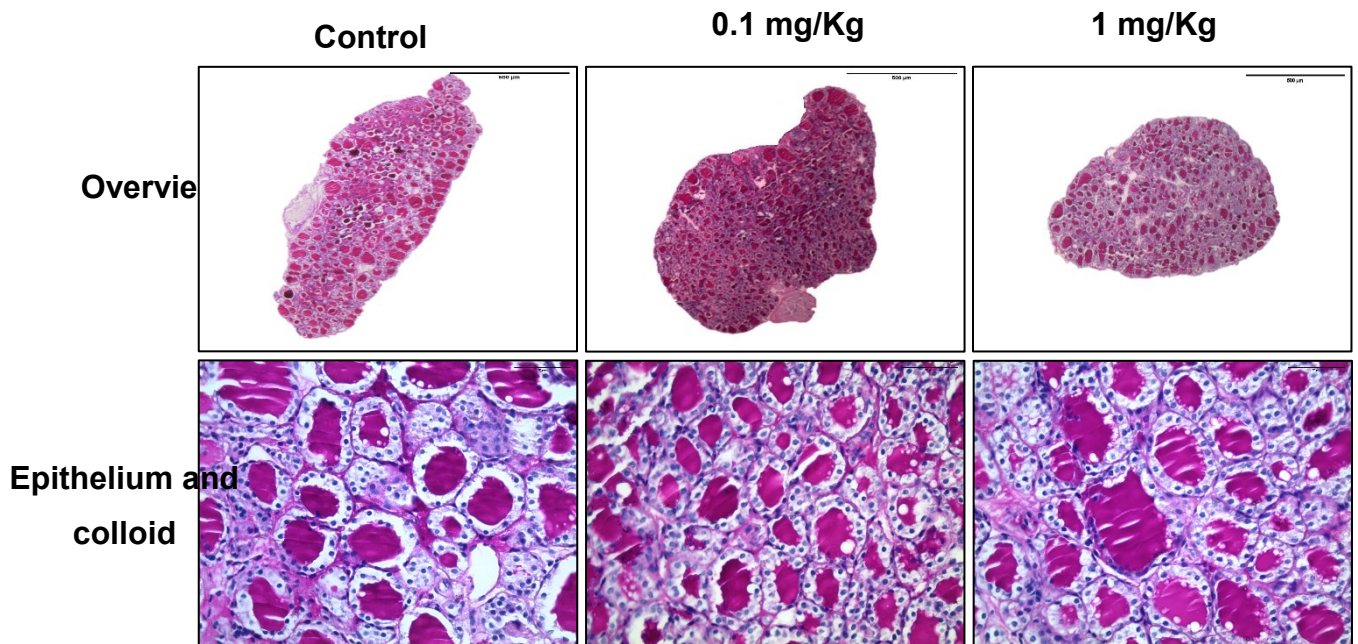


Figure 13. Photomicrographs of thyroids from females of the experimental groups in the first estrus after PND 75. Periodic acid Schiff (PAS) and hematoxylin. Scale = 500 μ m in the first line and 50 μ m in the second line.

Table 5. Thyroid stereology in the females of the experimental groups in the first estrus after PND 75.

	Experimental groups (n=6/group)		
	Control	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg
Glandular epithelium (%)	52.96 (47.84 – 54.38)	53.48 (35.41 – 59.78)	49.38 (35.10 – 62.03)
Glandular epithelium (mg)	2.00 \pm 0.31 ^a	1.43 \pm 0.16 ^{ab}	1.25 \pm 0.27 ^b
Colloid (%)	42.79 (36.37 – 54.87)	40.29 (27.04 – 56.37)	42.92 (31.23 – 49.54)
Colloid (mg)	1.72 \pm 0.20 ^a	1.18 \pm 0.17 ^{ab}	1.02 \pm 0.09 ^b
Parafollicular cells (%)	1.24 (0.46 – 3.57)	0.96 (0.68 – 1.12)	1.54 (0.46 – 1.73)
Parafollicular cells (mg)	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.05 \pm 0.02
Other interstitial components (%)	5.53 (3.46 – 7.86)	3.01 (2.20 – 5.89)	5.48 (4.17 – 7.87)
Other interstitial components (mg)	0.22 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03

Values expressed as mean \pm SEM or median and interquartile range. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test. Different letters indicate statistical differences among the groups. $p < 0.05$.

3.2. First Experiment: Reproductive performance and fetal evaluations

Body mass gain, water intake, and food ingestion in pregnant mice from the experimental groups were similar during pregnancy (Figures 14 and 15). Regarding reproductive performance, females from both treated groups showed a reduction of 30% in the gestational rate, when compared to the control group (Table 6). Additionally, it was observed an augmented frequency of fetal death in the offspring of females previously exposed to 0.1 mg/Kg of PPF ($p < 0.05$) (Table 6). On the other hand, no differences were found for the other indexes assessed in this study (Table 6).

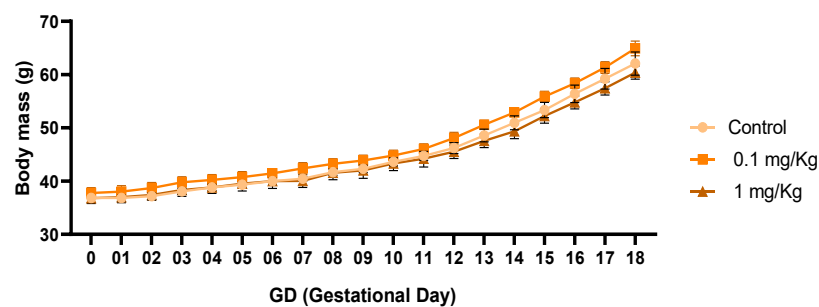


Figure 14. Body mass gain during pregnancy. Values expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

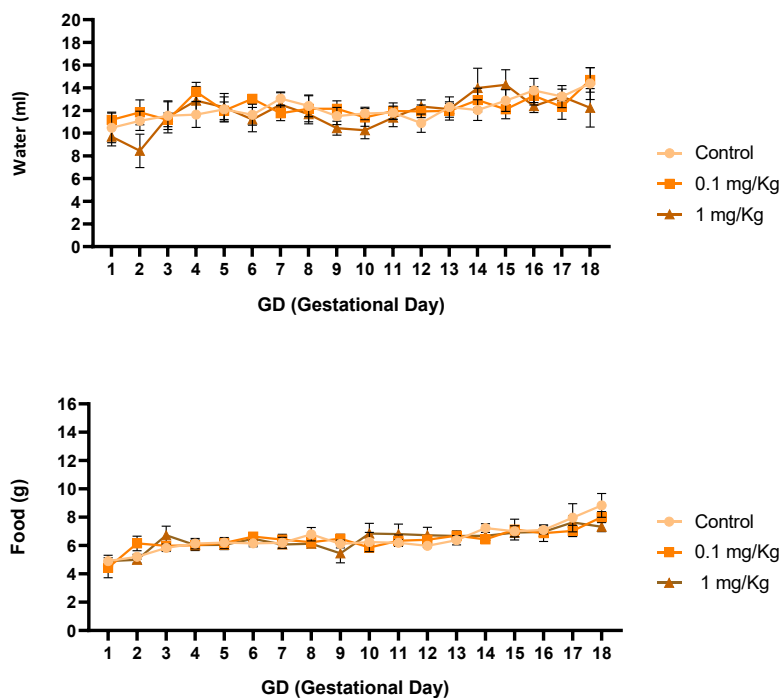


Figure 15. Water intake and food consumption during pregnancy. Values expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

Table 6. Reproductive performance of females from the experimental groups after natural mating with untreated males.

	Experimental groups (n=10/group)		
	Control	PPF 0.1 mg/Kg	PPF 1 mg/Kg
Gestational rate (%)	100%	70%	70%
Fertility test (%)	93.33 (86.67 – 100)	100 (86.67 – 100)	66.67 (46.15 – 92.86)
Pre-implantation loss (%)	6.67 (0.00 – 13.33)	0.00 (0.00 – 13.33)	33.33 (7.14 – 53.85)
Post-implantation loss (%)	11.11 (3.84 – 20.63)	11.76 (10.00 – 35.71)	16.67 (15.38 – 25.00)
Sex ratio (M:F)	1.37 (0.75 – 2.00)	1.40 (0.71 – 3.50)	1.20 (0.57 – 1.67)
Gravid uterus (g)	16.44 ± 1.80	18.80 ± 1.59	14.66 ± 1.50
Dead fetus (%)	0.00 (0.00 – 0.00) ^a	0.50 (0.00 – 1.25) ^b	0.00 (0.00 – 0.00) ^a
Male fetus mass (g)	1.41 ± 0.04	1.44 ± 0.05	1.41 ± 0.06
Female fetus mass (g)	1.31 ± 0.03	1.30 ± 0.05	1.32 ± 0.04
Placenta mass from male fetus (g)	0.11 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.00
Placenta mass from female fetus (g)	0.11 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.00

Values expressed as mean ± SEM or median and interquartile range. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test. Different letters indicate statistical differences among the groups. $p < 0.05$.

The fetal biometric parameters evaluated, as well as the frequency of congenital anomalies and early developmental milestones, were similar among the groups, showing that PPF did not affect fetal development (Tables 7 and 8).

Table 7. Fetal biometric parameters of male and female offspring of animals from the experimental groups.

	Experimental Groups		
	Control (n=10)	0.1 mg/Kg (n=7)	1 mg/Kg (n=7)
Craniocaudal distance in the female fetus (mm)	23.78 ± 0.34	23.78 ± 0.32	23.40 ± 0.33
Craniocaudal distance in the male fetus (mm)	24.60 ± 0.36	24.30 ± 0.28	24.42 ± 0.36
Head circumference in the female fetus (mm)	47.83 ± 0.59	48.48 ± 1.43	46.90 ± 0.93
Head circumference in the male fetus (mm)	48.73 ± 0.66	50.28 ± 0.90	49.73 ± 0.70
AGDi in the female fetus (mm)	0.72 ± 0.04	0.69 ± 0.07	0.70 ± 0.05
AGDi in the male fetus (mm)	1.12 ± 0.07	1.08 ± 0.08	1.08 ± 0.04

Values expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

Table 8. Frequency of congenital anomalies and anticipation of developmental milestones in the offspring of animals from the experimental groups.

	Experimental groups		
	Control	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg
Total congenital anomalies	5.62	8.84	5.26
Curly tail	2.25	0.00	1.75
Elongated snout	1.12	1.23	0.00
Exencephaly	1.12	0.00	0.00
Macroglossia	1.12	0.00	0.00
Congenital anomalies of limbs	0.00	3.70	1.75
Gastroschisis	0.00	2.47	1.75
Exophthalmos	0.00	1.23	0.00
Open eyelid	16.85	15.07	14.04

Values expressed in percentage (%). Fisher's exact test. $p > 0.05$.

3.3. Second Experiment: Uterotrophic assay, body mass, and organ masses

Females used in the second experiment had similar initial and final body masses among the experimental groups (Figure 16). As expected, the mass of the uterus with and without fluid of the animals that received 17β -estradiol increased compared to the other groups ($p < 0.05$), showing the efficacy of the test, although uteri masses among the other groups were similar (Figure 17). The mass of the other collected organs showed no differences among the groups (Table 9).

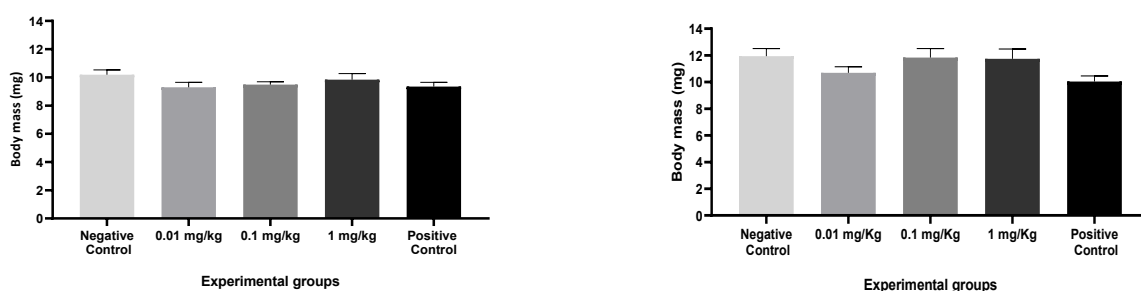


Figure 16. Female body mass at the beginning and the final of the uterotrophic assay, respectively. Values expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

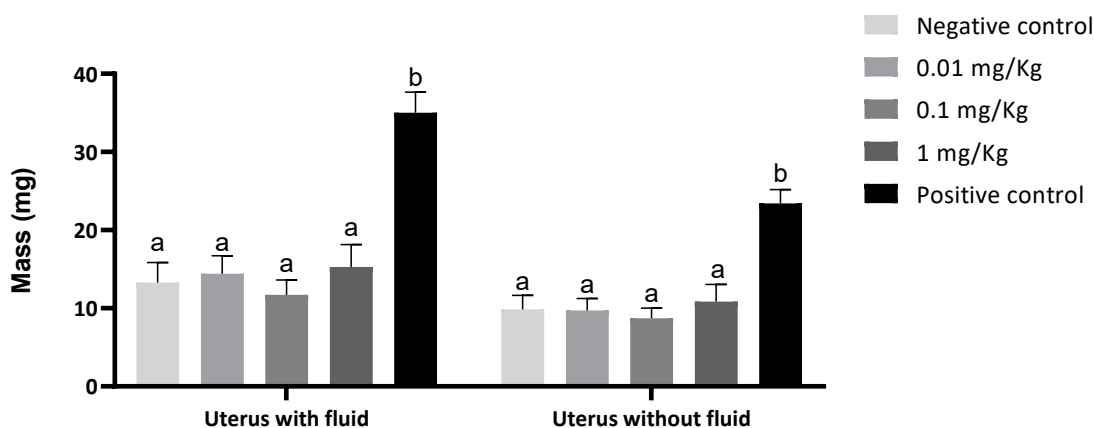


Figure 17. Mass of uterus with and without fluid. Values expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Different letters indicate statistically significant differences among the groups. $p < 0.05$.

Table 9. Reproductive and vital organ masses of females used in the uterotrophic assay

	Experimental Groups (n=7/group)				
	Negative Control	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	Positive Control
Ovaries (mg)	3.00 ± 0.22	2.43 ± 0.20	2.57 ± 0.30	2.57 ± 0.20	2.71 ± 0.29
Oviducts (mg)	3.00 ± 0.00	2.43 ± 0.20	3.00 ± 0.00	2.86 ± 0.26	3.00 ± 0.00
Adrenal gland (mg)	2.43 ± 0.20	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.14 ± 0.26	2.57 ± 0.20
Kidneys (mg)	102.80 ± 3.83	82.29 ± 4.23	85.71 ± 3.89	96.29 ± 5.40	94.14 ± 6.56
Liver (mg)	556.00 ± 33.70	432.30 ± 24.44	470.40 ± 30.56	511.50 ± 28.96	527.00 ± 44.54

Values expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. $p > 0.05$.

4. Discussion

It is known that endocrine disruptors act by mimicking or antagonizing the action of endogenous hormones, such as estrogen (Ye and Liu, 2019). When evaluating the *in vitro* estrogenic activity of thirty-two pesticides, it was found that PPF exhibited estrogenicity (Kojima et al., 2005). However, Ji *et al.*, (Ji et al., 2020) observed *in vitro* that only PPF metabolites had intense estrogenic activity. The uterotrophic assay is a test validated by the Organization for Economic Cooperation and Development, which consists of evaluating the ability of a compound to induce an agonist or antagonist activity to endogenous estrogens (OECD, 2007; Otha et al., 2012). In this study, the mass of the uterus of the PPF-exposed females did not change after the exposure, indicating that PPF showed no estrogenicity in the doses and conditions tested.

In female rodents, the vaginal opening and the first estrus are considered external markers of puberty onset (Si et al., 2012). Some endocrine disruptors already described may affect this critical phase of postnatal development, resulting in early or late puberty (Perveen et al., 2020). Female mice when *in utero* exposed to the insecticide cypermethrin, an estrogenic compound, showed an anticipation of vaginal opening (Gan et al., 2023). However, rats exposed to the pesticide methoxychlor during the beginning of the postnatal period showed no change on the day of vaginal opening (Bertolasio et al., 2011).

Therefore, in this study, PPF did not affect puberty onset, since the females from the experimental groups showed similar ages of vaginal opening and first estrus. Considering that puberty onset is dependent on increased levels of estradiol and that PPF showed no estrogenicity in the tested doses, it was expected that the age of puberty onset would be similar among the groups. Thus, the absence of estrogenic action of the insecticide may explain the similar ages of puberty onset.

Determining the regularity of the estrous cycle is considered a useful marker for assessing the integrity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and ovarian activity (Ramos Nieto et al., 2021). When there are changes in the estrous cycle, such as a prolonged diestrus, reduced proestrus, and shorter estrus, it may be due to an imbalance in the estrogen/progesterone ratio, as suggested by Baligar and Kaliwal (Baligar and Kaliwal, 2002). In this study, PPF-treated females showed no changes in estrous cyclicity.

Furthermore, monitoring body mass and water and food consumption during the experiment are considered crucial parameters for assessing the animal's state of health, and, in addition, the mass of vital organs can also indicate signs of systemic toxicity (EPA, 1998). Herein, the treated groups showed body mass growth and consumption of water and food similar to the control group.

In the present study, a decrease in thyroid mass and the masses of glandular epithelium and colloid were observed at the dose of 1 mg/Kg. Thyroid hormones play an important role in maintaining different biological processes, such as metabolism, reproduction, and development (Tovo-Neto et al., 2018). In the ovaries, adequate levels of thyroid hormones modulate the action of FSH and LH, because they are involved in the survival of follicles and granulosa cells (Canipari et al., 2019; Cecconi et al., 1999). In the uterus, through intracellular receptors, these hormones regulate the responsiveness of the organ to estrogen (Silva et al., 2018).

Thyroid dysfunction is associated with reproductive disorders, where thyroid hypofunction reduces the number of growing follicles, increases follicular atresia and oxidative stress in the ovary, decreases proliferative rate of uterine epithelial and stromal cells, and diminishes the endometrial thickness (Silva et al., 2018). Furthermore, a previous study showed that *Xenopus laevis* exposed to PPF metabolite (4'-OH-PPF) exhibited decreased thyroid hormone signaling with an antagonistic activity to T3 (Vancamp et al., 2021). Then, we suppose that the thyroid may be a

target for this toxicant, as well as its metabolite shown in the previous study performed with frogs. Additional studies are necessary to elucidate the pathways used by PPF to provoke toxicity in the thyroid.

Additionally, relative liver mass was increased at both doses of exposure. It is known that the liver is involved in the response to most xenobiotics due to its ability to biotransform chemical compounds (Williams and Iatropoulos, 2002). After analyzing PPF metabolites in rat livers *in vitro*, it was shown that their toxicity is greater than that of PPF (Liu et al., 2020). In addition, WHO studies have shown an increase in liver mass in rats exposed to doses of 120 mg/Kg/day (WHO, 2008). We tested doses that did not exceed the maximum limit of PPF allowed for WHO for daily ingestion, and even using lower doses, we showed an increased relative liver mass, suggesting a possible toxic effect for this organ.

Concerning the reproductive organs, in this study, both groups exhibited a similar number of follicles and corpora lutea. In contrast, a study with *Danio rerio* found that PPF inhibited follicle maturation, causing an increase in the proportion of follicles in early stages containing previtellogenic oocytes (Oliveira et al., 2022). Furthermore, it is known that exposure to different pesticides suppresses follicular development and causes apoptosis in granulosa cells (Badraoui et al., 2010; Wang et al., 2019).

Herein, females exposed to PPF presented an increase in ovarian interstitial tissue, in both cortex and medulla, which may be related to the increased levels of androgen secretion. It is known that ovarian interstitial tissue is steroidogenic, as well as theca cells, and it is capable to synthesize androgens (Al-Mehdi, 1979). Ovarian interstitial tissue, when present in augmented quantity, is indicative of increased androgen production. Thus, augmented androgen levels may impair the female genital system, provoking ovarian dysfunction or damaging other reproductive organs like the uterus, by decreasing endometrium thickness and making it more edematous (Astapova et al., 2019; Camargo et al., 2014; Pelletier, 2000). Moreover, increased testosterone levels and a reduced expression of aromatase *cyp19b* genes were observed in female zebrafish exposed to PPF, which resulted in decreased E₂/T ratio, suggesting an androgenic and anti-estrogenic effect of PPF in females (Maharajan et al., 2020).

In the ovary, mast cell numbers change according to the phase of the reproductive cycle and play a role in increasing vascular permeability in response to

LH, interacting with estrogen and progesterone, and helping to maintain the organ's homeostasis (Gayfan et al., 1991). In the uterus, mast cells also fluctuate according to the phase of the cycle and their most important role is in the implantation, by secreting substances that generate the tissue remodeling necessary during this process (Woidacki et al., 2013). Females exposed to glyphosate, another pesticide, during pregnancy, showed increased mast cell numbers in the uterus, which, together with other inflammatory processes, contributed to increased post-implantation losses (Ingaramo et al., 2022). Despite this, no difference was observed in the number of mast cells in the ovary and uterus of PPF-exposed animals.

In the uterus, excess androgenic stimulation may inhibit the growth of endometrial tissue (Tuckerman et al., 2000). Females exposed to exogenous androgens showed decreased thickness of the endometrium and edematous endometrial stroma (Camargo et al., 2014). Moreover, the activity of the aromatase enzyme may be negatively affected by the influence of exogenous androgens; thus, they may impair the balance between steroid hormones and impact uterine structure (Camargo et al., 2014; Mobini Far et al., 2007). In this study, the increased amount of ovarian interstitial tissue was accompanied by a decrease in the thickness of the endometrial stroma with reduced endometrial projections towards the lumen, and a reduction in the content of endometrial collagen fibers; thus, endometrium had an edematous appearance. When assessed together, these results reinforce the androgenic effect of PPF in the female genital system.

In the uterine stroma, collagen fibers are organized interspersed with cells and can have their synthesis, degradation, and organization modified by steroid hormones (Bracho et al., 2019; Gisela S et al., 2020). Once these hormones are deregulated, with a predominance of androgens, collagen fibers undergo disarrangements in their distribution throughout the endometrium, which may impair endometrial receptivity during implantation (Chávez-Genaro et al., 2022).

Although a previous study showed that the administration of PPF during pregnancy caused a decrease in female mass gain and an increased duration of pregnancy (Shahid and Saher, 2020), in this study, females demonstrated similar mass gain and water and food consumption throughout pregnancy. It is important to highlight that the doses used in this previous study were higher than the acceptable daily intake

allowed by the WHO, unlike this study, in which the guidelines were followed to simulate human exposure to PPF (WHOPES, 2017; WHO, 2008).

Herein, there was a reduction of 30% in the pregnancy rate of both PPF-exposed females. It is worth mentioning that females were inseminated and presented vaginal plug or sperm in vaginal smears, although the mice were not able to keep gestation. This result indicates a possible damage of PPF to oocytes, reducing the viability of germ cells, which, in turn, compromises fertilization and the success of pregnancy.

Recent studies have reported that PPF may induce oxidative stress in zebrafish ovaries and testis, by increasing reactive oxygen species formation and lipid peroxidation and provoking glutathione depletion (Oliveira et al., 2022; Oliveira et al., 2021). Furthermore, considering that PPF may increase oxidative stress, it may provoke DNA damage in oocytes, which could be transmitted to the zygote whether fertilization was successful. Then, embryo or fetal development may be compromised during critical phases of the prenatal period, which, at last, may increase fetal death in the offspring. Shahid and Saher (Shahid and Saher, 2020) when administered PPF to pregnant mice also reported augmented fetal death and changes in the mass and histology of liver, kidney, brain, and heart in the offspring of these females (Shahid and Saher, 2020). Despite this, in this study, when females were exposed to PPF until pre-conception, there were no changes in the frequency of congenital anomalies or fetal biometric parameters.

Then, PPF may increase ovarian interstitial tissue and impair endometrial stroma, which indicates an androgenic effect and an endocrine-disruptive action of this pesticide. When oocytes are under androgenic stimulation and exposed to increased oxidative stress, as we suppose these are part of the adverse outcome pathways of PPF, then, the events such as fertilization and successful pregnancy may be harmed. Whether embryo development progresses, fetal viability may be impaired and fetal death can be augmented.

5. Conclusion

In summary, female mice exposed to PPF from pre-puberty to sexual maturity exhibited systemic toxic effects, as demonstrated by reduced thyroid mass, diminished mass of the thyroid glandular epithelium and colloid, and increased liver mass. In addition, PPF increased ovarian interstitial tissue and decreased endometrial stroma thickness and the content of collagen fibers; thus, it made the uterus more edematous. Together, the results indicate a possible androgenic effect of this pesticide. Moreover, PPF reduced the pregnancy rate in both groups and increased fetus death in the group exposed to the lower dose, suggesting diminished viability of oocytes and an impairment to fetal viability mediated by maternal factors. Then, considering that this study was performed with environmentally acceptable doses of PPF, it indicates that this pesticide may represent a possible risk to the reproductive health of women exposed chronically to PPF since infancy and adolescence.

6. Funding

Funding: This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Brazil) as scholarships provided to Alice Santos da Silva and Henrique Frederico Enz Fagá, respectively. Fátima Regina Mena Barreto Silva was supported by CNPq grants # 305799/2019-3.

7. Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

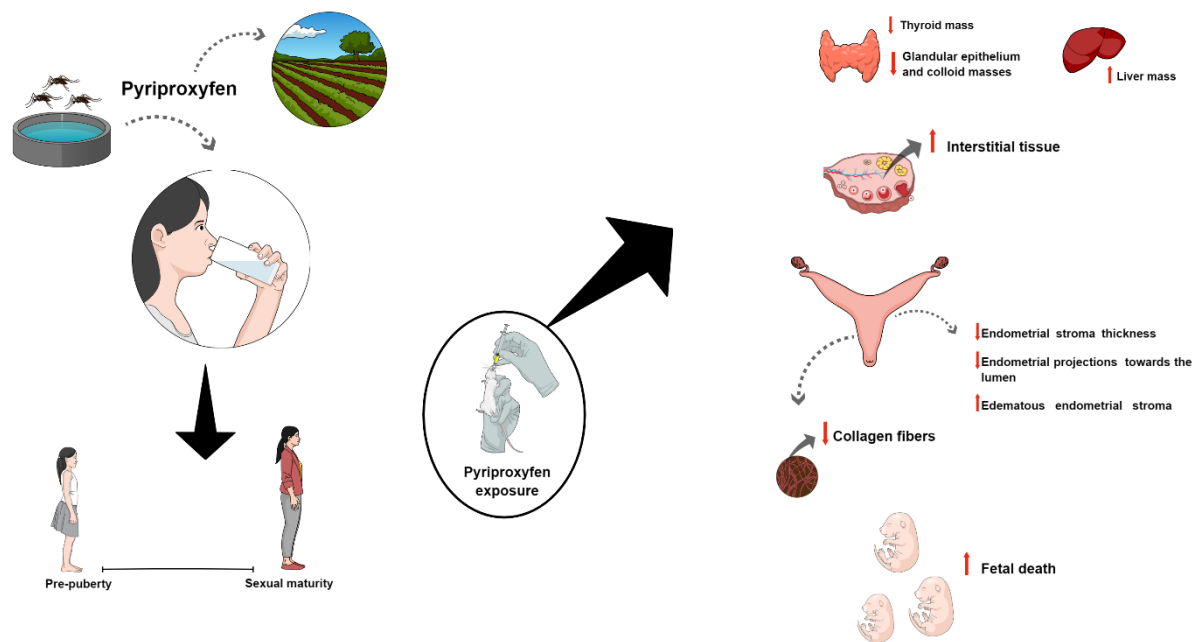
8. CRediT authorship contribution statement

Alice Santos da Silva: Conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, visualization, and writing of the original draft. **Tainara Fernandes de Mello:** Methodology, investigation, and formal analysis. **Henrique Frederico Enz Fagá:** Investigation and formal analysis. **Jennyfer Karen Knorst:**

Investigation and formal analysis. **Fátima Regina Mena Barreto Silva:** Conceptualization, resources, and writing of the original draft. **Gabriel Adan Araújo Leite:** Conceptualization, resources, methodology, project administration, supervision, visualization, and writing of the original draft. The manuscript was revised and approved by all authors.

9. Acknowledgments

The authors are thankful to the Laboratório Multiusuário de Estudos de Biologia (LAMEB) from UFSC, and to all colleagues who collaborated on this work.



Supplementary Figure 1. Graphical abstract. Created by the author. Developed at Mind the Graph.

10. References

Al-Mehdi, M. I. A. 1979. Fine structure and origin of interstitial tissue in the ovary of the pregnant rat. *Acta Anat.* 103, 245-251. <https://doi.org/10.1159/000145021>.

- Astapova, O., Minor, B. M. N., Hammes, S. R. 2019. Physiological and Pathological Androgen Actions in the Ovary. *Endocrinol.* 160, 1166–1174. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00101>.
- Badraoui, R., Abdelmoula, N. B., Feki, N., Nasr, H. B., Rebai, T. 2010. Endocrine disruption and ovarian morphometric responses in rats following exposure to tetradifon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 268–272. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.09.013>.
- Baligar, P. N., Kaliwal, B. B. 2002. Reproductive toxicity of carbofuran to the female mice: effects on estrous cycle and follicles. *Industrial Health* 40, 345-352. <https://doi.org/10.2486/indhealth.40.345>.
- Bertolasio, J., Fyfe, S., Snyder, B. W., Davis, A. M. 2011. Neonatal injections of methoxychlor decrease adult rat female reproductive behavior. *Neurotoxicology*, 32, 809–813. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.06.007>.
- Borgeest, C., Symonds, D., Mayer, L. P., Hoyer, P. B., Flaws, J. A. 2002. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol. Sci.* 68, 473–478. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.2.473>.
- Bracho, G. S., Acosta, M. V., Altamirano, G. A., Tschopp, M. V., Luque, E. H., Kass, L., Bosquiazzo, V. L. 2020. Androgen receptor and uterine histoarchitecture in a PCOS rat model. *Mol. Cell. Endocrinol.* 518, 110973. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110973>.
- Bracho, G. S., Altamirano, G. A., Kass, L., Luque, E. H., Bosquiazzo, V. L. 2019. Hyperandrogenism induces histo-architectural changes in the rat uterus. *Reprod. Sci.* 26, 657–668. <https://doi.org/10.1177/1933719118783881>.
- Camargo, I. C. C., Leite, G. A. A., Pinto, T., Ribeiro-Paes, J. T. 2014. Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. *Exp. and Toxicol. Pathol.* 66, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.01.005>.
- Canipari, R., Mangialardo, C., Di Paolo, V., Alfei, F., Ucci, S., Russi, V., Santaguida, M. G., Virili, C., Segni, M., Misiti, S., Centanni, M., Verga Falzacappa, C. 2019. Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles. *J. Endocrinol. Invest.* 42, 271-282. <https://doi.org/10.1007/s40618-018-0912-2>.
- Cecconi, S., Rucci, N., Scaldaferrri, M. L., Masciulli, M. P., Rossi, G., Moretti, C., D'Armiento, M., Ulisse, S. 1999. Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation

and granulosa cell aromatase activity. *Endocrinol.* 140, 1783-1788. <https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6635>.

Chávez-Genaro, R., Toledo, A., Hernández, K., Anesetti, G. 2022. Structural and functional changes in rat uterus induced by neonatal androgenization. *J. Mol. Histol.* 53, 903–914. <https://doi.org/10.1007/s10735-022-10106-5>.

Damasceno, D. C., Kempinas, W. G., Volpato, G. T., Consonni, M., Rudge, M. V. C., Paumgarten, F. J. R. 2008. *Anomalias congênitas: estudos experimentais*, first ed, Coopmed, Belo Horizonte.

EPA. 1998. Health Effects Test Guidelines: OPPTS 870.4100 Chronic Toxicity, United States Environmental Protection Agency, <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100IRTR.PDF?Dockey=P100IRTR.PDF>. (accessed 05 June 2023).

Gan, H., Zhu, B., Zhou, F., Ding, Z., Liu, J., Ye, X. 2023. Perinatal exposure to low doses of cypermethrin induce the puberty-related hormones and decrease the time to puberty in the female offspring. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 2665–2675. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22328-x>.

Gayfan, F., Aceitero, J., Bellido, C., Sanchez-Criado, J. E., Aguilar, E. 1991. Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biol. Reprodu.* 45, 27–33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.1.27>.

Guerra, M. T., Erthal, R. P., Punhagui-Umbelino, A. P. F., Trinque, C. M., Bari, M. A. T., Nunes, T. D. M., Costa, W. F., Cleto, P. H., Fernandes, G. S. A. 2023. Reproductive toxicity of maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate and butyl paraben (alone or in association) on both male and female Wistar offspring. *J. Appl. Toxicol.* 43, 242–261. <https://doi.org/10.1002/jat.4377>.

Hubrecht, R., Kirkwood, J. 2010. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, eighth ed., Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781444318777>.

Ingaramo, P. I., Alarcón, R., Cagliaris, M. L., Varayoud, J., Muñoz-de-toro, M., Luque, E. H. 2022. Altered uterine angiogenesis in rats treated with a glyphosate-based herbicide. *Environ. Pollut.* 296, 118729. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118729>.

Ji, C., Song, Q., Chen, Y., Zhou, Z., Wang, P., Liu, J., Sun, Z., Zhao, M. 2020. The potential endocrine disruption of pesticide transformation products (TPs): The blind

- spot of pesticide risk assessment. *Environ. Int.* 137, 105490. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105490>.
- Kim, K. H., Kabir, E., Jahan, S. A. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.
- Kojima, M., Fukunaga, K., Sasaki, M., Nakamura, M., Tsuji, M., Nishiyama, T. 2005. Evaluation of estrogenic activities of pesticides using an in vitro reporter gene assay. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 271–280. <https://doi.org/10.1080/09603120500155765>.
- Kumar, S., Sharma, A., Kshetrimayum, C. 2019. Environmental & occupational exposure & female reproductive dysfunction. *Indian J Med Res.* 150, 532–545. https://doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_1652_17.
- Leite, G. A. A, Figueiredo, T. M., Pacheco, T. L., Guerra, M. T., Anselmo-Franci, J. A., Kempinas, W. G. 2018. Reproductive outcomes in rat female offspring from male rats co-exposed to rosuvastatin and ascorbic acid during pre-puberty. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A.* 81, 873-892. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1504702>.
- Leite, G. A. A., Rosa, J. L., Sanabria, M., Cavariani, M. M., Franci, J. A. A., Pinheiro, P. F. F., Kempinas, W. G. 2014. Delayed reproductive development in pubertal male rats exposed to the hypolipemiant agent rosuvastatin since prepuberty. *Reprod. Toxicol.* 44, 93-103. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.01.004>.
- Liu, H., Li, P., Wang, P., Liu, D., Zhou, Z. 2020. Toxicity risk assessment of pyriproxyfen and metabolites in the rat liver: A *vitro* study. *J. Hazard Mater.* 389, 121835. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121835>.
- Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Karthik, C., Nataraj, B., Nambirajan, K., Hemalatha, D., Jiji, S., Kadirvelu, K., Liu, K., Ramesh, M. 2020. Pyriproxyfen induced impairment of reproductive endocrine homeostasis and gonadal histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) by altered expression of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis genes. *Sci. Total Environ.* 735, 139496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139496>.
- Maoz, D, Ward, T, Samuel, M, Müller, P, Runge-Ranzinger, S, Toledo, J, Boyce, R., Velayudhan, R., Horstick, O. 2017. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005651>.

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62, 609-614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>.

Ministério da Saúde. 2021. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 20. https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_20.pdf/view (accessed 05 January 2023).

Ministério da Saúde. 2021. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 27. https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_26.pdf/view (accessed 05 January 2023).

Mobini Far, H. R., Agren, G., Lindqvist, A., Marmendal, M., Fahlke, C., Thiblin, I. 2007. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 131, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.07.037>.

OECD/OCDE. 2007. 440 OECD guideline for the testing of chemicals uterotrophic bioassay in rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-440-uterotrophic-bioassay-in-rodents_9789264067417-en. (accessed 30 May 2022).

Oliveira, V. S., Castro, A. J. G., Marins, K., Mendes, A. K. B., Leite, G. A. A., Zamoner, A., Kraak, G. V. D., Silva, F. R. M. B. 2021. Pyriproxyfen induces intracellular calcium overload and alters antioxidant defenses in *Danio rerio* testis that may influence ongoing spermatogenesis. *Environ. Pollut.* 270, 116055. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116055>.

Oliveira, V. S., Marins, K., Mendes, A. K. B., Zamoner, A., Leite, G. A. A., Silva, F. R. M. B. 2022. *In vivo* exposure to pyriproxyfen causes ovarian oxidative stress and inhibits follicle maturation in zebrafish. *J Appl Toxicol.* 43, 799–807. <https://doi.org/10.1002/jat.4425>.

- Otha, R., Takagi, A., Ohmukai, H., Marumo, H., Ono, A., Matsushima, Y., Inoue, T., Ono, H., Kanno, J. 2012. Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. *J. Toxicol. Sci.* 37, 879–889. <https://doi.org/10.2131/jts.37.879>.
- Padilla-Banks, E., Jefferson, W. N., Newbold, R. R. 2001. The immature mouse is a suitable model for detection of estrogenicity in the uterotrophic bioassay. *Environ. Health Perspect.* 109, 821-826. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109821>.
- Pelletier, G. 2000. Invited review localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol. Histopathol.* 15, 1261-1270.2000. <https://doi.org/10.14670/hh-15.1261>.
- Perveen, A., Shen, J., Kaka, N. A., Li, C. 2020. Maternal exposure to T-2 toxin affects puberty genes and delays estrus cycle in mice offspring. *Animals.* 10, 471. <https://doi.org/10.3390/ani10030471>.
- Ramos Nieto, M. R., Lasagna, M., Cao, G., Álvarez, G., Santamaira, C., Girault, M. E. R., Bourguignon, N., Giorgio, N., Vutura, C., Mardirosian, M., Rodriguez, H., Lux-Llantos, V., Cocca, C., Núñez, M. 2021. Chronic exposure to low concentrations of chlorpyrifos affects normal cyclicity and histology of the uterus in female rats. *Food Chem. Toxicol.* 156, p. 112515. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112515>.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>.
- Shahid, A., Saher, M. 2020. Repeated exposure of pyriproxyfen to pregnant female mice causes developmental abnormalities in prenatal pups. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 26998–27009. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08656-w>.
- Sharma, R. K., Setia, P. S., Shama, A. K. 2020. Insecticides and ovarian functions. *Environ Mol Mutagen.* 61, 369–392. <https://doi.org/10.1002/em.22355>.
- Si, J., Han, X., Zhang, F., Xin, Q., An, L., Li, G., Li, C. 2012. Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride advances puberty and affects patterns of estrous cyclicity in female mice. *Environ. Toxicol.* 27, 662–670. <https://doi.org/10.1002/tox.21756>.
- Silva, J. F., Ocarino, N. M., & Serakides, R. 2018. Thyroid hormones and female reproduction. *Biol. Reprod.* 99, 907-921. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y115>.
- Sullivan, J. J., Goh, K. S. 2008. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *J Pestic Sci.* 33, 339–350. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R08-02>.
- Talsness, C. E., Shakibaei, M., Kuriyama, S. N., Gande, S. W., Sterner-Kock, A., Schnitker, P., Souza, C., Grote, K., Chahoud, I. 2005. Ultrastructural changes

- observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicol Lett.* 157, 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.02.001>.
- Tovo-Neto, A., Rodrigues, M. S., Habibi, H. R., Nóbrega, R. H. 2018. Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 265, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.023>.
- Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M. T., Tanguay, R. L. 2016. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environ. Pollut.* 218, 1089–1093. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.061>.
- Tuckerman, E. M., Okon, M. A., Li, T., Laird, S. M. 2000. Do androgens have a direct effect on endometrial function? An *in vitro* study. *Fertil. Steril.* 74, 771–779. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)00711-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)00711-1).
- Vancamp, P., Spirhanzlova, P., Sébillot, A., Butruille, L., Gothié, J. D., Le Mével, S., P., Leemans, M., Wejaphikul, K., Meima, M., Mughal, M. B., Roques, P., Remaud, S., Fini, J., Demeneix, B. A. 2021. The pyriproxyfen metabolite, 4'-OH-PPF, disrupts thyroid hormone signaling in neural stem cells, modifying neurodevelopmental genes affected by ZIKA virus infection. *Environ. Pollut.* 285, 117654. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117654>.
- Wang, H., He, Y., Cheng, D., Pu, D., Tan, R., Gao, L., Cui, Y., Wu, J. 2019. Cypermethrin exposure reduces the ovarian reserve by causing mitochondrial dysfunction in granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 379, 114693. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114693>.
- Westwood, F. R. 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol. Pathol.* 36, 375–384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>.
- WHOPES, Report of the twentieth WHOPES working group meeting, WHO/HQ, Geneva, 20–24 March 2017. <https://www.who.int/publications/i/item/who-htm-ntd-whopes-2017.04> (accessed 01 March 2022).
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J. 2002. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity, *Toxicol. Pathol.* 30, 41–53. <https://doi.org/10.1080/01926230252824699>.

Woidacki, K., Jensen, F., Zenclussen, A. C. 2013. Mast cells as novel mediators of reproductive processes. *Front. Immunol.* 4, 29. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00029>.

World Health Organization. 2008. Pyriproxyfen in drinking-water: Use for vector control in drinkingwater sources and containers. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/pyriproxyfen-background.pdf> (accessed 06 June 2021).

Ye, X., Liu, J. 2019. Effects of pyrethroid insecticides on hypothalamic-pituitary-gonadal axis: A reproductive health perspective. *Environ. Pollut.* 245, 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.031>.

4. DISCUSSÃO

Os desreguladores endócrinos são compostos que alteram negativamente a atividade endócrina, seja mimetizando ou bloqueando as ações hormonais (Rattan *et al.*, 2017; You; Song, 2021). Dentre as diferentes substâncias consideradas como desreguladores endócrinos, encontram-se os praguicidas, por demonstrarem que podem causar danos à reprodução feminina, afetando os tecidos e funções reprodutoras (Rattan *et al.*, 2017).

Em estudos de toxicologia, a utilização de roedores e outros organismos-modelo se mostra importante para observação dos efeitos tóxicos à saúde decorrentes da exposição aos desreguladores endócrinos (Rattan *et al.*, 2017). Em relação ao PPF, a literatura é escassa acerca das consequências que esse inseticida pode provocar a organismos não-alvo. Com isso, esse trabalho foi o primeiro a avaliar os efeitos da exposição ao PPF no sistema genital feminino desde a pré-puberdade até a maturidade sexual em camundongos.

Sabe-se que um dos mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos é mimetizar ou antagonizar a ação de hormônios esteroides, como o estrogênio, através da ligação aos receptores nucleares desses hormônios (Ye; Liu, 2019). Ao avaliar a atividade estrogênica *in vitro* de 32 praguicidas, incluindo o PPF, através do ensaio de gene repórter, um estudo verificou que o PPF apresenta efeito estrogênico tanto sozinho quanto combinado com outros praguicidas (Kojima *et al.*, 2005). Por outro lado, Ji *et al.*, (2020) observou, *in vitro*, que apenas os metabólitos do PPF possuíam intensa atividade estrogênica no teste, entretanto, o PPF não induziu nenhum efeito.

O ensaio uterotrófico é um teste validado pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), que consiste em avaliar a capacidade de um composto em induzir uma atividade agonista ou antagonista aos estrogênios endógenos (OECD, 2007; OTHA *et al.*, 2012). De acordo com a OECD (2007), o útero irá responder aos estrogênios com aumento de sua massa, devido à retenção de fluidos e ao aumento dos tecidos deste órgão. Como visto neste trabalho, os animais que receberam o 17 β -estradiol apresentaram aumento da massa do útero com fluido e sem fluido. A massa do útero das fêmeas que receberam PPF não foi alterada, indicando que, nas doses testadas, o PPF não apresentou atividade estrogênica.

O início da puberdade é um período crítico em que há um aumento contínuo na liberação pulsátil de GnRH, tendo como resultado a ativação do eixo HHG, o crescimento, o desenvolvimento e a maturidade sexual, que culmina na reprodução (Gan *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2018). Em roedores fêmeas, a abertura da cavidade vaginal e o primeiro estro são considerados marcadores externos da instalação da puberdade, ou seja, esses são os primeiros eventos para que se possa atingir a maturidade sexual (Si *et al.*, 2012). Fatores exógenos, como os desreguladores endócrinos, podem afetar essa fase do desenvolvimento pós-natal, resultando em puberdade precoce ou tardia (Perveen *et al.*, 2020).

Camundongos ICR fêmeas quando expostos ao inseticida cipermetrina no ambiente intra-uterino apresentaram antecipação da idade de abertura vaginal (Gan *et al.*, 2023). Por outro lado, ratas expostas ao praguicida metoxicloro durante o período pós-natal (DPN 1 ao 3) não apresentaram alteração no dia da abertura vaginal (Bertolasio *et al.*, 2011). Sendo assim, os estudos mostram que diferentes compostos podem alterar a idade de instalação da puberdade, incluindo os praguicidas. Todavia, neste trabalho, o PPF não afetou a instalação da puberdade, visto que as fêmeas tratadas com o inseticida apresentaram idade da abertura vaginal e do primeiro estro semelhantes ao grupo controle.

A determinação do ciclo estral é considerada um marcador importante que pode indicar como está a integridade do eixo HHG e, conseqüentemente, a atividade ovariana (Nieto *et al.*, 2021). Quando ocorrem alterações no número de ciclos ou na frequência das fases, como um diestro prolongado, redução de proestros e estros mais curtos, essas alterações podem ser indicativas de desequilíbrio na proporção estrogênio/progesterona, como sugeriu Baligar e Kaliwal (2002). Entretanto, neste estudo, as fêmeas tratadas com PPF não apresentaram alterações na ciclicidade estral, na duração dos ciclos, no número de ciclos no período avaliado ou na frequência de cada fase do ciclo.

O acompanhamento da massa corporal e do consumo de água e ração durante o experimento tem sido considerados essenciais para a identificação do estado de saúde do animal e, além disso, a massa dos órgãos coletados também podem indicar sinais de toxicidade sistêmica (*Environmental Protection Agency- EPA*, 1998). Neste trabalho, os animais de ambos os grupos tratados apresentaram curva de crescimento de massa corporal e consumo de água e ração, ao longo do experimento, semelhantes

ao grupo controle. No entanto, Shahid e Saher (2020) observaram diminuição da massa corporal em camundongos *Swiss* fêmeas expostas ao PPF nas doses de 1200, 600, 320, 200, 100, 40 e 20 mg/Kg/dia. Em outro estudo, utilizando ratos *Sprague-Dawley* machos e fêmeas, o PPF foi inserido na ração nas concentrações de 80, 400, 2000 e 10000 ppm e, no final do experimento os animais apresentaram diminuição da massa corporal, diminuição no consumo de ração e aumento na ingestão de água (Koyama *et al.*, 1989).

No presente trabalho, foi observada diminuição da massa da tireoide na dose de 1 mg/Kg. Os hormônios tireoidianos desempenham um papel importante na manutenção de diferentes processos biológicos, como osmorregulação, metabolismo, morfogênese, desenvolvimento e reprodução (Tovo-Neto *et al.*, 2018). Nos ovários, níveis adequados de hormônios tireoidianos modulam a ação dos hormônios FSH e LH, além de estarem envolvidos com a sobrevivência de folículos e células da granulosa (Canipari *et al.*, 2019; Cecconi *et al.*, 1999). Em relação ao PPF, foi demonstrado anteriormente que este inseticida pode interferir na tireoide em ensaios realizados com ratos machos e fêmeas púberes (Wegner *et al.*, 2016). Nesse mesmo estudo, outros praguicidas alteraram a massa e/ou histologia desse órgão (Wegner *et al.*, 2016).

Com o intuito de investigar neste trabalho como o PPF afetou a tireoide, a histomorfometria do órgão foi avaliada. Não foram observadas alterações a nível tecidual na tireoide, embora a estereologia tenha demonstrado redução nas massas do epitélio glandular e de coloide, o que indica uma possível ação tóxica do PPF sobre este órgão. Em um estudo prévio, a exposição de *Xenopus laevis* ao metabólito do PPF (4'-OH-PPF) promoveu diminuição da sinalização do hormônio tireoidiano T3, mostrando sua atividade antagônica em relação a este hormônio (Vancamp *et al.*, 2021).

Outro órgão que teve sua massa afetada pelo PPF foi o fígado, o que foi demonstrado pelo aumento da massa relativa em ambas as doses do praguicida. O fígado está envolvido na resposta da maioria dos xenobióticos, em função da sua capacidade de biotransformação de compostos químicos (Williams; Iatropoulos, 2002). Vale ressaltar que, ao analisar esses metabólitos em fígados de rato *in vitro*, foi possível observar que a capacidade de toxicidade dos metabólitos é maior que a do PPF e que o órgão possui afinidade diferente, em maior ou menor grau, aos

isômeros desses compostos (Liu *et al.*, 2020). Ademais, estudos da OMS mostraram aumento da massa do fígado de ratos expostos a doses de 120 mg/Kg/dia (WHO, 2008), que representam doses muito maiores do que as utilizadas neste estudo.

Apesar de não ter afetado a massa dos órgãos reprodutores, a exposição ao PPF nas doses testadas provocou prejuízos histológicos no ovário e no útero, além de alterações morfométricas uterinas. Nesse estudo, as fêmeas dos grupos experimentais apresentaram a contagem de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento e de atresia e número de corpos lúteos semelhantes entre si. Em contraste, um estudo com *Danio rerio* constatou que o PPF inibiu a maturação de folículos, provocando aumento na proporção de folículos em estágios iniciais, ou seja, aqueles que apresentam oócitos pré-vitelogênicos (De Oliveira *et al.*, 2022). Além disso, a exposição a diferentes praguicidas tem se mostrado capaz de suprimir o desenvolvimento folicular e causar apoptose nas células da granulosa (Badraoui *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019).

Apesar de não ter afetado a maturação de folículos ovarianos, o PPF provocou aumento de tecido intersticial, tanto na região cortical, quanto na medula do ovário. Como dito anteriormente, alguns autores sugeriram que o PPF tem atividade estrogênica (De Oliveira *et al.*, 2022; Kojima *et al.*, 2005). Apesar disso, o ensaio uterotrófico realizado nesse trabalho, mostrou que o mesmo não é estrogênico. Somado a isso, o aumento de tecido intersticial no ovário pode ser considerado um indicativo de atividade androgênica do PPF, já que as células do tecido intersticial, quando em maior quantidade, secretam mais andrógenos. Além disso, foi observado aumento nos níveis plasmáticos de testosterona, bem como, redução na expressão no gene da aromatase *cyp19b*, que resultou na diminuição da razão E₂/T em peixes-zebra fêmeas, sugerindo efeitos androgênicos e antiestrogênicos do PPF nas doses de 10 e 100 µg/L (Maharajan *et al.*, 2020).

Além disso, com o intuito de mensurar a resposta a estímulos imunogênicos e não-imunogênicos, foi realizado a contagem de mastócitos nos ovários e no útero. Os mastócitos são células do sistema imune responsáveis pela síntese, secreção ou liberação de diversos mediadores, como a heparina, histamina e proteases, que ficam armazenados em grânulos e são liberados frente a estímulos inflamatórios que podem ocorrer nos órgãos (Garfield *et al.*, 2000). No ovário, estão mais concentrados na região da medula e sua quantidade é variada de acordo com a fase do ciclo

reprodutivo, exercendo função no aumento da permeabilidade vascular em resposta ao LH, interagindo com o estrogênio e progesterona, e ajudando de maneira geral a manter a homeostase do órgão (Gayfan *et al.*, 1991). No útero, os mastócitos também oscilam em número de acordo com a fase do ciclo e seu papel de maior relevância é na implantação do blastocisto, por secretar substâncias que geram a remodelação tecidual necessária durante esse processo (Woidacki *et al.*, 2013).

Fêmeas expostas ao glifosato durante a prenhez apresentaram aumento do número de mastócitos no útero, que em conjunto com a invasão de macrófagos, aumento da expressão de TGF β e diminuição da vascularização no órgão, contribuíram para o aumento de perdas pós-implantação (Ingaramo *et al.*, 2022). Neste estudo, observou-se que há maior predominância de mastócitos no útero durante a fase de estro, especialmente no tecido conjuntivo depositado entre as duas camadas miometriais, embora os mastócitos também tenham estado presentes no endométrio e nas regiões cortical e medular do ovário das fêmeas de todos os grupos experimentais. Todavia, não foi observado diferença na quantidade de mastócitos no ovário e no útero dos animais dos grupos tratados com PPF, quando comparados ao grupo controle, o que sugere ausência de resposta inflamatória mediada por mastócitos após exposição ao PPF.

Considerando que houve aumento de tecido intersticial ovariano e, portanto, atividade androgênica do PPF, o útero mostrou-se como um órgão-alvo deste praguicida. Sabe-se que, no útero, o excesso de andrógenos pode provocar inibição do crescimento de células epiteliais endometriais, comprometendo o crescimento do estroma endometrial (Tuckerman *et al.*, 2000). Fêmeas expostas a esteroides anabólicos androgênicos apresentaram diminuição da espessura do endométrio, estroma endometrial com aspecto edematoso e aumento da espessura do miométrio (Camargo *et al.*, 2014). Além disso, quando avaliados *in vitro*, praguicidas como o glifosato e o fenarimol inibiram a atividade da enzima aromatase, impedindo que a enzima exerça sua função (Andersen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2020). Com isso, a atividade da aromatase pode ser afetada pela influência negativa de compostos com atividade androgênica, o que, desregularia o balanço entre estrógenos e andrógenos e, em última instância, afetaria a morfologia uterina devido ao aumento dos níveis de andrógenos (Camargo *et al.*, 2014; Far *et al.*, 2007). Neste trabalho, foram observadas diminuição da espessura do estroma endometrial e das projeções do endométrio em

direção ao lúmen, acompanhado de redução no conteúdo de fibras de colágeno, o que promoveu prejuízos ao estroma endometrial, que adquiriu aspecto mais edematoso.

No estroma endometrial uterino, as fibras de colágeno se organizam de maneira intercalada com as células e podem ter sua síntese, degradação e organização modificadas pelos hormônios esteroides (Bracho *et al.*, 2019; Bracho *et al.*, 2020). Uma vez que os níveis destes hormônios estão desregulados, com predominância de andrógenos, as fibras de colágeno acabam passando por desarranjos na sua distribuição pelo endométrio, que, em conjunto com a estratificação do epitélio luminal, degeneração vacuolar e hiperplasia, podem prejudicar a receptividade endometrial durante a implantação do blastocisto (Chávez-Genaro *et al.*, 2022).

As alterações observadas na histoarquitetura uterina das fêmeas expostas ao PPF podem refletir na fertilidade, impactando o desempenho reprodutivo e o desenvolvimento embrionário. Durante a prenhez, os animais apresentaram consumo de água e ração similares entre os grupos experimentais, assim como, ganho de massa corporal semelhante ao longo do período gestacional. Em contrapartida, um estudo prévio mostrou que a ingestão de PPF nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/Kg durante a prenhez de roedores, provocou diminuição no ganho de massa materna e aumento na duração da prenhez (Shahid; Saher, 2020). Vale ressaltar que, as doses utilizadas são maiores que a dose máxima permitida pela OMS para ingestão diária humana, diferindo desse trabalho, no qual foram seguidas as orientações desta agência, na tentativa de simular a exposição humana (WHO, 2008; *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme- WHOPEP*, 2017).

Neste trabalho, foi observada uma redução de 30% na taxa de prenhez das fêmeas de ambos os grupos expostos ao PPF. É importante destacar que as fêmeas foram inseminadas, o que foi confirmado pela presença de *plug* vaginal ou de espermatozoides no lavado vaginal. Entretanto, essas fêmeas não seguiram com a prenhez, o que sugere danos aos ovócitos após exposição ao PPF, com redução da viabilidade destas células, acarretando em prejuízos durante a etapa de fecundação.

Ademais, neste estudo houve aumento na porcentagem de morte fetal no grupo exposto a menor dose de PPF. Esse resultado indica que, mesmo quando há sucesso na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial, os prejuízos ao

gameta feminino, especialmente danos ao DNA gerados por estresse oxidativo, poderiam ser passados para a prole, e prejudicar a viabilidade fetal durante etapas críticas deste período. Sabe-se que o PPF pode aumentar o estresse oxidativo nos testículos e ovários de peixes-zebra, promovendo prejuízos aos gametas, e podendo aumentar os danos no DNA destas células (De Oliveira *et al.*, 2021; 2022). Shahid e Saher (2020) também observaram morte fetal na prole de camundongos fêmeas, quando estas foram expostas ao PPF durante a prenhez. Além disso, os autores observaram que os fetos apresentaram diminuição da massa corporal, e alterações na massa e histologia de órgãos vitais, tais como o fígado, rim, coração e encéfalo (Shahid; Saher, 2020). Apesar disso, neste estudo, as demais taxas relacionadas à performance reprodutiva das fêmeas, a frequência de anomalias congênitas fetais e os parâmetros biométricos fetais não foram afetados pelo PPF.

Como observado, este trabalho demonstrou que o PPF pode provocar alterações na massa de órgãos vitais, como o fígado e a tireoide, além de promover prejuízos estruturais para os órgãos reprodutores, como o ovário e o útero. A atividade androgênica do PPF somada à possível diminuição da viabilidade dos ovócitos refletiram na diminuição da taxa de prenhez de ambos os grupos experimentais e no aumento na taxa de fetos mortos no grupo exposto a menor dose de PPF. Como limitações do trabalho, não foi possível quantificar os níveis séricos dos hormônios esteroides e a expressão dos seus receptores nos órgãos-alvo, tais como o ovário e o útero. Tais análises complementariam os resultados obtidos neste estudo; entretanto, considerando as correlações entre os desfechos e a integração dos resultados entre si, foi possível demonstrar a toxicidade promovida pelo PPF no sistema genital de camundongos fêmeas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, camundongos fêmeas expostas ao PPF desde a pré-puberdade até a maturidade sexual exibiram efeitos tóxicos sistêmicos, conforme demonstrado pela redução da massa da tireoide e diminuição da massa do epitélio glandular e do coloide tireoideano, bem como pelo aumento da massa hepática. Além disso, o PPF aumentou o tecido intersticial ovariano e diminuiu a espessura do estroma endometrial e o conteúdo de fibras colágenas, tornando o endométrio mais edematoso. Juntos, os resultados indicam um possível efeito androgênico deste praguicida. Além disso, o PPF reduziu a taxa de prenhez em ambos os grupos tratados e aumentou a morte fetal no grupo exposto à menor dose, sugerindo uma diminuição da viabilidade dos oócitos e um comprometimento da viabilidade fetal mediado por fatores maternos. Considerando que este estudo foi realizado com doses ambientalmente aceitáveis de PPF, indica-se que este praguicida pode representar um possível risco à saúde reprodutiva de mulheres expostas cronicamente ao PPF desde a infância e a adolescência.

REFERÊNCIAS

- ABO, Stéphanie *et al.* Modelling female physiology from head to toe: Impact of sex hormones, menstrual cycle, and pregnancy. **J. Theor. Biol.**, v. 540, p. 111074, 2022. doi: /10.1016/j.jtbi.2022.111074.
- ABREU, Ana Paula; KAISER, Ursula B. Pubertal development and regulation. **Lancet Diabetes Endocrinol.**, v. 4, n. 3, p. 254-264, 2016. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00418-0.
- AJAYI, Ayodeji Folorunsho; AKHIGBE, Roland Eghoghosoa. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. **Fertil. Res. Pract.**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2020. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3.
- ALAVANJA, Michael CR; HOPPIN, Jane A.; KAMEL, Freya. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. **Annu. Rev. Public Health**, v. 25, p. 155-197, 2004. doi: 10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020.
- ANDERSEN, Helle Raun *et al.*, Estrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide fenarimol. **Toxicol. Lett.**, v. 163, n. 2, p. 142-152, 2006. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.10.004.
- BADRAOUI, Riadh *et al.* Endocrine disruption and ovarian morphometric responses in rats following exposure to tetradifon. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 166, n. 2, p. 268-272, 2010. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.09.013.
- BALIGAR, Prakash N.; KALIWAL, Basappa B. Reproductive toxicity of carbofuran to the female mice: effects on estrous cycle and follicles. **Ind. health**, v. 40, n. 4, p. 345-352, 2002. doi: 10.2486/indhealth.40.345
- BERTOLASIO, Jennifer *et al.* Neonatal injections of methoxychlor decrease adult rat female reproductive behavior. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 6, p. 809-813, 2011. doi: /10.1016/j.neuro.2011.06.007.
- BRACHO, Gisela S. *et al.* Androgen receptor and uterine histoarchitecture in a PCOS rat model. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 518, 1 dez. 2020. doi: 10.1016/j.mce.2020.110973.
- BRACHO, Gisela Soledad *et al.* Hyperandrogenism induces histo-architectural changes in the rat uterus. **Reprod. Sci.**, v. 26, n. 5, p. 657-668, 2019. doi: 10.1177/1933719118783881.
- BULLETTI, Carlo *et al.* Progesterone: the key factor of the beginning of life. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, n. 22, p. 14138, 2022. doi: 10.3390/ijms232214138.
- CAMARGO, Isabel Cristina Cherici *et al.* Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 66, n. 4, p. 195-202, 2014. doi: 10.1016/j.etp.2014.01.005.

CANIPARI, R. *et al.* Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 42, p. 271-282, 2019. doi: 10.1007/s40618-018-0912-2.

CASIDA, John E.; BRYANT, Robert J. The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. **Toxicol. Res.**, v. 6, n. 6, p. 755-763, 2017. doi: 10.1039/c7tx00198c.

CASIDA, John E.; DURKIN, Kathleen A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annu. Ver. Entomol.**, v. 58, p. 99-117, 2013. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153645.

CECCONI, S. *et al.* Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1783-1788, 1999. doi: 10.1210/endo.140.4.6635.

CHÁVEZ-GENARO, Rebeca *et al.* Structural and functional changes in rat uterus induced by neonatal androgenization. **J. Mol. Histol.**, v. 53, n. 6, p. 903-914, 2022. doi: 10.1007/s10735-022-10106-5.

DE OLIVEIRA, Vanessa Staldoni *et al.* In vivo exposure to pyriproxyfen causes ovarian oxidative stress and inhibits follicle maturation in zebrafish. **J. Appl. Toxicol.**, 2022. doi: 10.1002/jat.4425.

DE OLIVEIRA, Vanessa Staldoni *et al.* Pyriproxyfen induces intracellular calcium overload and alters antioxidant defenses in Danio rerio testis that may influence ongoing spermatogenesis. **Environ. Pollut.**, v. 270, p. 116055, 2021. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116055.

DE, Arnab *et al.* Worldwide Pesticide Use. In: **Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles**. New Delhi: Springer India, 2014. doi: 10.1007/978-81-322-1689-6_2.

DHADIALLA, Tarlochan S.; CARLSON, Glenn R.; LE, Dat P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 43, n. 1, p. 545-569, 1998. doi: 10.1146/annurev.ento.43.1.545.

DIVE. Orientações para o uso do larvicida Pyriproxyfen 0,5G no Programa de Controle da Dengue em Santa Catarina. v. 148, n. 48, p. 148–162, 2014. Disponível em: <https://dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agrivos/Dengue/Publicacoes/CONTROLE%20VETORIAL/4-%20Orienta%C3%A7%C3%A3o%20T%C3%A9cnica%20Pyriproxyfen.pdf>.

EPA. Health Effects Test Guidelines: OPPTS 870.4100 Chronic Toxicity. **United States Environmental Protection Agency**, v. 870.4100, 1998. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100IRTR.PDF?Dockkey=P100IRTR.PDF>.

FAO & WHO, Pyriproxyfen (200), 1999. Disponível em: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation99/25Pyriproxyfen.pdf.

FAO. **Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators**. Global, regional and country trends, 1990-2020, n. 46, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CC0918EN>.

FAR, Hamid Reza Mobini *et al.* Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 131, n. 2, p. 189-197, 2007. doi: 10.1016/j.ejogrb.2006.07.037.

GAN, Hongya *et al.* Perinatal exposure to low doses of cypermethrin induce the puberty-related hormones and decrease the time to puberty in the female offspring. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 30, n. 2, p. 2665-2675, 2023. doi:10.1007/s11356-022-22328-x.

GARCIA, Francisco Prieto *et al.* Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. **J. Res. Environ. Sci. Toxicol.**, v. 1, n. 11, p. 279–293, 2012.

GARFIELD, Robert E. *et al.* Modulation of rat uterine contractility by mast cells and their mediators. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 183, n. 1, p. 118-125, 2000. doi: 10.1067/mob.2000.105741.

GAYFAN, F. *et al.* Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. **Biol. Reprod.**, v. 45, n. 1, p. 27-33, 1991. doi: 10.1095/biolreprod45.1.27.

HAMMER, Karissa C.; VEIGA, Alexis; MAHALINGAIAH, Shruthi. Environmental toxicant exposure and menstrual cycle length. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v. 27, n. 6, p. 373, 2020. doi: 10.1097%2FMED.0000000000000579

HARTER, Campbell JL; KAVANAGH, Georgia S.; SMITH, Jeremy T. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. **J. Endocrinol.**, v. 238, n. 3, p. R173-R183, 2018. doi: 10.1530/JOE-18-0108.

INGARAMO, Paola I. *et al.* Altered uterine angiogenesis in rats treated with a glyphosate-based herbicide. **Environ. Pollut.**, v. 296, p. 118729, 2022. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118729.

IRAC. **IRAC Mode of Action Classification Scheme**. v. 9.4, p. 30, 2020. Disponível em: <https://irac-online.org/>.

ITRIYEVA, Khalida. The normal menstrual cycle. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**, v. 52, n. 5, p. 101183, 1 maio 2022. doi: 10.1016/j.cppeds.2022.101183.

JINDRA, Marek; BITTOVA, Lenka. The juvenile hormone receptor as a target of juvenoid “insect growth regulators”. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 103, n. 3, p. e21615, 2020. doi: 10.1002/arch.21615.

JINDRA, Marek; PALLI, Subba R.; RIDDIFORD, Lynn M. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 58, p. 181-204, 2013. doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700.

KIM, Ki-Hyun *et al.* Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Sci. Total Environ.**, v. 575, p. 525-535, 2017. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.

KOJIMA, Mihoko *et al.* Evaluation of estrogenic activities of pesticides using an in vitro reporter gene assay. **Int. J. Environ. Health Res.**, v. 15, n. 4, p. 271–280, 2005. doi: 10.1080/09603120500155765.

KOYAMA, Yuichiro *et al.* A six-month chronic dietary toxicity study of pyriproxyfen in rats. **J. Toxicol. Sci.**, v. 14, n. 1, p. 43–64, 1989. doi: 10.2131/jts.14.43.

KUMAR, Sunil *et al.* Environmental & occupational exposure & female reproductive dysfunction. **Indian J. Med. Res.**, v. 150, n. 6, p. 532, 1 dez. 2019. doi: 10.4103%2Fijmr.IJMR_1652_17.

LAFFAN, Susan B. *et al.* Species comparison of postnatal development of the female reproductive system. **Birth Defects Res.**, v. 110, n. 3, p. 163–189, 15 fev. 2018. doi: 10.1002/bdr2.1132.

LI, Xuehua *et al.* Effect of gestational exposure to arsenic on puberty in offspring female mice. **Chemosphere**, v. 202, p. 119–126, 2018. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.095.

LIU, Hui *et al.* The enantioselective environmental behavior and toxicological effects of pyriproxyfen in soil. **J. Hazard. Mater.** v. 365, p. 97-106, 2019. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.10.079.

LIU, Hui *et al.* Toxicity risk assessment of pyriproxyfen and metabolites in the rat liver: A vitro study. **J. Hazard. Mater.**, v. 389, p. 121835, 2020. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121835.

LIVADAS, Sarantis; CHROUSOS, George P. Molecular and environmental mechanisms regulating puberty initiation: an integrated approach. **Front. Endocrinol.**, v. 10, p. 828, 2019. doi: 10.3389/fendo.2019.00828.

LOPEZ-RODRIGUEZ, David *et al.* Endocrine-disrupting chemicals and their effects on puberty. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 35, n. 5, p. 101579, 2021. doi: 10.1016/j.beem.2021.101579.

MAHARAJAN, Kannan *et al.* Pyriproxyfen induced impairment of reproductive endocrine homeostasis and gonadal histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) by altered expression of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis genes. **Sci. Total Environ.**, v. 735, p. 139496, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139496.

MANOTAS, María Carolina *et al.* Genetic and Epigenetic Control of Puberty. **Sex. Dev.**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2022. doi: 10.1159/000519039.

MAOZ, Dorit *et al.* Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0005651.

MELLO, Marcia S. Campos *et al.* Sexual maturation and fertility of mice exposed to triphenyltin during prepubertal and pubertal periods. **Toxicol. Rep.**, v. 2, p. 405–414, 2015. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.12.006.

MESSINIS, Ioannis E *et al.* Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. **Reprod. Biomed. Online**, v. 28, n. 6, p. 714–722, 2014. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.02.003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico**: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 20, v. 52, n.20, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_20.pdf/view.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico**: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 27, v. 52, n. 26, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_26.pdf/view.

MOTTA-MENA, Natalie V.; PUTS, David A. Endocrinology of human female sexuality, mating, and reproductive behavior. **Horm. Behav.**, v. 91, p. 19–35, 2017. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.11.012.

NIETO, María Rosa Ramos *et al.* Chronic exposure to low concentrations of chlorpyrifos affects normal cyclicity and histology of the uterus in female rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 156, p. 112515, 2021. doi: 10.1016/j.fct.2021.112515.

OECD/OCDE **440 OECD guideline for the testing of chemicals uterotrophic bioassay in rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties**, 2007. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-440-uterotrophic-bioassay-in-rodents_9789264067417-en.

OTHA, Ryo *et al.* Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. **J. Toxicol. Sci.**, v. 37, n. 5, p. 879–889, 2012. doi: 10.2131/jts.37.879.

OYOLA, Mario G.; HANDA, Robert J. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. **Stress**, v. 20, n. 5, p. 476–494, 2017. doi: 10.1080/10253890.2017.1369523.

PELLETIER, G. Invited Review Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. **Histol. Histopathol.**, v. 15, n.4, p. 1261-1270, 2000. doi: 10.14670/HH-15.1261.

PERVEEN, Aneela *et al.* Maternal exposure to T-2 toxin affects puberty genes and delays estrus cycle in mice offspring. **Animals**, v. 10, n. 3, 2020. doi: 10.3390/ani10030471.

RANI, Lata *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **J. Clean. Prod.**, v. 283, p. 124657, 2021. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.124657.

RATTAN, Saniya *et al.* Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. **J. Endocrinol.**, v. 233, n. 3, p. R109-R129, 2017. doi: 10.1530/JOE-17-0023.

REZENDE-TEIXEIRA, Paula *et al.* What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. **Environ. Pollut.**, v. 300, p. 118983, 2022. doi: 10.1016/j.envpol.2022.118983.

SAKALI, Anastasia Konstantina *et al.* Effects on Puberty of Nutrition-Mediated Endocrine Disruptors Employed in Agriculture. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 4184, 2021. doi: 10.3390/nu13114184.

SHAHID, Amna *et al.* An investigation on some toxic effects of pyriproxyfen in adult male mice. **Iran. J. Basic Med. Sci.**, v. 22, n. 9, p. 997–1003, 2019. doi: 10.22038/Ijbm.2019.33825.8051.

SHAHID, Amna; SAHER, Marryam. Repeated exposure of pyriproxyfen to pregnant female mice causes developmental abnormalities in prenatal pups. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 27, n. 21, p. 26998–27009, 2020. doi: 10.1007/s11356-020-08656-w.

SHARMA, Raajnish Kumar *et al.* Insecticides and ovarian functions. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 61, n. 3, p. 369–392, 2020. doi: 10.1002/em.22355.

SI, Jiliang *et al.* Perinatal Exposure to Low Doses of Tributyltin Chloride Advances Puberty and Affects Patterns of Estrous Cyclicity in Female Mice. **Environ. Toxicol.**, v. 27, p. 662–670, 2012. doi: 10.1002/tox.21756.

SKORUPSKAITE, Karolina *et al.* The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. **Hum. Reprod. Update**, v. 20, n. 4, p. 485–500, 2014. doi: 10.1093/humupd/dmu009.

SPAZIANI, Matteo *et al.* Hypothalamo-Pituitary axis and puberty. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 520, p. 111094, 15 jan. 2021. doi: 10.1016/j.mce.2020.111094.

STAMATIADES, George A.; KAISER, Ursula B. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 463, p. 131–141, 2018. doi: 10.1016/j.mce.2017.10.015.

SULLIVAN, Jonathan J.; GOH, Kean S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **J. Pestic. Sci.**, v. 33, n. 4, p. 339–350, 2008. doi: 10.1584/jpestics.R08-02.

TINSLEY, R.; HUBRECHT, Robert; KIRKWOOD, J. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals. Hoboken: Wiley-Blackwell, p. 741-760, 2010.

TOVO-NETO, Aldo *et al.* Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 265, p. 230-236, 2018. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.04.023.

TUCKERMAN, Elizabeth M. *et al.* Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. **Fertil. Steril.**, v. 74, n. 4, p. 771-779, 2000. doi: 10.1016/S0015-0282(00)00711-1.

TUDI, Muyesaier *et al.* Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021. doi: 10.3390/ijerph18031112.

VANCAMP, Pieter *et al.* The pyriproxyfen metabolite, 4'-OH-PPF, disrupts thyroid hormone signaling in neural stem cells, modifying neurodevelopmental genes affected by ZIKA virus infection. **Environ. Pollut.**, v. 285, p. 117654, 2021. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117654.

VELASCO, Inmaculada *et al.* Dissecting the KNDy hypothesis: KNDy neuron-derived kisspeptins are dispensable for puberty but essential for preserved female fertility and gonadotropin pulsatility. **Metabolism**, v. 144, p. 155556, 2023. doi: 10.1016/j.metabol.2023.155556.

VIJAYAKUMAR, Nandita *et al.* Puberty and the human brain: Insights into adolescent development. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 92, p. 417-436, 2018. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.06.004.

VILLAMOR, Eduardo; JANSEN, Erica C. Nutritional Determinants of the Timing of Puberty. **Annu. Rev. Public Health**, v. 37, p. 33-46, 2016. doi: 10.1146/annurev-publhealth-031914-122606.

WANG, Huiyuan *et al.* Cypermethrin exposure reduces the ovarian reserve by causing mitochondrial dysfunction in granulosa cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 379, 15 set. 2019. doi: 10.1016/j.taap.2019.114693.

WEGNER, Susanna *et al.* Identifying reference chemicals for thyroid bioactivity screening. **Reprod. Toxicol.**, v. 65, p. 402-413, 2016. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.08.016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pyriproxyfen in drinking-water: use for vector control in drinking-water sources and containers**. 1. ed. Geneva: WHO Press, 2008.

WHOPES. WHO PESTICIDE EVALUATION SCHEME. **Report of the twentieth WHOPES working group meeting, WHO/HQ, Geneva, 20-24 March 2017**. World Health Organization, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-htm-ntd-whopes-2017.04>.

WILLIAMS, Gary M.; IATROPOULOS, Michael J. Alteration of Liver Cell Function and Proliferation: Differentiation Between Adaptation and Toxicity. **Toxicol. Pathol.**, v. 30, n. 1, p. 41–53, 2002. doi: 10.1080/01926230252824699.

WITCHEL, Selma F. *et al.* Update on adrenarche. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 32, n. 4, p. 574–581, 2020. doi: 10.1097/mop.0000000000000928.

WOIDACKI, Katja; JENSEN, Federico; ZENCLUSSEN, Ana C. Mast cells as novel mediators of reproductive processes. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 29, 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00029.

WOOD, Claire L. *et al.* Puberty: Normal physiology (brief overview). **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 33, n. 3, p. 101265, 2019. doi: 10.1016/j.beem.2019.03.001.

YE, Xiaoqing; LIU, Jing. Effects of pyrethroid insecticides on hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a reproductive health perspective. **Environ. Pollut.**, v. 245, p. 590-599, 2019. doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.031.

YILMAZ, Bayram *et al.* Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 21, n. 1, p. 127–147, 2019. doi: 10.1007/s11154-019-09521-z.

YOU, Hyekyoung Hannah; SONG, Gwonhwa. Review of endocrine disruptors on male and female reproductive systems. **Comp. Biochem. Physiol. Part - C: Toxicol. Pharmacol.**, v. 244, p. 109002, 2021. doi: 10.1016/j.cbpc.2021.109002.

ZHANG, Chao *et al.*, Molecular basis for endocrine disruption by pesticides targeting aromatase and estrogen receptor. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 17, n. 16, p. 5664, 2020. doi: 10.3390/ijerph17165664.

ZHANG, WenJun. Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. **Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.**, v. 8, n. 1, p. 1–27, 2018.

ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina



Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Exposição de camundongos Swiss ao piriproxifeno: avaliação da toxicidade reprodutiva e da fertilidade masculina e feminina", protocolada sob o CEUA nº 1963200721 (ID 001928), sob a responsabilidade de **Gabriel Adan Araujo Leite e equipe; Gabriel Martins Vitoreti de Oliveira; João Victor Ramos da Cruz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 11/11/2021.

We certify that the proposal "Swiss mice exposure to pyriproxyfen: assessment of reproductive toxicity and fertility in males and females", utilizing 210 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 1963200721 (ID 001928), under the responsibility of **Gabriel Adan Araujo Leite and team; Gabriel Martins Vitoreti de Oliveira; João Victor Ramos da Cruz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 11/11/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 01/2025 Área: Beg (Biologia Celular, Embriologia E Genética)

Origem: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

Linhagem: Camundongos Swiss

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 90 dias

Quantidade: 210

Peso: 1 a 50 g

Florianópolis, 07 de dezembro de 2023

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



ANEXO B – Emenda de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina



Universidade Federal de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : EMENDA v21/03/2022

Certificamos que a EMENDA (versão de 21/03/2022) da proposta intitulada "Exposição de camundongos Swiss ao piriproxifeno: avaliação da toxicidade reprodutiva e da fertilidade masculina e feminina", CEUA nº 1963200721 (ID 01.0863), sob a responsabilidade de **Gabriel Adan Araujo Leite** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) em 17/05/2022.

Pedido apresentado à CEUA: A pós-graduanda Alice Santos da Silva vai desenvolver seu projeto de mestrado como parte do projeto de pesquisa aprovado pela CEUA com número de protocolo 1963200721. A pós-graduanda já cursou em 2021 uma disciplina relacionada ao Manejo Animal, a qual é intitulada "Noções básicas de manejo e ciência de animais de laboratório", de um crédito. Além disso, a Alice apresenta experiência prévia com estudos realizados com animais de laboratório, especialmente roedores.

Considerações da CEUA: Resultado CEUA - Aprovado PARECER - APROVADO - Tendo em vista as respostas as pendências apontadas pelos relatores sou de parecer favorável à aprovação do projeto.

Término previsto: 01/2025

ANIMAIS UTILIZADOS

	Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	210	0
Machos e Fêmeas		

Florianópolis, 07 de dezembro de 2023



Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

