

Waldo Oliveira Monteiro Filho.

**INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA SOBRE O
SISTEMA SEROTONINÉRGICO DURANTE O
DESENVOLVIMENTO TESTICULAR PRÉ-NATAL E
NEONATAL DE RATOS WISTAR UTILIZANDO
CLORIDRATO DE FLUOXETINA**

**RECIFE
2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
VETERINÁRIA**

Waldo Oliveira Monteiro Filho

**INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA SOBRE O SISTEMA
SEROTONINÉRGICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO
TESTICULAR PRÉ-NATAL E NEONATAL DE RATOS
WISTAR UTILIZANDO CLORIDRATO DE FLUOXETINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof.Dr.: Valdemiro Amaro da Silva Júnior.

**RECIFE
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

M775i Monteiro Filho, Waldo Oliveira
Intervenção farmacológica sobre o sistema serotoninérgico durante o período pré-natal e neonatal de ratos Wistar utilizando cloridrato de fluoxetina / Waldo Oliveira Monteiro Filho.
-- 2009.
109 f. : il.

Orientador : Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária
Inclui referências e anexo.

CDD 636.0896

1. Rato
 2. Testículo
 3. Células de Sertoli
 4. Serotonina
 5. Fluoxetina
- I. Silva Júnior, Valdemiro Amaro da
II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
VETERINÁRIA**

**INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA SOBRE O SISTEMA
SEROTONINÉRGICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO
TESTICULAR PRÉ-NATAL E NEONATAL DE RATOS
WISTAR UTILIZANDO CLORIDRATO DE FLUOXETINA**

**Dissertação de Mestrado elaborada por
WALDO OLIVEIRA MONTEIRO FILHO**

**Aprovada em 31 de julho de 2009.
BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr.: Valdemiro Amaro da Silva Junior
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Área de Histologia

Prof. Dr.: Joaquim Evêncio Neto
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Área de Histologia

Prof. Dr.: Fábio de Souza Mendonça
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Área de Histologia

Prof. Dr.: Frederico Celso Lira Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Medicina Veterinária
Área de Anatomia Patológica

Dedico este trabalho aos meus pais Waldo
Monteiro(*in memorian*) e Dulcinéa , meus irmãos
Antonio, Carlos e Fátima;
Meus Avós, Antonio Guedes(*in memorian*) e
Antonieta Calheiros(*in memorian*), por todas
lembranças e por tudo que vivemos.
Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao ORIENTADOR, **PROFESSOR DOUTOR VALDEMIRO AMARO DA SILVA JÚNIOR**, pela palavra sincera, pelo conhecimento transmitido, que além de excelente orientador é um grande **AMIGO**. Obrigado pela oportunidade de realizar este Mestrado.

À DOUTORANDA, **SANDRA MARIA DE TORRES** por toda ajuda e incentivo durante todo trabalho do mestrado, obrigado.

Ao DOUTORANDO, **BRUNO TENÓRIO** por toda ajuda e paciência na realização dos trabalhos.

Aos Alunos de iniciação, Bolsistas, e Monitores do Laboratório de Histologia.

Ao **PROFESSOR DOUTOR, FREDERICO CELSO LIRA MAIA** por toda ajuda, atenção e amizade.

À DOUTORANDA, **MARIA HELENA RIBEIRO**, por toda amizade e incentivo.

Aos Amigos da **UFPE**, **MÁRCIO EUSTÁQUIO**, do **Núcleo de Educação Física**, **RAFAEL**, do Laboratório de Imunopatologia keiso-Asami, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, por todo carinho, ajuda e amizade que sempre me dispensaram.

Aos grandes amigos, Dr. **LAMARCK BEZERRA**, Dr. **EZEQUIEL MUNIZ**, **Dr. MARCOS**, pelo convívio no Sindicato dos Médicos Veterinários, e momentos de descontração.

À **PROFESSORA DOUTORA, ANA MARIA CARNEIRO LEÃO**, pela oportunidade de iniciar no mestrado e toda atenção dispensada.

À **PROFESSORA DOUTORA, CRISTINA OLIVEIRA COELHO**, pela paciência e aconselhamentos.

Ao **PROFESSOR DOUTOR, ROBERTO CASTRO**, por todo carinho e dedicação que tem para com todos, sempre disposto a ajudar.

Aos eternos **PROFESSORES: GLÓRIA POTIER, JOÃO EMÍLIO CRUZ, ADELMAR AFONSO AMORIM E MARLEYNE AMORIM, ROSILDA, AGENOR, ANTONIO ROBERTO BARROS COELHO, RENATO CÂMARA, EDVALDO LOPES, EDUARDO COLLI, ELIEL**, lhes sou grato pela oportunidade de adquirir tanto conhecimento de cunho científico quanto humanos, de responsabilidade, amizade e dedicação profissional.

À **SECRETÁRIA** da Pós-Graduação em Ciência Veterinária, **EDNA CHÉRRIAS**, pela amizade, paciência e ajuda na condução do Mestrado.

Ao **TÉCNICO ADMINISTRATIVO TOM MENEZES**, pela orientação e incentivo no transcurso do mestrado.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação, **CATARINA PINTO, MARGARETH ROLIM, MOÍSES, VANESSA**, pelo convívio e incentivo nos momentos difíceis.

À **UFPE**, por ter proporcionado condições para realização do Mestrado.

Aos **ANIMAIS** que participam involuntariamente das pesquisas legando a sua vida para nosso bem estar e progresso, participando inequivocamente da nossa evolução.

À **MEDICINA VETERINÁRIA** por proporcionar-me tantas alegrias, desafios, aprendizados.

A **DEUS**, agradeço.

Ao Senhor pertence a terra e tudo o que nela se contém, o mundo e os que nele habitam.

(Salmo 24)

À minha esposa Olívia, minhas filhas Laura e Fernanda, por todo amor e carinho.

Resumo

Atualmente, os inibidores da recaptação seletiva da serotonina (ISRS) são os antidepressivos mais freqüentemente prescritos para o tratamento da depressão, sendo o principal efeito colateral em adultos relacionado às disfunções sexuais. Distúrbios depressivos são comuns tanto durante o período pré-natal quanto nos meses iniciais após o nascimento e a fluoxetina é largamente utilizado no tratamento da depressão neste período. Até o presente momento, nenhum estudo mais pormenorizado sobre a intervenção farmacológica do sistema serotoninérgico durante o período crítico do desenvolvimento testicular em ratos neonatos e os seus reflexos no processo espermatogênico em ratos maduros sexualmente foi realizado. Neste trabalho foram realizados 3 experimentos utilizando cloridrato de fluoxetina. No primeiro experimento foi observado o efeito da administração direta da fluoxetina durante o período pós-natal do desenvolvimento testicular de ratos Wistar porém, com avaliação aos 150 dias de idade. Neste trabalho se observou redução o peso testicular bruto e líquido, volume de túbulos e epitélio seminíferos. O diâmetro tubular foi reduzido nos animais tratados com 20mg/Kg o que gerou aumento no comprimento total de túbulos seminíferos neste grupo. Não foram observadas alterações morfométricas na população de células de Sertoli, produção espermática diária e eficiência do processo espermatogênico. No segundo experimento foram estudados os efeitos da transferência de fluoxetina transplacentária e pelo leite materno sobre o desenvolvimento testicular de ratos Wistar pré-buberes. Neste experimento se observou alterações no desenvolvimento ponderal de peso corporal, em parâmetros volumétricos testiculares e comprimento total de túbulos seminíferos em dosagens mais elevadas de fluoxetina. Notou-se tendência de redução da população total de células de Sertoli por testículo e atraso no aparecimento do lume tubular nos animais expostos a maior dose. No terceiro experimento se utilizou o mesmo protocolo do segundo experimento, porém as análises foram realizadas em animais maduros sexualmente. De acordo com os resultados observados o contato fetal e neonatal com fluoxetina, no período crítico de proliferação das células de Sertoli influenciou no desenvolvimento somático dos animais e ocasionou alterações em parâmetros testiculares, tais como o peso de epidídimo e glândula seminal, volumetria do epitélio seminífero, volumetria total das células de Leydig, comprimento total dos túbulos seminíferos e uma tendência de redução na produção espermática por testículo. Ainda que a fluoxetina tenha interferido na volumetria das células de Leydig, não se constatou alteração nos níveis plasmáticos de testosterona e da espermatogênese. A maior parte das alterações está relacionada ao grupo tratado com a maior dosagem do antidepressivo, 20mg/Kg, inferindo que nessa dosagem a fluoxetina pode, de fato, causar alterações no desenvolvimento somático e do aparelho reprodutivo.

Palavras-chave: Rato, Testículo, Células de Sertoli, Fluoxetina

Abstract

Currently, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are the most frequently prescribed antidepressants for the treatment of depression and major side effects in adults related to sexual dysfunction. Depressive disorders are common both during the prenatal period and early months after birth and fluoxetine is widely used to treat depression in this period. Until the present moment, no further study on the pharmacological intervention in the serotonin system during the critical period for testicular development in neonatal rats and the effects on the spermatogenic process in sexually mature rats was performed. We carried out 3 experiments using fluoxetine hydrochloride. In the first experiment observed the effect of direct administration of fluoxetine during postnatal testicular development in rats, but with assessment at 150 days of age. In this paper, we observed reduction in testicular weight gross and net volume of tubules and seminiferous epithelium. The tubular diameter was reduced in animals treated with 20 mg/Kg which caused an increase in total length of seminiferous tubules in this group. There were no histological changes in the population of Sertoli cells, daily sperm production and efficiency of the spermatogenic process. The second experiment studied the effects of transplacental transfer of fluoxetine and breast milk on the testicular development of prepubertal rats. In this experiment, were observed changes in the body weight development, in the testicular volumetric parameters and total length of seminiferous tubules, mainly in higher doses of fluoxetine. There was a trend of reduction of Sertoli cells population and delay in the appearance tubular lumen in animals exposed to higher dose. In the third experiment was used the same protocol of the second experiment, but the testis were performed in rats sexually mature. According to the results was observed that fetal and neonatal contact with fluoxetine during the critical period of Sertoli cells proliferation influenced the somatic development of animals and induced changes in testicular parameters, such as the weight of the epididymis and seminal gland, volumes of the seminiferous epithelium, the total Leydig cells volume, total length of seminiferous tubules and a trend of reduction in sperm production per testis. Although fluoxetine has interfered with the Leydig cells volumetry, were not observed changes in plasma levels of testosterone and spermatogenesis. Most of the changes were related to the group treated with the highest dosage of the antidepressant, 20 mg/kg, implying that this dosage fluoxetine may actually cause changes in somatic development and reproductive function.

Key-words: Rat, Testis, Sertoli cell, Fluoxetine.

LISTA DE FIGURAS

Trabalho 2

- Figura 1- Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno durante 21 dias pós-natal..... 83
- Figura 2 – Fotomicrografia do testículo de ratos wistar neonatais controle e tratado com 5mg/Kg de fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21 º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade..... 86
- Figura 3 – Fotomicrografia do testículo de ratos Wistar neonatais controle e tratado com fluoxetina nas dosagens de 10 e 20 mg/Kg do 13 º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade..... 87
- Figura 4- Valores médios e desvios-padrão da concentração plasmática de testosterona(ng/ml) de ratos wistar neonatais controle e tratado com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade..... 88

Trabalho 3

- Figura 1 – Desenvolvimento ponderal ao longo dos 90 dias pós-natal dos animais do grupo controle e tratado com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal..... 97
- Figura 2- Valores médios e desvios-padrão da concentração plasmática de testosterona(ng/ml) de ratos wistar neonatais controle e tratado com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 90 dias de idade..... 102
- Figura 3- Fotomicrografia do testículo de ratos wistar adultos controle e tratado com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno, e avaliados aos 90 dias de idade..... 103

Lista de tabelas

Trabalho 1

Tabela 1- Peso corporal e testicular final e IGS de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina aos 150 dias de idade (Média \pm desvio padrão).....	58
Tabela 2- Parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina aos 150 dias de idade (Média \pm desvio padrão).....	59
Tabela 3- População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina aos 150 dias de idade (Média \pm desvio padrão).....	59
Tabela 4- Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de sertoli e produção espermática por testículo e por grama de testículo de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina aos 150 dias de idade (Média \pm desvio padrão).....	61

Trabalho 2

Tabela 1- Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno durante 21 dias pós-natal.....	83
Tabela 2- Peso corporal e testicular final e IGS de ratos Wistar controles e tratados submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade (Média \pm desvio padrão).....	84
Tabela 3- Parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade (Média \pm desvio padrão).....	84
Tabela 4- Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de sertoli de testículo de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade (Média \pm desvio	

padrão).....	85
--------------	----

Trabalho 3

Tabela 1- Desenvolvimento ponderal dos animais do grupo controle e tratados com fluoxetina do 13º dia gestação até o 21º dia pós-natal e avaliado aos 90 dias (Média ± desvio padrão).....	98
---	----

Tabela 2- Peso corporal, peso testicular, epididimário, prostático, da glândula seminal e índice gonadossomático dos animais tratados com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós natal e avaliados aos 90 dias de idade.....	99
--	----

Tabela 3- Parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar controle e tratado com diferentes doses de fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal com fluoxetina e avaliados aos 90 dias (Média ± desvio padrão).....	101
--	-----

Tabela 4- População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar controles e submetidos a diferentes doses de fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal e avaliada aos 90 dias (Média ± desvio padrão).....	102
--	-----

Tabela 5- Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de sertoli, produção espermática diária em testículo de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal e avaliados aos 90 dias (Média ± desvio padrão).....	104
---	-----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACTH	- Hormônio Adrenocorticotrófico
ABP	- Proteína Ligante de Andrógeno
AMP	- Adenosina Monofosfato
AMH	- Hormônio anti-mülleriano
β -END	- β -Endorfina
CRH	- Hormônio Liberador de Corticotropina
EOP	- Peptídeos Opióides Endógenos
FSH	- Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
5-HT	- 5-Hidroxitriptamina, Serotonina ou indolamina
5-HTP	- 5-Hidroxitriptofano
HCG	- Gonadotrofina coriônica humana
HPA	- Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPG	- Hipotálamo-Pituitária-Gonadal
5-HIAA	- 5-Ácido Hidroxindolacético
IGF-I	- Fator de Crescimento semelhante a Insulina I
ISRS	- Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
LH	- Hormônio Luteinizante
LM	- Leite Materno
MAO	- Monoaminoxidase
NCAM	-Maturação de adesão celular(N)
NPY	- Neuropeptídeo Y
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaqueta
POMC	- Pró-opiomelanocorticotrófica
SRy	- Sex-determining Region Y – Região determinante do Sexo Y
SNC	- Sistema Nervoso Central
SN	- Sistema Nervoso
SS	- Sistema serotoninérgico
TGF- α	- Fator de Crescimento Transformador- α
TNF- α	-Fator tumoral- α
TP	-Transplacentária
mg	- Miligrama
kg	- Quilograma

μL	- microlitro
g	- Grama
UI	- Unidades Internacionais
M	- Molaridade
n	- Número Amostral
h	- Horas
mm	- Milímetros
x	- Vezes
μm	- Micrômetro
p	- Nível de Significância Estatística
%	- Percentual

LISTA DE SIGLAS

- DALY** - Disability Adjusted Life Years
- DMFA** - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
- UFRPE** - Universidade Federal Rural de Pernambuco
- WHO** - World Health Organization – Organização Mundial de Saúde
- YLD** - Years Lived with Disability

Sumário

1. Introdução	19
2. Revisão de Literatura.....	24
2.1. Testículo	24
2.2. Células de Sertoli	26
2.3. Proliferação de Células de Sertoli e os Níveis de FSH.....	27
2.4. Sistema Serotoninérgico (SS).....	30
2.5. Serotonina e a Regulação da Função Testicular.....	31
2.6 Intervenção Farmacológica do Sistema Serotoninérgico.....	34
3. Objetivo.....	36
3.1. Geral.....	36
3.2. Específicos	36
4. Protocolo Experimental da Comissão de Ética em Experimentação e uso de animais.....	37
Referências.....	37
Trabalho 1	
Intervenção Farmacológica Neonatal sobre o Sistema Serotoninérgico Utilizando Cloridrato de Fluoxetina: Repercussão Sobre Parâmetros Produtivos e Celulares no Testículo de Ratos Wistar Adultos.....	
	49
Resumo.....	49
Abstract.....	50
Introdução.....	50
Animais, Intervenções Farmacológicas e Desenho Experimental.....	52
Perfusão Tecidual e Processamento Histológico.....	53
Proporções Volumétricas(%) e volume dos componentes dos testículos..	53
Diâmetro tubular, Altura do Epitélio Seminífero e Comprimento Total dos Túbulos Seminíferos.....	54
Contagem da população de células de Sertoli e da Linhagem Germinativa por Secção Transversal de Túbulos Seminíferos.....	
	55
Análise Estatística.....	56

Resultados e Discussão.....	56
Conclusão.....	62
Referências.....	63
Trabalho 2	
Influência da Transferência de um Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina Via Transplacentária e Leite Materno no Desenvolvimento Testicular Neonatal em Ratos Wistar.....	68
Resumo	68
Abstract.....	69
Introdução.....	69
Animais, Manipulações Farmacológicas e Desenho Experimental.....	71
Perfusão Tecidual e Processamento Histológico.....	71
Proporções Volumétricas (%) e Volume dos Componentes do Testículo..	72
Diâmetro Tubular, Altura do Epitélio Seminífero e Comprimento Total dos Túbulos Seminíferos.....	72
Contagem da População de Células de Sertoli por Secção Transversal de Túbulos Seminíferos.....	73
Dosagem de Testosterona.....	74
Análise Estatística.....	74
Resultados e Discussão.....	74
Conclusão.....	79
Referências.....	79
Anexos.....	83
Trabalho 3	
Avaliação dos Efeitos do Cloridrato de Fluoxetina Via Transplacentária e Leite Materno em Parâmetros Testiculares de Ratos Wistar Adultos...	89
Resumo.....	89
Abstract.....	90
Introdução.....	90
Animais, Manipulações Farmacológicas e Desenho Experimental.....	92

Processamento Histológico e Histometria Testicular.....	93
Dosagem de Testosterona.....	96
Análise Estatística.....	96
Resultados e Discussão.....	96
Pesos dos Testículos, Epidídimo, Próstata, Glândula Seminal, e Índice Gonadossomático.....	98
Histometria Testicular.....	99
Conclusão.....	106
Referências.....	106
Anexo.....	111

1.INTRODUÇÃO

A depressão trata-se de uma desordem mental comum na qual o indivíduo pode apresentar alterações de humor, perda de interesse em diversas áreas da vida, sentimentos de culpa ou baixa auto-estima, além de alterações no sono ou apetite e problemas de concentração (WHO, 2009). Hoje em dia a depressão ocupa o segundo lugar no DALY ou YLD (Disability Adjusted Life Years ou Years Lived with Disability) entre os indivíduos de 15 a 44 anos de ambos os sexos, sendo estimado que em 2020 este distúrbio, ainda sem causas bem definidas, seja a segunda maior causa de incapacitação em indivíduos de todas as idades (WHO, 2009).

No mundo, aproximadamente 121 milhões de pessoas apresentam sintomas de depressão. Antidepressivos e tratamento psicoterápico são efetivos em 60%-80% dos casos (WHO, 2009). Aproximadamente 1 milhão de brasileiros consomem antidepressivos diariamente sendo um quarto desse número consumidores de fluoxetina, ou seja prozac e similares (ATHAYDE, 2007).

Atualmente, com o avanço da farmacologia, é possível dispor de substâncias altamente seletivas que atuam especificamente em determinados sistemas de neurotransmissão. A utilização dessas substâncias vem sendo empregada em estudos experimentais para analisar a função da serotonina durante o período crítico de desenvolvimento do Sistema Nervoso (SN). Estes estudos têm produzido dados que contribuem para um melhor discernimento do papel exercido por este neurotransmissor (MAGALHÃES et al., 2006).

Entretanto, até o presente momento não se tem notícia da utilização desses fármacos com o objetivo de avaliar a influência da manipulação do sistema serotoninérgico durante o período crítico do desenvolvimento testicular pré e pós-natal.

A principal teoria para a origem da depressão propõe que essa desordem seja causada por uma deficiência na neurotransmissão monoaminérgica em certos locais no cérebro. Assim, drogas que facilitam a ação de monoaminas, na fenda sináptica, são utilizadas como medicamentos antidepressivos (BUFALO, 2007).

Durante os últimos anos tem sido crescente o interesse sobre os efeitos colaterais produzidos pela utilização de drogas que atuam sobre neurotransmissores cerebrais como a serotonina, dopamina e noradrenalina. Esses efeitos colaterais podem ser estudados depois de repetidas ou agudas administrações das drogas através de inúmeras metodologias. Ligação do neurotransmissor ao receptor, ativação da cinética enzimática, renovação e reutilização dos neurotransmissores e mudanças no comportamento representam algumas das metodologias básicas envolvidas na mensuração destes efeitos (RÉNYI, 1986).

A avaliação do perfil dos efeitos colaterais induzidos por antidepressivos e drogas neurolépticas é de particular interesse, uma vez que tais avaliações podem dar importantes informações sob ação terapêutica destas drogas (RÉNYI, 1986).

Para a avaliação do risco de uma substância sobre o sistema reprodutor o mais indicado é a utilização de informações derivadas de estudos em humanos. No entanto, na ausência destas, o conhecimento dos mecanismos que controlam a reprodução assim como os riscos reprodutivos oferecidos por algumas substâncias vêm do uso de dados de experimentação animal. Vários agentes têm sido demonstrados causarem toxicidade reprodutiva tanto em humanos quanto em animais de laboratório. Assim, avaliar o efeito desses medicamentos na função sexual desses animais pode ajudar a identificar substâncias nocivas a reprodução humana (BUFALO, 2007).

Os antidepressivos inibidores da monoaminoxidase (MAO) exercem seus efeitos sobre os sistemas orgânicos influenciados por aminas simpatomiméticas e serotonina. A MAO é importante na regulação metabólica das catecolaminas e da serotonina no tecido nervoso, hepático e no testículo (BALDESSARINI, 1996).

De acordo com Urry e Dougherty (1975) um dos efeitos colaterais atribuídos a elevação da serotonina e noradrenalina devido a utilização de um inibidor da MAO sobre a função testicular foi uma severa degeneração nos túbulos seminíferos. Este achado foi confirmado por Hedger et al.(1995) que induziram, através da aplicação durante 4 dias de altas doses de 5HT intraperitoneal (10mg/Kg), uma completa disrupção do processo espermatogênico caracterizado pela degeneração de células espermatogênicas. Segundo os mesmos autores a 5HT também inibiu a liberação de LH e a esteroidogênese nas células de Leydig.

Segal et al.(1975) encontrou altos níveis de serotonina e 5-HIAA na urina de 102 homens com oligospermia e azoospermia os quais podem estar relacionados com estresse psicogênico ou comprometimentos na metabolização da serotonina. Portanto, este neurotransmissor está diretamente ligado ao controle das funções endócrinas e exócrinas do testículo.

Os antidepressivos tricíclicos aumentam os níveis teciduais de serotonina e noradrenalina através da inibição da recaptação destas aminas biogênicas na fenda sináptica (BRILEY e MORET, 1996; HYTTEL, 1994; EAP e BAUMANN, 1996). Dentre os principais efeitos colaterais produzidos por esse grupo de antidepressivos e relacionados com o sistema endócrino e o sistema reprodutor, podemos citar a tumefação testicular, ginecomastia, retardo no orgasmo e impotência orgástica no homem (BALDESSARINI, 1996; LABBATE et al., 1998).

Atualmente, os inibidores da recaptação seletiva da serotonina (ISRS) são os antidepressivos mais freqüentemente prescritos para o tratamento da depressão (RÉNYI, 1986; BALDESSARINI, 1996;). O principal efeito colateral observado nas terapias antidepressivas utilizando estes fármacos relaciona-se com disfunções sexuais (BALON, 1995; WALDINGER e OLIVER, 1998., LABBATE et al., 1998).

De acordo com Matuszyk et al.(1998), ratos tratados com doses sub-crônicas de fluoxetina apresentam redução significativa na motivação sexual e um aumento na latência ejaculatória. Segundo Cantor et al.(1999) ratos tratados com doses crônicas de fluoxetina tiveram respostas ejaculatórias diminuídas, porém esse efeito colateral foi atenuado através da administração de oxitocina. Em humanos as funções sexuais primárias afetadas pelo uso de antidepressivos ISRS's, acima de 3 meses, são o orgasmo e a ereção (LABBATE et al., 1998; MADEO et al., 2008).

A ereção peniana e a ejaculação ocorrem devido à atividade periférica parassimpática e β -adrenérgica, e a fluoxetina é um antidepressivo com a mais baixa afinidade para receptores colinérgicos e α -adrenérgico.

Os mecanismos das disfunções sexuais provavelmente estão relacionados com o bloqueio da recaptação da serotonina no sistema nervoso central (SNC) (MURRAY e HOOBERMAN, 1993). A serotonina no SNC também é responsável pelo mecanismo da ereção peniana através dos receptores 5HT-1b, e os agonistas desse receptor e bloqueadores da recaptação do 5-HT tem induzido disfunções eréteis em ratos e primatas (BERENDSEN e BROEKKAMP, 1987; SZELE et al., 1988).

Estudos prévios sugerem que o comportamento sexual em ratos machos é inibido pela serotonina. Portanto, embora um aumento na atividade central da serotonina, como os que são obtidos pela administração de precursores da 5HT ou inibidores da MAO, é acompanhado pela depressão do comportamento sexual em machos e, uma redução serotoninérgica na neurotransmissão cerebral, como as que são obtidas pela triptofano-hidroxilase, ou por lesões químicas e mecânicas de neurônios serotoninérgicos, facilitam o comportamento sexual em ratos machos (MATUSZCYK et al., 1998).Recentemente inúmeros estudos dão suporte ao papel estimulador exercido pela fluoxetina sobre o eixo HPA. A administração aguda da fluoxetina e outros antidepressivos em ratos estimulou a secreção de ACTH pela hipófise e de corticosterona pela adrenal em proporção dose-dependente (AARMARIO e GARCIA-MARQUEZ, 1987; LI et al., 1993; DINAN, 1996). Dando consistência aos achados citados anteriormente, a fluoxetina aumentou o conteúdo de CRH no sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, reforçando a hipótese de que este antidepressivo, em particular, afeta toda a árvore límbica do eixo HPA (BARDEN et al., 1995; HOLSBOER e BARDEN, 1996).

Segundo Torres et al.(1998) a fluoxetina desencadeia a transcrição de genes c-fos, CRH e o seu receptor CRH1 em várias regiões do cérebro, particularmente no núcleo paraventricular do hipotálamo, o que corrobora os achados de Aarmario e Garcia-Marquez (1987), Li et al. (1993), Dinan (1996), Barden et al. (1995), Holsboer e Barden (1996). Além do aumento do conteúdo de CRH hipotalâmico, Perry e Fuller, (1997) detectaram através da injeção sistêmica, que a fluoxetina foi capaz de induzir a liberação extracelular de noradrenalina no hipotálamo de ratos.

De maneira geral, a utilização de antidepressivos sejam eles inibidores da MAO, tricíclicos ou ISRS's podem produzir supressão do eixo reprodutivo (URRY e DOUGHERTY, 1975; PERRY e FULLER, 1997; TORRES et al., 1998; LABBATE et al., 1998). Esta supressão ocorre pela ativação simultânea do eixo HPA e do sistema simpático-adrenomedular através dos produtos liberados por estes dois sistemas (KNOL, 1991; CALOGERO et al., 1997; CHROUSOS, 1998). Os fatores mais importantes envolvidos são o CRH, peptídeos opióides endógenos (EOP), catecolaminas e glicocorticóides.

Apesar do vasto conhecimento sobre a ação dessas aminas biogênicas (serotonina e noradrenalina) no controle das funções reprodutivas do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e diretamente na função testicular em ratos maturos sexualmente (URRY e DOUGHERTY, 1975; NAUMENKO e SHISHKINA, 1978; DAS et al., 1982, 1985, 1986; HEDGER et al., 1995), e dos efeitos colaterais dos antidepressivos tricíclicos (BALDESSARINI, 1996), até o presente momento, nenhum estudo mais pormenorizado sobre a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico durante o período crítico do desenvolvimento testicular em ratos neonatos e os seus reflexos no processo espermatogênico em ratos maturos sexualmente foi realizado.

Em ratos adultos o tratamento com p-Clorofenilalanina associada ao propionato de testosterona resultou em significantes mudanças nos pesos dos testículos, vesícula seminal, glândula bulbo uretral, glândula prepuccial e próstata (GAWIENOWKI et al., 1973), o que provavelmente denota uma influência da serotonina no eixo HPG também em indivíduos adultos. Shishkina e Borodin (1989) determinaram através da redução da biossíntese de serotonina no SNC pela p-Clorofenilalanina em ratos pré-púberes que esse neurotransmissor estaria envolvido na regulação da maturação sexual, muito embora de forma antagônica em diferentes momentos do período pré-púbere. Por outro lado, os períodos utilizados pelos autores supracitados não são críticos no desenvolvimento testicular de ratos, uma vez que este período decorre nos primeiros 21 dias pós-natal (SHARPE, 1994).

De acordo com Lesage et al. (1996), ratos neonatos machos apresentam uma ativação do eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal) e HPG (Hipotálamo-Pituitária-Gônada) os

quais podem estar temporalmente relacionados com o aumento do metabolismo intra-hipotalâmico da serotonina, noradrenalina e do NPY (neuropeptídeo Y). O funcionamento do eixo HPG em ratos neonatos é determinante para mitose das células de Sertoli e estabelecimento da produção espermática normal em indivíduos adultos (ROCHA et al., 1999).

Depressão clínica ocorre em 10-15% das mulheres durante a gestação, enquanto a depressão pós-parto ocorre entre 10-22% das mulheres. Esta condição clínica pode trazer complicações para as mães e o feto, além de efeitos adversos provocados durante pós-parto sobre o desenvolvimento cognitivo, motor e desenvolvimento emocional do neonato (KIM et al., 2005). A partir da introdução da fluoxetina nos anos 80, ela e outros inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) estão sendo utilizados de forma crescente no tratamento da depressão pré e pós-parto, devido a sua eficiência, baixo índice de efeito colateral materno e maior margem de segurança em relação a antidepressivos inibidores da MAO e tricíclicos (NONACS e COHEN, 2002; COOPER e MURRAY, 1998; LARSON et al., 2004; SIMON et al., 2002).

Em ratas gestantes foi comprovado que a fluoxetina e norfluoxetina atravessam a barreira placentária e se distribuem dentro do embrião/feto durante os períodos de organogênese e pós-organogênese (POHLAND et al., 1989). A transferência de fluoxetina e norfluoxetina através do leite maternos de ratas vem sendo utilizada para estudar os efeitos deste ISRS e seu derivado N-metilado, norfluoxetina, em ratos neonatos (PEREIRA et al., 2007).

A fluoxetina é primariamente metabolizada no fígado em norfluoxetina, que tem a mesma atividade farmacológica além de existir uma boa correlação entre as concentrações fluoxetina-norfluoxetina sangüínea e cerebral. Estes dois componentes são altamente lipossolúveis podendo, desta forma, atravessar a barreira placentária e também ser excretada no leite. Além disso, a meia-vida da fluoxetina (1-3 dias) e da norfluoxetina (7-15 dias) sugerem risco ao neonato devido a sua acumulação no leite materno (HEIKKINEN et al., 2003). Embora o nível plasmático em neonatos amamentados com leite contendo fluoxetina ou norfluoxetina seja baixo em relação aqueles tipicamente vistos em paciente, alguns trabalhos reportam que os níveis são suficientes para produzir a inibição do transportador de serotonina (EPPERSON et al., 2006).

Alguns efeitos adversos como choro constante, irritabilidade, desnutrição e déficit de crescimento tem sido descrito em neonatos amamentados por mães submetidas a tratamento antidepressivo com ISRS (CHAMBERS et al., 1999; KRISTENSEN et al., 1999; HENDRICK et al., 2001). Por outro lado, a utilização de fluoxetina intra-uterina em ovelhas

provocou redução no fluxo sanguíneo uterino, alterou a função hipotalâmica no adulto e ampliou a magnitude do cortisol fetal pré-parto nas ovelhas (MORRISON et al., 2005).

Os efeitos provocados pela manipulação do sistema serotoninérgico durante o período pré-natal e neonatal sobre o desenvolvimento testicular, levando-se em consideração todos os dados acima, as inter-relações serotonina-antidepressivos e sistema reprodutor, assim como, a larga escala em que estas drogas estão sendo utilizadas atualmente, são de grande relevância para investigações dentro deste tema.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a intervenção farmacológica sobre o sistema serotoninérgico durante o período pré-natal e neonatal do desenvolvimento testicular de ratos wistar utilizando fluoxetina na função testicular de ratos pré-puberes e maturos sexualmente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TESTÍCULO

O testículo é um órgão com funções exócrinas e endócrinas localizado na região pélvica no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Esta túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, envia septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lobos (RUSSELL et al., 1990).

Funcionalmente, o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, também chamado de espaço intertubular e o compartimento de túbulos seminíferos (RUSSELL et al., 1990). Com exceção das células germinativas que se originam do epiblasto, as células somáticas dos testículos são procedentes dos ductos mesonéfricos e do epitélio celomático (KARL e CAPEL, 1998; MERCHANT-LARIOS e MORENO-MENDOZA, 1998). Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (RUSSELL et al., 1990; SETCHELL, 1991). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (FAWCETT et al., 1973; FRANÇA e RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente neste compartimento. Assim, por exemplo, o percentual ocupado pelas mesmas nos testículos de animais sexualmente maduros no período reprodutivo pode variar de aproximadamente 1% em carneiros até cerca de 35% em capivaras (FRANÇA e RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (FRANÇA e RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999). Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, que se encontra localizada numa região bastante rica em vasos e tecido conjuntivo denominada de mediastino testicular. A partir desta região a rede testicular encontra-se conectada ao epidídimo através dos ductos eferentes.

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mióides ou peritubulares e matriz extracelular. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distintas: as células germinativas originárias do epiblasto e as células de Sertoli provenientes do epitélio celomático (KARL e CAPEL, 1998). Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois compartimentos, o compartimento basal onde se localizam as espermatogônias e os espermátócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos e leptótenos), e o compartimento adluminal, no qual encontram-se os espermátócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermátócitos secundários e espermátides. Desta forma, o compartimento adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e imunoprivilegiado essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990; SETCHELL, 1991; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994). No lume tubular encontram-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém-espermiados.

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (FRANÇA e RUSSELL, 1998). O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (BASCUM e OSTERUD, 1925). Já no suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (FRANÇA e RUSSELL, 1998). De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180µm a 300µm (ROOSEN-RUNGE, 1977).

2.2. CÉLULAS DE SERTOLI

Nos testículos de animais sexualmente maduros as células de Sertoli estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o qual reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (RUSSELL, 1993).

Além da formação da barreira de célula de Sertoli já comentada anteriormente, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, podem ser citadas: o fornecimento de nutrientes, mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose.

As células de Sertoli secretam ainda fluido em direção ao lume tubular, o qual possui substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides. A secreção de fluido também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando a mesma envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como células mióides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (RUSSELL e GRISWOLD, 1993; BARDIN et al., 1993; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994; FRANÇA e RUSSELL, 1998). É importante aqui salientar que as células de Leydig e as células mióides também possuem extensas interações funcionais com as células de Sertoli, conforme já foi sugerido anteriormente. Em relação às células de Leydig, estas interações serão comentadas com maiores detalhes mais adiante. O período de proliferação dos diversos tipos celulares encontrados no testículo ocorre em épocas distintas, sendo cada um deles regulado por fatores específicos, os quais têm origem tanto intra quanto extratesticular (ORTH, 1993).

As células de Sertoli são as primeiras células somáticas a se diferenciarem no testículo e expressam o Sry, o gene responsável pela determinação do sexo masculino, o qual desempenha um papel fundamental na diferenciação e remodelação das gônadas (KARL e CAPEL, 1998). Já nesta fase, as interações das células de Sertoli entre si e com as células germinativas via fator neural de adesão celular (NCAM) são cruciais para a formação dos cordões testiculares e os eventos iniciais que propiciarão o estabelecimento do processo espermatogênico (ORTH e JESTER, 1995). Também neste período as células de Sertoli

produzem o hormônio anti-Mülleriano (AMH) responsável pela regressão dos ductos de Müller ou paramesonéfricos (PELLINIEMI et al., 1993).

Em ratos, a proliferação das células de Sertoli ocorre principalmente na fase final do período fetal e se estende por duas a três semanas após o nascimento (CLERMONT e PEREY, 1957; STEINBERGER e STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; ALMIRÓN e CHEMES, 1988; BORTOLUSSI et al., 1990; VERGOUWEN et al., 1991), coincidindo o encerramento das divisões mitóticas das células de Sertoli com o início de proliferação dos espermatócitos primários, formação das junções de oclusão, início de maturação das células de Sertoli, secreção de fluido e formação do lume tubular (RUSSELL et al., 1989). Como cada célula de Sertoli possui uma capacidade de suporte para células germinativas relativamente fixa para cada espécie, o tamanho potencial do testículo e da produção espermática é estabelecido já nesta etapa do desenvolvimento testicular (ORTH et al., 1988; ORTH, 1993). Estudos envolvendo o homem e várias espécies de mamíferos domésticos (GONDOS e BERNDTSON, 1993) sugerem que o período de proliferação das células de Sertoli, à semelhança do observado em ratos, ocorre predominantemente no período perinatal.

2.3 PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE SERTOLI E OS NÍVEIS DE FSH

Em animais adultos as células de Sertoli completamente diferenciadas constituem uma população estável. Durante o desenvolvimento testicular ocorre um aumento relativamente rápido da população de certos tipos celulares tanto no período fetal quanto no período neonatal. As células que constituem população testicular se expandem em períodos particulares do desenvolvimento e, pelo menos no caso das células de Sertoli e das células espermatogênicas, esses períodos são distintos e inversamente correlacionados. Além de distintos, estes períodos de multiplicação das células testiculares são controlados por fatores específicos para cada população (ORTH, 1993).

Fortes evidências indicam que o número de células de Sertoli em qualquer espécie é importante para determinar a capacidade espermatogênica e o tamanho do testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Portanto a população de células de Sertoli, segundo Johnson et al. (1994), Berndtson et al. (1987a, b), Berndtson e Thompson (1990) e França e Russell (1998), correlaciona-se linear e positivamente com o peso do testículo, volume e comprimento total de túbulos seminíferos, população de espermatogônias A₁ e com a produção espermática diária. O estabelecimento desta população ocorre em idades muito precoces do desenvolvimento testicular. Após este período, as células de Sertoli perdem sua habilidade mitótica e permanecem numericamente estáveis (GONDOS e BERNDSTON, 1993).

A maioria das mitoses das células de Sertoli nos mamíferos ocorre na vida intra-uterina e por um curto período pós-natal. O final do processo mitogênico está relacionado com a formação da barreira de células de Sertoli e o estabelecimento da puberdade. Após estes dois eventos nenhum aumento sazonal ou relacionado com a idade é observado na população de células de Sertoli (FRANÇA e RUSSEL, 1998).

De acordo com Cooke et al. (1994), existe uma tremenda variação no padrão de proliferação entre as espécies. O período mitogênico é muito curto em ratos e camundongos; ele inicia-se no final da gestação para ambas espécies e continua até o 12^o-15^o dia pós-natal em camundongos (VERGOUWEN et al., 1991; JOYCE et al., 1993) e até o 15^o-18^o dia pós-natal em ratos (CLERMONT e PEREY 1957; STEINBERGER e STEINBERGER 1971; ORTH, 1982; VAN HASTER et al., 1992). Portanto, durante o período fetal destas espécies observa-se uma maior expansão da população de células de Sertoli e após o nascimento, a proliferação destas células já está em declínio (ORTH 1982; VAN HASTER et al., 1992; VERGUOWEN et al., 1991; JOYCE et al., 1993).

É importante salientar que, além das diferentes extensões nos períodos proliferativos pós-natais entre as espécies, a intensidade de proliferação é um outro fator que deve ser levado em consideração durante este período (COOKE et al., 1994). Portanto, os mamíferos podem apresentar longos períodos de proliferação de células de Sertoli com uma baixa média mitogênica e diminuição gradual desta média. Por outro lado, outros podem apresentar períodos mais condensados de proliferação de células de Sertoli, caracterizados por altos índices mitóticos, porém, que declinam rapidamente e culminam com a maturação das células de Sertoli (COOKE et al., 1994).

Em algumas espécies, a mitogênese da célula de Sertoli no período fetal não foi quantificada, entretanto é sabido que em coelhos o período de proliferação pode se estender até o 60^o dia pós-natal (COOKE et al., 1994).

Segundo Hochereau-de Reviers et al. (1987), entre o 42^o e o 100^o dia do período fetal em carneiros ocorre uma elevada proliferação de células somáticas e germinativas, entretanto sem qualquer diferenciação. Nesta espécie as divisões mitóticas das células de Sertoli são mais numerosas antes do nascimento do que depois, por outro lado, no período pós-natal observou-se que a proliferação deste tipo celular, apesar de discreto, perdurou até o 40^o dia (COOKE et al., 1994; HOCHEREAU-DE REVIERS et al., 1995). Em touros a proliferação de células de Sertoli no período pós-natal inicia-se por volta da 20^a e se prolonga até a 32^a semana, a partir da qual ocorre uma estabilização no número de células de Sertoli por testículo nesta espécie (CURTIS e AMANN, 1981). No homem a população de células de Sertoli aumenta gradativamente no período pós-natal até atingir um platô entre 25 e 40 anos

(GONDOS e BERNDTSON, 1993). Por outro lado, a partir dos 40 anos se observa um declínio gradativo na população de células de Sertoli acompanhado também por uma diminuição na produção espermática (JOHNSON et al., 1994).

O FSH (hormônio folículo-estimulante) é uma glicoproteína que se liga a receptores específicos localizados na membrana plasmática das células de Sertoli, sendo considerado como o principal fator mitogênico para estas células. Este hormônio é sintetizado e secretado pelos gonadotrofos localizados na adenohipófise, sob a ação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido no hipotálamo, sendo seu controle “feedback” negativo exercido pela inibina secretada pelas células de Sertoli. Trabalhos envolvendo tanto a administração de FSH quanto à supressão do mesmo, no período de proliferação das células de Sertoli, mostram que o número de células está reduzido ou aumentado (HOCHEREAU-DE-REVIERS e COUROT, 1978; ORTH, 1984; ORTH et al., 1984; VAN VORSTENBOSCH et al., 1987; ORTH, 1993; SHARPE, 1994; MEACHEM et al., 1996; SINGH e HANDELSMAN, 1996; ROCHA et al., 1999).

O efeito mitogênico do FSH sobre as células de Sertoli imaturas é mediado pelo aumento dos níveis intracelulares do AMP cíclico (ORTH e BOEHM, 1990). No entanto, pouco é sabido a respeito dos eventos específicos que causam o início da divisão das células de Sertoli em resposta ao FSH. Especula-se que o estrógeno, produzido pela aromatização de andrógenos nas células de Sertoli imaturas, sob o estímulo do FSH, pode exercer um papel mediador importante na divisão celular (ULISSE et al., 1994). A ação da inibina neste processo, via células de Leydig, também é possível (ORTH, 1993; SHARPE, 1994; DE KRETZER et al., 1996).

De acordo com Griswold (1993), as respostas das células de Sertoli ao FSH variam de acordo com o período de desenvolvimento testicular em que o animal se encontra. Durante o período fetal e neonatal do desenvolvimento testicular o FSH (hormônio folículo estimulante) é considerado o fator regulador de maior relevância na mitogênese da população de células de Sertoli (HOCHEREAU-DE-REVIERS e COUROT, 1978; ORTH, 1984; ORTH et al., 1984; VAN VORSTENBOSCH et al., 1987; ORTH, 1993; SHARPE, 1994; MEACHEM et al., 1996; SINGH e HANDELSMAN, 1996). Ao longo destes períodos, os níveis séricos normais de FSH são cruciais para a determinação do tamanho adequado da população de células de Sertoli do testículo no indivíduo adulto (ORTH, 1984; ORTH et al., 1988).

2.4 SISTEMA SEROTONINÉRGICO (SS)

Dentre os sistemas de neurotransmissão, destaca-se o serotoninérgico (SS), que consiste de um conjunto de neurônios, cujo neurotransmissor é a indolamina, denominada 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT). A serotonina está presente em muitos outros organismos vivos desde espécies que possuem SN primitivo até bastante evoluído como o do homem. O aparecimento precoce na embriogênese do sistema de neurotransmissão serotoninérgica sugere um papel ativo no desenvolvimento neurológico (LEVIT *et al.*, 1997, MORIN, 1999).

A 5-HT tem como precursor o aminoácido essencial L-Triptofano, presente na corrente sanguínea. Atravessando a barreira hematoencefálica, inicia-se a síntese enzimática da 5-HT, através da hidroxilação do L-triptofano pela triptofano hidroxilase, originando o 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este por sua vez, é descarboxilado pela descarboxilase dos aminoácidos aromáticos, formando a 5-Hidroxitriptamina (5-HT) (GRAHAME – SMITH, 1964). Esta, por sua vez, é estocada em vesículas sinápticas nas terminações serotoninérgicas, onde serão liberadas por exocitose (SANDERS – BUSH e MARTIN, 1982; FELDMAN e QUENZER, 1984). Estando na fenda sináptica, a 5-HT interage com múltiplos receptores presentes nas membranas pré e pós-sináptica (HAMON e EMERIT, 1989).

A serotonina pode ser capturada (bomba de recaptação) indo novamente para o interior dos terminais serotoninérgicos. Essa recaptação tem importante função de cessar a estimulação dos receptores nas sinapses. No interior do neurônio, a 5-HT é inativada pela ação da enzima monoaminoxidase, a MAO A, com formação do ácido 5-hidroxiindolacético (FELDMAN e QUENZER, 1984).

As ações da serotonina resultam mais precisamente de sua interação no nível celular, com receptores de membrana específicos (WHITAKER – AZMITIA, 1994). Esses receptores apresentam grande heterogeneidade e localização pré e pós-sináptica (neste último caso, podem localizar-se em neurônios serotoninérgicos ou não). Através de sua interação com os receptores, a serotonina estimula ou modula uma ampla variedade de funções do SNC (CHOPIN *et al.*, 1994). A atividade serotoninérgica está envolvida na regulação de um número de funções fisiológicas como: temperatura, sono, controle das secreções neuroendócrinas, comportamento, apetite, aprendizado e memória, locomoção, atividade sexual e outras. Conseqüentemente, também está implicada em disfunções levando a várias patologias, como: ansiedade; depressão; esquizofrenia; desordem compulsiva obsessiva (DCO), agressividade; impulsividade, distúrbios do sono, disfunções sexuais e outras (ZIFA e FILLION, 1992 ; MÖSSNER e LESCH, 1998).

2.5 SEROTONINA E A REGULAÇÃO DA FUNÇÃO TESTICULAR

Evidências farmacológicas demonstraram que a serotonina no cérebro exerce um importante controle na secreção do FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), por agir na inibição da liberação de GnRH (fator liberador de gonadotrofinas) no hipotálamo (URRY e DOUGHERTY, 1975; NAUMENKO e SHISHKINA, 1978; DAS et al., 1982, 1985; HEDGER et al., 1995). De acordo com os autores citados anteriormente, a consequência principal da elevação dos níveis cerebrais de serotonina se reflete diretamente na inibição da espermatogênese e esteroidogênese. A inibição desses processos ocorre devido à necessidade da ação sinérgica, ou até mesmo aditiva, do FSH e da testosterona na manutenção qualitativa e quantitativa do processo espermatogênico (GRISWOLD, 1993; SHARPE, 1994). Esses hormônios estão diminuídos em função da elevação dos níveis cerebrais de serotonina. Localmente, esse neurotransmissor pode inibir a espermatogênese e a esteroidogênese pela redução aguda do fluído intratesticular devido à constrição da artéria testicular como também de enzimas fundamentais da esteroidogênese, tais como: 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase, isomerasas e hidroxilases (KALLA, 1979; DAS et al., 1982, 1985, 1986; HEDGER et al., 1995).

Apesar de ser o principal neurotransmissor no cérebro, a serotonina, também está presente em muitos tecidos periféricos incluindo células cromafins da mucosa gastrointestinal, glândula pineal, plaquetas, mastócitos, pâncreas, pulmão, timo, tireóide e trato urogenital (VERBEUREN, 1989; SANDERS-BUSH e MAYER, 1996). Esse neurotransmissor, bem como a monoaminoxidase, a enzima que metaboliza a 5HT, foram identificadas no testículo e glândulas sexuais acessórias (ELLIS et al., 1972; CAMPOS et al., 1990; TINAJERO et al., 1993a; AGUILAR et al., 1995). Em ratos, a 5HT testicular pode ser proveniente das terminações nervosas na cápsula (CAMPOS et al., 1990), de mastócitos (KOPS et al., 1990; AGUILAR et al., 1995) e das células de Leydig (TINAJERO et al., 1993).

A serotonina demonstrada imunohistoquimicamente em mastócitos e células de Leydig de hamster tem os níveis intratesticulares modificados durante o desenvolvimento sexual e no período de transição entre a regressão e recrudescência testicular relacionada às variações do fotoperíodo, sugerindo que este neurotransmissor pode atuar como um importante modulador local da ação das gonadotrofinas sobre a esteroidogênese (FRUNGIERI et al., 1999).

As células de Leydig em ratos são fonte de inúmeros hormônios e/ou fatores potencialmente ativos além da testosterona, dentre os quais: IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina-I), proibitina, inibina, TGF- α (fator de crescimento transformador- α), PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta) e POMC (pró-opiomelanocorticotrófina),

os quais participam no controle autócrino e parácrino das funções das células de Leydig e de Sertoli (POCCIA, 1994).

Na espécie humana, foram identificadas nas células de Leydig através de imunocitoquímica, enzimas relacionadas com a síntese e biotransformação das catecolaminas dopamina e noradrenalina em serotonina, além de outros marcadores neuronais típicos (DAVIDOFF et al., 1993). A partir destes achados, as células de Leydig puderam ser relacionadas como membro do sistema neuroendócrino difuso (DAVIDOFF et al., 1993).

A serotonina é o principal regulador da produção do CRH (Hormônio liberador de corticotrofina) pelo hipotálamo. Em condições de estresse, ocorre um aumento da atividade funcional de neurônios serotoninérgicos, que estão envolvidos na inibição da secreção de testosterona (TINAJERO et al, 1992).

O CRH é um peptídeo com 41 aminoácidos caracterizado como mediador chave das respostas endócrinas, viscerais e comportamentais relacionadas ao estresse, além de seus bem estabelecidos efeitos anti-reprodutivos centrais (AUDHYA et al., 1989, TINAJERO et al., 1992). Além da estrutura do CRH hipotalâmico ser semelhante à encontrada no testículo, também foi possível observar altas concentrações deste peptídeo nas células de Leydig, em algumas células germinativas e em espermatozóides no testículo de rato maduro, camundongo, cobaia, ovino, macaco e no homem. Segundo Audhya et al.(1989) e Yoon et al. (1988) o CRH modula a produção fisiológica de ACTH e β -END através de um mecanismo autócrino e parácrino. De acordo com Eskeland et al.(1989), as células de Leydig possuem receptores funcionais para CRH e a secreção de β -END é estimulada por este peptídeo. Segundo Fabbri et al. (1990) o principal estímulo trófico para liberação do CRH pelas células de Leydig foi o hormônio trófico hCG/LH. Fabbri et al. (1990) também observou que este peptídeo age através de receptores funcionais exercendo inibição autócrina sobre a esteroidogênese nas células de Leydig, caracterizando-o como um hormônio anti-reprodutivo testicular.

Segundo Dufau et al. (1993) a secreção de CRH, estimulada pelo LH em células de Leydig, ocorre através da liberação da 5HT e ativação autócrina de receptores 5HT₂. Portanto, a serotonina é um importante regulador da função das células de Leydig estimulando a secreção de CRH, o qual age como um inibidor da formação da AMPc induzido por gonadotrofina e produção de andrógeno (TINAJERO et al., 1993). Esta regulação pode ser feita pela serotonina produzida pelas células de Leydig (ação autócrina), e/ou outras fontes, incluindo mastócitos intersticiais, fontes sistêmicas, ou fibras nervosas em estados fisiológicos e patológicos (DUFAU et al., 1993; TINAJERO et al., 1993; AGUILAR et al., 1995).

No testículo, a liberação do CRH induzida pela 5HT nas células de Leydig, promove um efeito autócrino nestas células caracterizado pela liberação da β -endorfina (DUFAU et al., 1993). A β -endorfina, um peptídeo derivado do processamento de sua molécula precursora, a POMC (pro-opiomelanocorticotrofina), e outros peptídeos opióides foram identificados no cérebro, hipófise, trato gastrointestinal, extratos de testículo, próstata e vesícula seminal de ratos sexualmente maduros (SHARPE et al., 1980; SHU-DONG et al., 1982a). A β -endorfina também foi identificada, nas células de Leydig de camundongos, hamsters, cobaios e coelho (SHU-DONG et al. 1982b).

A identificação de receptores de alta afinidade para a β -endorfina nas células de Sertoli e a inibição da produção de ABP (proteína ligante de andrógeno), através do tratamento crônico de culturas com este tipo de células pelo peptídeo opióide, sugere que os mesmos, exercem um papel modulador sobre as células de Sertoli de ratos adultos (FABBRI et al., 1988). Portanto, em adultos, a ação da β -endorfina previne uma excessiva estimulação trófica da espermatogênese pela testosterona (FABBRI e DUFAU, 1988, CICERO et al, 1989a,b; MARGORIS et al., 1989; CHANDRASHEKAR e BARTKE, 1992).

Segundo Fabbri e Dufau (1988) a β -endorfina comporta-se como um inibidor parácrino da função da célula de Sertoli. A ligação da serotonina com receptores específicos ($R_{5HT_{2c}}$) proporciona liberação do CRH, o qual estimula a liberação de β -endorfina e a transcrição de RNAm da sua molécula precursora, a POMC (CHEN et al., 1984; PINTAR et al., 1984; CHEN e MADIGAN, 1987; BARDIN et al., 1987; DUFAU et al., 1993; TINAJERO et al., 1993; AGUILAR et al., 1995).

Durante o desenvolvimento fetal e pós-natal do testículo, em camundongos e hamsters, Shaha et al. (1984) identificaram nas duas espécies o mesmo padrão de imunomarcagem para β -endorfina durante o período fetal, neonatal e pré-púbere nas células Leydig. De acordo com os mesmos autores o número e a intensidade de marcação das células intersticiais aumentaram durante a vida fetal, declinaram após o nascimento, e aumentaram novamente com a puberdade, caracterizando dois picos: um durante o período fetal-neonatal e o outro no período púbere do desenvolvimento testicular nestas espécies.

Em ratos os níveis de β -endorfina imunorreativa (i- β E) durante o desenvolvimento pós-natal do testículo foram muito baixos ou raramente detectados entre o 5^o e 20^o dia de idade, mas aumentou bruscamente e paralelamente com o peso do testículo entre os dias 20^o e 60^o de idade; por outro lado, nenhuma mudança significativa no i- β E foi observada até os 150 dias de idade (ADAMS e CICERO, 1989).

Em células de Sertoli imaturas de ratos, estudadas *in vivo* e *in vitro*, foi verificado que

a β -endorfina produzida dentro do testículo seria um modificador parácrino da resposta proliferativa das células de Sertoli ao FSH, implicando em uma comunicação entre as células de Leydig e as células de Sertoli durante o desenvolvimento testicular perinatal, período no qual o tamanho desta população celular é estabelecido (ORTH, 1986; ORTH e BOEHM, 1990). Desta forma, de acordo com Orth (1993) e Sharpe (1994), a interação direta entre as células de Leydig e Sertoli durante o desenvolvimento perinatal do testículo é muito importante para determinação do tamanho final da população de células de Sertoli e, por conseguinte da produção espermática no adulto, uma vez que, o número de células de Sertoli parece ser o principal regulador da magnitude da produção espermática no rato (ORTH et al., 1988; BERNDTSON e THOMPSON, 1990), carneiro (HOCHEREAU-DE-REVIERS et al., 1987), garanhão (JOHNSON e THOMPSON, 1983), touro (ATTAL e COUROT, 1963; BERNDTSON et al., 1987a,b), suíno (FRANÇA et al., 1999) e humano (JOHNSON et al., 1994).

Durante o período perinatal do desenvolvimento testicular, o estímulo para produção e liberação de β -endorfina provavelmente deve seguir o mesmo mecanismo proposto por Dufau et al. (1993), onde a serotonina é a principal desencadeadora da cascata de eventos que levam ao controle parácrino exercido pelas células de Leydig sobre a proliferação das células de Sertoli nesta fase.

2.6 INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA SOBRE SISTEMA SEROTONINÉRGICO

Experimentalmente diversas estratégias podem ser utilizadas para manipular a quantidade 5HT nos tecidos. Uma das estratégias para diminuir a concentração de 5HT e a utilização da p-Clorofenilalanina, um inibidor seletivo da triptofano-hidroxilase. Esse inibidor produz uma profunda e duradoura diminuição dos níveis de 5HT, porém os níveis de catecolaminas não são alterados. A p-Cloroanfetamina e outras anfetaminas halogenadas também podem ser utilizadas com a mesma finalidade, uma vez que, o seu mecanismo de ação consiste em promover uma rápida liberação da 5HT das plaquetas e neurônios seguida por prolongada e seletiva diminuição da 5HT no SNC (SANDERS-BUSH e MAYER, 2001; RANG et al., 2001).

Os fármacos empregados para o tratamento do variado grupo de desordens caracterizados pela diminuição dos níveis de serotonina também podem ser utilizados como estratégia para aumentar os níveis de 5HT nos tecidos (SANDERS-BUSH e MAYER, 2001). Dentre estes podemos incluir os tricíclicos (amitriptilina e imipramina), drogas inibidoras da monoaminoxidase (fenelzina, tranilcipramina, selegilina e clorgilina), drogas atípicas (bupropiona, nefazodona, trazodona) e, mais recentemente, os inibidores da recaptação

seletiva da serotonina (fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, venlafaxina) (BRILEY e MORET, 1996; HYTTEL, 1994; BALDESSARINI, 1996; GARERI et al., 1998, 2000).

Os fármacos inibidores da MAO (monoaminoxidase) exercem seus efeitos sobre os sistemas orgânicos influenciados por aminas simpatomiméticas e serotonina. A MAO é uma enzima mitocondrial importante na regulação metabólica das catecolaminas e da serotonina no tecido nervoso, hepático, intestino e no testículo (BALDESSARINI, 1996). Esta enzima funciona com uma “válvula de segurança” ao desaminar oxidativamente, e inativar, qualquer excesso de moléculas neurotransmissoras (noradrenalina, dopamina e serotonina) que pode extravasar das vesículas sinápticas quando o neurônio está em repouso (HARVEY e CHAMPE, 1998). A desaminação oxidativa dos neurotransmissores pode ser realizado por duas isoenzimas a MAO-A e a MAO-B, as quais são inibidas não seletivamente pelas drogas que atuam diretamente sobre essas enzimas. Entretanto, já é bem determinado experimentalmente que a inibição do subtipo A é responsável pela elevação da serotonina (BENNETT, 1997; YEGHIAYAN et al., 1997; HADDJERI et al., 1998; GARERI et al., 1998; 2000).

Os antidepressivos tricíclicos assim chamados, pela presença na sua estrutura química de três anéis benzênicos são as drogas mais comumente usadas na terapia da depressão, entretanto, não podem ser classificados como drogas meramente antidepressivas uma vez que, também são utilizadas em desordens obsessivo-compulsivas e na síndrome do pânico (GARERI et al., 1998, 2000). Em termos de ação terapêutica, os antidepressivos tricíclicos aumentam os níveis teciduais de serotonina e noradrenalina através da inibição da recaptção destas aminas biogênicas na fenda sináptica (BRILEY e MORET, 1996; HYTTEL, 1994; EAP e BAUMANN, 1996; GARERI et al., 1998; 2000).

Nas últimas décadas, os antidepressivos tricíclicos foram utilizados como terapia eletiva no tratamento das desordens depressivas. Entretanto, essa terapia vem sendo substituída pelos ISRS's (inibidores da recaptção seletiva de serotonina). Isto se deve ao fato de que os antidepressivos tricíclicos e os tetracíclicos são ineficientes para alguns pacientes, além de apresentarem efeitos colaterais indesejáveis, tais como aumento de peso, sintomas anticolinérgicos, alérgicos, hematológicos, gastrointestinais, endócrinos e cardiovasculares (BRILEY e MORET, 1996; HYTTEL, 1994; EAP e BAUMANN, 1996).

Atualmente, os inibidores da recaptção seletiva da serotonina são os antidepressivos mais freqüentemente prescritos para o tratamento da depressão (RÉNYI, 1986; BALDESSARINI, 1996;). Os ISRS's - fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, venlafaxina - têm mostrado eficácia contra a depressão. Esta eficiência é similar à observada

nos antidepressivos tricíclicos, porém com poucos efeitos colaterais (BRILEY e MORET, 1996).

Farmacologicamente os antidepressivos ISRS's são semelhantes aos tricíclicos, no que diz respeito a inibição da recaptação seletiva da serotonina, porém, os antidepressivos tricíclicos também são inibidores da recaptação de noradrenalina para dentro das terminações nervosas adrenérgicas e antagonistas das respostas muscarínicas colinérgicas e α -adrenérgicas aos neurotransmissores autonômicos (BALDESSARINI, 1996; GARERI et al., 1998; 2000). A propriedade farmacológica dos antidepressivos ISRS's e a sua baixa capacidade de inibir a recaptação da noradrenalina fazem desse grupo de fármacos, atualmente, a terapia de eleição para tratamento dos distúrbios físicos e psíquicos característicos da depressão, além de atuar especificamente no sistema serotoninérgico (CACCIA, 1998; HIEMKE e HÄTTER, 2000)

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar os efeitos da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico através do inibidor seletivo da recaptura de serotonina, cloridrato de fluoxetina, durante o período crítico do desenvolvimento testicular e suas conseqüências sobre a função testicular de ratos maduros sexualmente.

3.2 ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos da intervenção sobre sistema serotoninérgico através da administração de doses crescentes (1mg/Kg, 5mg/Kg, 10mg/Kg e 20mg/Kg) do cloridrato de fluoxetina (Hidrocloreto de N-metil-3-fenil-3-[(α,α,α -trifluoro-p-tolil)-oxi]propilamina) em ratos neonatos durante os primeiros 21 dias pós-natal e ratas do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal sobre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo de ratos pré-bubers e adultos considerando os seguintes parâmetros:

- a. Desempenho ponderal do peso corporal dos ratos machos, entre 0 e 150 dias de idade;
- b. Peso testicular aos 21 dias.
- c. Peso testicular, epididimário, glândula seminal e próstata aos 90 e 150 dias de idade;
- d. Proporções volumétricas entre componentes do parênquima testicular e diâmetro dos túbulos seminíferos;
- e. Morfologia das células da linhagem espermatogênica e das células de Sertoli através de microscopia de luz e as relações quantitativas entre as mesmas;
- f. População celular dos túbulos seminíferos no estágio 7, pelo sistema acrossômico, do ciclo do epitélio seminífero (CES) para ratos adultos;

- f. Número de células de Sertoli por grama de parênquima testicular e por testículo para ratos adultos;
- g. Produção espermática diária estimada através da histologia quantitativa dos testículos para ratos adultos;
- h. Determinar os níveis séricos de testosterona em animais neonatos e adultos submetidos a influência do ISRS durante o período pré e pós-natal correspondente a definição da população de células de Sertoli.

4.PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pela comissão de ética do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em acordo com os princípios básicos para pesquisa envolvendo animais, pré-estabelecidos pela Comissão e em consonância com as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e legislações pertinentes (Proc. N° 014/2002 CEEA/DMFA-UFRPE). (Anexo à página 111.)

Referências

- AARMARIO, A.; GARCIA-MARQUEZ, C. Tricyclic antidepressants activate the pituitary adrenal axis in the rat. Tolerance to repeated drug administration. **European Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 239-244, 1987.
- ADAMS, M.L., CICERO, T.J. The ontogeny of immunoreactive β -endorphin and β -lipotropin in the rat testis. **Life Science**, v.44, p.159-166, 1989.
- AGUILAR, R.; ANTÓN, F.; BELLIDO, C.; AGUILAR, E.; GAYTAN, F. Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. **Journal of Endocrinology**, v.146, p.15-21, 1995.
- ALMIRÓN, I.; CHEMES, H. Spermatogenic on set. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. **Int. J. Androl.**, v. 11, p. 235-246, 1988.
- ATTAL, J. ; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v. 3, p. 219-241, 1963.
- ATHAYDE, P. Sofrer faz bem. **Carta na escola**, São Paulo, 18 set. 2007. Disponível em: <http://www.cartanaescola.com.br/edicoes/19/sofrer-faz-bem>. Acesso em: 14/05/2009.
- AUDHYA, T., HOLLANDER, C.S., SCHLESINGER, D.H., HUTCHINSON, B. Structural characterization and localization of corticotropin-releasing factor in testis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.995, p.10-16, 1989
- BALDESSARINI, R. J. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos (depressão e

mania). In: GOODMAN, L. S., (9.ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. México: Mc Graw-Hill Companies, cap. 19, p. 314-334, 1996.

BALON, R. **Flouxetine and sexual dysfunction**. JAMA, v. 273, p. 1489, 1995.

BARDEN, N.; REUL, J.; HOLSBOER, F. Do antidepressants stabilize mood through action on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system? **Trends of Neuroscience**, v. 18, p. 6-11, 1995.

BARDIN, C.W., CHEN, C.C., MORRIS, P.L., GERENDAI, I., BOITANI, C., LIOTTA, A.S., MARGORIS, A., KRIEGER, D.T. Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. **Recent Progress in Hormone Research**, v.43, p.1-28, 1987.

BARDIN, C.W., GUNSALUS, G.L., and CHENG, C.Y. The cell biology of the Sertoli cell. In: DESJARDINS, C., EWING, L.L. **Cell and molecular biology of the testis**. New York: Oxford University Press, 1993. Cap.9, p.189-219..

BASCOM, K.F., OSTERUD, H.L. Quantitative studies of testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. **Anatomical Records**, v.31, p.159-169, 1925.

BENNETT JR., J.P. Drogas para os distúrbios afetivos (do humor). In: BRODY, T.M.;

LARNER, J; MINNEMAN, K.P.; NEU, H.C., (2.ed.). **Farmacologia Humana da Molecular à Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997. Cap.24, p.292-300.

BERENDSEN, H.H.G.; BROEKKAMP, C.L.E. Drug-induced penile erections in rat: indication of serotonin 1B receptor mediation. **European journal of pharmacology**, v.135, p.279-287, 1987.

BERNDTSON, W.E., IGBOELI, G., PARKER, W.G. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v.37, p.60-67, 1987a.

BERNDTSON, W.E., IGBOELI, G., PICKETT, B.W. Relationship of absolute of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. **Journal Animal Science**, v.64, p.241-246, 1987b.

BERNDTSON, W.E., THOMPSON, D.L. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in sprague-dawley rats. **Journal of Andrology**, v.11, p.429-435, 1990.

BORTOLUSSI, M., ZANCHETTA, R., BELVEDERE, P., COLOMBO, L. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotrophin receptors in rat testis from birth to puberty. **Cell and Tissue Research**, v.260, p. 185-191, 1990.

BRILEY, M.; MORET, C. Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. **Clinical Neuropharmacology**, v.16, p.387-400, 1996

BUFALO, A. C. **Antidepressivo *Hypericum perforatum* L. sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos Wistar.** 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Departamento de farmacologia, Universidade Federal do Paraná.

CACCIA, S. Metabolism of the newer antidepressants. An overview of the pharmacological and pharmacokinetic implications. **Clin Pharmacokinet.** 34(4), Apr, p. 281-302. 1998.

CALOGERO, A. E., BAGDY, G.; D'AGATA, R. Mechanism of stress on reproduction. **Annals New York Academy of Science**, v. 814, p. 364-367, 1997.

CAMPOS, M.B.; VITALE, M.L.; CALANDRA, R.S.; CHIOCHIO, S.R. Serotonergic innervation of the rat testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.475-479, 1990.

CANTOR, J. M.; BINIK, Y. M.; PFAUS, J. G. Chronic fluoxetine inhibits sexual behavior in the male rat: reversal with oxytocin. **Psychopharmacology**, v. 144, p. 355-362, 1999.

CHAMBERS, C.D. ANDERSON, P.O.; THOMAS, R.G.; DICK, L.M.; FELIX, R.J.; JOHNSON, K.A. et al. Weight gain in infants breastfed by mothers who take fluoxetine. **Pediatrics**, v. 104, p.e61, 1999.

CHANDRASEKHAR, V., BARTKE, A. The influence of β -endorphin on testicular endocrine function in adult rats. **Biology of Reproduction**, v.47, p.1-5, 1992.

CHEN, C-L.C., MATHER, J.P., MORRIS, P.L., BARDIN, C.V. Expression of pro-opiomelanocortin-like gene in the testis and epididymis. **Proc. Acad. Sci. USA.**, v.81, p.5672-5675. 1984.

CHEN, C-L.C., MADIGAN, M.B. Regulation of testicular proopiomelanocortin gene expression. **Endocrinology**, v.121, p.590-596, 1987.

CHOPIN, P.; MORET, C.; BRILEY, M. Neuropharmacology of 5-Hydroxytryptamine_{1B/1D} Receptor Ligands. **Pharmac. Ther.**, v.62, p.385, 1994

CHROUSOS, G.P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. **Annals New York Academy of Science**, v. 581, p. 311-335, 1998.

CICERO, T.J., ADAMS, M.L., O'CONNOR, L.H., NOCK, B. In vivo evidence for a direct effect of naloxone on testicular steroidogenesis in male rat. **Endocrinology**, v.125, p.957-963, 1989a.

CICERO, T.J., O'CONNOR, L, NOCK, B., ADAMS, M.L., MILLER, B.T., BELL, R.D., MEYER, E.R. Age-related differences in the sensitivity, on opiate-induced perturbations in reproductive endocrinology in the developing and adult male rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.248, p.256-261, 1989b.

CLERMONT, Y., PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **American Journal of Anatomy**. v.100, p.241-267, 1957.

COOPER, P.J.; MURRAY, L. **Postnatal depression.** **BMJ**, v.316, p.1884-1886, 1998.

COOKE, P.S., HESS, R.A., KIRBY, J.D., BUNICK,D., HARDY, M.P. Neonatal propylthiouracil treatment as a model system for studying factors controlling testis growth and sperm production. In: ANDRZEJ BARTKE. **Function of somatic cells in the testis**. Norwell: Springer-Verlag, 1994. Cap.26, p.400-406.

CURTIS, S.K., AMANN, R.P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal Animal Science**, v.53, p.1645-1657, 1981.

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Further evidence for an inhibitory effect of L-tryptophan loading on testicular functions of rat. **Andrologia**, v.18, p.618-623, 1986.

DAS, T. K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N. M. Effect of intraventricular injection of 5, 6 - dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in rat. **Journal of Endocrinology**, v. 106, p. 395-400, 1985.

DAS, T. K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N. M. Spermatogenesis in rat: effect of L-tryptophan loading. **Andrologia**, v. 14, p. 242-249, 1982.

DAVIDOFF, M.S.; SCHULZE, W.; MIDDENDORFF, R.; HOLSTEIN, A.-F. The Leydig cell of human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. **Cell Tissue Research**, v.271, p.429-439, 1993.

DINAN, T. G. Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. **Life Science**, v. 58, p. 1683-1694, 1996.

DUFAU, M.L., TIJANERO, J.C., FABBRI, A. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. **Faseb Journal**, v.7, p.299-307, 1993.

EAP, C.B.; BAUMANN, P. Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients. **Journal of Chromatography B**, v.686, p.51-63, 1996.

ELLIS, L.C.; JAUSSE, A.W.; BAPTISTA, M.W.; URRY, R.L. Correlation of age changes in monoamine oxidase activity and androgen synthesis by rat testicular minced and teased preparation in vitro. **Endocrinology**, v.90, p.1610-1618, 1972.

EPPERSON, C.N.; JATLOW, P.I.; CZARKOWSKI, K.; ANDERSON, G.M. Maternal fluoxetine treatment in the postpartum period: effects on platelet serotonin and plasma drug levels in breastfeeding mother-infant pairs. **Pediatrics**, v.112, n.5, p. e425-e429, 2006.

ESKELAND, N.L., LUGO, D.I., PINTAR, J.E., SCHACHTER, B.S. Stimulation of β -endorphin secretion by corticotropin-releasing factor in primary rat Leydig cell cultures. **Endocrinology**, v.124, p.2914-2919, 1989.

FABBRI, A., TIJANERO, J.C., DUFAU, M.L. Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cell and has a major local anti-reproductive role in the testis. **Endocrinology**, v.127, p.1541-1543, 1990.

FABBRI, A., DUFAU, M.L. Hormonal regulation of β -endorphin in the testis. **Journal Steroid Biochemistry**, v.30, p.347-352, 1988.

FAWCETT, D.W., NEAVES, W.B., FLORES, M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v.9, p.500-532, 1973.

FELDMAN, R.S.; QUENZER, L.R. Serotonin. In: **Fundamentals of neuropsychopharmacology**. Sinauer, 1984.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Ed. Madrid: Churchill Comuications Europe España, cap. 16, p. 198-219, 1998.

FRANÇA, L.R., SILVA JR., V.A., CHIARINI-GARCIA, H., KOPROWSKY, S.G., DEBELJUK, L. Histometric evaluation of the testis and testosterone and FSH levels in Piau boars, during testis development. In: Testis Workshop, XV, 1999, Louisville. **The testis: from stem cell to sperm function**. Norwell: Serono Symposia USA,,1999. p.41(I-30).

FRUNGIERI, M.B.; GONZALEZ-CALVAR, S.I.; RUBIO, M.; OZU, M.; LUSTIG, L.; CALANDRA, R.S. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. **Neuroendocrinology**, v. 69, p. 299-308, 1999.

GARERI, P.; FALCONI, U.; DE FAZIO, P.; DE SARRO, G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. **Progress in Neurobiology**, v.61, p.353-396, 2000.

GARERI, P.; STILO, G.; BEVACQUA, I.; MATTACE, R.; FERRERI, G.; DE SARRO, G. Antidepressant drugs in the elderly. **Gen. Pharmac.**, v.30, p.465-475, 1998.

GAWIENOWKI, A.M., MERKER, J.W., DAMON Jr.,R.A. Alteration of sexual behavior and sex accessory glands by p-chlorophenylalanine and testosterone. **Life Science**, v.12, p. 307-315, 1973.

GODINHO, C.L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros**. Belo Horizonte: UFMG, ICB, 1999. 74p. (dissertação, mestrado).

GONDOS, B.; BERNDSTON, R. H. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. **The sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press. cap. 4, p. 115-154, 1993.

GRAHAME-SMITH, D.G. Tryptophan hydroxylation in brain. **Biochemistry Biophysic Research Communication**, v.16, p.586, 1964.

GRISWOLD, M.D. Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. Cap. 23, p.493-508.

HADDJERI, N.; DE MONTIGNY, C.; CURET, O.; BLIER, P. Effect of the reversible monoamine oxidase-A inhibitor befloxatone on the rat 5-hydroxytryptamine neurotransmission. **Eur J Pharmacol**, v.19, n.343(2-3), p.179-192, 1998.

HAMON, M.; EMERIT, M. B. Les facteurs chimiques impliqués dans la différenciation neuronale. In: RELIER, J.P.; LAULNGER, J.; SALLE, B.L. **Médecine Périnatale (foetus et nouveau-né)**. Paris: Médecine-Sciences. Flammarion, 1989. p.194-200.

HIEMKE, C; HÄRTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacol Ther**. v.85, p.11-28, 2000.

HEDGER, M. P.; KHATAB, S.; GONZALES, G.; DE KRETZER, D. M. Acute and short-term action of serotonin administration on the pituitary-testicular axis in the adult rat. **Reproduction fertility development**, v. 7, p. 1101-1109, 1995.

HEIKKINEN, T.; EKBLAD, U.; PALO, P.; LAINE, K. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. **Clin. Pharmacol. Therap.** v.71, n. 4, p. 330-337, 2003.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. **Farmacologia Ilustrada**. Ed. Artmed: Porto Alegre, 1998, p.478.

HENDRICK, V.; STOWE, Z.N.; ALTSHULER, L.L.; MINTZ, J.; HWANG, S.; HOSTETTER, A.; et al. Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. **Biol. Psychiatry**, v. 50, p.775-782, 2001.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T.; COUROT, M. Sertoli cell and development of seminiferous epithelium. **Ann. Biol. Anim. Biophys.** v. 18, n. 2 B, p. 573-583, 1978.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T., MONET-KUNTZ, C., COUROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in ram and bulls. **Journal Reproduction and Fertility (Supplement)**, v.34, p.101-114, 1987.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; PERREAU, C.; PISSELET, C.; LOCATELLI, A.; BOSC, M. Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. **Journal Reproduction and Fertility**, v.103, p.41-46, 1995.

HOLSBOER, F.; BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 187-205, 1996.

HYTTEL, J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). **International Clinical Psychopharmacology**, v. 9, suppl.1, p.19-26, 1994.

JOHNSON, L., THOMPSON, D.L. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. **Biology of Reproduction**, v.29, p.777-

JOHNSON, L., CARTER, G.K., VARNER, D.D., TAYLOR, T.S., BLANCHARD, T.L., REMBERT, M.S. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.315-321. 1994.

JOYCE, K.L., PORCELLI, J., COOKE, P.S. Neonatal goitrogen treatment increased adult testis size and sperm production in the mouse. **Journal of Andrology**, v.14, p. 448 - 455, 1993.

KALLA, N.R. Demonstration of direct effect of serotonin on rat Leydig cell. **Andrologia**, v.11, p. 259-262, 1979.

KARL, J., CAPEL, B. Sertoli cells of mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**, v.203, p.323-333, 1998

KIM, J.; RIGGS, K.W.; MISRI, S.; KENT, N.; OBERLANDER, T.F.; GRUNAU, R.E.; FITZGERALD, C.; RURAK, D.W. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. **British J. Clin Pharmacol.**, v.62, p.155-163, 2005.

KNOL, B. W. Stress and endocrine hypothalamus-pituitary-testis system: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 13, p. 104-114, 1991.

KOPS, S.K.; THEOHARIDES, T.C.; CRONIN, C.T., KASHGARIAN, M.G.; ASKENASE, P.W. Ultrastructural characteristics of rat peritoneal mast cells undergoing differential release of serotonin without histamine and without degranulation. **Cell and tissue research**, v.262, p.415-424. 1990.

KRISTENSEN, J.H., ILETT, K.F.; HACKTETT, L.P.; YAPP, P.; PAICH, M.; BEGG, E.J. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine concentrations in human milk. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 48, p. 521-527, 1999.

LABBATE, L. A.; GRIMES, J. B.; ARANA, G. W. Serotonin reuptake antidepressant effects on sexual function in patients with anxiety disorders. **Biology Psychiatry**, v. 43, p. 904-907, 1998.

LARSSON, C. SYDSJÖ, G.; JOSEFSSON, A. Health, sociodemographic data, and pregnancy outcome in women with antepartum depressive symptoms. **Obstet. Gynecol.** v.104, p.459-466, 2004.

LESAGE, J.; BERNET, F.; MONTEL, V.; DUPOUY, J. P. Hypothalamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and gonadal and adrenal activities, during the early postnatal period in the rat. **Neurochem. Res.**, v. 21, p. 87-96, 1996.

LEVIT, P.; HARVEY, J. A.; FRICOLMAN, E.; SIMANSKY, K.; MURPHY, E. H. New evidence of neurotransmitter influences on brain development. **Trends Neurosci.** v.20, p.269-274, 1997.

LI, Q; LEVY, A. D., CABRERA, T. M.; BROWNFIELD, M. S.; BATTAGLIA, G.; VAN DE KAR, L. D. Long-term fluoxetine, but not desipramine, inhibits the ACTH and oxytocin res-

ponses to the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, in male rats. **Brain Research**, v. 630, p. 148-156, 1993.

MADEO, B.; BETTICA, P.; MILLER, S.; BALESTRIERI, A.; GRANATA, A.R.; CARANI, C.; ROCHIRA, V. The effects of citalopram and fluoxetine on sexual behavior in healthy men: evidence of delayed ejaculation and unaffected sexual desire. A randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy, parallel group study. **J Sex Med**, v.5, p.2431-2441, 2008.

MAGALHÃES, C.P.; LIMA, L.O.; SILVA, M.C.; MARINHO, S.M.O.C.; NASCIMENTO, E.; SILVA, C.M.; SOUZA, S.L.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Efeitos do tratamento neonatal com inibidor seletivo de recaptura da 5-HT sobre o desenvolvimento anatômico crânio-encefálico. **Arq Neuropsiquiatr.**, v.64, p.990-993, 2006.

MARGORIS, A.N., KOUKOULIS, G., GRINO, M., CHROUSOS, G.P. In vitro-perfused rat testes secrete β -endorphin and dynorphin: their effect on testosterone secretion. **Biology of Reproduction**, .40, p.776-784, 1989.

MATUSZCYK, J. V.; LARSSON, K.; ERIKSSON, E. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, p. 527-532, 1998.

MEACHEM, S.J., MCLACHLAN, R.I., DE KRETZER, D.M., ROBERTSON, D.M., WREFORD, N.G. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. **Biology of Reproduction**, v.54, p.36-44, 1996.

MERCHANT-LARIOS, H., MORENO-MENDOZA, N. Mesonephric stromal differentiate into Leydig cell in the mouse fetal testis. **Experimental Cell Research**, v.244, p.230-238, 1998.

MÖSSNER, R; LESCH, K-P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. **Brain, Behav. Immu.**, v.12, p.249-271, 1998.

MORIN, L. P. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. In: The finnish medical society duodecim, **ann med**, p.12-33, 1999

MORRISON JL, RIGGS KW, RURAK DW. Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. **Reprod Fertil Dev**. 2005;17(6):641-50.

MURRAY, M.J.; HOOBERMAN, D. Fluoxetine and prolonged erection. **American journal of psychiatry**, v.150, p.167-168, 1993.

NAUMENKO, E. V.; SHISHKINA, G. T. Role of serotonin in feedback control of hypothalamic-pituitary-testicular complex in male rat. **Neuroendocrinology**, v. 26, p. 359-366, 1978.

NONACS, R.; COHEN, L.S. Depression during pregnancy: diagnosis and treatment options. **J. Clin Psychiatry**, v.63, Suppl. 7, p.24-30, 2002

ORTH, J.M., BOEHM, R. Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cells by a pertussis toxin-sensitive mechanism. **Anatomical Record**, v.226, p.320-327, 1990.

ORTH, J. M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing L.L. (Eds), **Cell and Molecular Biology of the Testis**, 1st ed, New York: Oxford University Press, p. 3-42, 1993.

ORTH, J. M. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, v. 203, p. 485-492, 1982.

ORTH, J. M. The role of follicle stimulating in controlling sertoli cell proliferation in testis of fetal rats. **Endocrinology**, v. 115, p. 1248-1255, 1984.

ORTH, J.M. FSH-induced Sertoli cell proliferation in the development rat is modified by β -endorphin produced in the testis. **Endocrinology**, v.119, p.1876-1878. 1986.

ORTH, J.M., HIGGINBOTHAM, C., SALISBURY, R. Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of 3H-thymidine by Sertoli cells in testis of immature rats. **Biology of Reproduction**, v.30, p. 263-270, 1984.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from sertoli cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 787-794, 1988.

ORTH, J.M., JESTER, W.F. NCAM mediates adhesion between gonocytes and Sertoli cells in cocultures from testes of neonatal rats. **Journal of Andrology**, v.16, p. 389-399, 1995.

PAULA, T.A.R. **Análise histométrica e funcional dos testículos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas**. Belo Horizonte: UFMG, ICB, 1999. p.84 (tese, doutorado).

PELLINIEMI, L.J., FRÖJDMAN, K., PARANKO, J. Embryological and prenatal development and function of Sertoli cell. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. (Eds.). **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. Cap.3, p.87-113.

PEREIRA, J. D.; CARICATI-NETO, A.; JURKIEWICZ, A.; JURKIEWICZ, N. Decreased noradrenergic and serotonergic reactivity of vas deferens of newborn rats from mothers treated with the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine during pregnancy and breast-feeding. **Life Sciences** 81 (2007) 1501–1508.

PERRY, K. W.; FULLER, R. W. Fluoxetine increases norepinephrine release in rat hypothalamus as measured by tissue levels of MHPG-SO₄ and microdialysis in conscious rats. **Journal of neural transmission**, v. 104, p. 953-966, 1997.

PINTAR, J.E., SCHACHTER, B.S., HERMAN, A.B., DURGERIAN, S., KRIEGER, D.T. Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in adult rat testis. **Science**, v.225, p.632-634, 1984.

POCCIA, D. Molecules of the somatic cells. In: POCCIA, D. **Molecular biology intelligence**

unit; molecular aspects of spermatogenesis. Austin: R.G.Landes Company, 1994.Cap.4, p.75-90.

POHLAND, R.C.; BYRD, T.K.; HAMILTON, M.; KOONS, J.R. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* Apr;98(2):198-205. 1989.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.703.

RÉNYI, L. The effect of selective 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors on 5-methoxy-N,M-dimethyltryptamine-induced ejaculation in the rat. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 87, p. 639-648, 1986.

ROCHA, D. M. C.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L. R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult wistar rats. **Tissue e Cell**, v. 31, p. 372-379, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E.C. **The process of spermatogenesis in animals.** Cambridge: Academic Press, 1977. 123p.

RUSSELL, L.D. Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell.** Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. Cap.1, p. 1-38.

RUSSELL, L.D., BARTKE, A., GOH, J.C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. **The American Journal of Anatomy**, v.184, p.179-189, 1989.

RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis.** Bolesta: Cache River Press. Cap. 1, p. 1-40, 1990.

RUSSELL, L.D., GRISWOLD, MD. **The Sertoli Cell.** Clearwater: Cache River Press, (1993).801p.

SANDERS-BUSH, E.; MAYER, S.E. Agonistas e antagonistas dos receptores da 5-hidroxitriptamina (serotonina). In: GOODMAN, L.S., (9.ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica.** México: Mc Graw-Hill Companies, 1996. cap.11, p. 183-194.

SANDERS-BUSH, E.; MARTIN, L. **Storage and release of serotonin.** OSBORNE,N.N. (Eds) 1982

SANDERS-BUSH, E.; MAYER, S.E. 5-Hydroxytryptamine (Serotonin): Receptor agonists and antagonists. In:**The pharmacological basis of therapeutics.** Ed. New York: MacGraw-Hill,2001, cap.11, p.269-290.

SEGAL, S; SADOVSKY, E.; PALTI, Z.; PFEIFER, Y.; POLISHUK, W. Serotonin and 5-

hydroxyindoleacetic acid in fertile and subfertile men. **Fertility and Sterility**, v.26, p.314-316, 1975.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. **Reproduction in Domestic Animals**. 4th Ed. San Diego: Academic Press, Inc.,1991. cap. 6, pp. 221-250.

SHAHA, C., LIOTTA, A.S., KRIEGER, D.T., BARDIN, C.W. Ontogeny of immunoreactive β -endorphin in fetal, neonatal, and pubertal testes from mouse and hamster. **Endocrinology**, v. 114, p.1584-1591. 1984

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E, Neill, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**, ed.2, New York: Raven Press, 1994. v.1, cap 22, p.1363-1434.

SHARPE, B., PEKARY, E.A., MEYER, N.V., HERSHMAN, J.M. β -endorphin in male rat reproductive organs. **Biochemical and biophysical research communications**, v.95, p.618-623, 1980

SHISHKINA, G.T.; BORODIN, M.P. **Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in males rats**. *Neuroscience Behavior Physiology*, v. **19**, p. **145-149**, **1989**.

SHU-DONG, T., PHILLIPS, D.M., BARDIN, C.W., HALMI, N., LIOTTA, A.S., MARGIORIS, A., KRIEGER, D.T. ACTH and β -endophin-relates peptides are present in multiple sites in reproductive tract of the rat. **Endocrinology**, v.110, p.2204-2206, 1982a.

SHU-DONG, T., PHILLIPS, D.M., HALMI, N.,KRIEGER, D., BARDIN, C.W. β -Endorphin is present in the male reproductive tract of five species. **Biology of Reproduction**, v.27, p.755-764, 1982b.

SIMON, G.E.; CUNNINGHAM, M.L.; DAVIS, L.R. Outcomes of prenatal antidepressant exposure. **Am. J. Psychiatry**. v.159, p. 2055-2061, 2002.

SINGH, J.,HANDELSMAN, D.J. Neonatal administration of FSH increase Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. **Journal of Endocrinology**, v.151, p.37-48, 1996

STEINBERG, A, STEINBERG, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. **Biology of Reproduction**, v.4, p.84-87, 1971.

SZELE, F.G.; MURPHY, D.L.; GARRICK, N.A. Effects of fenfluramine, M-chlorophenylpiperazine, and other serotonin agonist and antagonist on penile erections in nonhuman primates. **Life science**, v.43, p.1297-1303, 1988.

TINAJERO, J.C.; FABBRI, A.; DUFAU, L. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. **Endocrinology**, v.130, p.1780-1788, 1992.

TINAJERO, J.C.; FABBRI, A.; DUFAU, L. Serotonergic inhibition of rat Leydig cell function by propranolol. **Endocrinology**, v.133, p.257-264, 1993.

TORRES, G.; HOROWITZ, J. M.; LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Fluoxetine induces the transcription of genes encoding *c-fos*, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain. **Neuroscience**, v. 87, p. 463-477, 1998.

ULISSE, S.; JANNINI, E.A.; CAROSA, E.; PIERSANTI, D.; GRAZIANO, F.M.; D'ARMIENTO, M. Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. **Journal of Endocrinology**, vol. 140, pag. 431-436, 1994.

URRY, R. L.; DOUGHERTY, M. S. Inhibition of rat spermatogenesis and seminiferous tubule growth after short-term and long-term administration of a monoamine oxidase inhibitor. **Fertility and Sterility**, v. 26, p. 232-238, 1975.

VAN HASTER, H.L., DE JONG, F.H., DOCTER, R., DE ROOIJ, D.G. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v.131, p. 1574 - 1576, 1992.

VAN VORSTENBOSCH, C.J.A.H.V.; SPEK, E.; COLENBRANDER, B.; WENSING, C.J.G. The ultrastructure of normal fetal and neonatal pig testis germ cells and the influence of fetal decapitation on germ cell development. **Development**, v.99, p. 553-563, 1987.

VERBEUREN, T.J. Synthesis, storage, release, and metabolism of 5-hydroxytryptamine. In: Fozard, J.R.(ed) **The peripheral action of 5-hydroxytryptamine**. Oxford University Press, Oxford,p.1-25, 1989

VERGOUWEN, R.P., JACOBS, S.G.P.M., HUISKAMP, R., DAVIDS, J.A., DE ROOIJ, D.G. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, p. 233-243, 1991.

WALDINGER, M. D.; OLIVIER, B. Selective serotonin reuptake inhibitor-induced sexual dysfunction: clinical and research considerations. **International Clinical of Psychopharmacology**, v. 12, suppl. 6, p. S27-33, 1998.

WHITAKER-AZMITIA, P.M.; AZMITIA, E.C. Astroglial 5-HT_{1A} receptors and S-100 in development and plasticity. **Persp. Dev. Neurobiol.**, v.2, n.3, p.233-38, 1994.

YEGHIAYAN, S.K.; ANDERSEN, S.L.; BALDESSARINI, R.J. Lack of effect of chronic clorgyline or selegiline on dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen or nucleus accumbens. **Neuroscience Letters**, v.236, p.147-150, 1997.

YOON, D.J., SKLAR, C., DAVID, R. Presence of corticotropin-releasing factor in rat testis. **Endocrinology**, v.122, p.759-761, 1988.

ZIFA, E; FILLION,G. 5-hydroxytryptamine receptors. **A review J. Pharm Pharmacol.** V. 44, p. 401-408, 1992.

Intervenção farmacológica neonatal sobre sistema serotoninérgico utilizando cloridrato de fluoxetina: repercussão sobre parâmetros produtivos e celulares no testículo de ratos Wistar adultos

MONTEIRO FILHO, W.O.; PINTO, C.F.; DE TORRES, S.M.; MANHÃES-DE-CASTRO, R;
SILVA JÚNIOR, V.A.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

Autor para correspondência:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Área de Histologia

E-mail: valdemiroamaro@bol.com.br

Fone (081) 33206390 / (081) 99898246

RESUMO

Neste trabalho, o sistema serotoninérgico em ratos Wistar neonatos foi manipulado através de um inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS), a fluoxetina, com o propósito de observar a repercussão sobre parâmetros testiculares em animais adultos. Trinta animais foram distribuídos de acordo com os tratamentos: controle (n=6), tratados com 1mg/kg (n=6), 5mg/kg (n=6), 10mg/kg (n=6) e 20mg/kg (n=6) de fluoxetina (IP). Aos 150 dias, os animais foram anestesiados e perfundidos intracardiacamente com solução fixadora. Os testículos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato. Cortes histológicos de 4µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados histometricamente. A manipulação neonatal do sistema serotoninérgico com fluoxetina reduziu o peso testicular bruto e líquido, volume de túbulos e epitélio seminíferos. O diâmetro tubular foi reduzido nos animais tratados com 20mg/Kg o que gerou aumento no comprimento total de túbulos seminíferos neste grupo. Não foram observadas alterações morfométricas na população de células de Sertoli, produção espermática diária e eficiência do processo espermatogênico. Concluiu-se que a intervenção farmacológica neonatal sobre o sistema serotoninérgico não interferiu nos parâmetros morfométricos produtivos do testículo de ratos adultos.

Palavras-chave: Rato, testículo, células de Sertoli, produção espermática, fluoxetina.

ABSTRACT

In this work, the serotonergic system in newborn Wistar rats was manipulated by serotonin re-uptake selective inhibitor (SRSI), fluoxetine, with purpose of observe the repercussion on testicular parameters in adults animals. Thirty animals were distributed according to treatment: control (n=6), treated with 1mg/kg (n=6), 5mg/kg (n=6), 10mg/kg (n=6) e 20mg/kg (n=6) of the fluoxetine (IP). Around to 150 days, the animals were anesthetized and infused intra-cardiac with fixative solution. Testis were routinely processed for inclusion in plastic resin (metacrilato glicol). Histological sections with 4µm of the weight were stained by toluidina blue/sodium borate 1% and analyzed histometrically. The manipulation of serotonergic system with fluoxetine reduced the crude and liquid testicular weight, epithelium and seminiferous tubule volume. Tubular diameter was reduced in animals treated with 20mg/Kg this fact generated increase in the seminiferous total length in this group. Morphometrical alterations in Sertoli cell population, daily sperm production and spermatogenic process efficiency not were observed in this work. In conclusion, neonatal pharmacological intervention on serotonergic system do not interfered in the testicular morphometrical productive parameters in adults rats.

Key-words: Rat, testis, Sertoli cell, sperm production, fluoxetine.

Introdução

Durante os últimos anos tem sido crescente o interesse sobre os efeitos colaterais produzidos pela utilização de drogas que atuam sobre neurotransmissores cerebrais como a serotonina, dopamina e noradrenalina. Esses efeitos colaterais podem ser estudados depois de repetidas ou agudas administrações das drogas através de inúmeras metodologias. Ligação do neurotransmissor ao receptor, ativação da cinética enzimática, renovação e reutilização dos neurotransmissores e mudanças no comportamento representam algumas das metodologias básicas envolvidas na mensuração destes efeitos. A avaliação do perfil dos efeitos colaterais induzidos por antidepressivos e drogas neurolépticas é de particular interesse, uma vez que tais avaliações podem dar importantes informações sob ação terapêutica destas drogas (Rényi, 1986).

Os inibidores da recaptção seletiva da serotonina (SSRIs) são os antidepressivos mais freqüentemente prescritos para o tratamento da depressão (Baldessarini, 1996). O principal efeito colateral observado nas terapias antidepressivas utilizando os SSRIs relaciona-se com disfunções sexuais (Balon, 1995; Waldinger e Oliver, 1998., Labbate et al., 1998).

De acordo com Matuszcyk et al. (1998), ratos tratados com doses sub-crônicas de fluoxetina apresentam redução significativa na motivação sexual e um aumento na latência ejaculatória. Segundo Cantor et al. (1999), ratos tratados com doses crônicas de fluoxetina tiveram respostas ejaculatórias diminuídas, porém esse efeito colateral foi atenuado através da

administração de oxitocina. Em humanos as funções sexuais primárias afetadas pelo uso de antidepressivos SSRIs, acima de 3 meses, são o orgasmo e a ereção (Rosen et al., 1999).

Inúmeros estudos dão suporte ao papel estimulador exercido pela fluoxetina sobre o eixo HPA. A administração aguda da fluoxetina e outros antidepressivos a ratos estimulou a secreção de ACTH pela hipófise e de corticosterona pela adrenal (o glicocorticóide primário em roedores) em proporção dose-dependente (Aarmario e Garcia-Marquez, 1987; Li et al., 1993; Dinan, 1996). Dando consistência aos achados citados anteriormente, a fluoxetina aumentou o conteúdo de CRH (Hormônio liberador de corticotrofina) no sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, reforçando a hipótese de que este antidepressivo, em particular, afeta toda a árvore límbica do eixo HPA (Hipotálamo-Hipófise-Adrenal) (Barden et al., 1995; Holsboer e Barden, 1996). Segundo Torres et al. (1998) a fluoxetina desencadeia a transcrição de genes *c-fos*, CRH e o seu receptor CRH₁ em várias regiões do cérebro, particularmente no núcleo paraventricular do hipotálamo, o que corrobora os achados de Aarmario e Garcia-Marquez (1987), Li et al. (1993), Dinan (1996), Barden et al. (1995), Holsboer e Barden (1996). Além do aumento do conteúdo de CRH hipotalâmico, Perry e Fuller (1997) detectaram através da injeção sistêmica, que a fluoxetina foi capaz de induzir a liberação de noradrenalina no hipotálamo de ratos.

De maneira geral a utilização de antidepressivos sejam eles inibidores da MAO, tricíclicos ou SSRIs podem produzir supressão do eixo reprodutivo (Urry e Dougherty, 1975; Perry e Fuller, 1997; Torres et al., 1998; Labbate et al., 1998). Esta supressão ocorre pela ativação simultânea do eixo HPA e do sistema simpático-adrenomedular através dos produtos liberados por estes dois sistemas (Knol, 1991; Chrousos, 1998, Calogero et al., 1997). Os fatores mais importantes envolvidos são o CRH, peptídeos opióides endógenos (EOP), catecolaminas e glicocorticóides.

Apesar do vasto conhecimento sobre a ação dessas aminas biogênicas (serotonina e noradrenalina) no controle das funções reprodutivas do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e diretamente na função testicular em ratos maturos sexualmente (Urry e Dougherty, 1975; Naumenko e Shishkina, 1978; Das et al., 1982, 1985; Hedger et al., 1995), e dos efeitos colaterais dos antidepressivos tricíclicos (Baldessarini, 1996), até o presente momento, nenhum estudo mais pormenorizado sobre a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico durante o período crítico do desenvolvimento testicular em ratos neonatos e os seus reflexos no processo espermatogênico em ratos maturos sexualmente foi realizado.

De acordo com Lesage et al. (1996), ratos neonatos machos apresentam uma ativação do eixo HPA e HPG (Hipotálamo-hipófise-gônada) os quais podem estar temporalmente

relacionados com o aumento do metabolismo intra-hipotalâmico da serotonina, noradrenalina e do NPY (neuropeptídeo Y). O funcionamento do eixo HPG em ratos neonatos é determinante para mitose das células de Sertoli e estabelecimento da produção espermática normal em indivíduos adultos (Rocha et al., 1999).

Evidências farmacológicas demonstraram que a elevação cerebral no níveis de 5-HT afeta a secreção de FSH (hormônio folículo estimulante) e (LH) hormônio luteinizante, por inibir a liberação de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina) no hipotálamo, com subsequentes efeitos sobre o processo espermatogênico e esteroidogênese em ratos adultos (Naumenko e Shishkina, 1978; Urry e Dougherty, 1975; Das et al., 1982; Das et al., 1985).

Em ratos neonatos, níveis adequados de FSH são cruciais para o estabelecimento da população de células de Sertoli, a qual esta diretamente relacionada com o tamanho do testículo e a produção espermática (França et al., 2000).

Os efeitos provocados pela manipulação do sistema serotoninérgico durante o período neonatal sobre o desenvolvimento testicular, levando-se em consideração todos os dados acima, as inter-relações serotonina-antidepressivos e o sistema reprodutor e a larga escala em que estas drogas estão sendo utilizadas atualmente, carecem de melhores investigações. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico através do inibidor seletivo da recaptura de serotonina, o cloridrato de fluoxetina, durante o período crítico do desenvolvimento testicular e suas conseqüências sobre a função testicular de ratos maduros sexualmente.

Animais, manipulações farmacológicas e desenho experimental.

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), mantidos em ciclo claro/escuro de 12h com controle de umidade (50%) e temperatura (22°C), obtidos do biotério do DMFA / UFRPE. A partir da previsão de partos, os ratos neonatos foram escolhidos aleatoriamente para composição dos seguintes grupos: I) grupo tratado com 1mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (6 ratos); II) grupo tratado com 5 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (6 ratos); III) grupo tratado com 10 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (6 ratos); IV) grupo tratado com 20 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (6 ratos); V) grupo controle (6 ratos).

Os animais dos grupos tratados receberam doses de cloridrato de fluoxetina por quilo de peso corporal por via intraperitoneal (Nowakowska et al., 1997; Matuszcyk et al., 1998; Gandarias et al., 1999; Frank et al., 2000). Os tratamentos foram iniciados com 1 dia de idade e finalizados aos 21 dias de idade dos ratos. O grupo controle recebeu, no mesmo período, somente a solução veículo (água deionizada estéril) utilizada para a diluição do cloridrato de fluoxetina.

Os animais dos grupos de tratamento permaneceram com as mães em caixas individuais até 21 dias após o nascimento. Após o desmame cada grupo foi dividido em lotes de cinco animais por caixa e receberam ração peletizada, com níveis nutricionais adequados e água *ad libitum* até o final do experimento.

A pesagem dos animais foi feita diariamente durante os primeiros 21 dias do experimento, para acompanhamento da curva de crescimento corporal e para cálculo diário das doses dos antidepressivos.

Perfusão tecidual e processamento histológico.

Aos 150 dias de idade, os ratos de cada grupo foram anestesiados, por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50mg/kg), heparinizados (125UI/100g de peso corporal) e submetidos à perfusão intracardiaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9% acrescida de heparina sódica (500 UI/litro) por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Após a lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4 durante 5 a 10 minutos. Os testículos e epidídimos foram removidos, pesados em balança digital modelo Kern 410 com precisão de quatro de casas decimais. Os testículos foram utilizados para as análises microscópicas. Após as mensurações os mesmos foram seccionados em fragmentos com até 2mm de espessura e re-fixados em glutaraldeído a 4%, em tampão fosfato (0,01M - pH 7,4), por duas horas, a 5° C. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato. Foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura em micrótomo rotativo de lâmina de vidro, corados em azul de toluidina/borato de sódio e analisados em microscópio Zeiss binocular modelo Axiostar.

A análise histométrica dos testículos, determinação do número de células de Sertoli e o cálculo da produção espermática diária estimada através da histologia quantitativa dos testículos foram executadas de acordo com metodologia descrita por Silva Junior et al. (2006) e Moraes et al. (2009).

Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo

As proporções volumétricas dos constituintes do parênquima testicular foram estimadas a partir 6615 pontos por animal, utilizando-se retículo com 441 intersecções

(pontos), em aumento de 400x. Uma vez que o testículo pode ser dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lume; enquanto no segundo foram investigados as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea e do mediastino testicular. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04); França (1992), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. O peso líquido do testículo em ratos foi determinado pela redução de 6,5% do peso bruto referente ao somatório do percentual de peso da albugínea e mediastino alocados ao testículo (França e Russell, 1995).

Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas utilizando-se régua micrométrica Olympus adaptada a uma das oculares de 10x, em aumento de 100x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurado a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo expresso em metros foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (Attal e Courot, 1963; Dorst e Sajonski, 1974):

$$CT = \frac{VTS}{\pi R^2}$$

VTS = Volume total de túbulos seminíferos;

πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2)

Contagem da população de células de Sertoli e da linhagem germinativa por secção transversal de túbulos seminíferos

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio VII do ciclo, classificado de acordo com o método acrossômico Russel et al. (1990) foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas no mínimo 10 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados: espermatócitos I, na fase de preleptóteno/ leptóteno (SPT I Pl/L); espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P); espermátides arredondadas (SPD Ar); nucléolo de células de Sertoli.

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM^2}{2}\right) - \left(\frac{DM^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nuclear médio (D.M.) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de uma régua micrométrica Olympus adaptada a uma das oculares de 10x e acoplada à objetiva de 100x, propiciando um aumento final de 1000x. No caso das espermatogônias do tipo A que apresentam núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico, em virtude disto, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente. Com a finalidade de avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli nos animais tratados e controle, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e entre estes números e o número de células de Sertoli no estágio VII ciclo. As seguintes razões foram obtidas: espermátides arredondadas/ nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se o índice de célula de Sertoli que mede a eficiência desta célula; número total corrigido de células germinativas/ nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se a capacidade total de suporte da célula de Sertoli.

A estimativa do número de células de Sertoli por testículo foi realizada a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII e comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de Reviere e Lincoln (1978):

$$\text{Número CS / Testículo} = \frac{\text{Comp. Tot. Tub. Sem.} \times \text{Num. Cor. Nucl. CS / Sec. Transv.}}{\text{Espessura do Corte}}$$

Onde, Número CS Testículo = Número de células de Sertoli por testículo; Comp. Tot. Tub. Sem. = Comprimento total de túbulos Seminíferos (μm); Num. Cor. Nucl. CS Sec. Transv. = Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal; Espessura do corte (μm). A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Jr. et al. (2006):

$$\text{PED} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Total CS Testículo} \times \text{N}^\circ \text{ AR} \times \text{Freq. R el. Est. VII}}{\text{Duração do Estágio VII}}$$

Onde, PED = produção espermática diária; N° Total CS Testículo = Número total de células de Sertoli por testículo; N° AR = Número de espermátides arredondas no estágio VII; Freq. Rel. Est. VII = frequência relativa do estágio VII; Duração do estágio (dias).

Análise Estatística

Dependendo da tendência normal dos resultados obtidos, utilizou-se testes paramétricos ou não paramétricos. Para os dados considerados normais foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações, visando analisar quais grupos diferiram entre si. Caso os dados não seguissem uma tendência normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn. Em todas as análises realizadas, os dados foram expressos através de estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

No presente experimento não se observou diferença significativa no peso corporal final entre os grupos controle e tratados com diferentes doses de cloridrato de fluoxetina. Por outro lado, é conveniente salientar que neste experimento a administração do antidepressivo

foi feita nos primeiros 21 dias pós-natal e a avaliação feita aos 150 dias de idade. Silva Junior et al. (2008) observaram redução do peso corporal ao final deste período de tratamento. Estudos anteriores utilizando citalopram e fluoxetina, administrados via subcutânea durante o período citado anteriormente, reduziu a curva de ganho de peso nos animais (Deiró et al., 2004; Mendes da Silva et al., 2002). Este efeito pode ser atribuído à ação inibitória da serotonina sobre a ingesta alimentar (Simansky, 1996), muito embora, tenha sido relatado por Morrison et al., (2005) uma redução na altura das vilosidades intestinais causada pela administração de inibidores seletivos da recaptura de serotonina o que reduziria a absorção de nutrientes. Apesar deste fenômeno de redução de ganho de peso ter sido bem relatado no período crítico de desenvolvimento pós-natal em ratos, a interrupção do tratamento parece influenciado na recuperação do peso dos animais, uma vez que, não se observou diferença nos pesos dos animais no presente experimento.

O peso testicular dos animais tratados durante os primeiros 21 dias pós-natal e avaliados aos 150 dias teve redução significativa de 8%, 10%, 14% e 13% entre os grupos tratados com doses crescentes de fluoxetina (1-20mg/Kg) e o grupo controle. Também foi observado redução de peso testicular nos animais tratados com 10mg/Kg em relação aos submetidos a menor dosagem de fluoxetina (1mg/Kg). De acordo com França e Russell (1998) o peso testicular é um parâmetro morfométrico com correlação direta e positiva com outros parâmetros testiculares como comprimento total de túbulos seminíferos, população de células de Sertoli, produção espermática. É importante salientar também que, o testículo apresenta um rápido crescimento durante o período fetal e neonatal; contudo cada população celular se expande em diferentes fases sob a influência de diferentes fatores sejam eles de origem extra ou intra-testicular. Em ratos, este dois períodos são de grande importância para o estabelecimento do tamanho final do testículo e da produção espermática no adulto (Orth, 1993). A célula de Sertoli apresenta um período proliferativo que se estende desde o momento de diferenciação do testículo na vida embrionária até o estabelecimento da puberdade, na maioria das espécies (Gondos e Berndston, 1993). Portanto, durante este período a população de células de Sertoli é estabelecida e com isso parâmetros como peso testicular, comprimento de túbulos seminíferos e produção espermática no indivíduo adulto (Silva Junior et al., 2006; Silva Junior et al., 2008).

No que diz respeito ao peso epididimário e índice gonadossomático não se constatou diferença estatística, entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal e testicular final e IGS de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de Fluoxetina aos 150 dias de idade (Média \pm desvio padrão).

Parâmetros	GRUPOS EXPERIMENTAIS				
	Controle (n=6)	(1mg/kg) (n=6)	(5mg/kg) (n=6)	(10mg/kg) (n=6)	(20mg/kg) (n=6)
Peso Corporal (g)	397,7 \pm 70,7	387,33 \pm 31,58	388,7 \pm 13,3	351,2 \pm 28,0	388,5 \pm 39,7
Peso Testicular (g)	1,78 \pm 0,11a	1,63 \pm 0,06b	1,60 \pm 0,08bc	1,53 \pm 0,07c	1,55 \pm 0,11bc
Epidídimo(g)	0,63 \pm 0,05	0,62 \pm 0,03	0,63 \pm 0,03	0,60 \pm 0,02	0,63 \pm 0,05
IGS (%)	0,46 \pm 0,09	0,42 \pm 0,03	0,41 \pm 0,01	0,44 \pm 0,05	0,40 \pm 0,03

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na avaliação dos parâmetros volumétricos testiculares foi observada uma redução significativa do peso líquido do testículo, volume testicular de túbulo seminífero nos animais tratados com 5mg, 10mg e 20mg em relação ao grupo controle; e do epitélio seminífero nos animais tratados com 1mg, 5mg e 10mg em relação ao controle. Os demais parâmetros volumétricos do parênquima testicular não sofreram alterações (Tabela 2). O percentual volumétrico de túbulos seminíferos que ocupa o parênquima testicular em ratos é de 89%, o qual está diretamente correlacionado com o peso líquido do testículo, volume de túbulos seminíferos, epitélio seminífero, comprimento total de túbulos seminíferos e produção espermática (Russell e França, 1995; França et al., 2005). No presente trabalho, observou-se que a manipulação neonatal do sistema serotoninérgico no período crítico do desenvolvimento do desenvolvimento testicular alterou o volume dos túbulos seminíferos de maneira mais acentuada nos animais tratados com doses a partir de 5mg/Kg de fluoxetina com redução média deste parâmetro em torno de 13,42%. Estes resultados corroboram os achados de Silva Junior et al. (2008). Os autores citados anteriormente manipularam o sistema serotoninérgico de ratos neonatos durante os primeiros 21 dias pós-natal, utilizando fluoxetina, e analisaram morfometricamente o testículo no 22º dia pós-natal. Os mesmos obtiveram redução significativa do volume de túbulos seminíferos, entretanto, é importante ressaltar que nesta fase do desenvolvimento testicular, em ratos, a população celular que influenciou diretamente esta redução foi a de células de Sertoli.

Tabela 2. Parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de Fluoxetina aos 150 dias de idade. (Média ± desvio padrão).

Parâmetros (ml)	<i>GRUPOS EXPERIMENTAIS</i>				
	Controle	Fluoxetina	Fluoxetina	Fluoxetina	Fluoxetina
	(n=6)	(1mg/kg)	(5mg/kg)	(10mg/kg)	(20mg/kg)
		(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
Peso.Líquido	1,67 ± 0,1a	1,52 ± 0,06b	1,49 ± 0,07b	1,42 ± 0,1b	1,44 ± 0,1b
Túb. Seminífero	1,54 ± 0,12a	1,41 ± 0,06ab	1,35 ± 0,09b	1,31 ± 0,06b	1,34 ± 0,12b
Epit. Seminífero	1,39 ± 0,11a	1,26 ± 0,06b	1,24 ± 0,09b	1,21 ± 0,07b	1,23 ± 0,10ab
Lume	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,05	0,08 ± 0,03
Túnica. Própria	0,039 ± 0,006	0,033 ± 0,009	0,033 ± 0,004	0,029 ± 0,006	0,028 ± 0,007
Leydig	0,024 ± 0,005	0,027 ± 0,006	0,034 ± 0,007	0,025 ± 0,007	0,032 ± 0,006
Cél. Conjuntivo.	0,003 ± 0,003	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,003	0,002 ± 0,002
Vaso Sanguíneo	0,034 ± 0,021	0,045 ± 0,022	0,034 ± 0,012	0,033 ± 0,011	0,025 ± 0,008
Esp. Linfático.	0,066 ± 0,033	0,036 ± 0,020	0,072 ± 0,022	0,049 ± 0,016	0,046 ± 0,016

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No presente experimento contabilizou-se células do estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, presentes em túbulos seminíferos com perfil mais arredondado. Neste estágio estão presentes espermatogônias A, espermátócitos I em fase de pré-leptóteno, espermátócitos I em fase de paquíteno, espermátides arredondadas e espermátides alongadas próximas do lume. A população celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do C.E.S. (ciclo do epitélio seminífero) está contemplada na Tabela 3. De acordo com a avaliação morfométrica não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 3. População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de Fluoxetina aos 150 dias de idade. (Média ± desvio padrão)

Parâmetros	<i>GRUPOS EXPERIMENTAIS</i>				
	Controle	Fluoxetina	Fluoxetina	Fluoxetina	Fluoxetina
	(n=6)	(1mg/kg)	(5mg/kg)	(10mg/kg)	(20mg/kg)
		(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
Espermatogônia A	0,92 ± 0,35	0,77 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2
Nucléolo Cel. Sertoli	9,4 ± 1,7	8,7 ± 1,8	10,3 ± 1,4	8,8 ± 0,6	8,1 ± 0,9
Cito I Pré-leptóteno	25,2 ± 4,9	26,0 ± 3,2	24,6 ± 5,6	29,3 ± 3,2	27,0 ± 1,7
Cito I Paquíteno	31,8 ± 5,1	27,3 ± 6,9	28,5 ± 3,6	28,8 ± 2,2	28,5 ± 2,4
Espermátide					
Arredondada	83,5 ± 15,1	74,2 ± 7,1	78,2 ± 10,1	80,8 ± 7,8	72,9 ± 9,8

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na tabela 4 podemos observar os valores referentes a parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli e produção espermática por testículo e por grama de testículo de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina.

De acordo com os resultados da tabela 4 ocorreu redução estatisticamente significativa do diâmetro tubular do grupo tratado com 20mg/Kg de fluoxetina em relação aos demais grupos. O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero refletem diferentes graus da atividade do epitélio, ocasionados por influência sazonal, pelo estabelecimento da puberdade, ou por efeitos deletérios da idade avançada de drogas bociogênicas e de hormônios gonadotróficos endógenos e exógenos o que os tornam parâmetros importantes na avaliação quantitativa da espermatogênese, uma vez que existe correlação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica do testículo (Moraes et al., 2009). De acordo com França e Russell (1998), o diâmetro tubular médio não sofre alteração significativa após o estabelecimento da maturidade sexual e permanece aparentemente constante ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em determinada espécie, mesmo ocorrendo variações expressivas, interespecíficas e raciais.

Por outro lado, no que diz respeito a altura de epitélio seminífero foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com 5mg/Kg e 10mg/Kg de fluoxetina. Os animais tratados com 10mg/Kg de fluoxetina tiveram redução de 16% na altura do epitélio seminífero em relação aos animais tratados com a dose de 5mg/Kg de fluoxetina. Os animais tratados com a maior dose tiveram tendência de redução em torno de 12% com relação ao grupo tratado com 5mg/Kg de fluoxetina, muito embora, não se observou diferença significativa entre os grupos de tratados com fluoxetina e o grupos controle.

A altura do epitélio seminífero, na maioria de espécies domésticas, apresenta pequenas variações relacionadas à composição variada das associações celulares ou a possíveis alterações no volume das células de Sertoli, observada em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (França e Russel, 1998). Ademais, diversos fatores etiológicos podem estar envolvidos no desenvolvimento da degeneração testicular, tais como idade avançada, deficiências nutricionais, choque térmico, hormônios, neoplasias, irradiação e trauma, entre outros, que causam interrupção do processo espermatogênico que se caracterizam inicialmente pela descamação das células germinativas no lume tubular e redução da altura do epitélio seminífero, necrose e apoptose das células do epitélio germinativo e hialinização dos túbulos seminíferos (Foster, 1997; Ortega-Pacheco et al., 2006). Contudo, não se observou qualquer alteração no epitélio germinativo que justifique degeneração testicular. Além disso, o tratamento neonatal não alterou, nos ratos adultos, a população celular por secção transversal no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero.

No comprimento total de túbulos seminíferos ocorreu uma redução significativa nos animais tratados com 5mg e 10mg em relação ao grupo tratado com 20mg. A produção espermática diária por grama de testículo (PED/g de testículo) que estima a eficiência do processo espermatogênico sofreu redução estatisticamente significativa nos animais tratados com 5mg em relação aos tratados com 20mg (Tabela 4).

Tabela 4. Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli e produção espermática por testículo e por grama de testículo de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de Fluoxetina aos 150 dias de idade. (Média ± desvio padrão)

Parâmetros	<i>Grupos Experimentais</i>				
	Controle	Fluoxetina	Fluoxetina	Fluoxetina	Fluoxetina
	(n=6)	(1mg/kg)	(5mg/kg)	(10mg/kg)	(20mg/kg)
		(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
Peso Líq. Testicular(g)	1,67± 0,1a	1,52± 0,06b	1,49± 0,07b	1,42± 0,1b	1,44 ± 0,1b
Diâmetro Tubular	384,6 ± 27,1a	365,6 ± 15,1a	388,6 ± 11,3a	366,0 ± 46,0a	318,9 ± 26,9b
Altura do Epitélio	117,9 ± 7,4abc	114,2 ± 5,0abc	121,7 ± 12,1b	102,0 ± 14,3c	107,6 ± 8,7abc
Comp. Total de Túbulo Seminífero	13,4 ± 1,9ab	13,5 ± 1,1ab	11,4 ± 1,3a	12,9 ± 3,0a	17,0 ± 2,6b
Sertoli/secç. Transv.	9,4 ± 1,7	8,7 ± 1,8	10,3 ± 1,4	8,8 ± 0,6	8,1 ± 0,9
SPDAr/secç. Transv.	83,51± 15,6	74,2 ± 7,1	78,2 ± 10,1	80,8 ± 7,8	72,9 ± 9,8
ICS	8,9 ± 0,06	8,4 ± 1,2	7,7 ± 1,3	9,2 ± 1,2	9,1 ± 1,6
Sertoli/testículo (x10⁷)	3,12 ± 0,56	2,95± 0,71	2,97 ± 6,9	2,86 ± 0,75	3,48± 0,79
PED/Testículo (x10⁶)	20,7 ± 3,8	18,8 ± 2,3	16,8 ± 3,2	19,3 ± 3,3	23,4 ± 6,2
PED/g/Testículo (x10⁶)	12,4 ± 1,8ab	12,3 ± 1,6ab	11,2 ± 1,8b	13,6 ± 2,6ab	16,1 ± 3,7ac

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

ICS – Índice de Célula de Sertoli; PED – Produção Espermática Diária.

Outros parâmetros como número de célula de Sertoli e espermátides arredondadas por secção transversal de túbulos seminíferos no estágio VII do C.E.S. não sofreram qualquer influência do tratamento neonatal com fluoxetina em dosagens crescentes. Isto também se estendeu para a capacidade de suporte das células de Sertoli, o ICS ou índice de células de Sertoli. A população total de células de Sertoli por testículo também não sofreu influencia das diferentes doses de fluoxetina administradas durante o período neonatal, assim como a produção espermática diária por testículo. Por outro lado foi possível observar um aumento da eficiência do processo espermatogênico (produção espermática diária/grama/testículo) nos animais que receberam a maior dose em relação aos animais tratados com 5mg/Kg de fluoxetina. Esta tendência se estendeu aos demais grupos de tratamento, porém não houve relevância significativa.

A redução diâmetro tubular observado nos animais tratados com a maior dose de fluoxetina foi em média 15,5%, o que justifica vários resultados como aumento do

comprimento tubular e manutenção de parâmetros com produção espermática diária por testículo e por grama de testículo; e população de células de Sertoli. Por outro lado, torna-se importante ressaltar que neste trabalho o peso testicular, o volume de túbulos seminíferos e de epitélio seminífero foi reduzido nos animais tratados com fluoxetina. Estes dados nos levaram a acreditar que haveria redução da população de células de Sertoli, comprimento total de túbulos seminíferos, produção espermática diária por testículo e eficiência da espermatogênese. De acordo com Silva Júnior et al. (2008), a manipulação do sistema serotoninérgico em ratos durante o período crítico do desenvolvimento testicular reduziu a população de células de Sertoli nos animais pré-puberes e os níveis de FSH. De acordo com a literatura, o esperado seria a redução de parâmetros morfométricos relacionados diretamente com esta população celular (França et al., 2000; França et al., 2005; Silva Junior et al., 2006) em indivíduos adultos. Contudo, o que se observou neste trabalho vai totalmente de encontro ao que é citado comumente na literatura. Provavelmente, após a retirada do inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS) e passado o período de eliminação da fluoxetina e norfluoxetina, que nos animais neonatos é de aproximadamente 5 e 15 horas (Caccia et al., 1990), respectivamente, o testículo pode ter desenvolvido estratégias de adaptação, que promoveram a recuperação dos padrões morfométricos e celulares da espécie.

O FSH (Hormônio Folículo Estimulante) é o principal agente mitogênico responsável pela proliferação das células de Sertoli (Orth, 1982; Orth, 1984; Almiron e Chemes, 1988); portanto, níveis adequados deste hormônio são necessários para o estabelecimento do tamanho final do testículo e a produção espermática, uma vez que estas variáveis são controladas pela população de células de Sertoli durante o período crítico do desenvolvimento testicular (Orth, 1988; Orth, 1993). Entretanto, no experimento realizado por Silva Junior et al. (2008) a redução dos níveis de FSH e da população de células de Sertoli aos 21 dias pós-natal não se traduziu em redução de produção espermática em adulto e perda de eficiência da espermatogênese. Esta afirmação se deve ao fato que ao mesmo protocolo de tratamento em ambos os experimentos apenas com análises em tempo diferentes do desenvolvimento testicular. O que se observou foi uma recuperação dos parâmetros testiculares estando provavelmente relacionada a elevação nos níveis de FSH ao final do término do tratamento com o ISRS nos animais com 21 dias pós-natais e ao prolongamento do período de sensibilidade da célula de Sertoli a este hormônio.

5. Conclusão

A intervenção farmacológica sobre o sistema serotoninérgico durante o período crítico do desenvolvimento testicular neonatal de ratos Wistar com cloridrato de fluoxetina, interferiu em parâmetros como peso testicular, peso líquido do testículo e diâmetro de túbulos

seminíferos. Contudo, parâmetros morfométricos produtivos, tais como produção espermática diária testicular, eficiência da espermatogênese por grama de testículo e população celular no estágio VII de animais adultos não foram influenciados pela ação do cloridrato de fluoxetina no período neonatal.

Referências

AARMARIO, A.; GARCIA-MARQUEZ, C. Tricyclic antidepressants activate the pituitary adrenal axis in the rat. Tolerance to repeated drug administration. **European Journal of Pharmacology**, v.140, p.239-244, 1987.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anat. Rec.**, v. 94, p.238-248, 1946.

ALMIRÓN, I., CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. **Int. J. Androl.**, v.11, p.235-246, 1988.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **J.Dairy sci.**, v.45, p.774-781, 1962.

ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablisement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v.3, p.219-241, 1963.

BALDESSARINI, R.J. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos (depressão e mania). In: GOODMAN, L.S., (9.ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. México: Mc Graw-Hill Companies, 1996. Cap.19, p.314-334.

BALON, R. Fluoxetine and sexual dysfunction. **JAMA**, v.273, p.1489, 1995.

BARDEN, N.; REUL, J.; HOLSBOER, F. Do antidepressants stabilize mood through action on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system? **Trends of Neuroscience**, v.18, p.6-11, 1995.

CACCIA, S.; CAPPI, M.; FRACASSO, C.; GARATTINI, S. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**; 100(4):509-14, 1990.

CALOGERO, A.E., BAGDY, G., D'AGATA, R. Mechanism of stress on reproduction. **Annals New York Academy of Science**, v.814, p.364-367, 1997.

CANTOR, J.M.; BINIK, Y.M.; PFAUS, J.G. Chronic fluoxetine inhibits sexual behavior in the male rat: reversal with oxytocin. **Psychopharmacology**, v.144, p.355-362, 1999.

CHROUSOS, G.P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptative response. **Annals New York Academy of Science**, v.581, p.311-335, 1998.

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Effect of intraventricular injection of 5,6-dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in rat. **Journal of Endocrinology**, v.106, p.395-400, 1985

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Spermatogenesis in rat: effect of L-tryptophan loading. **Andrologia**, v.14, p.242-249, 1982.

DEIRÓ, T.C.B.J.; MANHÃES DE CASTRO, R.; CABRAL FILHO, J.E.; SOUZA, S.L.;

FREITAS, S.; FERREIRA, L.M.P.; GUEDES, R.C.A.; CÂMARA, C.R.V., BARROS, K.M.F.T. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Bio Res**, 37: 1503-1509, 2004

DINAN, T.G. Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. **Life Science**, v.58, p.1683-1694, 1996.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monotsh. Vet. Med.**, v.29, p. 650-652, 1974.

FOSTER, R.A.: Pathology of the scrotal contents and accessory sex glands of domesticated animals. Proceedings of the Reproductive Pathology Symposium. American College of Theriogenologists and Society for Theriogenology, Hastings NE, USA, pp. 37-49, 1997.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. Building a testis. **Tissue & Cell**, 27 (2), p. 129-147. 1995.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology** 63 (2005) 300-318.

FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and

sertoli cell index. In: International Congress on Animal Reproduction, 12th, 1992, Netherlands. **Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction**. Hague: Netherlands, p.1716-1718, 1992.

FRANÇA, R.L.; SILVA Jr., V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cel proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biol. Reprod.**, v. 63, p.1629-1636, 2000.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: Male reproduction; a **multidisciplinary overview**. Ed. Madrid: Churchill Comunicions Europe España, cap 16, p.198-219. 1998.

FRANK, J.L.W.; HENDRICKS, S.E.; OLSON, C.H.. Multiple ejaculations and chronic fluoxetine effects on male rat copulatory behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 66: 337-342, 2000.

GANDARIAS, J.M.; ECHEVARRIA, E.; ACEBES, I.; ABECIA, L.C.; CASIS, O.; CASIS, L. Effects of fluoxetine administration on um-opiod receptor immunostaining in the rat forebrain. **Brain Research**, v.817, p.236-240, 1999.

GONDOS, B.; BERNDSTON, R.H. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. cap. 4, p.115-154.

HEDGER, M.P.; KHATAB, S.; GONZALES, G.; DE KRETZER, D.M. Acute and short-term action of serotonin administration on the pituitary-testicular axis in the adult rat. **Reproduction fertility development**, v.7, p.1101-1109, 1995.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M-T., LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal Reproduction and Fertility**, v.54, p.209-213. 1978.

HOLSBOER, F.; BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocrine reviews**, v.17, p.187-205, 1996.

KNOL, B.W. Stress and endocrine hypothalamus-pituitary-testis system: a review. **The Veterinary Quarterly**, v.13, p.104-114, 1991.

LABBATE, L.A.; GRIMES, J.B.; ARANA, G.W. Serotonin reuptake antidepressant effects on sexual function in patients with anxiety disorders. **Biology psychiatry**, v.43, p.904-907, 1998.

LESAGE, J.; BERNET, F.; MONTEL, V.; DUPOUY, J.P. Hypothalamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and gonadal and adrenal activities, during the early postnatal period in the rat. **Neurochem. Res.**, v.21, p. 87-96, 1996.

LI, Q; LEVY, A.D., CABRERA, T.M.; BROWNFIELD, M.S.; BATTAGLIA, G.;VAN DE KAR, L.D. Long-term fluoxetine, but not desipramine, inhibits the ACTH and oxytocin responses to the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, in male rats. **Brain research**, v.630, p.148-156, 1993.

MATUSZCYK, J.V.; LARSSON, K.; ERIKSSON, E. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v.60, p.527-532, 1998.

MENDES DA SILVA, C.; SOUZA, S.L.; BARRETO MEDEIROS, J.M.; FREITAS-SILVA, S.R.; ANTUNES, D.E.C.; CUNHA, A.D.U.; RIBAS, V.R.; FRANÇA, M.F.S.; NOGUEIRA, M.I.; MANHÃES DE CASTRO, R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr**, 60(4): 928-931, 2002.

MORAES, T.A.P., JASSET, P.F., TORRES, S.M., MORAES, A.V., SILVA JÚNIOR, V.A., GUERRA, M.M.P. Efeito do uso de pentoxifilina no período neonatal sobre a produção espermática em ratos Wistar adultos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p.80-87, 2009.

MORRISON JL, RIGGS KW, RURAK DW. Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. **Reprod Fertil Dev**. 2005;17(6):641-50.

NAUMENKO, E.V.; SHISHKINA, G.T. Role of serotonin in feedback control of hypothalamic-pituitary-testicular complex in male rat. **Neuroendocrinology**, v.26, p.359-366, 1978.

NOWAKOWSKA, E.; KUS, K.; CHODERA-OTUSZEWSKA, R. Behavioural effects of two antidepressants with opposite action mechanisms. **Biological Psychiatry**, v.42, p.1S-297S, 1997.

ORTEGA-PACHECO, A.; RODRÍGUEZ-BUENFIL, J.C.; SEGURA-CORREA, J.C.; BOLIO-GONZALEZ, M.E.; JIMÉNEZ-COELLO, M.; LINDE FORSBERG, C. Pathological Conditions of the Reproductive Organs of Male Stray Dogs in the Tropics: Prevalence, Risk Factors, Morphological Findings and Testosterone Concentrations. **Reprod Dom Anim** p.1-9. 2006.

ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing L.L. (Eds), **Cell and Molecular Biology of the Testis**, 1st ed, Oxford University Press, New York, p. 3-42, 1993.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, v. 203, p. 485-492, 1982

ORTH, J.M. The role of follicle stimulating in controlling Sertoli cell proliferation in testis of fetal rats. **Endocrinology**, v. 115, p. 1248-1255, 1984.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 787-794, 1988.

PERRY, K.W.; FULLER, R.W. Fluoxetine increases norepinephrine release in rat hypothalamus as measured by tissue levels of MHPG-SO₄ and microdialysis in conscious rats. **Journal of neural transmission**, v.104, p.953-966, 1997.

RÉNYI, L. The effect of selective 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors on 5-methoxy-N,M-dimethyltryptamine-induced ejaculation in the rat. **Brazilian Journal Pharmacology**, v.87, p.639-648, 1986.

ROCHA, D.M.C., DEBELJUK, L., FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult wistar rats. **Tissue e Cell**, v.31, p.372-379, 1999.

ROSEN, R.C.; LANE, R.M.; MENZA, M.; Effects of SSRIs on sexual function: a critical review. **J Clin Psychopharmacol**. 1999 Feb;19(1):67-85.

RUSSELL, L.D., FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue & Cell**, 27 (2) 129-147, 1995.

RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D., (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. *Bolesta: Cache River Press*, 1990. cap. 1, p. 1-40.

SILVA JÚNIOR, V.A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and spin production in adult rats. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.45, p.1-10, 2006.

SILVA, J. V. A.; LINS, A. M. J. A. A.; AMORIM, J. A. A.; PINTO, C. F.; DEIRÓ, T. B. J.; OLIVEIRA, J. R. M.; PEIXOTO, C. A; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal administration of fluoxetine decreased final sertoli cell number in Wistar rats. **Int. J. Morphol.**, 26(1):51-62, 2008.

SIMANSKY, K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. **Behav. Brain Res**, 73: 37-42, 1996.

TORRES, G.; HOROWITZ, J.M.; LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Fluoxetine induces the transcription of genes encoding *c-fos*, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain. **Neuroscience**, v.87, p.463-477, 1998.

URRY, R.L.; DOUGHERTY, M.S. Inhibition of rat spermatogenesis and seminiferous tubule growth after short-term and long-term administration of a monoamine oxidase inhibitor. **Fertility and sterility**, v.26, p.232-238, 1975.

WALDINGER, M.D.; OLIVIER, B. Selective serotonin reuptake inhibitor-induced sexual dysfunction: clinical and research considerations. **International clinical of psychopharmacology**, v.12, suppl.6, p.S27-33, 1998.

Influência da transferência de um inibidor seletivo da recaptção de serotonina via transplacentária e leite materno no desenvolvimento testicular neonatal em ratos Wistar

MONTEIRO FILHO, W.O.; DE SÁ, I.R.; TORRES, S.M.;
MANHÃES-DE-CASTRO,R; SILVA JÚNIOR, V.A.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

Autor para correspondência:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Área de Histologia

E-mail: vajunior@dmfa.ufrpe.br

Fone (081) 33206390 / (081) 99898246

RESUMO

Neste trabalho, o sistema serotoninérgico em ratos Wistar foi manipulado durante os períodos fetal e neonatal, via transplacentária (TP) e leite materno (LM), respectivamente, utilizando um inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS), a fluoxetina. O propósito deste estudo foi observar as repercussões sobre parâmetros testiculares em ratos neonatos aos 21 dias pós-natal. Trinta e oito animais foram distribuídos de acordo com os tratamentos: I) Controle =Água deionizada (n=10); II) tratado com 5 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=10); III) grupo tratado com 10 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=8); IV) grupo tratado com 20 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=10). Aos 21 dias, os animais foram anestesiados e perfundidos intracardiacamente com solução fixadora. Os testículos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato. Cortes histológicos de 4µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados histometricamente. A manipulação neonatal do sistema serotoninérgico com fluoxetina reduziu o peso corporal dos neonatos e alterou a curva de desenvolvimento ponderal, principalmente nas dosagens mais altas. Parâmetros volumétricos tais como: cordões/túbulos seminíferos, epitélios seminíferos, lume de túbulos seminíferos e volume total das células de Leydig foram reduzidos em dosagens mais elevadas do ISRS, porém os níveis de testosterona não sofreram alterações. O comprimento total de túbulos seminíferos reduziu de forma compatível aos achados de volume de túbulos seminíferos e a tendência redução da população total de células de Sertoli por testículo. No presente experimento foi observado a influência da fluoxetina TP (transplacentária) e LM (leite materno) no aparecimento do lume tubular nos animais expostos a maior dose. De acordo com os resultados o contato fetal e neonatal com fluoxetina ocorrido via transplacentária e do leite materno ocasionou alterações em parâmetros testiculares diretamente envolvidos com a produção espermática em ratos adultos.

Palavras-chave: Fluoxetina, serotonina, células de Sertoli, testículo.

ABSTRACT

In this work, the serotonergic system was manipulated during fetal and neonatal period, by transplacentally barrier and breast feeding, respectively, using inhibitor selective of serotonin re-uptake (ISSR), fluoxetine. Aim of this study was to observe the repercussion under testicular parameters in newborn rats with 21 pos-natal days old. Thirty-eight animals were distributed according to treatments: I) Control = deionized water (n=10); II) treated with 5mg/kg of fluoxetine (n=10); III) treated with 10mg/kg of fluoxetine (n=8); IV) treated with 20mg/kg of fluoxetine (n=10). To 21 days, the animals were anesthetized and infused intracardiac with fixative solution. Testis was routinely processed for inclusion in plastic resin (metacrilato glicol). Histological sections with 4 μ m of the weight were stained by toluidina blue/sodium borate 1% and analyzed histometrically. The manipulation of serotonergic system with fluoxetine reduced the body weight of newborn and altered curve of growth, mainly in higher dosage. Volume parameters such as: cords/seminiferous tubules, seminiferous epithelium, lume of seminiferous tubule and Leydig cell volume were reduced in higher dosage of the ISSR, however testosterone levels do not suffered changes. The total length of seminiferous tubule was reduced in a compatible way with results found to seminiferous tubule volume and a strong tendency of reduction observed in Sertoli cell population per testis. In this experiment was observed the influence of the fluoxetine passed by transplacentally barrier (TB) and breast feeding (BF) in retarding the appearance of tubular lumen in exposed animals to fluoxetine higher dosage. According to results fetal and newborn contact with fluoxetine by TB and BF provoked alterations in testicular parameters directly related with sperm production in adult rats.

Key words: Fluoxetine, serotonin, Sertoli cell, testis.

Introdução

Depressão clínica ocorre em 10 a 15% das mulheres durante a gestação, enquanto a depressão pós-parto ocorre entre 10 a 22% das mulheres. Esta condição pode colocar em risco tanto a mãe quanto o feto, além do que existem forte evidências de efeitos adversos da depressão pós-natal materna sobre o desenvolvimento cognitivo, motor e desenvolvimento emocional dos neonatos (Kim et al., 2005).

É importante conhecer a extensão da transferência de drogas pelo leite humano com o objetivo de testar a segurança da amamentação no caso de ingestão de droga pela mãe. Distúrbios depressivos são comuns tanto durante o período pré-natal quanto nos meses iniciais após o nascimento, depressão pós-parto. Fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, é largamente utilizado no tratamento da depressão neste período. A droga é metabolizada para norfluoxetina que em humanos tem uma vida média plasmática prolongada, em torno de 15 dias, e potência similar ao inibidor de recaptação de serotonina (Kristensen et al., 1999).

Fluoxetina e norfluoxetina são componentes altamente solúveis em lipídeos, portanto capazes de cruzar a barreira placentária, como também serem excretados pelo leite. Além

disso, a meia-vida longa deste fármaco sugere riscos de acúmulo nos fetos e nos neonatos, principalmente através da ingestão do leite materno (Heikkinen et al., 2003). Em ratas gestantes foi comprovado que a fluoxetina e norfluoxetina atravessam a barreira placentária e se distribuem dentro do embrião/feto durante os períodos de organogênese e pós-organogênese (Pohland et al., 1989). A transferência de fluoxetina e norfluoxetina através do leite maternos de ratas vem sendo utilizada para estudar os efeitos deste ISRS e seu derivado N-metilado, norflouxetina, em ratos neonatos (Pereira et al., 2007).

Evidências farmacológicas demonstraram que a elevação cerebral dos níveis de 5-HT afetou a secreção de FSH (Hormônio folículo estimulante) e hormônio luteínizante (LH) por inibir a liberação de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina) no hipotálamo, com subsequente efeitos sobre o processo espermatogênico e esteroidogênese em ratos adultos (Urry e Dougherty, 1975; Naumenko e Shishkina, 1978; Das et al., 1982, 1985)

Em ratos neonatos, níveis adequados de FSH são cruciais para o estabelecimento da população de células de Sertoli, a qual esta diretamente relacionada com o tamanho do testículo e a produção espermática (França et al., 2000). Silva Junior et al. (2008) observaram que a administração intra-peritoneal (IP) neonatal de fluoxetina em ratos Wistar reduziu o peso testicular, população de células de Sertoli e comprimento total de túbulos seminíferos. Por outro lado, o acesso dos neonatos a fluoxetina e norfluoxetina ocorre através do leite materno (Pereira et al., 2007).

A diferenciação morfológica testicular em ratos ocorre entre 12º e 13º de gestação, com a formação dos cordões testiculares. A partir deste momento até o período perinatal se observa uma intensa proliferação de células de Sertoli, porém estas células tendem a reduzir seu índice mitótico do nascimento até o 16º dia pós-natal quando se inicia a formação da barreira hemato-testicular e início do aparecimento do lúmen nos cordões testiculares (Orth, 1993; Gondos e Berndtson, 1993). É importante considerar que o período pré-natal é fundamental para definição da população de células de Sertoli, por conseguinte a manipulação do sistema serotoninérgico durante o período de organogênese e pós-organogênese testicular em fetos, via placentária, nos daria subsídios a respeito das prováveis conseqüências da utilização de ISRS durante a gestação sobre o desenvolvimento testicular. Para tal o presente experimento se propõe a estudar os efeitos da administração de fluoxetina em ratas do 13º de gestação até o 21º dia pós-natal sobre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo de ratos pré-púberes.

Animais, manipulações farmacológicas e desenho experimental.

Inicialmente foram utilizadas 20 ratas gestantes Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), as quais foram mantidas em ciclo claro/escuro de 12h com controle de umidade (50%) e temperatura (22°C), obtidos do biotério da Área de Fisiologia do DMFA/UFRPE. Com a finalidade de compor os grupos de tratamento, a partir do 13º dia de gestação as ratas passaram a receber, via sonda orogástrica (gavagem), solução de fluoxetina, diluída em água deionizada de acordo com o seguinte protocolo: I) Controle =Água deionizada (n=5); II) tratado com 5 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=5); III) grupo tratado com 10 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (5 ratas); IV) grupo tratado com 20 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (5 ratas). As doses foram calculadas levando-se em consideração o peso vivo do animal (Nowakowska et al., 1997; Matuszczyk et al., 1998; Gandarias et al., 1999; Frank et al., 2000). Após o parto das fêmeas pertencentes ao mesmo grupo de tratamento, foi feita a sexagem dos neonatos e os ratos machos foram escolhidos aleatoriamente para composição dos seguintes grupos: I) Controle =Água deionizada (n=10); II) tratado com 5 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=10); III) grupo tratado com 10 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=8); IV) grupo tratado com 20 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=10). Os ratos neonatos machos permaneceram com suas mães, as quais continuaram a receber o mesmo tratamento preconizado durante a gestação, para que os neonatos continuassem a receber o inibidor seletivo da recaptção de serotonina, fluoxetina, via leite materno durante os primeiros 21 dias pós-natal. Os animais dos grupos de tratamento (6 por caixa) permaneceram com as mães em caixas individuais até 21 dias após o nascimento. A pesagem dos animais neonatos foi feita diariamente durante os 21 dias do experimento, para acompanhamento da curva de peso corporal. As mães receberam ração peletizada, com níveis nutricionais adequados e água ad libitum.

Perfusão tecidual e processamento histológico.

Aos 21 dias de idade, os ratos de cada grupo foram anestesiados, por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (30mg/kg), heparinizados (125UI/100g de peso corporal), puncionados no seio venoso na confluência das veias cavas e submetidos à perfusão intracárdica com solução fisiológica de NaCl a 0,9% acrescida de heparina sódica (500 UI/litro) por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Após a lavagem do sistema vascular, os animais serão perfundidos com glutaraldeído a 4% em tampão cacodilato a 0,01M e pH 7,4

durante 20 minutos. Os testículos foram removidos, pesados, seccionados em fragmentos com até 2mm de espessura e re-fixados por duas horas a 5°C na mesma solução de perfusão.

Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato. Os cortes histológicos de 4 µm de espessura foram realizados em micrótomo rotativo de lâmina de vidro, corados em azul de toluidina/borato de sódio e analisados em microscópio Olympus modelo BX-51.

A análise histométrica dos testículos e determinação do número de células de Sertoli estimadas através da histologia quantitativa dos testículos foram executadas de acordo com metodologia descrita por Silva Junior et al. (2006) e Moraes et al. (2009).

Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo

A densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular foi estimada através da contagem de 6615 pontos por animal, utilizando uma grátula integradora com 441 pontos (Olympus) acoplada a uma ocular de 10X de ampliação e uma objetiva com 40X de ampliação (ampliação final de 400X). As contagens serão realizadas usando microscópio óptico BX51 Olympus.

O volume da cada componente testicular, expresso em µL, foi estimado baseado no conhecimento do volume ocupado por cada um destes constituintes e pelo peso líquido do testículo. O valor deste último será obtido pela subtração do peso da albugínea do peso bruto do testículo. Como a densidade testicular está próxima de 1, o peso líquido do testículo será considerado igual ao seu volume. O peso líquido do testículo nesta idade será determinado pela redução de 9,2% do peso bruto do testículo, o qual se refere ao peso da albugínea alocado no testículo (Silva Junior et al., 2008).

Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas utilizando-se régua micrométrica (U-OCMSQ10/10-Olympus) adaptada a uma das oculares de 10x, em aumento de 100x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurado a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até o

lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas. O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo expresso em metros foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (Attal e Courot, 1963; Dorst e Sajonski, 1974):

$$CT = \frac{VTS}{\pi R^2}$$

VTS = Volume total de túbulos seminíferos;

πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2)

Contagem da população de células de Sertoli por secção transversal de túbulos seminíferos

A estimativa do número de células de Sertoli foi feita através contagem destas células em 10 secções transversais de cordões/túbulos seminíferos por animal. Para tal, em cada secção transversal somente foram contabilizadas as células de Sertoli com o nucléolo visível.

As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro do nucléolo e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almqvist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM^2}{2}\right) - \left(\frac{DM^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nuclear médio (D.M.) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 nucléolos de células de Sertoli, para cada animal. Os diâmetros nucleolares foram medidos com o auxílio de uma régua micrométrica (U-OCMSQ10/10-Olympus) adaptada a uma das oculares de 10x e acoplada à objetiva de 100x, propiciando um aumento final de 1000x.

A estimativa do número de células de Sertoli por testículo foi realizada a partir do número corrigido de núcleo de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de Reviers e Lincoln (1978):

$$\text{Número CS / Testículo} = \frac{\text{Comp. Tot. Tub. Sem.} \times \text{Num. Cor. Nucl. CS / Sec. Transv.}}{\text{Espessura do Corte}}$$

Onde, Número CS Testículo = Número de células de Sertoli por testículo; Comp. Tot. Tub. Sem. = Comprimento total de túbulos Seminíferos (μm); Num. Cor. Nucl. CS Sec./Transv. = Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal; Espessura do corte (μm).

Dosagem de Testosterona

Amostras de sangue foram obtidas por punção no seio venoso da veia cava de animais previamente heparinizados (125UI/100g), em recipiente sem anticoagulante. Após colheita, as amostras de sangue foram centrifugadas e separadas o plasma sanguíneo para armazenamento (-20°C) e posterior análise da concentração de testosterona. Após descongelação, as amostras foram analisadas em duplicata através do teste de Elisa (Brown et al., 2004) e o resultado expresso em ng/mL.

Análise Estatística

Dependendo da tendência normal dos resultados obtidos, utilizou-se testes paramétricos ou não paramétricos. Para os dados considerados normais foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações, visando analisar quais grupos diferiram entre si. Caso os dados não seguissem uma tendência normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn. Em todas as análises realizadas, os dados foram expressos através de estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A fluoxetina é freqüentemente prescrita durante a gestação e amamentação, e pode ser detectada no plasma de neonatos e no leite humano. Evidências já foram apresentadas para os potenciais efeitos adversos em neonatos humanos decorrentes da exposição intra-uterina aos ISRS e da síndrome de abstinência (Pereira et al., 2007).

Em humanos a fluoxetina e seu metabólito, norfluoxetina, possuem uma meia-vida longa (1-3 e 7-15 dias, respectivamente), sugerindo riscos aos neonatos devido à eliminação via leite materno. Estudos de farmacocinética da fluoxetina e norfluoxetina durante a gestação e lactação demonstraram altas concentrações destas substâncias durante o início do período pós-natal, os quais declinaram gradualmente durante os primeiros 2 meses de vida (Heikkinen et al., 2003). Por outro lado, em ratos a administração oral de 5-20 mg/kg de fluoxetina e norfluoxetina apresentou uma meia-vida de 5 e 15 horas, respectivamente (Caccia et al., 1990). Embora o “clearance” renal destes componentes seja mais alto em roedores do que humanos, no presente estudo nos utilizamos as mesmas dosagens descritas por outros autores (Nowakowska et al., 1997; Matuszyk et al., 1998; Gandarias et al., 1999; Frank et al., 2000).

De acordo com os dados contidos na Tabela 1, os animais tratados com a maior dose de fluoxetina nasceram com redução de peso em relação aos animais do grupo controle e tratado com a menor dosagem de fluoxetina (5mg/kg de peso vivo da mãe), contudo os animais que receberam via transplacentária as doses de 5 e 10 mg/kg não apresentaram diferença de peso em relação aos animais controle.

No presente trabalho, o peso corporal dos ratos neonatos que receberam via transplacentária a maior dose do ISRS, no primeiro dia pós-natal, foi reduzido em relação aos animais controle. O aumento agudo dos níveis plasmáticos de 5-HT decorrentes da utilização pré-natal de fluoxetina, segundo Morrison et al., (2005), reduz o fluxo uterino e a disponibilidade de oxigênio e nutrientes, justificando pelo menos em parte a redução de peso ao nascer dos ratos tratados com a maior dose de fluoxetina.

Neste experimento, os animais expostos as diferentes doses de fluoxetina nos períodos pré e pós-natal tiveram uma redução no peso corporal no 21º dia pós-natal. O peso testicular foi reduzido 34% no grupo tratado com a maior dose quando comparado aos grupos controle e tratado com 5mg/kg (Tabela 2). Porém, não se constatou alteração de peso epididimário entre os grupos de tratamento. O presente estudo demonstrou que a administração de fluoxetina nas ratas gestantes e após o parto provocaram redução do peso corporal e atraso no desenvolvimento testicular. Os dados de peso testicular corroboram os achados de Silva Júnior et al. (2008) que obtiveram redução de 36% no peso testicular em animais neonatos tratados com 20mg/kg de fluoxetina via intra-peritoneal.

Na figura 1 podemos observar a curva de desenvolvimento ponderal obtida a partir da pesagem diária dos animais neonatos expostos a diferentes dosagens de fluoxetina via leite materno. De acordo com as curvas de desenvolvimento ponderal dos animais submetidos às doses de 10 e 20mg/kg observa-se que estas possuem comportamento bastante próximo, indicando que estas dosagens têm efeitos semelhantes sobre o ganho de peso corporal. Os

animais tratados com a menor dose possuem curva de ganho de peso com comportamento intermediário em o grupo controle e tratados com as doses de 10 e 20mg/kg de peso vivo das mães. Portanto, as maiores diferenças estatísticas ao longo do desenvolvimento pós-natal em relação ao grupo controle se observou nos animais que ingeriram leite das mães tratadas com doses mais elevadas.

Estudos anteriores mostraram que a utilização de citalopram e fluoxetina, administrados via subcutânea e intra-peritoneal durante os primeiros 21 dias pós-natal induziram redução na curva de ganho de peso corporal em ratos (Mendes da Silva et al., 2002; Deiró et al., 2004; Silva Junior et al., 2008). Estes efeitos podem ser atribuídos à ação inibitória da serotonina sobre a ingestão alimentar (Simansky, 1996). Estes inibidores seletivos da recaptação de serotonina parecem aumentar a disponibilidade deste neurotransmissor no terminal sináptico no SNC o que poderia explicar os efeitos redutores da fome e da ingestão alimentar em humanos e hipofagia em ratos (Wong et al., 1988; Macguirk e Siloverstone, 1990; Nowakowska et al., 1997). Além disso, existe também a redução na altura das vilosidades intestinais causada pela administração neonatal de fluoxetina (Macguirk e Siloverstone, 1990). Portanto, a redução do ganho de peso corporal (Figura 1) pode também estar relacionada à diminuição da absorção intestinal, provocando a redução de nutrientes essenciais.

No índice gonadossomático, que caracteriza o percentual de massa corporal alocada no testículo foi observada diminuição significativa nos animais tratados com a maior dose do inibidor seletivo de recaptação serotonina (Tabela 2). Isto denota que a elevação dos níveis fetais e neonatais de 5-HT promovem efeito direto sobre a massa testicular.

Na tabela 2 estão registrados os dados volumétricos do testículo (peso líquido), túbulos seminíferos, lume, túnica própria, espaço linfático, vasos sanguíneos e células de Leydig dos animais dos grupos controle e tratados com fluoxetina via leite materno.

O parênquima testicular pode ser dividido funcionalmente compartimento tubular e intertubular (Russell et al., 1990). Parâmetros biométricos tais como peso líquido do testículo e os pertencentes ao compartimento tubular, tais como: volume de cordões/túbulos seminíferos, epitélios seminíferos e lume de túbulos seminíferos tiveram redução significativa nos animais tratados via transplacentária e leite materno onde as fêmeas em aleitamento receberam 20mg/kg de fluoxetina via oral, exceto a túnica própria. De acordo com França et al. (2000) o peso testicular é um parâmetro morfométrico com correlação direta e positiva com outros parâmetros testiculares como volume de túbulos seminíferos, comprimento total de túbulos seminíferos, população de células de Sertoli, produção espermática. Os achados do presente experimento corroboram com os obtidos por Silva Junior et al., (2008) nos quais os

autores em questão demonstraram que a fluoxetina administradas IP no período pós-natal reduziu o peso testicular e os mesmos parâmetros volumétricos do compartimento tubular.

No compartimento intertubular todos os grupos de animais neonatos que receberam diferentes doses do ISRS via transplacentária (TP) e leite materno (LM) tiveram redução no volume líquido de células de Leydig. O volume líquido das células de Leydig é um parâmetro que indica fortemente a população celular e ou da atividade esteroidogênica destas células (Silva Junior e França, 2001). Além disso, França et al. (2005) relacionaram a quantidade e o tamanho das células de Leydig, bem como o volume do retículo endoplasmático a capacidade destas células quanto a produção de testosterona. De acordo com os resultados volumétricos das células de Leydig no presente experimento é bastante provável que o ISRS tenha influenciado na população de células de Leydig. Na figura 4 podemos observar os valores médios e desvios-padrão da concentração plasmática de testosterona (ng/mL) de ratos Wistar neonatais controle e tratado com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade. Após realização de análise estatística ($P=0,2129$) não se constatou alteração significativa dos níveis séricos de testosterona em ratos neonatos aos 21 dias pós-natal após tratamento pré e pós-natal com diferentes dosagens de fluoxetina. Entretanto os resultados de testosterona na figura 4 apontam para normalidade na capacidade esteroidogênica das células de Leydig.

Em ratos Sprague Dawley a população de células Leydig fetal é bastante ativa na produção de testosterona durante o período pós-natal sendo substituída pela população de células Leydig adultas a partir do 14º dia pós-natal que aumentam de número e passam assumir a função esteroidogênica na produção de testosterona (Ariyaratne e Chamindrani Mendis-Handagama, 2000). A diferenciação inicial da célula precursora para progenitora de célula de Leydig é independente de LH (Hormônio luteinizante); contudo este hormônio é essencial para os estágios finais da linhagem de células de Leydig uma vez que induzem proliferação celular, hipertrofia e estabelecimento das organelas necessárias para função esteroidogênica (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). De acordo com Silva Junior et al., (2008) os níveis de FSH foram reduzidos nos animais tratados no período pós-natal com fluoxetina. No presente experimento é bastante provável que o tratamento pré e pós-natal via TP e LM tenha promovido algum desequilíbrio no eixo HPG (hipotálamo-hipofise-gônada), entretanto sem repercussão para o LH. Essa possibilidade é viável devido influência negativa que o sistema serotoninérgico exerce sobre a biossíntese de GnRH, através de receptores 5-HT1 e 5-HT2, promovendo redução dos níveis de mRNA nos neurônios hipotalâmicos secretores deste neuropeptídeo (Li e Pelletier, 1995).

Por sua vez, o volume de parênquima testicular alocado em conjuntivo no compartimento intertubular aumentou nos animais que receberam 5mg/kg de fluoxetina, via transplacentária e leite materno. O espaço linfático, por conseguinte, reduziu em todos os tratamentos com fluoxetina. Contudo, diferença estatística só foi observada nos animais que foram amamentados por fêmeas que receberam 5 e 20mg/kg do ISRS.

Na tabela 4 podemos observar os valores referentes a parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina.

De acordo com os resultados da tabela 4 ocorreu redução de 27% no comprimento total de túbulos seminíferos do grupo tratado com 20mg/Kg de fluoxetina em relação aos grupos controle e tratado com 5mg/kg do ISRS via transplacentária e leite materno. Esta redução foi compatível à redução no volume de túbulos seminíferos e com a tendência redução da população total de células de Sertoli por testículo denotando a íntima correlação positiva existente entre estes parâmetros biométricos testiculares.

Com relação à população total de células de Sertoli por testículo, não se constatou diferença significativa entre os grupos, entretanto podemos observar tendência à redução (27%) desta população celular ($p=0,0622$) no grupo submetido a maior dosagem do ISRS. No que diz respeito ao percentual de túbulos seminíferos não-luminados constatou-se diferença significativa entre os grupos tratados com 5mg e 20mg/kg de fluoxetina, onde se observou maior percentual de túbulos sem lume nos animais tratados com a maior dose. A mesma tendência se observou entre os animais tratados com a maior dose e o grupo controle. Estes dados são corroborados pela redução no volume de lume de túbulos seminíferos nos animais submetidos a maior dose do ISRS via TP e LM. Nas figuras 2 e 3 podemos observar o parênquima testicular de animais controle e tratados com diferentes doses de fluoxetina, via tranplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias pós-natal. De acordo com as observações qualitativas do testículo feita nos diferentes tratamentos foi possível observar diferentes graus de maturação testicular, o que está relacionado ao número de túbulos seminíferos luminados. Segundo as observações histológicas, podemos observar menor grau de maturação testicular nos animais tratados com a maior dose de fluoxetina.

O aparecimento do lume tubular está relacionado ao grau de maturação das células de Sertoli, que por sua vez depende do aparecimento da barreira hemato-testicular (junções de adesão, claudina e ocludina) e da influência dos níveis de testosterona, FSH e TNF- α (Hellani et al., 2000; Kaitu'u-Lino et al., 2007). No presente experimento foi constatado a influência da fluoxetina TP e LM no aparecimento do lume tubular aos 21 dias pós-natal nos animais expostos a maior dose.

O período de organogênese (12^o-18^o dia pré-natal) e pós-organogênese testicular em ratos (após 18^o dia pré-natal) são fundamentais para o estabelecimento da atividade funcional normal do testículo. Portanto, qualquer alteração no equilíbrio hormonal poderá ser danoso ao processo espermatogênico de um indivíduo adulto, principalmente se houver repercussões sobre a população de células de Sertoli (Silva Junior et al., 2006).

Conclusão

O contato fetal e neonatal com fluoxetina 20mg/Kg ocorrido via transplacentária e do leite materno provocou redução nos parâmetros testiculares diretamente envolvidos com a produção espermática em indivíduos adultos, tais como: peso testicular, peso líquido do testículo, volume total de túbulos seminíferos, comprimento total de túbulos seminíferos e tendência de diminuição da população total de células de Sertoli por testículo. Atraso no processo de luminação dos túbulos seminíferos também foi uma das conseqüências da dose mais elevada do ISRS. O volume total de células de Leydig também foi reduzido em todas as doses de ISRS empregadas no experimento, porém não ocorreram alterações endócrinas da função testicular no 21^o dia pós-natal.

Referências

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anat.Rec.**,v.94,p.238-246, 1946.
- ADAMS, M.L., CICERO, T.J. The ontogeny of immunoreactive β -endorphin and β -lipotropin in the rat testis. **Life Science**, v.44, p.159-166, 1989.
- ARIYARATNE HB, CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA S. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. **Biol Reprod.** Mar;62(3):680-90,2000.
- AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **J.Dairy sci.**, v.45, p.774-781,1962.
- ATTAL, J. ; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v.3, p.219-241, 1963.

BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park**, Front Royal, Virginia – EUA, 2004. 93 p.

CACCIA S, CAPPI M, FRACASSO C, GARATTINI S. Influence of dose and rout of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. In: **Phychopharmacology**, 100 (4): 509-14, 1990.

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Effect of intraventricular injection of 5,6-dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in rat. **Journal of Endocrinology**, 106: 395-400,1985

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Spermatogenesis in rat: effect of L-tryptophan loading. **Andrologia**, 14: 242-249, 1982

DEIRÓ, T.C.B.J.; MANHÃES DE CASTRO, R.; CABRAL FILHO, J.E.; SOUZA, S.L.; FREITAS, S.; FERREIRA, L.M.P.; GUEDES, R.C.A.; CÂMARA, C.R.V., BARROS, K.M.F.T. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Bio Res**, 37: 1503-1509,2004

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatsh. Vet. Med.**, v.29, p. 650-652, 1974.

FRANÇA L.R., AVELAR G.F., ALMEIDA F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology** 63 (2005) 300–318.

FRANÇA, R.L.; SILVA J.R., V.A.; CHIARINI-GARCIA, H.; GARCIA, S.K.; DEBELJUK, L.. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, 63: 1629-1636, 2000

FRANK, J.L.W.; HENDRICKS, S.E.; OLSON, C.H.. Multiple ejaculations and chronic fluoxetine effects on male rat copulatory behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 66: 337-342, 2000.

GANDARIAS, J.M.; ECHEVARRIA, E.; ACEBES, I.; ABECIA, L.C.; CASIS, O.; CASIS, L. 1999. Effects of fluoxetine administration on um-opiod receptor immune-staining in the rat forebrain. **Brain Research**, 817: 236-240,1999.

GONDOS, B., BERNDSTON, R.H. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell. Ed. Clearwater: Cache River Press.**, cap. 4, p.115-154, 1993

HEIKKINEN, T. M.D.; EKBLAD, U.; PALO, P.; LAINE, K.. Pharmacokinetics of fluoxetine andnorfluoxetine in pregnancy and lactation. In: **American Society for Clinical Pharmacology & Terapeutics**, 73:330- 7, 2003

HELLANI, A.; JI, J.; MAUDUIT, C.; DESCHILDRE, C.; TABONE, E.; BENAHMED, M. Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific

protein/claudin 11 in mouse testis. *Endocrinology*. Aug;141(8):3012-9, 2000.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal Reproduction and Fertility**, v.54, p.209-213, 1978.

KAITU'U-LINO, T.J.; SLUKA, P.; FOO, C.F., Stanton PG. Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro. **Reproduction**. 133(6):1169-79, 2007

KIM, J. K.; RIGGS, W.; MISRI, S.; KENT, N.; OBERLANDER, T. F.; GRUNAU, R. E.; FITZGERALD, C.; RURAK, D. W. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. **Br J Clin Pharmacol** 61:2 155–163, 2005.

KRISTENSEN, J. H.; ILETT, K.; HACKETT, F. L. P.; YAPP, P.; PAECH, M; BEGG, E. J. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk. **J Clin Pharmacol**, 48, 521–527. 1999.

LI, S.; PELLETIER, G. Involvement of serotonin in the regulation of GnRH gene expression in the male rat brain. **Neuropeptides**, 29(1):21-5. 1995

MACGUIRK, J.; SILOVERSTONE, T.. The effect of 5-HT re-uptake inhibitor fluoxetine on food intake and body weight in healthy male subject. **Int J Obes**, 14: 361-372, 1990

MATUSZCYK , J.V.; LARSSON, K.; ERIKSSON, E. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. **Pharmacology biochemistry and behavior**, 60: 527-532, 1998.

MENDES DA SILVA, C.; SOUZA, S.L.; BARRETO MEDEIROS, J.M.; FREITAS-SILVA, S.R.; ANTUNES, D.E.C.; CUNHA, A.D.U.; RIBAS, V.R.; FRANÇA, M.F.S.; NOGUEIRA, M.I.; MANHÃES DE CASTRO, R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr**, 60(4): 928-931, 2002.

MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; ARIYARATNE, H.B.. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. **Biol Reprod**. 2001 Sep;65(3):660-71.

MORAES, T.A.P., JASSET, P.F., TORRES, S.M., MORAES, A.V., SILVA JÚNIOR, V.A., GUERRA, M.M.P. Efeito do uso de pentoxifilina no período neonatal sobre a produção espermática em ratos Wistar adultos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p.80-87, 2009.

MORRISON, J.L.; RIGGS, K.W.; RURAK ,D.W. 2005. Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. **Reprod Fertil Dev.**,17(6):641-50.

NAUMENKO, E.V.; SHISHKINA, G.T. Role of serotonin in feedback control of hypothalamic-pituitary-testicular complex in male rat. **Neuroendocrinology**, 26: 359-366,1978..

NOWAKOWSKA, E.; KUS, K.; CHODERA-OTUSZEWSKA, R. Behavioural effects of two antidepressants with opposite action mechanisms. **Biological Psychiatry**, 42: 1S-297S, 1997.

ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing L.L. (Eds), **Cell and Molecular Biology of the Testis**, 1st ed, *Oxford University Press*, New York, p. 3-42, 1993

PEREIRA, J. D.; CARICATI-NETO, A.; JURKIEWICZ, A.; JURKIEWICZ, N. Decreased noradrenergic and serotonergic reactivity of vas deferens of newborn rats from mothers treated with the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine during pregnancy and breastfeeding. **Life Sciences** 81 (2007) 1501–1508.

POHLAND, R.C.; BYRD, T.K.; HAMILTON, M.; KOONS, J.R. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol.** Apr;98(2):198-205. 1989.

RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D., (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. *Bolesta: Cache River Press.*, cap. 1, p. 1-40, 1990

SILVA JUNIOR, V.A.; FRANÇA, L.R. Células de Leydig e esteroidogênese em mamíferos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, 35: 15-29, 2001.

SILVA JÚNIOR, V.A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of sertoli cells and spin production in adult rats. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.45, P.1-10, 2006.

SILVA, J. V. A.; LINS, A. M. J. A. A.; AMORIM, J. A. A.; PINTO, C. F.; DEIRÓ, T. B. J.; OLIVEIRA, J. R. M.; PEIXOTO, C. A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal administration of fluoxetine decreased final sertoli cell number in Wistar rats. **Int. J. Morphol.**, 26(1):51-62, 2008.

SIMANSKY, K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. **Behav. Brain Res**, 73: 37-42, 1996.

URRY, R.L.; DOUGHERTY, M.S. Inhibition of rat spermatogenesis and seminiferous tubule growth after short-term and long-term administration of a monoamine oxidase inhibitor. **Fertility and sterility**, 26: 232-238, 1975.

WONG, D.T.; REID, R.L.; THRELKE, P.G. Suppression of food intake in rats by fluoxetine: comparison of enantiomers and effects of serotonin antagonists. **Pharmacol Biochem Behav**, 31: 475-479, 1988.

Anexos

Tabela 1 – Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno durante 21 dias pós-natal.

Peso corporal	<i>Controle</i> (n=10)	5mg/kg (n=10)	10mg/kg (n=08)	20mg/kg (n=10)	P
1º dia	6,53 ± 0,31a	6,69 ± 0,41a	6,36 ± 0,67ab	5,92 ± 0,58b	0,0173
2º dia	7,69 ± 0,46ab	7,84 ± 0,64a	7,29 ± 0,68ab	6,96 ± 0,85b	0,0437
3º dia	9,46 ± 0,58ac	9,15 ± 0,76ac	8,31 ± 0,95abc	7,90 ± 1,01b	0,0016
4º dia	11,59 ± 0,74ac	11,68 ± 1,26ac	9,52 ± 1,19b	9,28 ± 0,70b	0,0001
5º dia	12,88 ± 1,94a	11,70 ± 3,17ab	11,40 ± 1,37b	11,38 ± 1,28b	0,0042
6º dia	14,34 ± 2,24	13,38 ± 3,01	12,81 ± 1,65	13,25 ± 1,57	0,0962
7º dia	17,38 ± 2,54a	15,70 ± 3,63ab	15,40 ± 2,29ab	15,30 ± 1,57b	0,0136
8º dia	20,10 ± 2,87a	18,00 ± 3,71b	16,56 ± 1,72ab	16,65 ± 1,95b	0,0011
9º dia	22,83 ± 3,06a	21,10 ± 4,56ab	18,34 ± 1,80b	18,49 ± 1,99b	0,0083
10º dia	24,94 ± 3,02a	22,39 ± 4,24ab	20,51 ± 2,62b	20,24 ± 2,17b	0,0082
11º dia	27,27 ± 3,11a	24,76 ± 4,36ab	21,81 ± 1,98b	22,35 ± 2,22b	0,0020
12º dia	30,61 ± 3,33a	26,69 ± 4,50ab	24,35 ± 2,42b	24,16 ± 2,56b	0,0004
13º dia	32,67 ± 3,62a	28,94 ± 4,72ab	23,62 ± 8,87b	27,01 ± 2,36b	0,0029
14º dia	35,78 ± 3,49a	31,03 ± 4,75ab	27,87 ± 2,71b	28,54 ± 3,05b	0,0005
15º dia	38,75 ± 3,77a	33,39 ± 4,79b	30,17 ± 2,79b	30,60 ± 3,05b	0,0001
16º dia	41,66 ± 3,69a	35,89 ± 4,88b	32,22 ± 2,78b	32,60 ± 2,91b	0,0001
17º dia	44,35 ± 3,63ac	38,84 ± 4,86bc	35,26 ± 2,83bcd	34,22 ± 2,95bd	0,0001
18º dia	46,86 ± 3,65ac	40,93 ± 4,38bc	37,40 ± 2,84bcd	35,88 ± 2,96bd	0,0001
19º dia	50,21 ± 4,16ac	43,38 ± 4,33bc	40,05 ± 3,01bcd	38,17 ± 3,31bd	0,0001
20º dia	53,69 ± 4,77a	47,85 ± 4,94b	43,14 ± 3,21b	43,50 ± 4,41b	0,0001
21º dia	56,81 ± 5,97a	51,49 ± 5,63ab	46,79 ± 3,82b	46,68 ± 4,27b	0,0002
22º dia	61,63 ± 5,43a	52,32 ± 6,49b	49,17 ± 3,68b	46,68 ± 4,27b	0,0001

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

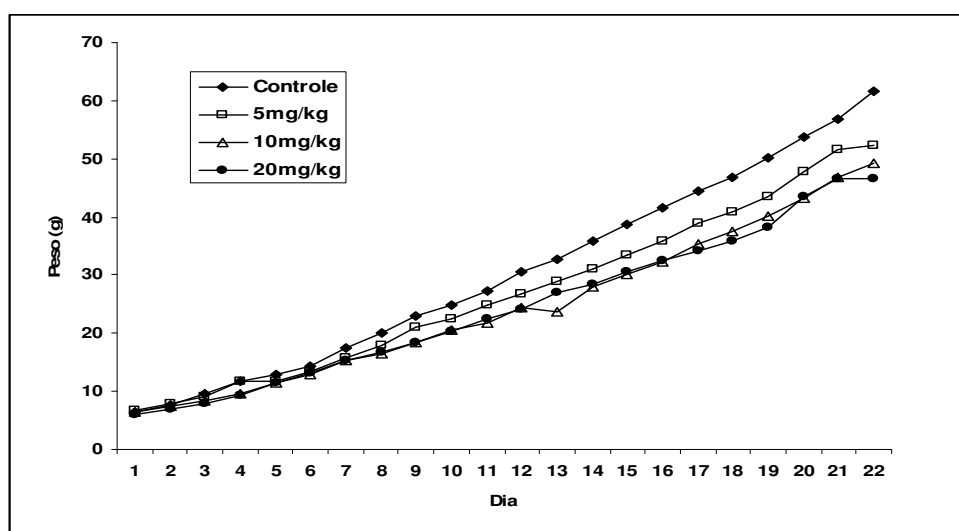


Figura 1. Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno durante 21 dias pós-natal

Tabela 2. Peso corporal e testicular final e IGS de ratos Wistar controles e tratados submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade (Média ± desvio padrão).

Parâmetros	<i>Controle</i>	5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg	P
	(n=10)	(n=10)	(n=08)	(n=10)	
Peso Corporal (g)	61,63 ± 5,43a	52,32 ± 6,49b	49,17 ± 3,68b	46,68 ± 4,27b	0,0001
Peso Testicular (g)	0,146 ± 0,023ac	0,123 ± 0,032c	0,109 ± 0,011bc	0,096 ± 0,008b	0,0001
Epidídimo (g)	0,018 ± 0,005	0,020 ± 0,005	0,015 ± 0,005	0,015 ± 0,003	0,0725
IGS	0,236 ± 0,023	0,232 ± 0,047	0,223 ± 0,012	0,206 ± 0,02	0,0788

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

Tabela 3. Parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar controles e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade. (Média ± desvio padrão).

Parâmetros	<i>Controle</i>	5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg	<i>P</i>
	(n=10)	(n=10)	(n=08)	(n=10)	
Peso Líquido (µL)	132,70 ± 21,59ac	111,80 ± 29,82ac	99,60 ± 0,11bc	86,90 ± 7,75b	0,0001
Túbulo Seminífero (µL)	117,20 ± 19,32ac	100,10 ± 25,78abc	87,83 ± 8,66bc	76,65 ± 6,34b	0,0001
Epitélio Seminífero (µL)	96,40 ± 17,89a	82,78 ± 22,38ac	69,95 ± 5,34abc	61,88 ± 4,72b	0,0004
Lume (µL)	8,21 ± 2,01a	6,22 ± 1,85ab	5,69 ± 3,40ab	4,97 ± 1,24b	0,0107
Túnica Própria (µL)	12,57 ± 2,37	11,07 ± 3,74	12,19 ± 1,63	9,80 ± 1,63	0,0900
Leydig (µL)	5,21 ± 1,25a	3,03 ± 1,17b	2,77 ± 1,03b	2,96 ± 0,81b	0,0019
Conjuntivo (µL)	0,52 ± 0,24ac	1,76 ± 0,52b	1,13 ± 0,33bc	0,61 ± 0,22C	0,0001
Vaso Sanguíneo(µL)	1,89 ± 0,95	2,54 ± 1,63	2,18 ± 0,67	2,14 ± 0,76	0,8959
Espaço Linfático(µL)	7,88 ± 1,54a	4,37 ± 2,02b	5,69 ± 1,38ab	4,54 ± 1,90b	0,0002

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

Tabela 4. Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli de testículo de ratos Wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade. (Média \pm desvio padrão)

Parâmetros					P
	<i>Controle</i> (n=10)	5mg/kg (n=10)	10mg/kg (n=08)	20mg/kg (n=10)	
Peso Líq. Testículo (μ g)	132,70 \pm 21,59 ^{ac}	111,80 \pm 29,82 ^{ac}	99,60 \pm 10,11 ^{bc}	86,90 \pm 7,75 ^b	0,0001
Diâmetro Tubular	147,87 \pm 7,29	138,80 \pm 24,15	146,167 \pm 12,083	141,53 \pm 17,22	0,6132
Altura do Epitélio	57,57 \pm 3,08	56,07 \pm 11,35	56,58 \pm 5,49	56,26 \pm 5,27	0,9658
Sertoli/secção transversal de cordão/túbulo seminífero	22,31 \pm 2,19	23,41 \pm 1,82	23,62 \pm 2,20	22,35 \pm 2,83	0,5262
Comprimento Total de Túbulo Seminífero(m)	6,86 \pm 1,24 ^a	7,12 \pm 2,96 ^a	5,28 \pm 0,68 ^{ab}	5,02 \pm 1,01 ^b	0,0271
Pop. Cel. Sertoli ($\times 10^7$)	3,85 \pm 0,88	4,16 \pm 1,72	3,12 \pm 0,47	2,82 \pm 0,75	0,0622
Túbulos seminíferos não luminados (%)	37,20 \pm 15,02 ^{ab}	34,40 \pm 8,57 ^a	35,60 \pm 9,44 ^{ab}	48,30 \pm 9,73 ^b	0,0286

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

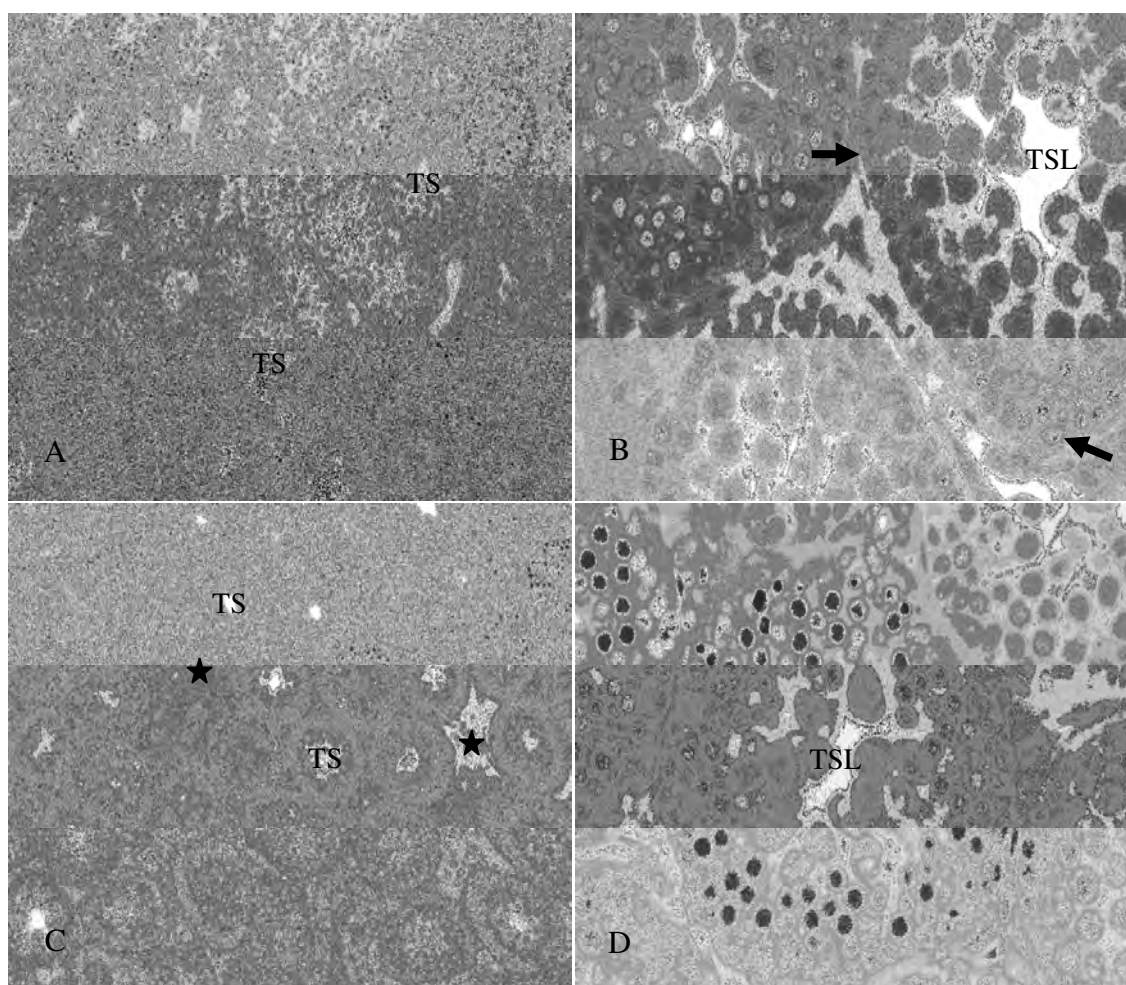


Figura 2: Fotomicrografia do testículo de ratos Wistar neonatais controle e tratado com 5mg/Kg de fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade.

Figura 2A: Testículo de rato Wistar do grupo controle. Túbulos seminíferos luminados (TSL);. Aumento de 100X.

Figura 2B: Detalhe de túbulo seminífero luminado (TSL) do grupo controle; células de Sertoli (seta). Aumento 400X.

Figura 2C: Parênquima testicular de rato tratado com 5mg/Kg de fluoxetina. Túbulos seminíferos luminados (TS); Espaço intertubular (estrals). Aumento de 100X.

Figura 2D: Detalhe de túbulo seminífero luminado (TSL) de animal tratado com 5mg/Kg de fluoxetina. Aumento de 400X.

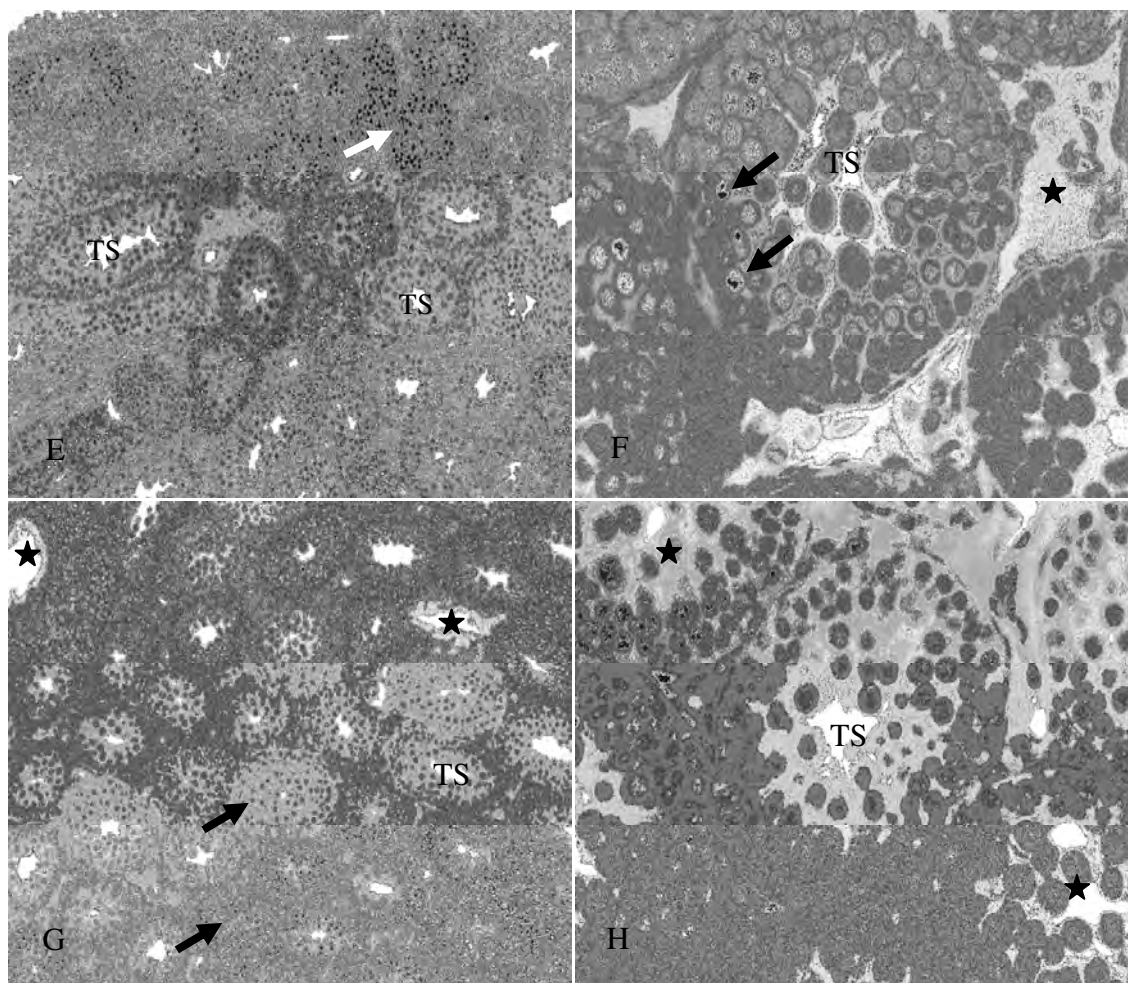


Figura 3: Fotomicrografia do testículo de ratos Wistar neonatais controle e tratado com fluoxetina nas dosagens de 10 e 20mg/kg do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade.

Figura 3A: Parênquima testicular de rato tratado com 10mg/Kg de fluoxetina. Observar túbulos seminíferos em corte transversal (TS); Cordões seminíferos (seta). Aumento de 100X.

Figura 3B: Detalhe de túbulo seminífero (TS) de rato tratado com 10mg/Kg de fluoxetina em processo de luminação. Notar presença de células germinativas em apoptose (seta). Aumento 400X.

Figura 3C: Parênquima testicular de ratos tratados com 20mg/Kg de fluoxetina. Observar túbulos seminíferos luminados (TS) e em processo de formação do lúmen (seta). Aumento 100X.

Figura 3D: Detalhe de túbulo seminífero luminado do grupo tratado com 20mg/Kg de fluoxetina; Túbulos seminíferos em processo de formação do lúmen. Aumento de 400X.

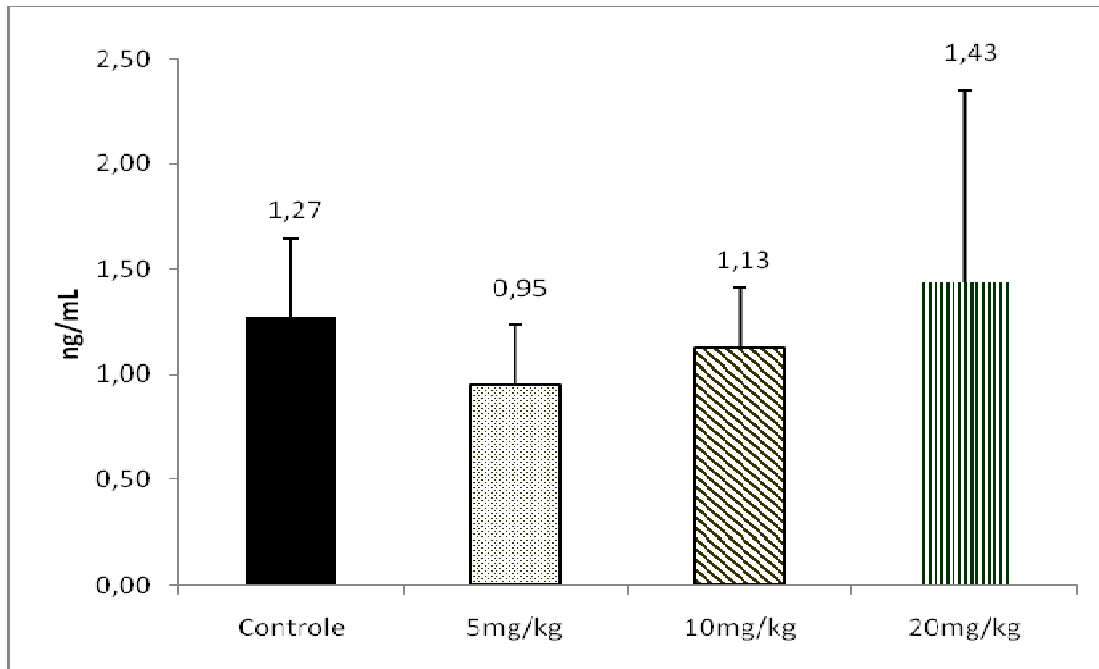


Figura 4. Valores médios e desvios-padrão da concentração plasmática de testosterona (ng/mL) de ratos Wistar neonatais controle e tratados com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 21 dias de idade.

Avaliação dos efeitos do cloridrato de fluoxetina via transplacentária e leite materno em parâmetros testiculares de ratos Wistar adultos.

MONTEIRO FILHO, W.O.; FALCÃO, H.R.; TORRES, S.M.; MANHÃES-DE-CASTRO, R;
SILVA JÚNIOR, V.A.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

Autor para correspondência:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Área de Histologia

E-mail: vajunior@dmfa.ufrpe.br

Fone (081) 33206390 / (081) 99898246

RESUMO

O propósito deste estudo foi a avaliação dos efeitos do cloridrato de fluoxetina via transplacentária e leite materno em parâmetros testiculares em ratos wistar adultos. A droga foi administrada via transplacentária e leite materno através da aplicação de solução de fluoxetina nas mães dos animais desde o 13^o dia de gestação até o 21^o dia de vida dos mesmos. Trinta e quatro animais foram distribuídos em grupos de acordo com o tratamento utilizado: I) Controle tratado com água deionizada (n=9); II) tratado com 5mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=8); III) grupo tratado com 10mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=8); IV) grupo tratado com 20mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=9). Aos 90 dias, os animais foram anestesiados e perfundidos intracardiacamente com solução fixadora. Foram removidos para pesagem o epidídimo, próstata, glândula seminal e testículos. Os testículos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato. Cortes histológicos de 4µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados histometricamente. Observou-se redução média em torno de 17% do volume do epitélio seminífero nos animais tratados com maior dose e redução de 29,5% no volume total das células de Leydig nos animais tratados com 5 e 20mg/Kg de cloridrato de fluoxetina. No comprimento total de túbulos seminíferos ocorreu uma redução significativa nos animais tratados com 20mg/Kg em relação ao grupo tratado com 5mg. De acordo com os resultados observados o contato fetal e neonatal com fluoxetina, no período crítico de proliferação das células de Sertoli influenciou no desenvolvimento somático dos animais e ocasionou alterações em parâmetros testiculares, tais como o peso de epidídimo e glândula seminal, volumetria do epitélio seminífero, volumetria total das células de Leydig, comprimento total dos túbulos seminíferos e uma tendência (não significativa) na produção espermática por testículo. Ainda que a fluoxetina tenha interferido na volumetria das células de Leydig os resultados não apontam nenhuma alteração nos níveis de testosterona e da espermatogênese. A maior parte das alterações estão relacionadas ao grupo tratado com a maior dosagem do antidepressivo, 20mg/Kg, inferindo que nessa dosagem a fluoxetina pode, de fato, causar alterações no desenvolvimento somático e do aparelho reprodutivo.

Palavras-chave: Fluoxetina, serotonina, células de Sertoli, testículo.

ABSTRACT

The aim of this study was the evaluation of the effects of fluoxetine chlorhydrate administrated through transplacental and breast milk ways on adult Wistar rats. The drug was administrated transplacental way and breast milk through application of fluoxetine on its mothers since thirteenth day of pregnancy until the twentieth-first day of the newborns. Thirty four animals were arranged according to different treatments: I) Control group treated with deionized water (n=9); II) treated with 5 mg/Kg of fluoxetine chlorhydrate (n=8); III) treated with 10 mg/Kg of fluoxetine chlorhydrate (n=8); IV) treated with 20 mg/Kg of fluoxetine chlorhydrate (n=9). To ninety days, animals were anesthetized and intracardially perfused with fixative solution. Epididymis, prostate, seminal gland and testis were extracted for weightening. Furthermore testis were routinely processed for inclusion with plastic glycol methacrylate resin. Histological sections with 4 μ m thickness were stained with toluidine/sodium borate to 1% and analyzed histometrically. Was observed an average reduction around 17% in seminiferous epithelium volume of animals treated with the highest dosage, was also noticed a reduction of 29,5% in Leydig cell volume amongst animals in the groups 5 mg/Kg and 20 mg/Kg fluoxetine chlorhydrate. In the total seminiferous tubule length occurred a significant reduction in treated animals with 20 mg/Kg in comparison with the group treated with 5 mg/Kg. According to the results the fetal and neonatal contact with fluoxetine chlorhydrate by transplacental way and breast milk on critical period of Sertoli cell proliferation influenced on somatic development of subjects and altered testicular patterns, as the epididymis and seminal gland weight, seminiferous epithelium volume, total Leydig cells volume, total seminiferous tubules length and a tendency (no-significant) in the testicle spermatogenic production. Though fluoxetine had interfered with the Leydig cell volumetry, the results did not point any alteration on testosterone levels as well as with spermatogenesis. Most of the alterations are associated to the group treated with the highest dose of antidepressant, 20mg/Kg, showing that, at this dosage, the fluoxetine can cause alterations in somatic and reproductive development.

Key words: Fluoxetine, serotonine, Sertoli cell , testis.

Introdução

A depressão é uma desordem mental comum, onde o indivíduo pode apresentar alterações de humor, perda de interesse em diversas áreas da vida, sentimentos de culpa ou baixa auto-estima, além de alterações no sono ou apetite e problemas de concentração (WHO, 2008).

Hoje em dia a depressão ocupa o segundo lugar no DALY ou YLD (Disability Adjusted Life Years ou Years Lived with Disability) entre os indivíduos de 15 a 44 anos de ambos os sexos, sendo estimado que em 2020 este distúrbio, ainda sem causas bem definidas, seja a segunda maior causa de incapacitação em indivíduos de todas as idades (WHO, 2008).

De acordo com a organização mundial de saúde (2008), aproximadamente 121 milhões de pessoas sofrem de depressão no mundo, aproximadamente 1 milhão de brasileiros consomem antidepressivos por dia sendo um quarto desse número consumidores de fluoxetina (Athayde, 2007)

Durante a gestação, a depressão clínica ocorre em 10 a 15% das mulheres, enquanto a depressão pós-parto ocorre entre 10 a 22% das mulheres. Esta condição pode colocar em risco tanto a mãe quanto o feto, além do que existem fortes evidências de efeitos adversos da depressão pós-natal materna sobre o desenvolvimento cognitivo, motor e desenvolvimento emocional dos neonatos (Kim et al., 2005).

É importante conhecer a extensão da transferência de drogas pelo leite humano com o objetivo de testar a segurança da amamentação no caso de ingestão de droga pela mãe. Distúrbios depressivos são comuns tanto durante o período pré-natal quanto nos meses iniciais após o nascimento, depressão pós-parto. Fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, é largamente utilizado no tratamento da depressão neste período. A droga é metabolizada para norfluoxetina que em humanos tem uma vida média plasmática prolongada, em torno de 15 dias, e potência similar ao inibidor de recaptação de serotonina (Kristensen et al., 1999).

Fluoxetina e norfluoxetina são componentes altamente solúveis em lipídeos, portanto capazes de cruzar a barreira placentária, como também serem excretados pelo leite. Além disso, a meia-vida longa deste fármaco sugere riscos de acúmulo nos fetos e nos neonatos, principalmente através da ingestão do leite materno (Heikkinen et al., 2003). Em ratas gestantes foi comprovado que a fluoxetina e norfluoxetina atravessam a barreira placentária e se distribuem dentro do embrião/feto durante os períodos de organogênese e pós-organogênese (Pohland et al., 1989). A transferência de fluoxetina e norfluoxetina através do leite materno de ratas vem sendo utilizada para estudar os efeitos deste ISRS e seu derivado N-metilado, norfluoxetina, em ratos neonatos (Pereira et al., 2007).

Evidências farmacológicas demonstraram que a elevação cerebral dos níveis de 5-HT afetou a secreção de FSH (Hormônio folículo estimulante) e hormônio luteinizante (LH) por inibir a liberação de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina) no hipotálamo, com subsequentes efeitos sobre o processo espermatogênico e esteroidogênese em ratos adultos (Urry e Dougherty, 1975; Naumenko e Shishkina, 1978; Das et al., 1982, 1985)

Em ratos neonatos, níveis adequados de FSH são cruciais para o estabelecimento da população de células de Sertoli, a qual está diretamente relacionada com o tamanho do testículo e a produção espermática (França et al., 2000). Silva Junior et al. (2008) observaram que a administração intra-peritoneal (IP) neonatal de fluoxetina em ratos Wistar reduziu o

peso testicular, população de células de Sertoli e comprimento total de túbulos seminíferos. Por outro lado, o acesso dos neonatos a fluoxetina e norfluoxetina ocorre através do leite materno (Pereira et al., 2007).

A diferenciação morfológica testicular em ratos ocorre entre 12º e 13º de gestação, com a formação dos cordões testiculares. A partir deste momento até o período perinatal se observa uma intensa proliferação de células de Sertoli, porém estas células tendem a reduzir seu índice mitótico do nascimento até o 16º dia pós-natal quando se inicia a formação da barreira hemato-testicular e início do aparecimento do lúmen nos cordões testiculares (Orth, 1993; Gondos e Berndtson, 1993). É importante considerar que o período pré-natal é fundamental para definição da população de células de Sertoli, por conseguinte a manipulação do sistema serotoninérgico durante o período de organogênese e pós-organogênese testicular em fetos, via placentária, nos daria subsídios a respeito das prováveis conseqüências da utilização de ISRS durante a gestação sobre o desenvolvimento testicular. Para tal, o presente experimento se propõe a estudar os efeitos da administração de fluoxetina em ratos do 13º de gestação até o 21º dia pós-natal sobre parâmetros morfológicos e morfométricos do testículo de ratos adultos.

Animais, manipulações farmacológicas e desenho experimental.

Inicialmente foram utilizadas 20 ratas gestantes Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), as quais foram mantidas em ciclo claro/escuro de 12h com controle de umidade (50%) e temperatura (22°C), obtidos do biotério da Área de Fisiologia do DMFA/UFRPE. Com a finalidade de compor os grupos de tratamento, a partir do 13º dia de gestação as ratas passaram a receber, via sonda orogástrica (gavagem), solução de fluoxetina diluída em água deionizada de acordo com o seguinte protocolo: I) Controle =Água deionizada (n=5); II) tratado com 5 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=5); III) grupo tratado com 10 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (N=5); III) grupo tratado com 20 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (N=5).

As doses foram calculadas levando-se em consideração o peso vivo do animal (NOWAKOWSKA et al., 1997; MATUSZCYK et al., 1998; GANDARIAS et al., 1999; FRANK et al., 2000). Após o parto das fêmeas pertencentes ao mesmo grupo de tratamento, foi feita a sexagem dos neonatos e os ratos machos foram escolhidos aleatoriamente para composição dos seguintes grupos: I) Controle = Água deionizada (n=9); II) tratado com 5 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=9); III) grupo tratado com 10 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=8); IV) grupo tratado com 20 mg/Kg de cloridrato de fluoxetina (n=9).

Os ratos neonatos machos permaneceram com suas mães, as quais continuaram a receber o mesmo tratamento preconizado durante a gestação, para que os neonatos continuassem a receber o inibidor seletivo da recaptção de serotonina, fluoxetina, via leite materno durante os primeiros 21 dias pós-natal. Os animais dos grupos de tratamento (6 por caixa) permaneceram com as mães em caixas individuais até 21 dias após o nascimento. A pesagem dos animais foi feita diariamente durante os primeiro 21 dias do experimento e após o desmame, semanalmente, para acompanhamento da curva de peso corporal até 90 dias pós-natal. As mães receberam ração peletizada, com níveis nutricionais adequados e água *ad libitum* durante o período de aleitamento. Após o desmame cada grupo foi dividido em lotes de seis animais por caixa e começaram a receber ração peletizada, com níveis nutricionais adequados e água *ad libitum* até o final do experimento.

Processamento Histológico e Histometria Testicular

Aos 90 dias de idade, os ratos de cada grupo foram anestesiados, por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50mg/kg), heparinizados (125UI/100g de peso corporal) e submetidos à perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9% acrescida de heparina sódica (500 UI/litro). Após a lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4. Os testículos e epidídimos foram removidos, pesados em balança digital modelo Kern 410 com precisão de quatro de casas decimais. De cada animal, um dos testículos foi utilizado para as análises microscópicas. Para tal, fragmentos com até 2mm de espessura foram re-fixados em glutaraldeído a 4%, em tampão fosfato (0,01M - pH 7,4), por duas horas, a 5° C.

Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato. Foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura em micrótomo rotativo de lâmina de vidro, corados em azul de toluidina/borato de sódio e analisados em microscópio Olympus binocular modelo BX-51.

A análise histométrica dos testículos, determinação do número de células de Sertoli e o cálculo da produção espermática diária estimada através da histologia quantitativa dos testículos foram executadas de acordo com metodologia descrita por Silva Junior et al. (2006) e Moraes et al. (2009).

As proporções volumétricas dos constituintes do parênquima testicular foram estimadas a partir 6615 pontos por animal, utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 400x. O testículo pode ser dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lume; enquanto no segundo foram investigados as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea e do mediastino testicular. Como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04); França (1992), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. O peso líquido do testículo em ratos foi determinado pela redução de 6,5% do peso bruto referente ao somatório do percentual de peso da albugínea e mediastino alocados ao testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1995).

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas utilizando-se régua micrométrica (Olympus, modelo U-OCMSQ10/10) adaptada a uma das oculares de 10x e acoplada à objetiva de 10x, proporcionado aumento de 100x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurado a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas. O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo expresso em metros foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI, 1974):

$$CT = \frac{VTS}{\pi R^2}$$

VTS = Volume total de túbulos seminíferos;

πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2)

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio VII do ciclo, classificado de acordo com o método acrossômico RUSSELL et al. (1990) foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas no mínimo 10 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados: espermatócitos I, na fase de preleptóteno/ leptóteno (SPT I Pl/L); espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P); espermátides arredondadas (SPD Ar); nucléolo de células de Sertoli.

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almqvist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM^2}{2}\right) - \left(\frac{DM^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nuclear médio (D.M.) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de uma régua micrométrica Olympus (modelo U-OCMSQ10/10) adaptada a uma das oculares de 10x e acoplada à objetiva de 100x, propiciando um aumento final de 1000x. No caso das espermatogônias do tipo A que apresentam núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico, em virtude disto, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente. Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli nos animais tratados e controle, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e entre estes números e o número de células de Sertoli no estágio VII do ciclo. As seguintes razões foram obtidas: espermátides arredondadas: nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se o índice de célula de Sertoli que mede a eficiência desta célula; número total corrigido de células germinativas: nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se a capacidade total de suporte da célula de Sertoli.

A estimativa do número de células de Sertoli por testículo foi realizada a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hoehrau-de Reviere e Lincoln (1978):

$$\text{Número CS / Testículo} = \frac{\text{Comp. Tot. Tub. Sem.} \times \text{Num. Cor. Nucl. CS / Sec. Transv.}}{\text{Espessura do Corte}}$$

Onde, Número CS Testículo = Número de células de Sertoli por testículo; Comp. Tot. Tub. Sem. = Comprimento total de túbulos Seminíferos (μm); Num. Cor. Nucl. CS Sec. Transv. = Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal; Espessura do corte (μm). A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Jr. et al. (2006):

$$\text{PED} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Total CS / Testículo} \times \text{N}^\circ \text{ AR} \times \text{Freq. R el. Est. VII}}{\text{Duração do Estágio VII}}$$

Onde, PED = produção espermática diária; N° Total CS Testículo = Número total de células de Sertoli por testículo; Prop. AR = Proporção de espermátides arredondas no estágio VII; Freq. Rel. Est. VII = frequência relativa do estágio VII; Duração do estágio (dias).

Dosagem de Testosterona

Amostras de sangue foram obtidas por punção no seio venoso da veia cava de animais previamente heparinizados (125UI/100g), em recipiente sem anticoagulante. Após colheita, as amostras de sangue foram centrifugadas e separadas o plasma sanguíneo para armazenamento (-20°C) e posterior análise da concentração de testosterona. Após descongelação, as amostras foram analisadas em duplicata através do teste de Elisa (Brown et al., 2004) e o resultado expresso em ng/mL.

Análise Estatística

Dependendo da tendência normal dos resultados obtidos, utilizou-se testes paramétricos ou não paramétricos. Para os dados considerados normais foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações, visando analisar quais grupos diferiram entre si. Caso os dados não seguissem uma tendência normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn. Em todas as análises realizadas, os dados foram expressos através de estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

No presente experimento não se observou diferença significativa no peso corporal final entre os grupos controle e tratados com diferentes doses de cloridrato de fluoxetina. Contudo, nos animais que receberam 5mg/kg constatou-se aumento do peso corporal em relação àqueles que receberam a maior dose via transplacentária e leite materno (Tabela 2). Por outro lado, é conveniente salientar que neste experimento a administração do antidepressivo foi feita a partir do 13º de gestação até o 21º dias pós-natal e a avaliação feita aos 90 dias de idade. Silva Junior et al. (2008) observaram redução do peso corporal após tratamento com fluoxetina durante 21 dias pós-natal. Estudos anteriores utilizando citalopram e fluoxetina, administrados via subcutânea durante o período citado anteriormente, reduziu a curva de ganho de peso nos animais (Deiró et al., 2004; Mendes da Silva et al., 2002). Este efeito pode ser atribuído à ação inibitória da serotonina sobre a ingesta alimentar (Simansky, 1996), muito embora, tenha sido relatado por Morrison et al., (2005) uma redução na altura das vilosidades intestinais causada pela administração de inibidores seletivos da recaptura de serotonina o que reduziria a absorção de nutrientes. Apesar deste fenômeno de redução de ganho de peso ter sido bem relatado no período crítico de desenvolvimento pós-natal em ratos, a interrupção do tratamento parece influenciado na recuperação do peso dos animais, uma vez que, não se observou diferença nos pesos dos animais no presente experimento (Figura 1; Tabela 1).

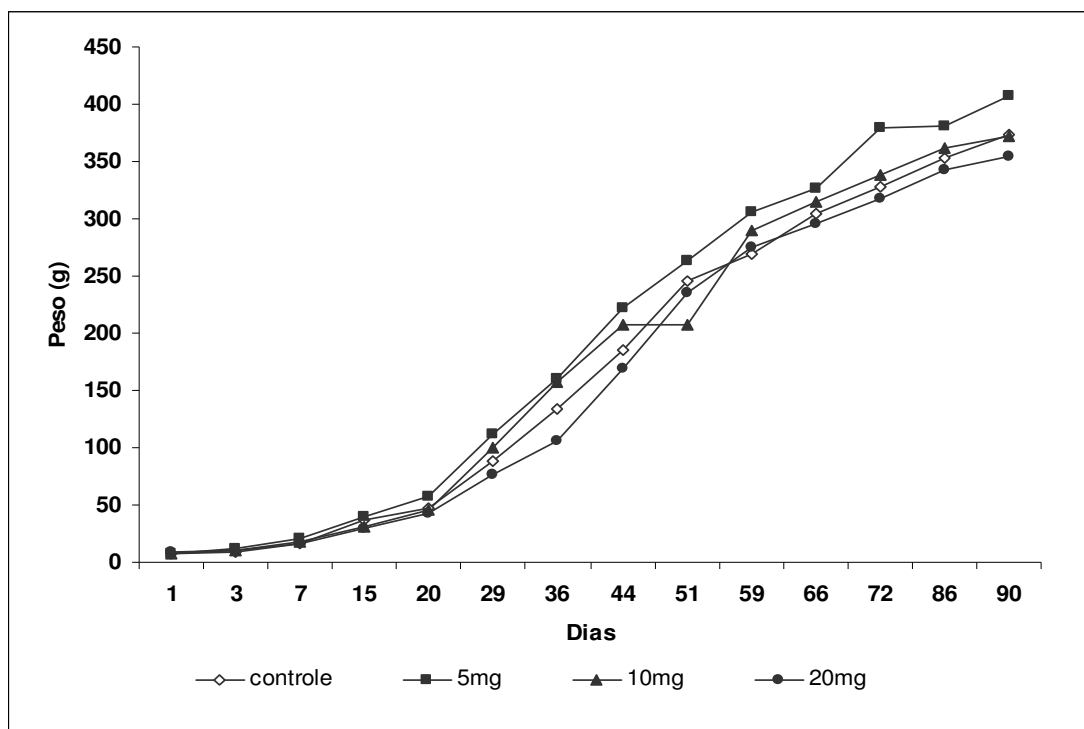


Figura 1 – Desenvolvimento ponderal ao longo dos 90 dias pós-natal dos animais do grupo controle e tratados com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal.

TABELA 1–Desenvolvimento ponderal dos animais do grupo controle e tratados com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal e avaliado aos 90 dias.

Peso (g)	<i>Controle</i>	5mg/Kg	10mg/Kg	20mg/Kg	P
	(n=09)	(n=08)	(n=08)	(n=09)	
1º dia	7,12 ± 1,08	7,60 ± 0,49	7,37 ± 1,20	8,11 ± 0,97	0,2448
3º dia	8,84 ± 1,73a	11,26 ± 0,82b	10,25 ± 1,74ab	10,66 ± 1,74ab	0,0283
7º dia	15,75 ± 3,44ac	20,01 ± 2,14b	18,09 ± 2,43abc	16,10 ± 2,41c	0,0115
15º dia	37,00 ± 1,79a	40,39 ± 4,35ac	30,92 ± 4,35b	29,20 ± 3,04b	0,0001
20º dia	47,55 ± 5,27ac	57,30 ± 5,14b	45,41 ± 6,57ac	42,77 ± 5,36c	0,0001
29º dia	88,94 ± 13,62acd	112,06 ± 10,90bd	100,58 ± 9,24d	76,56 ± 6,36c	0,0001
36º dia	134,50 ± 17,12ac	160,75 ± 16,57cd	157,31 ± 16,24bd	105,56 ± 9,92b	0,0001
44º dia	186,00 ± 27,32acd	222,00 ± 31,41bd	207,43 ± 21,70db	169,80 ± 17,62c	0,0014
51º dia	245,25 ± 29,84a	263,75 ± 28,16a	207,63 ± 21,70b	234,70 ± 11,02ab	0,0007
59º dia	268,50 ± 34,89a	305,63 ± 28,82b	290,13 ± 17,89ab	274,74 ± 17,29ab	0,0345
66º dia	304,25 ± 33,52	326,00 ± 32,45	314,38 ± 34,69	295,25 ± 21,42	0,2465
72º dia	328,50 ± 35,33ac	379,50 ± 48,17b	338,63 ± 24,77abc	318,00 ± 31,68c	0,0110
86º dia	352,50 ± 37,38	381,25 ± 47,41	361,50 ± 25,16	340,75 ± 42,10	0,2247
90º dia	353,00 ± 21,70acd	407,38 ± 49,63bc	371,75 ± 34,44abcd	343,89 ± 35,58d	0,0062

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa.

Pesos do Testículo, Epidídimo, Próstata, Glândula Seminal e Índice Gonadossomático(IGS)

O peso testicular dos animais tratados com a dose de 20mg/Kg desde o 13º dia gestacional até o 21º dia pós-natal e avaliado aos 90 dias teve redução média de 15% (Tabela 2). Entretanto, essa redução de peso não foi significativa em relação aos demais grupos experimentais.

O peso testicular dos animais tratados com a maior dose durante os primeiros 21 dias pós-natal e avaliado aos 90 dias teve redução média de 15% (Tabela 2). Entretanto, a redução de peso não foi significativa em relação aos demais grupos experimentais. De acordo com França e Russell (1998) o peso testicular é um parâmetro morfométrico com correlação direta e positiva com outros parâmetros testiculares como comprimento total de túbulos seminíferos, população de células de Sertoli, produção espermática. É importante salientar também que, o testículo apresenta um rápido crescimento durante o período fetal e neonatal; contudo cada população celular se expande em diferentes fases sob a influência de diferentes fatores sejam eles de origem extra ou intra-testicular. Em ratos, este dois períodos são de grande

importância para o estabelecimento do tamanho final do testículo e da produção espermática no adulto (Orth, 1993). A célula de Sertoli apresenta um período proliferativo que se estende desde o momento de diferenciação do testículo na vida embrionária até o estabelecimento da puberdade, na maioria das espécies (Gondos e Berndston, 1993). Portanto, durante este período a população de células de Sertoli é estabelecida e com isso parâmetros como peso testicular, comprimento de túbulos seminíferos e produção espermática no indivíduo adulto (Silva Junior et al., 2006; Silva Junior et al., 2008).

No que diz respeito ao peso epididimário dos animais submetidos a maior dosagem do ISRS observou-se redução extremamente significativa ($p=0,0006$). No peso da glândula seminal, por sua vez, constatou-se redução extremamente significativa ($p=0,0004$) nos animais tratados com o ISRS em relação ao grupo controle. Por outro lado, a próstata e o IGS não sofreram influência da fluoxetina veiculada transplacentariamente e leite materno (Tabela 2).

Tabela 2. Peso corporal, peso testicular, epididimário, prostático, da glândula seminal e índice gonadossomático dos animais tratados com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal com fluoxetina e avaliados aos 90 dias.

Parâmetros	<i>Controle</i>	5mg/Kg	10mg/Kg	20mg/Kg	P
	(n=08)	(n=08)	(n=08)	(n=08)	
Peso Corporal (g)	353,00 ± 21,70 ^{acd}	407,38 ± 49,63 ^{bc}	371,75 ± 34,44 ^{abcd}	343,89 ± 35,58 ^d	0,0062
Peso Testicular (g)	1,73 ± 0,17	1,71 ± 0,14	1,70 ± 0,16	1,45 ± 0,28	0,0789
Epidídimo (g)	0,61 ± 0,09 ^{acd}	0,58 ± 0,07 ^{acd}	0,56 ± 0,07 ^{acd}	0,44 ± 0,08 ^b	0,0006
Glândula Seminal (g)	1,78 ± 0,13 ^a	1,33 ± 0,25 ^b	1,24 ± 0,08 ^b	1,46 ± 0,17 ^b	0,0004
Próstata (g)	1,30 ± 0,42	1,58 ± 0,38	1,70 ± 0,46	1,53 ± 0,11	0,1601
IGS	0,49 ± 0,07	0,42 ± 0,05	0,46 ± 0,06	0,42 ± 0,06	0,0810

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$); IGS (%) = Índice Gonadossomático. Média ± desvio padrão

Histometria Testicular

Na tabela 3 podemos observar os dados referentes aos parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar controles e submetidos a diferentes doses de fluoxetina via transplacentária e leite materno aos 90 dias de idade. O percentual volumétrico de túbulos seminíferos que ocupa o parênquima testicular em ratos é de 89%, o qual está diretamente correlacionado com o peso líquido do testículo, volume de túbulos seminíferos, epitélio seminífero, comprimento total de túbulos seminíferos e produção espermática (Russell e França, 1995; França et al., 2005). O compartimento tubular no

testículo é composto pela túnica própria, epitélio germinativo (células de Sertoli e germinativas) e lume tubular. Dentre estes parâmetros notou-se redução significativa ($p=0,0212$) no volume de epitélio seminífero nos animais que receberam a maior dosagem de fluoxetina através da placenta e leite materno. Esta redução observada no epitélio justifica, pelo menos em parte, a tendência de redução observada em parâmetros como peso testicular bruto, líquido ($p=0,0789$) e volume de túbulos seminíferos ($p=0,0659$).

No presente trabalho, observou-se que a manipulação neonatal do sistema serotoninérgico no período crítico do desenvolvimento testicular alterou o volume do epitélio seminífero nos animais tratados com a dose de 20mg/Kg de fluoxetina com redução média deste parâmetro em torno de 17%. Estes resultados corroboram os achados de De Sá (2009, dados não publicados). O autor citado anteriormente manipulou o sistema serotoninérgico de ratos neonatos durante os primeiros 21 dias pós-natal, utilizando fluoxetina, e analisou morfometricamente o testículo aos 150 dias de idade. O mesmo obteve redução significativa do volume de túbulos seminíferos. Vale ressaltar que no trabalho realizado por De Sá(2009, dados não publicados) a redução foi em torno de 13,42% no volume de túbulos seminíferos e os animais neonatos receberam fluoxetina via intra-peritoneal durante 21 dias pós-natal. No presente experimento a maior redução do volume de epitélio seminífero pode estar relacionada ao maior período de utilização do inibidor seletivo de recaptação de serotonina.

No compartimento intertubular foram contabilizados o volume total de células de Leydig, células do conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. Dentre estes componentes foi constatada redução de 29,5% no volume total das células de Leydig nos animais tratados com 5 e 20mg/Kg de cloridrato de fluoxetina. De acordo com De Sá (2009, dados não publicados) a administração pré-natal e pós-natal de fluoxetina reduziu o volume total das células de Leydig em ratos neonatos aos 21 dias pós-natal. Com os resultados do presente experimento pode-se constatar que os efeitos do ISRS sobre a volumetria das células de Leydig nos animais neonatos perdurou nos animais adultos.

As células de Leydig constituem-se na fonte de andrógenos testiculares que são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol. Baseado em inúmeros trabalhos realizados em diferentes laboratórios pode-se observar diferenças na população de células de Leydig por grama de testículo, como também no volume da célula em várias espécies de mamíferos (EWING e KEENEY, 1993, SILVA JUNIOR e FRANÇA, 2001). Além disso, França et al. (2005) relacionaram a quantidade e o tamanho das células de Leydig, bem como o volume do retículo endoplasmático a capacidade destas células quanto a produção de testosterona. Portanto, de acordo com os nossos resultados é provável que a manipulação do sistema serotoninérgico com o ISRS durante o período fetal e neonatal do desenvolvimento

testicular, que promoveu a redução volumétrica total das células de Leydig nos animais adultos, tenha repercussões na população total de células de Leydig. Por outro lado, de acordo com os níveis séricos de testosterona apresentados na figura 2 ($P = 0,0397$) não se observou diferença entre os grupos controle e tratados com ISRS, porém entre os grupos tratados com 10 e 20 mg de fluoxetina se constatou aumento de 59% dos níveis séricos nos animais tratados com a maior dose de fluoxetina em relação aos tratados com 10mg/Kg.

Em ratos a população de células de Leydig é definida em um período diferente daquele observado nas células de Sertoli. Após a puberdade o número de células intersticiais ou de Leydig aumenta linearmente possuindo correlação direta e positiva com as células germinativas, estabelecimento da espermatogênese e definição da produção espermática (França et al., 2000). Por outro lado, a redução volumétrica da população de células de Leydig parece não ter afetado o processo espermatogênico nos animais tratados com 20mg/kg, uma vez que, de acordo com os dados presentes na tabela 3 não se observou qualquer alteração numérica na população de células de Sertoli, tão pouco na população de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero (Tabela 4). Além disso, após avaliação qualitativa do processo espermatogênico não se observou qualquer alteração digna de nota entre os animais tratados e controle em consequência do protocolo de tratamento com fluoxetina empregado no período pré e pós-natal descrito no presente experimento (Figura 3). Os dados de testosterona também justificam a ausência de alterações morfológicas e quantitativas do processo espermatogênico

Tabela 3. Parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal com fluoxetina e avaliados aos 90 dias. (média \pm desvio padrão).

Parâmetros					<u>P</u>
	<u>Controle</u> (n=09)	5mg/Kg (n=08)	10mg/Kg (n=08)	20mg/Kg (n=09)	
Peso Líquido (μL)	1615,21 \pm 162,80	1594,93 \pm 134,20	1584,77 \pm 147,60	1359,70 \pm 259,40	0,0789
Túbulo Seminífero	1409,56 \pm 142,80	1411,19 \pm 121,30	1386,11 \pm 102,90	1195,55 \pm 223,4	0,0659
Epitélio Seminífero	1215,51 \pm 122,60a	1233,32 \pm 93,14a	1223,39 \pm 105,80a	1012,15 \pm 179,2b	0,0212
Lume (μL)	152,00 \pm 33,04	138,30 \pm 41,16	125,90 \pm 27,10	149,60 \pm 63,26	0,6460
Túnica Própria (μL)	42,95 \pm 12,52	39,57 \pm 5,19	36,83 \pm 9,63	33,81 \pm 7,98	0,2189
Leydig (μL)	22,14 \pm 3,60a	15,60 \pm 3,65b	22,56 \pm 10,57ab	15,56 \pm 4,08b	0,0091
Conjuntivo (μL)	11,47 \pm 4,67	13,14 \pm 4,22	11,67 \pm 3,36	9,64 \pm 3,30	0,3525
Vaso Sanguíneo (μL)	6,56 \pm 4,61	13,74 \pm 4,88	13,00 \pm 9,11	11,39 \pm 4,04	0,0633
Espaço Linfático (μL)	163,75 \pm 15,97	141,26 \pm 35,42	151,41 \pm 58,30	127,56 \pm 35,11	0,1173

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

P = significância.

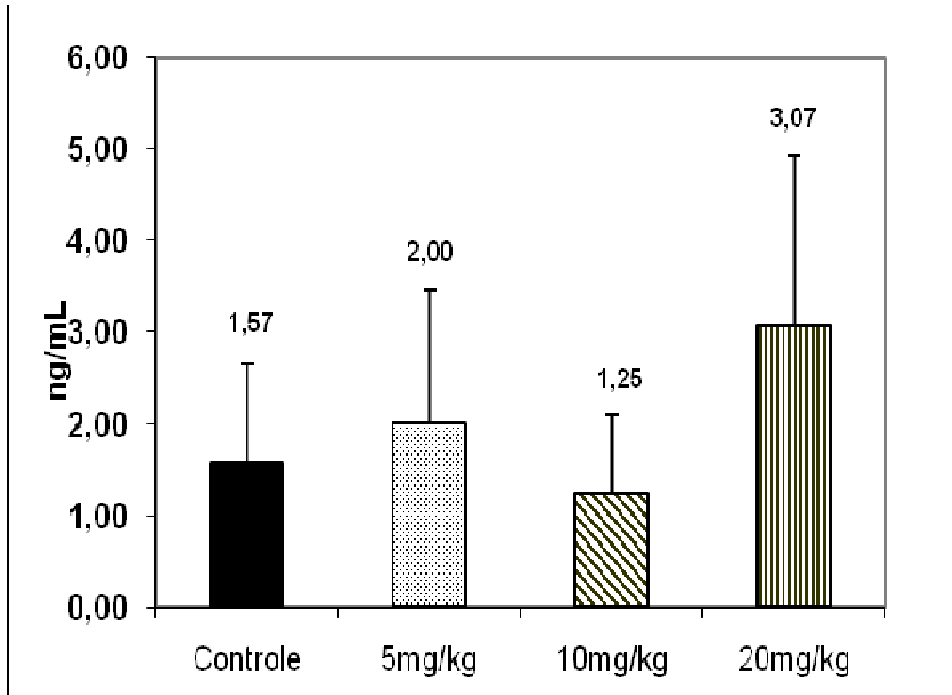


Figura 2. Valores médios e desvios-padrão da concentração plasmática de testosterona (ng/mL) de ratos Wistar neonatais controle e tratado com fluoxetina do 13° dia de gestação até o 21° dia pós-natal, via transplacentária e leite materno e avaliados aos 90 dias de idade

Tabela 4. População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero de ratos wistar controles e submetidos a diferentes doses de fluoxetina do 13° dia de gestação até o 21° dia pós-natal e avaliada aos 90 dias. (média \pm desvio padrão).

Parâmetros	Controle	5mg/Kg	10mg/Kg	20mg/Kg	P
	(n=09)	(n=08)	(n=08)	(n=09)	
Espermatogônia	<u>0,35 \pm 0,28</u>	0,40 \pm 0,18	0,64 \pm 0,59	<u>0,33 \pm 0,17</u>	0,5170
Núcleo Cel. Sertoli	7,45 \pm 1,84	7,16 \pm 1,28	6,92 \pm 1,47	7,23 \pm 2,06	0,9376
Pré-leptóteno	23,28 \pm 2,00	23,58 \pm 1,93	23,90 \pm 2,19	24,39 \pm 2,19	0,6453
Paquíteno	24,93 \pm 1,68	24,74 \pm 2,54	24,78 \pm 2,85	25,60 \pm 1,89	0,6255
Espermátide Arredondada	65,89 \pm 4,85	64,62 \pm 5,70	64,47 \pm 5,29	65,75 \pm 2,80	0,8911

Letras diferentes na mesma linha equivalem à diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). P = significância.

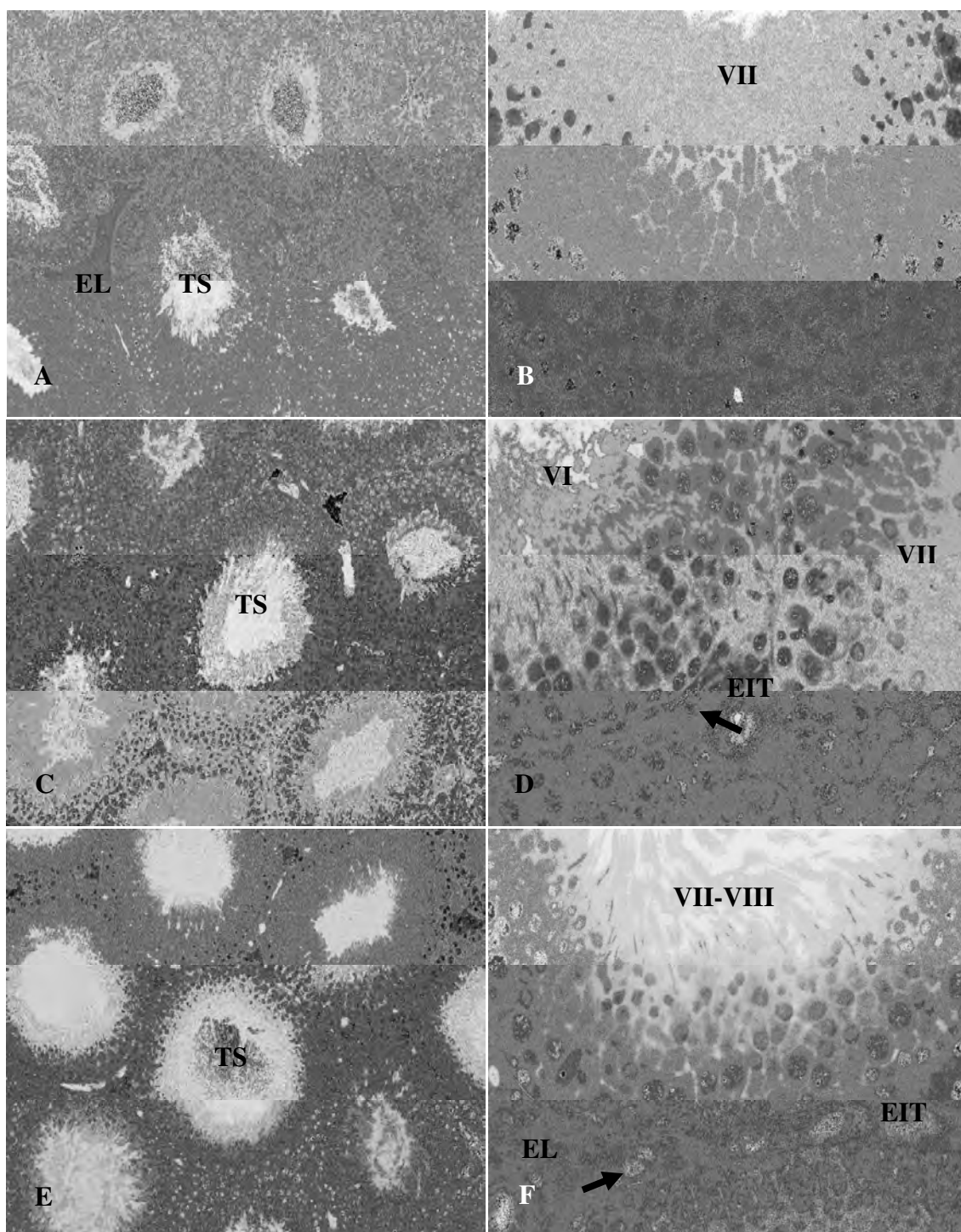


Figura 3: Fotomicrografia do testículo de ratos Wistar adultos controle e tratados com fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal, via transplacentária e leite materno, e avaliados aos 90 dias de idade. Figura 1A: Testículo de rato Wistar do grupo controle; (TS) túbulo seminífero em corte transversal; (EL) espaço linfático. Aumento de 100X. Figura 1B: Detalhe de túbulo seminífero em corte transversal no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (CES). Aumento 400X. Figura 1C: Parênquima testicular de rato tratado com 5mg/Kg de fluoxetina; (TS) Túbulo seminífero em corte transversal. Aumento de 100X. Figura 1D: Detalhe de 2 túbulos seminíferos nos estágio VI e VIII do CES de animal tratado com 5mg/Kg de fluoxetina; Espaço intertubular (EIT); Célula de Leydig (seta). Aumento de 400X. Figura 1E: Parênquima testicular de rato tratado com 10mg/Kg de fluoxetina; (TS) túbulo seminífero em corte transversal. Aumento de 100X. Figura 1F: Detalhe de túbulo seminífero entre o estágio VII e VIII do CES de rato tratado com 20mg/Kg de fluoxetina; (EL) espaço linfático; Célula de Leydig (seta). Aumento 400X.

Na tabela 5 podemos observar os valores referentes a parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli e produção espermática por testículo e por grama de testículo de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de fluoxetina.

No comprimento total de túbulos seminíferos ocorreu uma redução significativa nos animais tratados com 20mg em relação ao grupo tratado com 5mg. Este resultado nos mostra a relação direta que existe entre o volume de epitélio seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos. Estes parâmetros também possuem relação com o peso testicular, o qual por sua vez tem relação direta com a população de células de Sertoli e a produção espermática diária (Silva Junior et al., 2006). Torna-se importante salientar que na maior dosagem empregada se observou tendência de redução do peso testicular em 15% com valor de $p=0,0789$. A produção espermática diária por testículo (PED/ testículo) não sofreu redução estatisticamente significativa nos demais grupos experimentais. Entretanto, é digna de nota a tendência de redução deste parâmetro na ordem de 18% com valor de $p=0,0513$ nos animais tratados com 20mg/kg de fluoxetina (Tabela 5). Outros parâmetros como número de célula de Sertoli e espermátides arredondadas por secção transversal de túbulos seminíferos no estágio VII do C.E.S. não sofreram qualquer influência do tratamento pré e pós-natal com fluoxetina em dosagens crescentes. Isto também se estendeu para a capacidade de suporte das células de Sertoli, o ICS ou índice de células de Sertoli. A população total de células de Sertoli por testículo também não sofreu influência das diferentes doses de fluoxetina administradas durante o período citado anteriormente.

Tabela 5. Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli, produção espermática diária em testículo de ratos wistar controle e submetidos a diferentes doses de fluoxetina do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal e avaliados aos 90 dias. (média \pm desvio padrão).

Parâmetros	<u>Controle</u> (n=09)	5mg/Kg (n=08)	10mg/Kg (n=08)	20mg/Kg (n=09)	P
Peso Líq. do Testículo (mg)	1619,00 \pm 161,40	1594,93 \pm 134,20	1584,77 \pm 147,60	1359,70 \pm 259,40	0,0781
Diâmetro Tubular	344,67 \pm 24,73	334,33 \pm 25,25	343,67 \pm 22,42	346,89 \pm 29,53	0,7662
Altura do Epitélio Sertoli/secção transversal de túbulo seminífero	115,04 \pm 10,80	108,75 \pm 10,77	119,58 \pm 7,46	114,00 \pm 8,56	0,1937
SPDar/secção transversal	7,47 \pm 1,84	7,16 \pm 1,28	6,92 \pm 1,47	7,23 \pm 2,01	0,9376
ICS	65,89 \pm 4,85	64,62 \pm 5,70	64,47 \pm 5,29	65,75 \pm 2,80	0,8911
Comprimento Total de Túbulo Seminífero(m)	9,33 \pm 2,47	9,27 \pm 1,79	9,88 \pm 3,41	10,05 \pm 4,24	0,9750
Pop. Cel. Sertoli ($\times 10^7$)	15,34 \pm 2,58ab	16,29 \pm 2,61a	15,11 \pm 2,21ab	12,73 \pm 2,46b	0,0355
PED/Testículo ($\times 10^6$)	2,89 \pm 1,00	2,89 \pm 0,57	2,61 \pm 0,70	2,33 \pm 0,89	0,4130
PED/g/Testículo ($\times 10^6$)	19,01 \pm 3,88	19,57 \pm 2,51	18,25 \pm 3,17	15,62 \pm 2,69	0,0513
	11,69 \pm 1,81	12,30 \pm 1,62	11,58 \pm 2,26	11,66 \pm 1,96	0,8705

P = significância; ICS = Índice de célula de Sertoli; SPDar = espermátide arredondada.

De acordo com Silva Júnior et al. (2008), a manipulação do sistema serotoninérgico em ratos durante o período crítico do desenvolvimento testicular reduziu a população de células de Sertoli nos animais pré-puberes e os níveis de FSH. De acordo com a literatura, o esperado seria a redução de parâmetros morfométricos relacionados diretamente com esta população celular (França et al., 2000; França et al., 2005; Silva Junior et al., 2006) em indivíduos adultos. Contudo, o que se observou neste trabalho vai totalmente de encontro ao que é citado comumente na literatura. Provavelmente, após a retirada do inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS) e eliminação da fluoxetina e norfluoxetina, que nos animais neonatos é de aproximadamente 5 e 15 horas (Caccia et al., 1990), respectivamente, o testículo pode ter desenvolvido estratégias de adaptação, que promoveram a recuperação dos padrões morfométricos e celulares da espécie.

O FSH (Hormônio Folículo Estimulante) é o principal agente mitogênico responsável pela proliferação das células de Sertoli (Orth, 1982; Orth, 1984; Almiron e Chemes, 1988); portanto, níveis adequados deste hormônio são necessários para o estabelecimento do tamanho final do testículo e a produção espermática, uma vez que estas variáveis são controladas pela população de células de Sertoli durante o período crítico do desenvolvimento testicular (Orth, 1988; Orth, 1993). Entretanto, no experimento realizado por Silva Junior et al. (2008) a redução dos níveis de FSH e da população de células de Sertoli aos 21 dias pós-natal não se traduziu em redução de produção espermática em adulto e perda de eficiência da espermatogênese nos dados fornecidos por De Sá (2009), dados não publicados utilizando o mesmo protocolo de tratamento de Silva Junior et al. (2008). O que se observou foi uma recuperação dos parâmetros testiculares estando provavelmente relacionada a elevação nos níveis de FSH ao final do término do tratamento com o ISRS nos animais com 21 dias pós-natais e ao prolongamento do período de sensibilidade da célula de Sertoli a este hormônio. Contudo, deve-se levar em consideração que a administração de fluoxetina foi feita intraperitonealmente nos animais neonatos.

No presente trabalho a administração de fluoxetina seguiu o mesmo protocolo descrito por De Sá (2009), onde o autor administrou fluoxetina em fêmeas gestantes, por via oral a partir do 13º dia e em aleitamento até o desmame aos 21 dias pós-natal.

Quando os efeitos do ISRS foram avaliados logo após o término do aleitamento se observou redução no comprimento total de túbulos seminíferos, no volume de cordões/túbulos seminíferos, epitélios seminíferos e lume de túbulos seminíferos. Além do retardo na luminação dos túbulos seminíferos e redução no volume líquido de células de Leydig nos animais que receberam a maior dose de fluoxetina (De Sá, 2009). Contudo, quando os efeitos do ISRS foram avaliados em ratos adultos não se observou alteração de parâmetro

relacionados a população de células de Sertoli, produção espermática diária ou eficiência do processo espermato gênico.

As alterações observadas em neonatos que passaram por tratamentos similares ao realizado nesse estudo podem ter perdurado até a fase adulta, mostrando que o uso de ISRS durante o período crítico do desenvolvimento testicular tem repercussões em indivíduos adultos. Entretanto, ainda é cedo para considerar-mos elucidadas todas as relações entre o desenvolvimento do aparelho reprodutor e a manipulação do eixo HPG através de drogas antidepressivas, como os ISRS. Estudos mais elaborados, envolvendo a medição dos níveis hormonais e análise do comportamento sexual, devem ser realizados para uma melhor compreensão dos efeitos causados por drogas antidepressivas sobre a função sexual.

Conclusão

O tratamento com fluoxetina na dosagem de 20mg/Kg, no período pré-natal e pós-natal, provocou mudanças no desenvolvimento somático nos animais adultos ao final do experimento.

Outras alterações puderam ser constatadas nos animais que receberam 20mg/Kg de fluoxetina, via transplacentária e leite materno, tais como: redução do peso epididimário e da glândula seminal. A mesma dosagem reduziu a volumetria total das células de Leydig assim como a volumetria do epitélio seminífero e demonstrou tendência de redução na produção espermática diária. Entretanto, nas doses compreendidas entre 5 e 20mg/Kg não se constatou alterações nos níveis séricos de testosterona e na espermatogênese.

Por outro lado, o tratamento pré-natal e neonatal com dosagens até 20mg/Kg em ratos não produziu alterações qualitativas nem perda da eficiência do processo espermato gênico.

Referências

- ALMIRÓN, I., CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. **Int. J. Androl.**, v.11, p.235-246, 1988.
- AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal dairy Science.**, v.45, p.774-781,1962.
- ATHAYDE, P. Sofrer faz bem. **Carta na escola**, São Paulo, 18 set. 2007. Disponível em: <http://www.cartanaescola.com.br/edicoes/19/sofrer-faz-bem>. Acesso em: 14/05/2009.
- ATTAL,J.,COUROT, M. Developpement testiculaire et etablisement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v.3, p.219-241, 1963.

BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA, 2004. 93 p.

CACCIA S, CAPPI M, FRACASSO C, GARATTINI S. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. In: **Psychopharmacology**, 100 (4): 509-14, 1990.

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Spermatogenesis in rat: effect of L-tryptophan loading. **Andrologia**, v.14, p.242-249. 1982

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Effect of intraventricular injection of 5,6-dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in rat. **Journal of Endocrinology**, v.106, p.395-400, 1985.

DAS, T.K.; MAZUNDER, R.; BISWAS, N.M. Further evidence for an inhibitory effect of L-tryptophan loading on testicular functions of rat. **Andrologia**, v.18, p.618-623, 1986.

DEIRÓ, T.C.B.J.; MANHÃES DE CASTRO, R.; CABRAL FILHO, J.E.; SOUZA, S.L.; FREITAS, S.; FERREIRA, L.M.P.; GUEDES, R.C.A.; CÂMARA, C.R.V., BARROS, K.M.F.T. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Bio Res**, 37: 1503-1509, 2004

DE SÁ, **Influência da transferência de um inibidor seletivo da recaptação de serotonina via transplacentária e leite materno no desenvolvimento testicular neonatal em ratos Wistar**, Recife: UFRPE, DMFA, 2009. p.60. (No Prelo).

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatsh. Vet. Med.**, v.29, p. 650-652, 1974.

EWING, L.L.; KEENEY, D.S. Leydig cell: Structure and function. In: DESJARDINS, C.; EWING, L.L.; (eds). Cell and molecular biology of the testis. **New York. Oxford University Press. Cap. 7, p. 137-165. 1993.**

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300–318, 2005.

FRANÇA. L.R.; RUSSELL, L.D. Building a testis. **Tissue & Cell**, 27 (2), p. 129-147. 1995.

FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and sertoli cell index. In: International Congress on Animal Reproduction, 12th, 1992, Netherlands. **Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction**. Hague: Netherlands, 1992. p.1716-1718.

FRANÇA. L.R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: **Male reproduction; a multidisciplinary overview**. Ed. Madrid: Churchill ComUNICATIONS Europe España, 1998, cap 16, p.198-219.

FRANÇA, R.L.; SILVA JR, V.A.; CHIARINI-GARCIA, H.; GARCIA, S.K.; DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1629-1636, 2000.

FRANK, J.L.W.; HENDRICKS, S.E.; OLSON, C.H. Multiple ejaculations and chronic fluoxetine effects on male rat copulatory behaviour. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.66, p.337-342, 2000.

GANDARIAS, J.M.; ECHEVARRIA, E.; ACEBES, I.; ABECIA, L.C.; CASIS, O.; CASIS, L. Effects of fluoxetine administration on um-opiod receptor immunostaining in the rat forebrain. **Brain Research**, v.817, p.236-240, 1999.

GONDOS, B., BERNDSTON. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. cap. 4, p.115-154.

HEIKKINEN, T.; EKBLAD, U.; PALO, P.; LAINE, K. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. **Clin. Pharmacol. Therap.** v.71, n. 4, p. 330-337, 2003.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal Reproduction and Fertility**, v.54, p.209-213, 1978.

KIM, J.; RIGGS, K.W.; MISRI, S.; KENT, N.; OBERLANDER, T.F.; GRUNAU, R.E.; FITZGERALD, C.; RURAK, D.W. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetina during pregnancy and breast-feeding. **British J. Clin Pharmacol.**, v.62, p.155-163, 2005.

KRISTENSEN, J.H., ILETT, K.F.; HACKTETT, L.P.; YAPP, P.; PAICH, M.; BEGG, E.J. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetina concentrations in human milk. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 48, p. 521-527, 1999.

MATUSZCYK, J.V.; LARSSON, K.; ERIKSSON, E. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v.60, p.527-532, 1998.

MENDES DA SILVA, C.; SOUZA, S.L.; BARRETO MEDEIROS, J.M.; FREITAS-SILVA, S.R.; ANTUNES, D.E.C.; CUNHA, A.D.U.; RIBAS, V.R.; FRANÇA, M.F.S.; NOGUEIRA, M.I.; MANHÃES DE CASTRO, R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr**, 60(4): 928-931, 2002.

MORAES, T.A.P., JASSET, P.F., TORRES, S.M., MORAES, A.V., SILVA JÚNIOR, V.A., GUERRA, M.M.P. Efeito do uso de pentoxifilina no período neonatal sobre a produção espermática em ratos Wistar adultos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p.80-87, 2009.

MORRISON, J.L.; RIGGS, K.W.; RURAK, D.W.. Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. **Reprod Fertil Dev**. 2005;17(6):641-50.

NAUMENKO, E.V.; SHISHKINA, G.T. Role of serotonin in feedback control of hypothalamic-pituitary-testicular complex in male rat. **Neuroendocrinology**, v.26, p.359-366, 1978.

NOWAKOWSKA, E.; KUS, K.; CHODERA-OTUSZEWSKA, R. Behavioural effects of two antidepressants with opposite action mechanisms. **Biological Psychiatry**, v.42, p.1S-297S, 1997.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, v.203, p.485-492, 1982.

ORTH, J.M., Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C., EWING, L.L.(Eds.). **Cell and molecular biology of the testis**. New York: Oxford University Press, 1993. Cap.1, p. 03-42.

ORTH, J.M., GUNSALUS, G.L., and LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v.122, n.3, p.787-794, 1988.

ORTH, J.M., HIGGINBOTHAM, C., SALISBURY, R. Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of 3H-thymidine by Sertoli cells in testis of immature rats. **Biology of Reproduction**, v.30, p. 263-270, 1984.

PEREIRA, J. D.; CARICATI-NETO, A.; JURKIEWICZ, A.; JURKIEWICZ, N. Decreased noradrenergic and serotonergic reactivity of vas deferens of newborn rats from mothers treated with the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine during pregnancy and breast-feeding. **Life Sciences** 81 (2007) 1501–1508.

POHLAND, R.C.; BYRD, T.K.; HAMILTON, M.; KOONS, J.R. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**. Apr;98(2):198-205. 1989.

ROCHA, D.M.C., DEBELJUK, L., FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult wistar rats. **Tissue & Cell**, v.31, p.372-379. 1999.

RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D., (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, p. 1-40.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue & Cell**, 27 (2) 129-147,1995

SILVA JUNIOR, V.A.; FRANÇA, L.R. Células de Leydig e esteroidogênese em mamíferos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, 35: 15-29, 2001.

SILVA JUNIOR, V.A.; VIEIRA, A.C.S; PINTO, C.F.; DE PAULA, T.A.R., PALMA, M.B.; AMORIM, M.J.A.L.; AMORIM JÚNIOR, A.A; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 46, p. 1-10, 2006.

SILVA, J. V. A.; LINS, A. M. J. A. A.; AMORIM, J. A. A.; PINTO, C. F.; DEIRÓ, T. B. J.; OLIVEIRA, J. R. M.; PEIXOTO, C. A; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal administration of fluoxetine decreased final sertoli cell number in Wistar rats. **Int. J. Morphol.**, 26(1):51-62, 2008.

SILVA JUNIOR, V.A; FRANÇA, L.R. Ultra estrutura de células de Leydig e esteiroidogênese em diferentes espécies de mamíferos. **Ciênc. Vet. Tróp.** v.3, p. 117-134, 2000.

SIMANSKY, K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res*, 73: 37-42, 1996.

URRY, R.L.; DOUGHERTY, M.S. Inhibition of rat spermatogenesis and seminiferous tubule growth after short-term and long-term administration of a monoamine oxidase inhibitor. **Fertility and sterility**, v.26, p.232-238, 1975.

World Health Organization (WHO): **Disorders management.** Disponível em: http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/. Acesso em: 14/05/2009.

Anexo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FIOLOGIA ANIMAL
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS

Recife, 13 de junho de 2002

PARECER N.º 014 / 2002 – CEEUA / DMFA.

TÍTULO DO PROJETO: "Manipulação Neonatal do Sistema Serotoninérgico em Ratas Wistar Utilizando um Inibidor Seletivo da Recaptura de Serotonina: Efeito Sobre o Desenvolvimento Testicular e Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada".

AUTORES: Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior, Dr. José Abelardo Alves de Souza, Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim, Dr. Ademar Afonso de Amorim Júnior, Dr. Raul Manhães de Castro, Ms. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, Hilda Taihim Gonçalves de Lima, Catarina Ferreira Pinto, Thiago Augusto de Moraes, Fernanda Maria Cajú.

Após análise do projeto em tela, esta Comissão é de parecer **FAVORÁVEL** à sua realização com utilização de experimentação "*in vivo*", visto que o mesmo não pode prescindir do uso de animais. A Comissão de Ética observou também que os métodos e técnicas utilizados não submetem os animais a condições de "stress", dor ou sofrimento bem como as acomodações utilizadas são compatíveis para esse fim, de acordo com os Princípios Básicos para Pesquisa Envolvendo Animais pré estabelecidos por esta Comissão.

PRESIDENTE:

