UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

MARCIO JOSÉ VIANA PINHEIRO JUNIOR

Avaliação do efeito de antidepressivo da classe dos inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina em testículos de ratos adultos

Araraquara, SP
2022

MARCIO JOSÉ VIANA PINHEIRO JUNIOR

Avaliação do efeito de antidepressivo da classe dos inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina em testículos de ratos adultos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Farmacêutico.

Orientador(a): Prof.(a). Dr.(a). Estela Sasso Cerri

Coorientador: Prof. Salmo Azambuja de Oliveira

Araraquara, SP

2022

Pinheiro Junior, Marcio José Viana.
P654a Avaliação do efeito de antidepressivo da classe dos inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina em testículos de ratos adultos / Marcio José Viana Pinheiro Junior. – Araraquara, 2022.
39 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação: Farmácia Bioquímica). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Estela Sasso Cerri.
Coorientador: Salmo Azambuja de Oliveira.

1. Testículo. 2. Célula de Leydig. 3. Macrófagos. 4. Antidepressivos. 5. Venlafaxina. I. Cerri, Estela Sasso, orient. II. Oliveira, Salmo Azambuja de, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

Esta ficha não pode ser modificada

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo deste curso de graduação, desde professores, orientadores, amigos, família, colegas e funcionários.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profª Drª Estela Sasso Cerri, por ter confiado em mim para integrar seu laboratório, por ter compartilhado de seu conhecimento comigo e pela sua disposição a sempre me ajudar.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Salmo Azambuja de Oliveira, por ter me amparado em todas as dificuldades na execução de etapas e na elaboração deste trabalho, sempre com paciência e empenho.

Agradeço à FAPESP, por ter me fornecido uma bolsa, financiando a Iniciação Científica que deu origem a este trabalho pelo processo 2019/09064-8.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Emilce e Marcio, às minhas tias Elenice e Eugênia e à minha avó Cida, por sempre me incentivarem a continuar meus estudos e a crescer como profissional e ser humano.

Agradeço à minha irmã, Maria Clara, por ter me ajudado a levar este curso e a vida com leveza. Minha eterna melhor amiga.

Agradeço à minha família de Araraquara: Fernando Hebling, Juliana Meireles, Letícia Tuzi, Letícia Genezini, Maiara Alane e Mariana Thiele. São amigos que levarei para sempre em minha memória. Obrigado por serem meus parceiros sempre, por toda a ajuda e alegria que me trouxeram nestes 5 anos de graduação.

Por fim, agradeço a esta instituição, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara (FCFAR), por me proporcionarem uma jornada de conhecimento e desenvolvimento pessoal de extrema qualidade. Agradeço a cada professor, técnico, funcionário administrativo, funcionário de segurança, funcionário de limpeza e manutenção por terem me permitido ter excelentes anos de graduação.

RESUMO

Nos testículos, as células de Sertoli (CS) e de Leydig (CL) são essenciais para a espermatogênese e esteroidogênese, respectivamente. Portanto, tratamentos medicamentosos que interferem nestas células podem prejudicar a homeostase hormonal, a produção de espermatozoides e causar infertilidade. A venlafaxina, um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina e noradrenalina, vem sendo muito utilizada no tratamento de transtorno depressivo, de ansiedade, síndrome do pânico e fobia social. Entretanto, efeitos adversos como disfunção sexual, queda nos níveis de testosterona e ginecomastia têm sido relatados. No presente estudo, avaliamos o impacto da venlafaxina na histofisiologia dos testículos de ratos adultos, com ênfase na viabilidade das células germinativas e na integridade estrutural e funcional das CS, das CL e macrófagos. Foi também investigado se as alterações testiculares induzidas pelo fármaco seriam revertidas após a interrupção do tratamento por 30 dias. Foram utilizados 18 ratos divididos em 3 grupos (n=6). Os grupos Venlafaxina-35 dias (GVF-35) e Venlafaxina-65 dias (GVF-65) receberam 30mg/Kg p.c. de cloridrato de venlafaxina por via oral (gavagem) durante 35 dias consecutivos. Já o grupo Controle (GC) recebeu água destilada. Após 35 dias de tratamento, os grupos GC e GVF-35 foram eutanasiados, enquanto o grupo GVF-65 permaneceu 30 dias sem tratamento antes da eutanásia. Os testículos foram processados para inclusão em historesina e parafina. Os cortes de historesina foram corados pela H.E. para a avaliação morfológica e medida dos diâmetros maiores e menores dos núcleos das CL. Os cortes de parafina foram submetidos ao método do TUNEL (detecção de morte celular), à reação histoquímica de Perls (detecção de macrófagos) e à reação de imunofluorescência para detecção de conexina-43 (junções Gap) nas CL. Os dados foram submetidos à análise estatística One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O tratamento com venlafaxina induziu aumento dos diâmetros maior e menor dos núcleos das CL (hipertrofia) nos animais do GVF-35. No entanto, tais alterações não foram observadas 30 dias após interrupção do tratamento (GVF-65). O número de macrófagos também aumentou em ambos os grupos tratados, indicando que a hipertrofia das CL poderia estimular o aumento de macrófagos. Além disso, a imunoexpressão de conexina-43 nas CL aumentou apenas no GVF-35, indicando uma maior interação física e funcional entre as CL hipertrofiadas, bem como entre CL e macrófagos. O epitélio seminífero dos animais dos grupos tratados, mostrou descamação de células germinativas e redução no número de CS, além de um aumento de células germinativas e CS TUNEL-positivas. Portanto, considerando que a venlafaxina aumenta os níveis de estrógeno, podemos concluir que as alterações no epitélio sejam decorrentes do aumento estrogênico. A hipertrofia das CL, causada pelo aumento de noradrenalina induzido pela venlafaxina, condiz com o aumento de conexina-43 e coincide com o aumento no número de macrófagos, indicando uma interdependência macrófago-CL durante as alterações causadas pelo tratamento. Esta hipótese é reforçada pela reversão total das alterações nas CL, em associação à reversão parcial do aumento no número de macrófagos, verificadas após interrupção do tratamento.

Palavras-chave: Testículo. Célula de Leydig. Macrófagos. Antidepressivos. Venlafaxina.

ABSTRACT

In the testes, Sertoli cells (SC) and Leydig cells (LC) are essential for spermatogenesis and steroidogenesis, respectively. Therefore, drug treatments that interfere with these cells may impair the hormonal homeostasis, sperm production and cause infertility. Venlafaxine, an antidepressant from the selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor class, has been widely used in the treatment of depressive disorder, anxiety, panic syndrome and social phobia. However, adverse effects such as sexual dysfunction, drop in testosterone levels and gynecomastia have been reported. In the present study, we evaluated the impact of venlafaxine on the testicular structure and function in adult rats, focusing on the germ cells viability and structural and functional integrity of SC, LC and macrophages. We also investigated whether the drug-induced testicular changes are reversed after the interruption of the treatment for 30 days. Eighteen rats divided into 3 groups (n=6) were used. The groups Venlafaxine-35 days (GVF-35) and Venlafaxine-65 days (GVF-65) received 30mg/Kg b.w. of venlafaxine hydrochloride through oral route (gavage) for 35 consecutive days. The Control group (GC) received distilled water. After 35 days of treatment, the GC and GVF-35 groups were euthanized, while the GVF-65 group remained untreated for 30 days before euthanasia. The testes were processed for embedding in historesin and paraffin. Historesin sections were stained by H.E. for morphological evaluation and measurement of major and minor diameters of LC nuclei. The paraffin sections were submitted to the TUNEL method (detection of cell death), to the Perls' histochemical reaction (macrophage detection) and to the immunofluorescence reaction for the detection of connexin-43 (Gap junctions) in the LC. Data were submitted to One-Way ANOVA statistical analysis followed by Tukey's test ($p<0.05$). The treatment with venlafaxine induced an increase in the nuclear diameters of the LC (hypertrophy) in the animals of the GVF-35. However, such changes were not observed 30 days after the interruption of the treatment (GVF-65). The number of macrophages also increased in both treated groups, indicating that LC hypertrophy may stimulate the rise in macrophages. Furthermore, the immunoexpression of connexin-43 in LCs increased only in GVF-35, indicating a greater physical and functional interaction between hypertrophic LCs as well as between LCs and macrophages. In the seminiferous epithelium of animals from the treated groups, germ cells detachment, reduction of SC number and increased TUNEL-positive germ cells and SC were also observed. Therefore, considering that venlafaxine increases serum estrogen levels, we conclude that the changes in the epithelium were caused by the estrogenic increase. The LC hypertrophy, caused by increased noradrenaline induced by venlafaxine, corroborates the increase in both connexin-43 immunoexpression and macrophage number, indicating a LC-macrophage interdependence during the changes caused by the treatment. This hypothesis is reinforced by the complete reversion of the changes in the LCs, associated with the partial reversion in the number of macrophages, observed after the treatment interruption.

Keywords: Testis. Leydig cell. Macrophages. Antidepressants. Venlafaxine.

SUMÁRIO

Dedicatória 3
Agradecimentos 4
Resumo 5
Abstract 6
1. Introdução 8
1.1 Histofisiologia testicular 8
1.1.1 Espermatogênese 8
1.1.1.1 Células de Sertoli: estrutura e função 9
1.1.2 Tecido intersticial: células de Leydig e macrófagos 11
1.1.2.1 Interação Macrófagos - Células de Leydig 12
1.2 Antidepressivos e sua ação no sistema reprodutor masculino 13
1.3 Venlafaxina 14
2. Objetivos 16
3. Materiais e Métodos 17
3.1 Animais e tratamento 17
3.2 Processamento para microscopia de luz 18
3.3 Análises morfométricas 19
3.3.1 Medida nuclear de células de Leydig 19
3.3.2 Quantificação de macrófagos 19
3.4 Reação de imunofluorescência 19
3.4.1 Área imunofluorescente de conexina-43 (Cx43) 20
3.5 Método do TUNEL 20
3.6 Análise estatística 21
4. Resultados 21
4.1 Integridade do epitélio seminífero 21
4.2 Células TUNEL-positivas no epitélio seminífero 23
4.3 Interferência da Venlafaxina nas células intersticiais e nos macrófagos 24
4.4 Avaliação da Conexina 43 nas células intersticiais 26
5. Discussão 27
6. Conclusão 30
7. Referências 30

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histofisiologia testicular

O aparelho reprodutor masculino é composto pelos testículos, epidídimos, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis. Cada testículo é envolvido por uma grossa cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Ela é espessada na superfície dorsal dos testículos para formar o mediastino do testículo, de onde partem septos fibrosos, os quais penetram o testículo, dividindo-o em compartimentos piramidais chamados lóbulos testiculares. Cada lóbulo é ocupado por um a quatro túbulos seminíferos que se alojam como novelos envolvidos por um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células intersticiais (células de Leydig) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A estrutura interna do túbulo seminífero é constituída por camadas concêntricas de células que formam o epitélio germinativo ou seminífero, tecido onde ocorre a espermatogênese. Associadas às células germinativas, estão as células de Sertoli (CS), células somáticas de sustentação que mantém a estrutura epitelial e participa do controle da espermatogênese. Revestindo o epitélio seminífero, encontra-se o tecido peritubular, formado por uma lâmina basal associada a células denominadas mioides, as quais são achatadas e contráteis, com características de células musculares lisas. Elas fazem leves contrações dos túbulos que geram impulsos para o transporte dos espermatozoides ao longo da rede testicular, controlando a saída tanto do fluído quanto dos espermatozoides, uma função potencialmente crítica na fertilidade masculina (ROMANO et al. 2005).

O testículo é o local de duas funções principais: uma função exócrina e uma função endócrina. A função exócrina envolve a produção de gametas altamente diferenciados, os espermatozoides, liberados no lúmen dos túbulos seminíferos e então armazenados no epidídimo. A função endócrina é realizada pelas células de Leydig, localizadas no compartimento intersticial, cujo papel principal é a produção de testosterona (STAUB; JOHNSON, 2018).

1.1.1. Espermatogênese

O processo de espermatogênese ocorre no epitélio germinativo do túbulo seminífero. Este epitélio é formado pelas CS, que se estendem da porção basal até

a luz do túbulo, e pelas células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermátides), as quais se encontram distribuídas em 4 a 8 camadas concêntricas, estando as mais diferenciadas perto da luz e as menos diferenciadas na base do epitélio (RUSSELL et al. 1990).

A espermatogênese é um processo finamente regulado que envolve mitose, meiose e diferenciação de células germinativas, culminando na produção de gametas masculinos, os espermatozoides, que são liberados do polo apical das CS. A espermatogênese pode ser dividida em três partes: espermatocitogênese ou fase mitótica, meiose e espermiogênese. Durante a espermatocitogênese, as células germinativas envolvem-se no processo espermatogênico, realizando uma primeira divisão mitótica que gera espermatogônias. Estas, por sua vez, proliferam, realizando várias divisões mitóticas sucessivas que resultam na produção de espermatócitos pré-leptótenos. Estes espermatócitos atravessam a barreira hematotesticular e iniciam a primeira divisão da meiose. Nesta etapa, as células germinativas passam por diferentes estágios (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) antes de passar pelas duas divisões meióticas (meiose I e II). A meiose permite a produção de espermátides haploides, as quais passam por um processo de diferenciação celular denominado espermiogênese. Durante este longo processo, as espermátides arredondadas se diferenciam em espermátides alongadas e, finalmente, em espermatozoides. Os espermatozoides são liberados na luz dos túbulos seminíferos por um processo chamado espermiação (RUSSELL et al. 1990; STAUB; JOHNSON, 2018).

1.1.1.1 Células de Sertoli: estrutura e função.

Descrita pela primeira vez em 1865 por Enrico Sertoli, a CS é uma célula somática colunar e piramidal, com sua superfície basal aderida à lâmina basal do túbulo, e suas extremidades apicais se estendem até a luz do túbulo. Seu núcleo se situa na base dos túbulos seminíferos, apresenta coloração clara, são frequentemente angulosos ou triangulares e possuem um nucléolo evidente (RUSSELL et al. 1993). Dentre as funções atribuídas às células de Sertoli podemos citar o suporte e a nutrição das células do epitélio seminífero, o transporte de espermátides maduras para a luz dos túbulos seminíferos, a secreção de proteína de ligação de andrógino (ABP), a produção de substâncias com ação endócrina ou

parácrina para controle da espermatogênese, bem como a interação com as células endócrinas intersticiais de Leydig (HOLSTEIN et al. 2003). As CS se conectam umas às outras por meio de especializações juncionais da membrana celular que formam a barreira hematotesticular. Tais junções podem ser oclusivas, adesivas e de tipo “gap”. A barreira hematotesticular separa o epitélio germinativo em um compartimento basal (onde se encontram as espermatogônias e os espermatócitos I em fase de pré-leptóteno) e compartimento adluminal (onde estão as demais células germinativas). Durante a espermatogênese, as células germinativas passam por esta barreira e se alojam no compartimento adluminal, onde ficam isoladas e protegidas do meio extra-tubular (RUSSELL et al. 1990, VOGL et al. 2000). Assim, a barreira hematotesticular não apenas isola o sangue do epitélio seminífero, mas também estabelece um limite delicado entre as células do compartimento basal (espermatogônias e espermatócitos pré-leptótenos) e as células do compartimento adluminal (demais espermatócitos I, espermatócitos II e espermátides) (RUSSELL et al. 1993). O processo de passagem das células germinativas através da barreira hematotesticular só ocorre na presença de testosterona, pois este hormônio regula a produção de proteínas constituintes da barreira, as quais são responsáveis pela sua remodelação estrutural (SMITH; WALKER, 2014).

Cada CS está associada a aproximadamente 30–50 células germinativas em cada estágio do ciclo espermatogênico. Isso mostra que o desenvolvimento de células germinativas depende muito da célula de Sertoli, e também que extensas comunicações ocorrem para coordenar os vários eventos da espermatogênese. Como tal, as células germinativas e as CS desenvolvem uma rede celular íntima e elaborada para comunicações célula-célula via fatores parácrinos e moléculas de sinalização, para que as células de Sertoli possam fornecer às células germinativas em desenvolvimento os nutrientes e fatores biológicos necessários. Qualquer interferência na regulação dessa ancoragem pode prejudicar a integridade do epitélio seminífero e, consequentemente, causar infertilidade (CHENG et al. 2002). Dentre várias substâncias produzidas pelas células de Sertoli, destacam-se: proteínas e enzimas de transporte, por exemplo, ABP, transferrina, ceruloplasmina, ativador de plasminogênio (PA), fatores de crescimento, como fatores de crescimento transformadores α e β (TGF-α, TGF-β) (CAUSSANEL et al. 1996; CUPP; SKINNER, 2001), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (HANDELSMAN et al. 1985; KOIKE; NOUMURA, 1995) e hormônios, como a inibina

B (ANDERSSON et al. 1998) e o hormônio anti-Mülleriano (AMH). O hormônio folículo-estimulante (FSH) é o principal regulador endócrino da função da CS, a única célula no testículo que expressa os receptores para este hormônio, o qual é necessário para a proliferação (DIERICH et al. 1998). A CS também expressa receptores de androgênio (AR), indicando que os efeitos androgênicos no epitélio seminífero são mediados pela célula de Sertoli, pois as células germinativas não expressam tal receptor. O AR é necessário para o funcionamento adequado da barreira hematotesticular, bem como para a meiose e para a espermiogênese, e seu nível de expressão nas CS aumenta ao longo do crescimento do indivíduo (PETERSEN et al. 2006; VERHOEVEN; CAILLEAU, 1998).

Estudos têm demonstrado que a falta de controle androgênico no túbulo seminífero, principalmente nas CS, está associada a uma série de defeitos funcionais que impedem a espermatogênese de alcançar a fase de meiose II. Nas células germinativas, alterações na expressão de AR pelas células de Sertoli causam, além da interrupção do processo de espermatogênese no paquíteno e diplóteno da meiose (CHANG et al. 2004; DE GENDT et al. 2004), alteração de inúmeras proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo, apoptose e reparo de DNA. Nas CSs, essas alterações na expressão de AR geram mudanças na morfologia celular, na membrana basal do epitélio, enfraquecimento das junções entre células, causando perda da integridade epitelial, e também deficiência na produção de substâncias como transferrina e proteases (WANG et al. 2006). A deficiência androgênica também acarreta no destacamento precoce de espermátides alongadas, bem como falha da espermiação, seguida de fagocitose de espermátides maduras pelas CS (HOLDCRAFT et al. 2004; SMITH; WALKER, 2014).

1.1.2 Tecido intersticial: células de Leydig e macrófagos

O tecido conjuntivo localizado entre os túbulos seminíferos é denominado tecido intersticial e é responsável não apenas pela nutrição dos constituintes dos túbulos seminíferos, como também é responsável pela produção de andrógenos e permite o transporte de hormônios. Este tecido conjuntivo é composto por nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Os capilares sanguíneos do testículo são fenestrados e possibilitam a passagem livre de macromoléculas. Neste tecido, são encontrados fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Além destas células, há também um tipo

adicional de célula, a célula de Leydig (CL), a qual é responsável pela biossíntese de testosterona (RUSSELL et al.; 1990). Estas células são arredondadas ou poligonais, têm um núcleo central e um citoplasma eosinófilo rico em pequenas gotículas lipídicas (KERR et al. 1993; SCHULZE 1984). As CL sintetizam testosterona em resposta ao hormônio luteinizante (LH), o qual se liga aos receptores acoplados à proteína G, resultando na ativação da adenilciclase, aumentando a formação de AMPc e consequentemente da proteína reguladora esteroidogênica aguda (StAR). A estimulação das CL pelo LH via StAR resulta na transferência de colesterol das gotículas lipídicas para a mitocôndria. Este passo é seguido pela conversão de colesterol em pregnenolona pela enzima do citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol C27 (CYP11A1), localizada no lado da matriz da membrana mitocondrial interna. A pregnenolona passa então por várias conversões enzimáticas no retículo endoplasmático liso até a formação de testosterona (HARDY; ZIRKIN, 1997; MARTIN et al. 2008; MILLER; BOSE, 2011; RONE et al. 2009). Dependendo da necessidade fisiológica do organismo, existe outra via de esteroidogênese que pode ocorrer nas CL para a produção de estrógeno a partir da enzima aromatase que converte testosterona em estrógeno (GENISSEL; CARREAU, 2001).

Além do estímulo das CL pelo LH, é importante destacar o papel da noradrenalina no estímulo da proliferação e da diferenciação das CL da peripuberdade para o estágio adulto (HUO et al. 2012). Há estudos também comprovando que o isoprotenerol, um medicamento análogo à adrenalina, estimula a produção androgênica pelas CL (ANAKWE; MOGER, 1986; COOKE et al. 1982; MOGER et al. 1982; MOGER; MURPHY, 1983). Levando-se em conta que a adrenalina e noradrenalina pertencem à classe das catecolaminas, é esperado que ambas apresentem o mesmo efeito estimulante sobre a esteroidogênese.

1.1.2.1 Interação Macrófagos – Células de Leydig

Os macrófagos residentes do interstício são originários inicialmente do saco vitelínico, posteriormente sendo substituídos por macrófagos derivados da medula óssea (LOKKA et al. 2020). Tais macrófagos apresentam uma íntima interação com as CL, a qual foi descrita pela primeira vez no final da década de 1960. Os macrófagos intersticiais produzem uma série de substâncias necessárias para a manutenção e função das CL, como o 25-hidroxicolesterol, um estimulador da esteroidogênese na célula de Leydig (HALES, 2002; NES et al. 2000). Também

sabe-se da importância dos macrófagos para a proliferação das CL, visto que eles secretam a interleucina IL-1 e o fator de crescimento TGF-α, que conhecidamente estimulam a síntese de DNA em CL imaturas (GAYTAN et al. 1994). Essa interação ocorre no outro sentido também, visto que é relatado que as CL produzem substâncias que atuam no recrutamento e funcionamento dos macrófagos para o interstício (HEDGER et al. 2002).

Para a manutenção desta interação, esses dois tipos celulares apresentam entre si associações de membrana do tipo interdigitações, permitindo uma troca de substâncias mais efetiva, como fatores de crescimento e interleucinas (HALES, 2002). Compondo estruturalmente tais junções, temos a presença de proteínas do tipo conexina, as quais permitem a comunicação intercelular através da transferência de moléculas entre células adjacentes. A conexina mais importante nesta interação é a Conexina 43, sendo elemento fundamental não apenas para a esteroidogênese, mas também para a espermatogênese e para homeostase da barreira hematotesticular, além de aumentarem o potencial migratório dos macrófagos para os tecidos (RODJAKOVIC et al. 2021, ZHANG et al. 2016).

Tanto CL quanto macrófagos intersticiais têm sua sobrevivência e proliferação regulados principalmente pelo hormônio luteinizante (LH), ou seja, quedas nos níveis séricos deste hormônio podem acarretar na redução do número destes dois tipos celulares (DUCKETT et al. 1997).

1.2 Antidepressivos e sua ação no sistema reprodutor masculino

A depressão é um transtorno que acomete mais de 300 milhões de pessoas no mundo. Os episódios depressivos podem ser leves, moderados ou graves, podendo os dois últimos se tornar uma crítica condição de saúde. Os sintomas mais comuns envolvem dificuldade em continuar um trabalho simples e atividades sociais, porém, em estágios mais graves, a depressão pode levar ao suicídio. Cerca de 800 mil pessoas morrem por suicídio a cada ano no mundo, sendo essa a segunda principal causa de morte entre pessoas com idade entre 15 e 29 anos (OPAS/OMS, 2018).

Os antidepressivos atuam nos neurotransmissores (moléculas responsáveis pelo impulso nervoso de um neurônio para o outro), uma vez que a depressão parece ser causada por desequilíbrios nos níveis dessas substâncias (NIMH, 2016).

Eles são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, podendo ser: inibidores da monoaminoxidase (IMAO), inibidores não seletivos de recaptação de monoaminas (ADTs), inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), inibidores seletivos de recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN), inibidores de recaptação de serotonina e antagonistas alfa-2 (IRSA), estimulantes da recaptação de serotonina (ERS), inibidores seletivos de recaptação de noradrenalina (ISRN), inibidores seletivos de recaptação de dopamina (ISRD) e antagonistas de alfa-2 adrenorreceptores (MORENO et al. 1999). Estes fármacos levam de 2 a 4 semanas para funcionar de forma correta e, com frequência, sintomas como sono, apetite e problemas de concentração melhoram antes do humor aumentar. Os efeitos adversos mais comuns dos antidepressivos incluem: náuseas, vômitos, ganho de peso, diarreia, sonolência e disfunções sexuais (NIMH, 2016).

Alguns estudos e ensaios clínicos têm confirmado a relação entre o uso de antidepressivos e disfunções sexuais. A duloxetina e o levomilnacipran (ambos ISRSNs), por exemplo, causam disfunção ejaculatória. Por este motivo, a duloxetina tem sido usada para tratar a ejaculação precoce. Além destes, a desvenlafaxina, outro ISRSN, também causa disfunção ejaculatória (DROBNIS; NANGIA, 2017).

Um estudo mostrou que a administração de doses de 200mg/kg de fluoxetina, um ISRS, por 60 dias em ratos machos causou redução no peso dos órgãos sexuais, queda nos níveis de testosterona e FSH no plasma sanguíneo, bem como queda no número de espermatozoides e na motilidade. Esses efeitos foram associados a um efeito do fármaco sobre a glândula hipófise, reduzindo os níveis séricos de gonadotrofinas – FSH e LH (BATAINEH; DARADKA, 2007; NØRR et al. 2016). Além destes efeitos, a fluoxetina também causa redução dos túbulos seminíferos e consequente morte de células de Sertoli e de células germinativas em roedores (SILVA JUNIOR et al. 2008; CÂMARA et al. 2019), bem como redução no diâmetro nuclear das CL e diminuição nos níveis de testosterona (CÂMARA et al. 2019).

1.3 Venlafaxina

A venlafaxina ($C_{17}H_{27}NO_2$), um composto bicíclico derivado de ciclohexanol e feniletilamina, pertencente à classe dos antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) (COWEN, 1998). A venlafaxina é indicada para

o tratamento de transtorno depressivo, transtorno de ansiedade, síndrome do pânico e fobia social (WYETH PHARMACEUTICALS INC, 2015). Sua eficácia já foi comparada com a dos ISRS em muitos estudos, sendo que na grande maioria deles a venlafaxina se mostra mais eficaz (STAHL et al. 2005). A dose recomendada deste fármaco em adultos é de 75 mg por dia, dividida em duas ou três doses, a qual pode ser aumentada com base na tolerância do paciente, chegando a dose máxima de 375 mg por dia (COWEN, 1998). A ação do fármaco depende da dose que for administrada. Doses baixas inibem a recaptação de serotonina, e doses mais altas (>150 mg/d) inibem a recaptação tanto de serotonina quanto de noradrenalina (STAHL et al. 2005). Como a venlafaxina é rapidamente absorvida, este fármaco alcança sua concentração máxima no plasma sanguíneo aproximadamente 2 horas após administração oral. Dentre os efeitos adversos comuns destaca-se: sonolência, náusea, dor de cabeça, boca seca, sudorese e disfunção sexual, principalmente problemas com ereção e ejaculação retardada. Também foram relatados casos de alterações hepáticas após o tratamento com venlafaxina, mas essas alterações são modestas e geralmente não requerem modificação da dose ou descontinuação do tratamento (SCHWEIZER et al. 1997).

Dentre os estudos que avaliaram inicialmente o uso de venlafaxina por seres do sexo masculino, há dois relatos de casos clínicos que apontaram para uma redução no nível de testosterona no sangue de pacientes em tratamento com o fármaco (BELL; SHIPMAN, 2000; SHEBAK; VARMA, 2014). Em um deles, apesar dos níveis baixos de testosterona, os níveis de LH e FSH continuaram os mesmos (SHEBAK; VARMA, 2014), enquanto que no outro relato, a interrupção do tratamento normalizou os níveis de testosterona (BELL; SHIPMAN, 2000). Em outro relato de caso clínico, um jovem de 19 anos que se tratava com doses de 150 mg/dia de venlafaxina desenvolveu ginecomastia (crescimento benigno das glândulas mamárias decorrente da proliferação do componente glandular) no lado esquerdo após 3 meses de tratamento. O nível de testosterona no sangue estava normal, porém havia um aumento no nível de prolactina, estradiol e LH. Os autores levantaram a hipótese de que a venlafaxina poderia causar ginecomastia ao interferir no equilíbrio das concentrações de estrógeno e andrógeno, ou ao aumentar o nível de prolactina (hormônio que estimula o corpo-lúteo e a produção de leite pelas glândulas mamárias) no sangue (KARAKURT et al. 2009).

Um estudo recente mostrou que a venlafaxina causa redução no nível de testosterona quando se encontra em altas concentrações (314-1000µM) numa cultura celular de células adrenais da linhagem H295R, pois o fármaco inibiu a atividade enzimática da CYP17(17-alfa hidroxilase), uma enzima essencial na síntese de testosterona (ISLIN et al. 2018).

Do laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da FoAR existem atualmente dois estudos buscando estudar os efeitos histofisiológicos da venlafaxina nos testículos de ratos machos adultos. Considerando os resultados mais relevantes a este trabalho, foi constatado que o tratamento com venlafaxina causa hipertrofia e aumento na atividade das CL, com elevação dos níveis séricos da proteína StAR e, consequentemente, de testosterona. Também foi observado aumento nos níveis de estrógeno, corroborado pelo aumento de aromatase. Esses níveis elevados de estrógeno podem ser os principais responsáveis pelos efeitos adversos da venlafaxina no testículo, visto que nos estudos em questão, os túbulos seminíferos dos animais do grupo tratado mostraram alterações, como aumento de morte de células germinativas e redução no número de células de Sertoli (DE SANTI et al. 2021; DE SANTI et al. 2022).

Este trabalho de conclusão de curso busca então dar continuidade aos estudos sobre o efeito do antidepressivo venlafaxina nos testículos, com ênfase nas CL e sua relação com os macrófagos residentes.

2. OBJETIVOS

Neste estudo, foi proposto avaliar os efeitos da venlafaxina nos testículos de ratos adultos, com ênfase na estrutura do epitélio seminífero, das CL e nos macrófagos residentes. Foi também proposto avaliar se as alterações nas CL e nos macrófagos são reversíveis após a interrupção do tratamento por 30 dias.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do tratamento com venlafaxina por 35 dias no epitélio seminífero, incluindo a viabilidade das células germinativas e células de Sertoli;

- Avaliar se o tratamento interfere na integridade estrutural e funcional das células de Leydig e no número de macrófagos;
- Avaliar se após 30 dias de interrupção do tratamento, os efeitos da venlafaxina sobre os macrófagos e CL são ou não revertidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento

O protocolo referente ao tratamento dos animais foi aceito pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP/FOAr/CEUA - processo nº 21/2017). Foram utilizados 18 ratos da linhagem Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), com aproximadamente 90 dias de idade, pesando entre 320-350g. Esses animais foram mantidos em gaiolas no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, sob condições higiênicas, ambientais e alimentares adequadas: ração vitaminada balanceada e água “ad libitum”, à temperatura entre 22 e 25°C (controlada por sistema de ar condicionado) e em regime circadiano (12h de luz e 12h no escuro).

Os animais foram distribuídos em 3 grupos (n=6): Grupo Controle (GC), Grupo Venlafaxina 35 dias (GVF35) e Grupo Venlafaxina 65 dias (GVF65). Os animais do grupo GVF35 e GVF65 receberam 30 mg/Kg p.c. de cloridrato de venlafaxina (diluído em água destilada) por 35 dias consecutivos, e os animais do GC receberam volume correspondente de água destilada pelo mesmo período. Esta dosagem de cloridrato de venlafaxina (30 mg/Kg p.c.) foi calculada utilizando-se o método do BW3/4 (Epa 2006), a taxa metabólica específica deste modelo animal (PACHALY, 2006) e a dose terapêutica utilizada em humanos (150 mg), a qual tem sido relacionada a ocorrência de ginecomastia (KARAKURT et al. 2009) e alterações nos níveis séricos de testosterona (BELL; SHIPMAN, 2000; SHEBAK; VARMA, 2014). O tratamento foi realizado por via oral (gavagem), via de administração recomendada pelo fabricante (WYETH, 2016). Os pesos dos animais foram monitorados em dias alternados para cálculo da dose do fármaco a ser aplicado e o volume de líquido a ser administrado foi ajustado de acordo com o peso de cada animal (1 mL/100 g p.c.). O tratamento se estendeu durante o período de 35 dias

consecutivos porque este é o período de tratamento (clínico) mínimo para o início da ação antidepressiva (GUTIERREZ et al. 2003; WYETH, 2016).

Considerando o tempo do ciclo espermatogênico no rato (52 dias) e o tempo de trânsito espermático do testículo para a cauda epididimária (13 dias), os animais do GVF65 foram mantidos sem qualquer tratamento por mais 30 dias (período de interrupção do tratamento) antes da eutanásia, totalizando 65 dias. Durante este período de interrupção do tratamento (30 dias), espera-se que ocorra uma possível recuperação dos parâmetros testiculares que foram afetados pelo fármaco.

Após o término do tratamento, os animais do GC, GVF35 e GVF65 foram anestesiados com 80 mg/kg de cloridrato de cetamina (Francotar, Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda, Jurubatuba, Brasil, Reg.MA: 7,885) e 8 mg/kg de cloridrato de xilazina (Virbaxyl; Virbac do Brasil Ind. Com. Jurubatuba, Brasil, Reg.MA:7.899) e submetidos à eutanásia. Os testículos foram removidos e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca diretamente do ventrículo esquerdo com tubos BD Vacutainer® para dosagem de testosterona sérica.

3.2 Processamento para microscopia de luz

Os testículos foram fixados, por 48h, em solução de formaldeído 4% (tamponada com fosfato de sódio, Ph 7,4; 0,1M) e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico para inclusão em glicolmetacrilato (CERRI; SASSO-CERRI, 2003) e parafina. A microtomia dos blocos de parafina e historesina foi realizada utilizando-se um micrótomo (MICRON 325, Leica) para a obtenção de cortes de 6µm e 3µm de espessura, respectivamente. Os cortes de historesina foram corados com H.E (CERRI; SASSO-CERRI, 2003) para as análises morfológicas e morfométricas. Os cortes de parafina foram submetidos à reação histoquímica de azul da Prússia de Perls para detecção de ferro férrico em macrófagos (DE OLIVEIRA et al.; 2021). Assim, após a desparafinização, os cortes foram imersos em solução ácida contendo 2% de ferrocianeto de potássio e 2% de ácido clorídrico por 1 hora (BANCROFT; STEVENS, 1996). Os cortes foram lavados em água destilada e a coloração nuclear foi realizada com solução aquosa de safranina a 1%. Os cortes foram desidratados e montados em meio de montagem resinoso.

Os cortes de parafina também foram aderidos às lâminas silanizadas e submetidos ao método TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) e reações de imunofluorescência (conforme descrito abaixo).

3.3 Análises morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas utilizando-se um microscópio (Olympus BX-51), uma câmera de captura DP-70 (Olympus) e um sistema de análise de imagens (Image-Pro Express Olympus).

3.3.1 Medida nuclear de células de Leydig

Para cada animal, foram utilizados 3 cortes não seriados dos testículos incluídos em historesina, corados com H.E. Nestes cortes, foram capturados 20 campos de tecido intersticial, em aumento de 40x. Com o uso do sistema de análise de imagens (Image-Pro Express Olympus), foram medidos aleatoriamente os diâmetros menor e maior do núcleo de 5 células de Leydig por campo, totalizando 100 CL por animal.

3.3.2 Quantificação de macrófagos

Para cada animal, foram utilizados 2 cortes não seriados dos testículos incluídos em parafina e corados pela reação de Perls. Nestes cortes, foram capturados 30 campos de tecido intersticial, em aumento de 40x. Com o uso do sistema de análise de imagens (Image-Pro Express Olympus), foram quantificados os macrófagos Perls-positivos em uma área (mm^2) de tecido intersticial padronizada para cada animal. Por fim, o número de macrófagos/mm^2 de tecido intersticial foi calculado.

3.4 Reação de imunofluorescência

Para avaliar se o tratamento interferiu na integridade estrutural e funcional das células intersticiais, foram realizadas reações de imunofluorescência para detecção de conexina-43 (proteína estrutural das junções comunicantes).

As secções testiculares não seriadas foram desparafinizadas, hidratadas, imersas em solução tamponada de citrato de sódio 0,001M, pH 6,0, e mantidas em forno de micro-ondas a 95ºC para recuperação antigênica. Os cortes foram submetidos à inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 9%. Todas as secções testiculares foram incubadas em BSA a 2% por 30 min para bloquear os sítios não-específicos. Após as lavagens em PBS, as secções foram incubadas em uma câmara úmida a 4 °C “overnight” com o anticorpo primário de coelho anti-conexina 43 (1:200; Santa Cruz Biotechnology; code: sc-271837, RRID: AB_10707826). Os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpos secundários anti-coelho conjugados com Alexa Fluor® 594 ou Alexa Fluor® 488 (Ready Probes® Life Technologies, Carlsbad, USA) por 1 hora, no escuro e a temperatura ambiente. Após as lavagens em PBS, a coloração nuclear foi realizada com DAPI (Molecular Probes da Life Technologies; Carlsbad, Califórnia, EUA) por 5 min no escuro e as lâminas foram montadas com meio de montagem aquoso Fluoromount® (EMS, Hatfield, EUA). Para todos os marcadores avaliados, controles negativos foram realizados de acordo com o mesmo protocolo, exceto a etapa de incubação com anticorpos primários, a qual foi substituída por incubação em soro não imunizado.

3.4.1 Área imunofluorescente de conexina-43 (Cx43)

Nos cortes testiculares não seriados, foi medida a área de imunofluorescência de Conexina 43 no tecido intersticial. Assim, em uma área tecidual padronizada de cada animal do GC, GVF35 e GVF65, foi medida a área imunofluorescente de Conexina, e a área imunofluorescente/mm^2 de tecido intersticial foi calculada para cada animal do GC, GVF35 e GVF65 (DE SANTI et al. 2021).

3.5 Método do TUNEL

Visando detectar morte celular no epitélio seminífero, foi realizado o método do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated Dutp-biotin Nick End-Labeling) de acordo com o Kit Apop-Tag Plus Peroxidase *In situ* (Millipore) e segundo SASSO-CERRI, MIRAGLIA (2002).

Após o processo de desparafinização, os cortes foram incubados com proteinase-K (20µg/ml), lavados e imersos em peróxido de hidrogênio para inativação da peroxidase endógena e incubados em "tampão de equilíbrio" (fornecido pelo Kit). Em seguida, os cortes foram incubados com a enzima TdT, durante 1:30h, a 37ºC, e imersos em "tampão de bloqueio". Após lavagem, os cortes foram incubados com anti-digoxigenina por 1 hora, e a reação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,06%. Após coloração nuclear com hematoxilina de Carazzi, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados com resina Permount®. Para controle positivo da reação, foram utilizados cortes de glândula mamária em involução (provenientes do kit) e, para o controle negativo da reação, alguns cortes testiculares foram submetidos à mesma reação, excetuando-se a etapa de incubação em TdT.

3.6 Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram avaliadas com o uso do programa de análise estatística GraphPadPrism 6.0. Os dados foram avaliados pelo One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

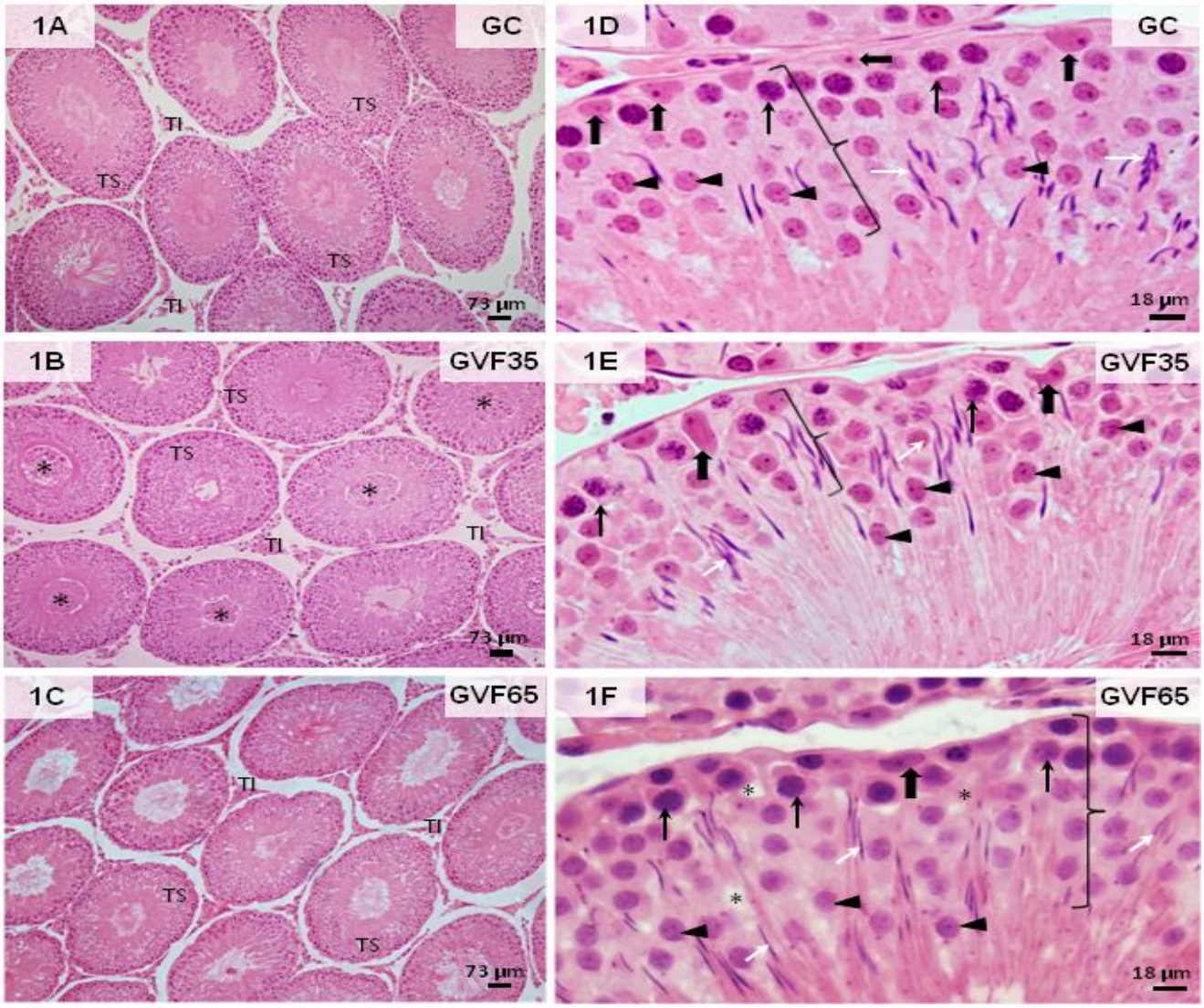
4. RESULTADOS

4.1. Integridade do epitélio seminífero

As secções dos túbulos seminíferos dos animais do GC, ao microscópio de luz, apresentaram características morfológicas normais, tais como: contorno regular, luz bem definida sem células descamadas e epitélio organizado com camadas concêntricas de células germinativas (Figs. 1A e 1D). Além disso, os núcleos das

células de Sertoli, normalmente justapostos ao tecido peritubular, apresentaram-se levemente basófilos, com formato ovóide a triangular, contorno regular e nucléolo bem evidente (Fig. 1D).

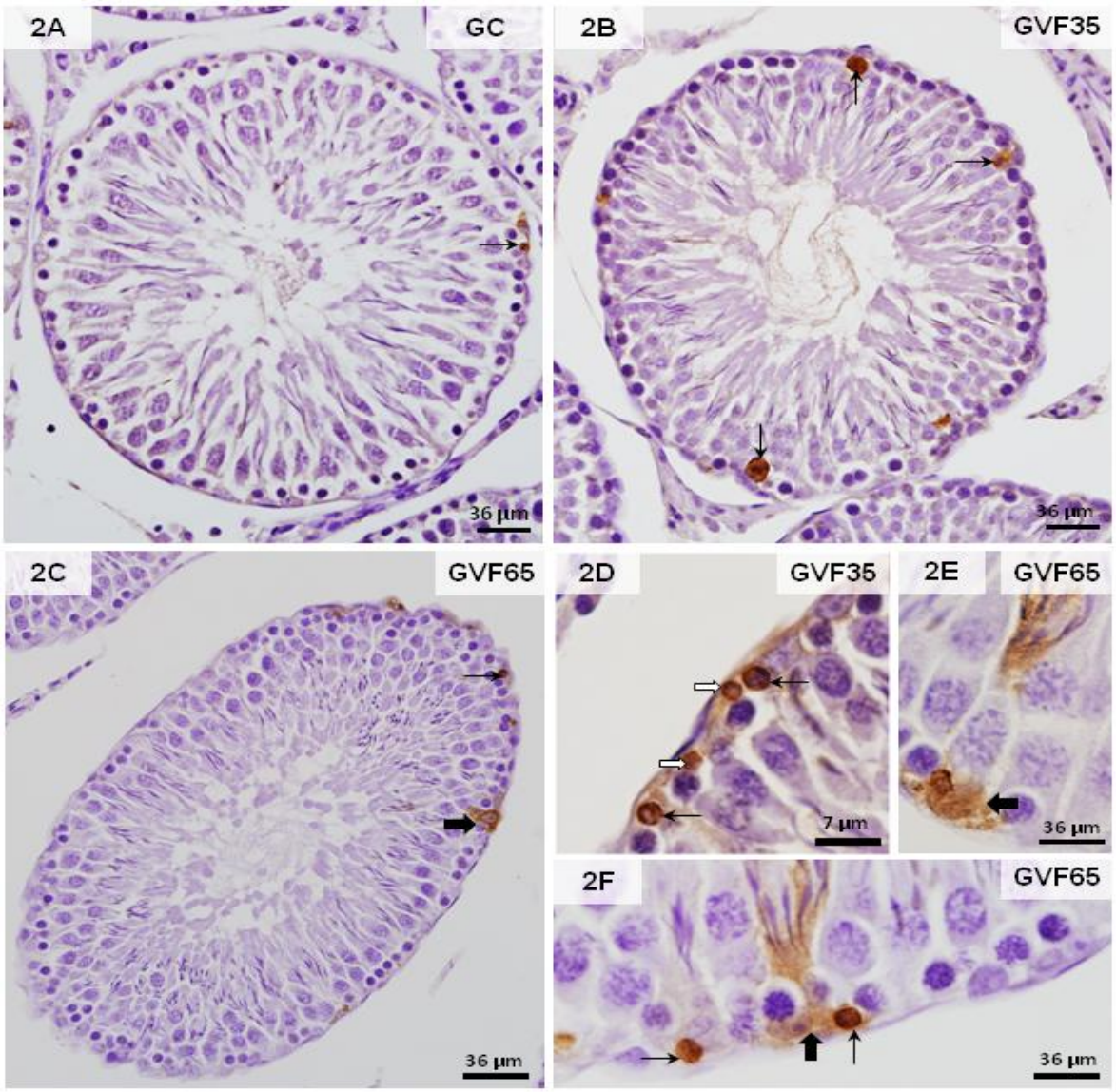
Nos cortes testiculares dos animais do GVF35, vários túbulos apresentaram numerosas células germinativas preenchendo a luz tubular, podendo ser observadas também algumas CS descamadas na luz. Além disso, os túbulos desses animais apresentaram-se menores em relação aos grupos controle (Fig. 1B). Em vários túbulos, o epitélio mostrou regiões com ausência de algumas células germinativas, principalmente espermatócitos, espermátides redondas e alongadas. As CS apresentam núcleos com formato irregular e com intensa basofilia (Fig. 1E). No GVF65, embora não tenha sido notada a presença de células descamadas na luz tubular, os túbulos seminíferos estavam aparentemente menores quando comparados aos dos animais do GC e GVF35 (Fig. 1C). Além disso, foi também notada a presença de núcleos de células de Sertoli intensamente basófilos e ausência de células germinativas em algumas regiões do compartimento basal do epitélio (Fig. 1F).



Figuras 1A – 1F - Fotomicrografias de secções de testículos de animais do GC, GVF35 e GVF65 coradas com H.E (A-F). Nas figuras **1A**, observa-se túbulos seminíferos (TS) e tecido intersticial (TI) com características normais e luz bem definida. Em **1B**, é possível identificar células descamadas na luz tubular (asteriscos). Em **1C**, os túbulos, apesar de regulares e com ausência de células na luz tubular, estão evidentemente menores em comparação aos do GC. Em **1D-1F**, estão apontadas as seguintes células organizadas em camadas concêntricas da base para a luz: células de Sertoli (setas grossas), espermatócitos (setas finas), espermátides redondas (cabeças de seta) e alongadas (setas brancas), formando o epitélio seminífero (delimitado por chave). Em **1D**, nota-se células de Sertoli com núcleo típico fracamente basófilo, formato ovoide a triangular e nucléolo bem evidente (setas grossas). Em **1E**, os núcleos das células de Sertoli apresentam formato irregular e intensa basofilia (setas grossas). Nota-se uma diminuição da quantidade de espermatócitos (setas finas) e redução da altura epitelial (chaves - }) em algumas porções do túbulo. Em **1F**, o núcleo da célula de Sertoli apresenta formato irregular e basofilia mais intensa (setas grossas), assim como em **1E**, além alguns espaços intraepiteliais (asteriscos).

4.2 Células TUNEL-positivas no epitélio seminífero

Nas secções dos animais GC35, detectaram-se poucas células TUNEL-positivas no epitélio seminífero (Fig. 2A). Porém, nos grupos tratados (Fig. 2B e 2C) foram observadas numerosas células germinativas TUNEL-positivas, como espermatogônias e espermatócitos (Fig. 2C e 2D). Nos cortes dos animais tratados, também foram observadas algumas células de Sertoli TUNEL-positivas (Fig. 2E e 2F).



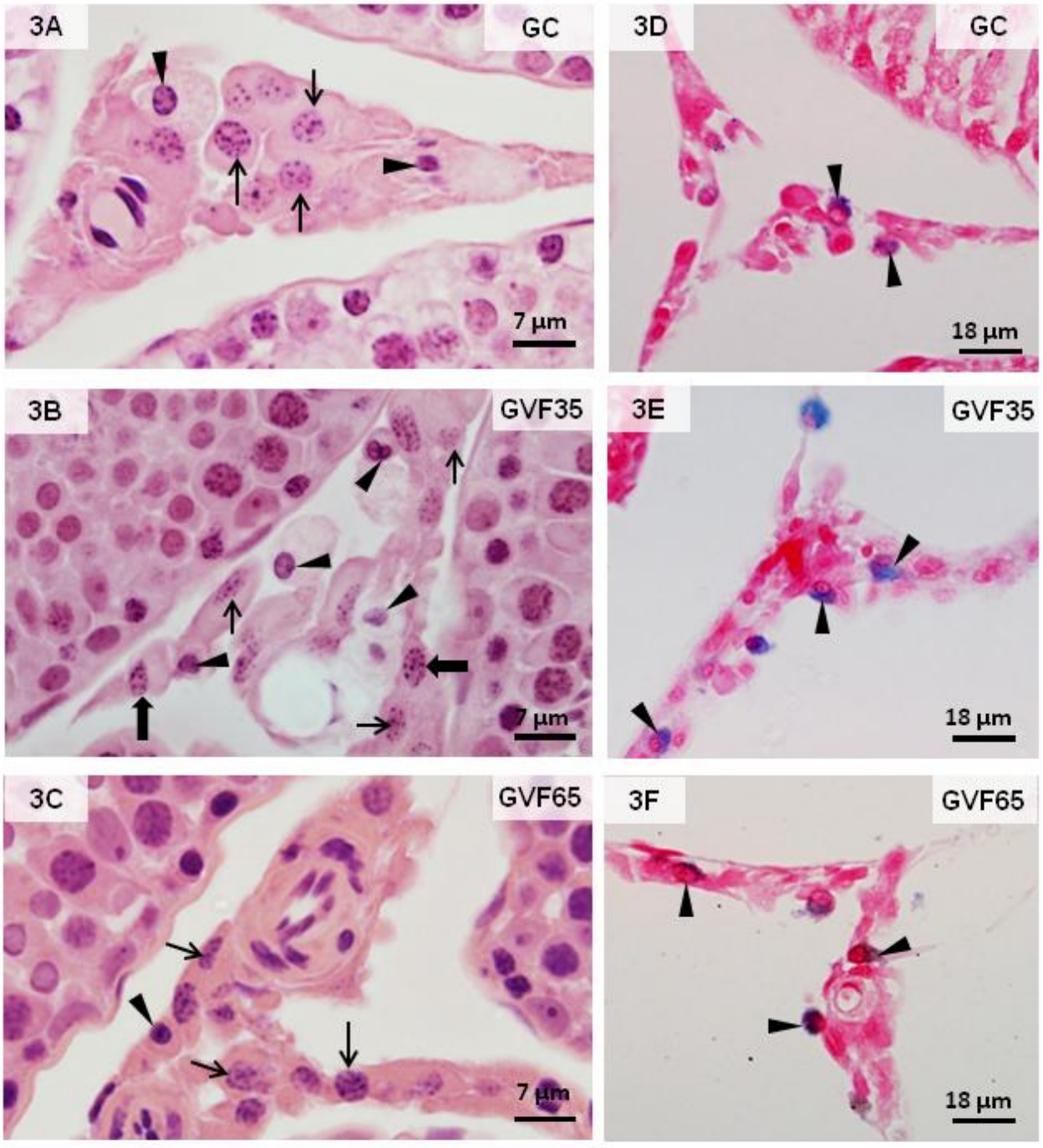
Figuras 2A-2F: Fotomicrografias de cortes testiculares dos animais do GC35 (A), GVF35 (B e D) e GVF65 (C, E e F) submetidos ao método do TUNEL e corados com Hematoxilina de Carazzi. No GC35 (**2A**), poucas células germinativas TUNEL-positivas (seta preta fina) são observadas, enquanto que numerosas células germinativas marcadas (setas pretas finas e brancas) são encontradas no GVF35 (**2B** e **2D**) e GVF65 (**2C**). Nas figuras **2B-2D**, notam-se espermatogônias (setas brancas) e espermatócitos (setas pretas finas) TUNEL-positivos. Em **2E** e **2F**, observam-se núcleos de célula de Sertoli com formato triangular e nucléolo característico marcado pelo método do TUNEL (seta preta grossa).

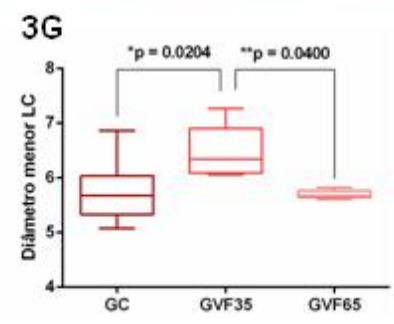
4.3 Interferência da Venlafaxina nas CL e nos macrófagos

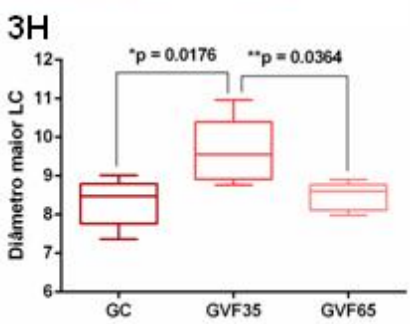
Ao avaliar o aspecto das células intersticiais com o tratamento nas lâminas coradas em HE, ficou evidente um aumento de tamanho nas CL no GVF35. Neste grupo, as CL mostraram um formato mais elíptico e irregular (Fig. 3B). Tais alterações não foram observadas com a descontinuação do tratamento (GVF65) (Fig. 3C). O aumento dos núcleos das CL foi confirmado pelo aumento significante

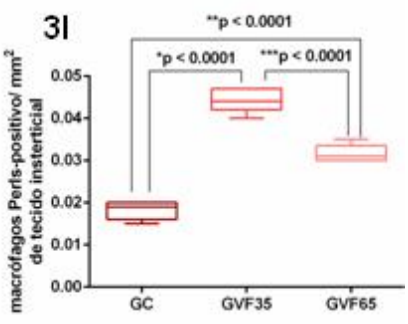
dos diâmetros nucleares maior e menor das CL nos animais do GVF35 em relação ao GC (Figs. 3G e 3H). Já os animais do GVF65 não apresentaram este aumento em comparação aos do GC (Figs. 3A, 3C, 3G e 3H).

Também foi notado um aumento no número de macrófagos nos animais dos grupos tratados em comparação com o controle (Figs. 3D, 3E, 3F e 3I). O grupo GVF 35 apresentou em média um aumento considerável de macrófagos no tecido intersticial quando comparado ao GC (Fig. 3I). O grupo GVF 65 também apresentou mais macrófagos do que o GC, porém seu aumento foi mais suave se comparado ao do GVF-35 (Fig. 3I).


3A
GC
7 µm
3D
GC
18 µm
3B
GVF35
7 µm
3E
GVF35
18 µm
3C
GVF65
7 µm
3F
GVF65
18 µm


3G
*p = 0.0204
**p = 0.0400
Diâmetro menor LC
GC
GVF35
GVF65

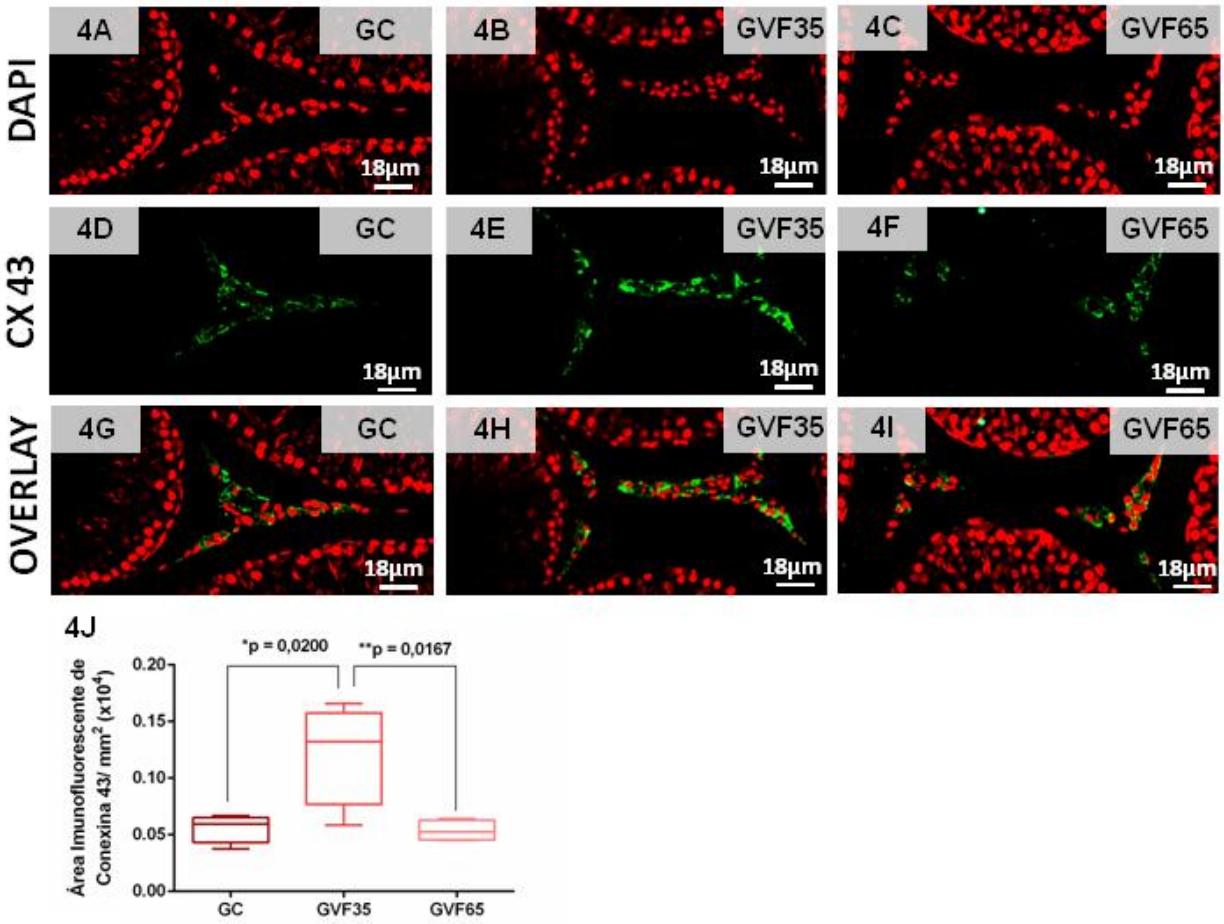

3H
*p = 0.0176
**p = 0.0364
Diâmetro maior LC
GC
GVF35
GVF65


3I
**p < 0.0001
*p < 0.0001
***p < 0.0001
macrófagos Perfis-positivo/ mm2 de tecido insterticial
GC
GVF35
GVF65

Figuras 3A-3I: Fotomicrografias de cortes testiculares dos animais do GC (A e D), GVF35 (B e E) e GVF65 (C e F) submetidos à coloração de H.E. (A, B e C) e à reação de Perls para detecção de macrófagos (D, E e F). Em GC (**3A**), observam-se CL características (setas pretas finas), com núcleo redondo e de tamanho regular e poucos macrófagos (ponta de seta). Já em GVF35 (**3B**), os núcleos das CL mostram formato irregular e elíptico (setas pretas grossas). Nota-se também um aparente aumento no número de macrófagos no tecido intersticial. Também podem ser observadas CL com núcleos reduzidos (setas pretas finas). Em GVF-65 (**3C**), é perceptível que as CL apresentam características semelhantes às de GC (3A). Nas figuras **4D-4F**, nota-se que os macrófagos Perls-positivos são mais abundantes em GVF-35 (**4E**), seguido de GVF-65 (**4F**) e por fim GC (**4D**). Em **4G** e **4F** é possível observar o aumento nas medidas nucleares das CL no grupo GVF-35 em comparação a GC e GVF-65. Em **4I**, nota-se um aumento quantitativo no número de macrófagos intersticiais Perls-positivos nos grupos tratados em relação ao GC.

4.4 Avaliação da Conexina 43 nas células intersticiais

A partir da reação de imunofluorescência para detecção de Conexina 43 e quantificação da área fluorescente, foi possível observar um aumento na imunoexpressão desta proteína nos animais do grupo GVF35 (fig. 4E e 4H). Tal aumento não foi observado no grupo GVF65 (fig. 4F e 4I), o qual mostrou imunoexpressão estatisticamente semelhante ao GC (fig. 4D e 4G).



Fotomicrografias de cortes testiculares dos animais do GC (A, D e G), GVF35 (B, E e H) e GVF65 (C, F e I) submetidos à reação de imunofluorescência para conexina-43 e quantificação de área immunofluosectente/ mm^2 (J). Coloração nuclear com iodeto de propídio (**4A**, **4B** e **4C)**. GC (**4D e 4G**) e GVF-65 (**4F e 4I**) apresentam intensidade de fluorescência para a conexina-43 semelhante. Já GVF-35 (**4E e 4H**) apresenta um padrão elevado de expressão de conexina-43. Em **4J**, a área imunofluorescente de conexina 43 é significantemente maior no GVF35; entretanto, no GVF65, a área é semelhante ao GC.

5. DISCUSSÃO

O tratamento com venlafaxina tem como um dos efeitos colaterais a disfunção sexual, principalmente disfunção erétil e ejaculação retardada (SCHWEIZER. et al. 1997). Conforme foi apresentado na introdução deste relatório, já foi relatado em alguns casos clínicos que pacientes em tratamento com venlafaxina mostraram níveis de testosterona no sangue reduzidos ou inalterados, acompanhado ou não de aumento no nível de prolactina, estradiol e LH (BELL; SHIPMAN, 2000; KARAKURT et al. 2009; SHEBAK; VARMA, 2014). Já nos estudos realizados por DE SANTI et al. (2021 e 2022), foi constatado um aumento nos níveis séricos tanto de testosterona quanto da sua conversão em estrógeno.

No presente estudo, é evidente que os ratos dos dois grupos tratados apresentaram alterações significantes na estrutura testicular, com perda na integridade do epitélio, inclusive nas células de Sertoli. Foi observado, principalmente no GVF35, túbulos seminíferos com descamação de células germinativas, uma alteração que pode ter sido causada por danos nas células de Sertoli (CS). Esta possibilidade pode ser reforçada pelo fato de que, em um estudo em paralelo conduzido por este grupo de estudo nas mesmas condições experimentais, houve queda significante no número destas células em ambos os grupos tratados, além da presença de núcleos de CS com formato irregular e intensa basofilia.

Além do controle androgênico, a CS tem como principal regulador endócrino o hormônio folículo-estimulante (FSH) (DIERICH et al. 1998). Ambos atuam no epitélio seminífero através de receptores nas CS. Uma alteração no equilíbrio desses hormônios ocasionaria diversas alterações não só na CS, mas no epitélio seminífero como um todo. Em um estudo realizado por AYALA et al. (2018), a administração do

inibidor seletivo de recaptação de serotonina (ISRS) fluoxetina em ratos machos causou uma queda nos níveis séricos tanto de FSH quanto de LH. Sabe-se que a fluoxetina aumenta a concentração de serotonina (5-HT) na fenda sináptica, elevando assim a atividade serotoninérgica no eixo hipotálamo-hipofisário (WONG et al. 1988; FULLER et. al. 1991). O hipotálamo regula a secreção de gonadotrofinas, que, por sua vez, regulam o desenvolvimento do aparelho reprodutor. Substâncias que interferem no sistema serotoninérgico alteram a produção de gonadotrofinas e esteróides sexuais, prejudicando o epitélio seminífero (ARAGÓN et al. 2005; AYALA et al. 2015). De fato, há boas evidências de que o sistema serotoninérgico desempenha um papel importante na regulação da secreção de gonadotrofinas. A ligação da serotonina ao receptor (5-HT2) estimula a secreção de GnRH e FSH, enquanto que a secreção de LH é modificada quando ambos receptores (5-HT1 e 5-HT2) são ativados (GOUVEIA; FRANCI, 2004). Como a venlafaxina também aumenta a concentração de serotonina, é possível que as alterações nas CS e no epitélio seminífero sejam decorrentes de um desequilíbrio hormonal induzido por este fármaco.

Outra hipótese para os efeitos da venlafaxina no epitélio seminífero é o aumento na conversão de testosterona em estrógeno. Há estudos na literatura associando alterações nas CS e consequentemente das células germinativas com níveis séricos de estrógeno elevados (LEAVY et al. 2017; SCHULSTER et al. 2016).

O aumento nos níveis de testosterona, relatados por DE SANTI et al. (2022), pode ser consequência das alterações morfológicas das CL, observadas no presente estudo. Estas células apresentaram um aumento significante no tamanho do núcleo, indicando uma hipertrofia celular no grupo GVF35 em relação aos grupos controle e GVF65, além do aumento na imunoexpressão de Conexina 43 nas CL do grupo GVF35. Após 30 dias de interrupção do tratamento, nossos resultados mostraram que tais alterações morfológicas e funcionais não foram detectadas nos testículos dos animais do GVF65. Estes resultados são compatíveis com o restabelecimento dos níveis séricos de testosterona, conforme demonstrado previamente por DE SANTI et al. (2022), indicando que as alterações foram reversíveis após a interrupção do tratamento.

Sabe-se que a noradrenalina estimula a proliferação e a diferenciação das CL (HUO et al. 2012), além de estimular a produção de testosterona por essas células (ANAKWE; MOGER, 1986; COOKE et al. 1982; MOGER et al. 1982; MOGER;

MURPHY, 1983). Deste modo, podemos sugerir que o tratamento induziu um aumento de noradrenalina nos testículos, estimulando um aumento da atividade esteroidogênica nas CL dos animais do GVF35 e, consequentemente, o aumento dos níveis de testosterona. Essa hipótese pode ser reforçada pela alta expressão de *Nur77* (DE SANTI et al. 2022), um receptor nuclear que quando ativado induz a produção de StAR e, consequentemente, de testosterona. Tal mecanismo pode explicar as alterações morfofuncionais, observadas nas CL no GVF35, e que foram revertidas com a interrupção do tratamento e consequente redução dos níveis de noradrenalina.

A presença de numerosos macrófagos nos grupos tratados, incluindo após interrupção do tratamento, ainda precisa ser esclarecida. Uma hipótese plausível é que este aumento de macrófagos seja devido ao recrutamento destas células para o testículo, em resposta aos níveis elevados de estrógeno. Sabe-se que macrófagos expressam receptores de estrógeno, sendo responsivos a este hormônio esteroide (HÄRKÖNEN et al. 2006). Em um estudo recente, foi demonstrado em casos de endometriose que o estrógeno promove a secreção de citocinas, aumentando o recrutamento e polarização de macrófagos no endométrio (LIANG et al. 2018). Tal mecanismo pode ter ocorrido também neste estudo devido ao aumento dos níveis séricos de estrógeno, o qual foi confirmado em estudo prévio nos ratos tratados com venlafaxina (DE SANTI et al. 2022).

Uma outra evidência que poderia explicar o aumento do número de macrófagos no testículo é a hipertrofia das CL. O aumento na expressão de Conexina-43 (proteína das junções *Gap*), no GVF35, indica maior troca de substâncias entre as CL e condiz com o aumento (hipertrofia) destas células, visto que o aumento da superfície de contato entre CL resulta também em um aumento de junções entre estas células. Sabe-se que as CL liberam citocinas recrutadoras de macrófagos para o tecido, um processo que ocorre em condições normais para manter a homeostase (HEDGER et al. 2002). Portanto, considerando o significante aumento de macrófagos no GVF35, podemos inferir que um recrutamento de macrófagos ocorreu durante o tratamento, concomitantemente à hipertrofia das CL. É importante destacar que, após 30 dias de interrupção do tratamento, embora as alterações nas CL tenham sido revertidas; ou seja, a área nuclear e a imunoexpressão de conexina-43 tenham retornado ao padrão normal, o número de macrófagos também reduziu significantemente, embora não tenha alcançado o valor do GC. Esse resultado

sugere que a ativação das CL (hipertrofia), sob estímulo do fármaco, e a atrofia destas células ao seu padrão normal após a interrupção do estímulo, parecem estar diretamente associadas ao aumento e redução do número de macrófagos, respectivamente, no GVF35 e GVF65.

Apesar dos resultados promissores, mais estudos se fazem necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais a venlafaxina causa tais alterações no epitélio seminífero e tecido intersticial, além do tempo necessário para a recuperação dos testículos frente os danos causados por esse antidepressivo.

6. CONCLUSÃO

- A venlafaxina interferiu na integridade do epitélio seminífero, causando descamação e morte de células germinativas, bem como alterações nas células de Sertoli.
- O tratamento causou hipertrofia das células de Leydig, e consequente aumento de conexina-43 nestas células. Essa hipertrofia deve ser decorrente do aumento da sinalização adrenérgica causada pelo fármaco. Entretanto, estas alterações foram restabelecidas após 30 dias de interrupção do tratamento.
- O tratamento causou um aumento do número de macrófagos, possivelmente, pelo recrutamento de monócitos/macrófagos induzido pelo tratamento. Esse aumento foi parcialmente revertido após interrupção do tratamento. Portanto, esses achados, em conjunto, indicam uma interdependência macrófago-CL durante as alterações causadas pela venlafaxina.
- Uma atenção especial deve ser dada a histofisiologia hormonal de pacientes tratados com o antidepressivo venlafaxina.

7. REFERÊNCIAS

ANAKWE, O.O.; MOGER, W.H. Catecholamine Stimulation of Androgen Production by Rat Leydig Cells. Interations with Luteinizing Hormone and Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. 1986. **Biology of Reproduction** v. 35, p. 806-814, 1986.

ANDERSSON, A.M.; MULLER, J.; SKAKKEBAEK N.E. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. 1998. **J Clin Endocrinol Metab** v. 83, p. 4451–4458, 1998.

ARAGÓN, M. A.; AYALA, M. E.; MARÍN, M.; AVILÉS, A.; MENSUMURA, D.; DOMÍNGUEZ, R. Serotoninergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. 2005. **Reproduction** v. 129, p. 717–727, 2005. doi:10.1530/REP.1.00598

AYALA, M. E.; VELÁZQUEZ, D. E.; MENDOZA, J. L.; MONROY, J.; DOMÍNGUEZ, R.; CÁRDENAS, M.; ARAGÓN, A. Dorsal and medial raphe nuclei participate differentially in reproductive functions of the male rat. 2015. **Reprod. Biol. Endocrinol**, 2015. 13, 132. doi:10.1186/S12958-015-0130-0

AYALA, M. E.; GONZÁLES, A.; OLIVAREZ, R. M.; ARAGÓN-MARTÍNEZ, A. Fluoxetine treatment of prepubertal male rats uniformly diminishes sex hormone levels and, in a subpopulation of animals, negatively affects sperm quality. 2018. **Reproduction, Fertility and Development,** 2018. doi:10.1071/rd17384

BATAINEH, H. N.; DARADKA, T. Effects of long-term use of fluoxetineon fertility parameters in adult male rats. 2007. **Neuro Endocrinol Lett** v. 28, p. 321–325, 2007.

BELL, S.; SHIPMAN, M. Reduced testosterone level in a venlafaxine treated patient. 2000. **Ann Clin Psychiatry** v.12 [3] p.171-173, 2000.

BELTRAME, F.L.; CANEGUIM, B.H.; MIRAGLIA, S.M.; CERRI, P.S.; SASSO-CERRI, E. Vitamin B12 supplement exerts a beneficial effect on the seminiferous epithelium of cimetidine-treated rats. 2011. **Cells Tissues Organs** v. 193 [3] p. 184-194, 2011. doi: 10.1159/000319371.

CÂMARA, M.L.; ALMEIDA, T.B.; DE SANTI, F.; RODRIGUES, B.M.; CERRI, P.S.; BELTRAME, F.L.; SASSO-CERRI, E. Fluoxetine-induced androgenic failure impairs the seminiferous tubules integrity and increases ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1): Possible androgenic control of UCHL1 in germ cell death?. 2019. **Biomed Pharmacother** v. 109 p. 1126-1139, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.034

CAUSSANEL, V.; TABONE, E.; MAUDUIT, C.; DACHEUX, F.; BENAHMED, M. Cellular distribution of EGF, TGF alpha and their receptor during postnatal development and spermatogenesis of the boar testis. 1996. **Mol Cell Endocrinol** v.123 p. 61–69, 1996.

CERRI , P. S.; SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. 2003. **Micron** v. 34 [8] p. 365-367, 2003.

CHANG, C.; CHEN, Y.T.; YEH, S.D.; XU, Q.; WANG, R.S.; GUILLOU, F.; LARDY, H.; YEH S. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. 2004. **Proc Natl AcadSci USA**, 2004. 101(18):6876-81.

CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development. 2002. **Physiol Rev** v. 82 [4] p. 825-874, 2002.

COOKE, B.A.; GOLDING, M.; DIX, C.J.; HUNTER, M.G. Catecholamine stimulation of testosterone production via cyclic AMP in mouse Leydig cells in monolayer culture. 1982. **Mol Cell Endocr** v. 27 p. 221-231, 1982.

COWEN, P.J. Comprehensive Clinical Psychology. 1998. **Pergamon** p. 135-161, 1998.

CUPP, A.S.; SKINNER, M.K. Expression, action, and regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor during embryonic and perinatal rat testis development. 2001. **J Androl** v. 22 p. 1019–1029, 2001.

DE GENDT, K.; SWINNEN, J.V.; SAUNDERS, P.T.; SCHOONJANS, L.; DEWERCHIN, M.; DEVOS, A.; TAN, K.; ATANASSOVA, N.; CLAESSENS, F.; LÉCUREUIL, C.; HEYNS, W.; CARMELIET, P.; GUILLOU, F.; SHARPE, R.M. VERHOEVEN, G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. 2004. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 101 [5] p. 1327-1332, 2004.

DE SANTI, F.; BELTRAME, F.L.; RODRIGUES, B. M.; JUNIOR, M.J.V.P.; SCARAMELE, N.F.; LOPES, F.L.; CERRI, P.S.; SASSO-CERRI, E. Venlafaxine-induced damage to seminiferous epithelium, spermiation, and sperm parameters in rats: A correlation with high estrogen levels. 2021. **Andrology** v. 9 [1] p. 297-311, 2021. doi: 10.1111/andr.12852. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32598512.

DE SANTI, F.; BELTRAME, F.L.; RODRIGUES, B.M.; SCARAMELE, N.F.; LOPES, F.L.; CERRI, P.S.; SASSO-CERRI, E. Venlafaxine-induced adrenergic signaling stimulates Leydig cells steroidogenesis via Nur77 overexpression: A possible role of EGF. 2022. **Life Sci**, 2022. 289:120069. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120069. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34688693.

DIERICH, A.; SAIRAM, M.R.; MONACO, L.; FIMIA, G.M.; GANSMULLER, A.; LEMEUR, M.; SASSONECORSI, P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH)

signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. 1998. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 95 p. 13612– 13617, 1998.

DROBNIS, E.Z.; NANGIA, A.K. Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents. In: Impacts of Medications on Male Fertility. 2017. **Adv Exp Med Biol** v. 1034 p. 13-24, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-69535-8_3.

DUCKETT, R.J.; WREFORD, N.G.; MEACHEM, S.J.; MCLACHLAN, R.I.; HEDGER, M.P. Effect of chorionic gonadotropin and flutamide on Leydig cell and macrophage populations in the testosterone-estradiol-implanted adult rat. 1997. **J Androl** v. 18 [6] p. 656-662, 1997. PMID: 9432138.

FULLER, R.W.; WONG, D.T.; ROBERTSON, D.W. Fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake. 1991. **Med. Res. Rev.** v. 11 p. 17–34, 1991. doi:10. 1002/MED.2610110103

GAYTAN, F.; BELLIDO, C.; MORALES, C.; REYMUNDO, C.; AGUILAR, E.; VAN ROOIJEN, N. Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. 1994. **J Androl** v. 15 [6] p. 558-564, 1994. PMID: 7721658.

GENISSEL, C.; CARREAU, S. Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig cells, Mol. Cell. 2001. **Endocrinol**. v. 178 p. 141–146, 2001. https://doi.org/10.1016/ S0303-7207(01)00409-9.

GOUVEIA, E. M.; FRANCI, C.R.; Involvement of serotonin 5HT1 and 5HT2 receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion. 2004. **Brain Res. Bull** v. 63, p. 243–251, 2004. doi:10.1016/ J.BRAINRESBULL.2004.03.002

HALES, D.B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. 2002. **J Reprod Immunol** v. 57 [1-2] p. 3-18, 2002. doi: 10.1016/s0165-0378(02)00020-7. PMID: 12385830.

HANDELSMAN, D.J.; SPALIVIERO, J.A.; SCOTT, C.D.; BAXTER, R.C. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis. 1985. **ActaEndocrinol (Copenh)** v. 109 [4] p. 543–549, 1985.

HARDY, M.P.; ZIRKIN, B.R. Leydig Cell Function. 1997. **Lipshultz L.I.; Howards S.S.; Infertility in the Male. Saint Louis: Mosby** v. 3 p. 59-70, 1997.

HÄRKÖNEN, P.L.; VÄÄNÄNEN, H.K. Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptor modulators. 2006. **Ann NY Acad Sci.** v. 1089 p. 218-227, 2006. doi: 10.1196/annals.1386.045. PMID: 17261769.

HEDGER, M.P. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. 2002. **J Reprod Immunol**, 2002.

HOLDCRAFT, R.W.; BRAUN, R.E. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. 2004. **Development** v. 131 [2] p. 459-467, 2004.

HOLSTEIN, A.F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. 2003. **Reprod Biol Endocrinol** v. 1 p. 107, 2003.

HUO, S.; ZHONG, X.; WU, X.; LI, Y. Effects of Norepinephrine and Acetylcholine on the Development of Cultured Leydig Cells in Mice. 2012. **J Biomed Biotechnol**, 2012. doi: 503093.

ISLIN, J.; MUNKBOEL, C.H.; STYRISHAVE, B. Steroidogenic disruptive effects of the serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors duloxetine, venlafaxine and tramadolin the H295R cell assay and in a recombinant CYP17 assay. 2018. **Toxicol In Vitro** v. 47 p. 63-71, 2018. doi: 10.1016/j.tiv.2017.10.029.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 2013. **12ª ed. Guanabara Koogan**, 2013. 978 -85-277-23 11-4.

KARAKURT, F.; KARGILI, A.; UZ, B.; KAYA, A.; KOSAR, A.; OZKARA, A.; OZBEK, M. Venlafaxine-Induced Gynecomastia in a Young Patient: A Case Report. 2009. **Clin Neuropharmacol** v. 32 [1] p. 51-52, 2009. doi: 10.1097/WNF.0B013E3181679126.

KERR, J.B.; MILLAR, M.; MADDOCKS, S.; SHARPE, R.M. Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertolicells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. 1993. **Anat Rec** v. 235 [4] p. 547-59, 1993.

KOIKE, S.; NOUMURA, T. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II in the perinatal rat gonad. 1995. **Growth Regul** v. 5 p.185–189,1995.

LEAVY, M.; TROTTMANN, M.; LIEDL, B. Effects of elevated β-estradiol levels on the functional morphology of the testis - new insights. 2017. **Sci Rep**, 2017;7:39931.

LIANG, Y.; XIE, H.; WU, J.; LIU, D.; YAO, S. Villainous role of estrogen in macrophage-nerve interaction in endometriosis. 2018. **Reprod Biol Endocrinol** v. 16

[1] p. 122, 2018. doi: 10.1186/s12958-018-0441-z. PMID: 30518376; PMCID: PMC6282253.

LOKKA, E.; LINTUKORPI, L.; CISNEROS-MONTALVO, S.; MÄKELÄ, J.A.; TYYSTJÄRVI, S.; OJASALO, V.; GERKE, H.; TOPPARI, J.; RANTAKARI, P.; SALMI, M. Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis. 2020. **Nat Commun** v. 11 [1] p. 4375, 2020. doi: 10.1038/s41467-020-18206-0. PMID: 32873797; PMCID: PMC7463013.

MARTIN, L.J.; BOUCHER, N.C.; BROUSSEAU, J.J.; TREMBLAY. The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase I. 2008. **Mol. Endocrinol** v. 22. p .2021–2037, 2008. https://doi.org/10.1210/me.2007-0370.

MILLER, W.L.; BOSE, H.S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. 2011. **J Lipid Res** v. 52 [12] p. 2111-2135, 2011. doi: 10.1194/jlr.R016675.

MOGER, W.H.; MURPHY, P.R.; CASPER, R.F. Catecholamine stimulation of androgen production by mouse interstitial cells in primary culture. 1982. **J Androl** v. 3 p. 227-231, 1982.

MOGER, W.H.; MURPHY, P.R. ß-Adrenergic agonist induced androgen production during primary culture of mouse Leydig cells. 1983. **Arch Androl** v. 10 p. 135-142, 1983.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. 1999. **Brazilian Journal of Psychiatry** p. 1516-4446, 1999.

NES, W.D.; LUKYANENKO, Y.O.; JIA, Z.H.; QUIDEAU, S.; HOWALD, W.N.; PRATUM, T.K.; WEST, R.R.; HUTSON, J.C. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. 2000. **Endocrinology** v. 141 p. 953–958, 2000. doi: 10.1210/endo.141.3.7350.

NØRR, L.; BENNEDSEN, B.; FEDDER, J.; LARSEN, E.R. Use of selective serotonin reuptake inhibitors reduces fertility in men. 2016. **Andrology** v. 4 [3] p. 389-394, 2016. doi: 10.1111/andr.12184.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS), ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Folha informativa - Depressão. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095>. Acesso em janeiro de 2019.

PETERSEN, C.; SODER, O. The Sertoli cell--a hormonal target and „super‟ nurse for germ cells that determines testicular size. 2006. **Horm Res** v. 66 [4] p. 153-161, 2006.

RODJAKOVIC, D.; SALM, L.; BELDI, G. Function of Connexin-43 in Macrophages. 2021. **Int J Mol Sci** v. 22 [3] p. 1412, 2021. doi: 10.3390/ijms22031412. PMID: 33573367; PMCID: PMC7866802.

ROMANO, F.; TRIPICIANO, A.; MUCIACCIA, B.; DE CESARIS, P.; ZIPARO, E.; PALOMBI, F.; FILIPPINI, A. The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. 2005. **Contraception** v. 72 [4] p. 294-297, 2005.

RONE, M.B.; FAN, J.; PAPADOPOULOS, V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein–protein interactions and implications in disease states. 2009. **Biochim Biophys Acta** v. 1791 [7] p. 646-658; 646–658, 2009.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN. R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.S.; CLEGG, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1990. **Clearwater: Cache River Press** v. 1, 1990.

RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli Cell. 1993. **Clearwater, Cache River Press**, 1993.

SASSO-CERRI, E.; MIRAGLIA, S.M. In situ demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. 2002. **Histol Histopathol** v. 17 [2] p. 411-417, 2002. doi: 10.14670/HH-17.411.

SCHULSTER, M.; BERNIE, A.M.; RAMASAMY, R. The role of estradiol in male reproductive function. **Asian J Androl** v. 18 p. 435-440, 2016.

SCHULZE, C. Sertoli cells and Leydig cells in man. 1984. **Adv Anat Embryol Cell Biol** v. 88 p. 1-104, 1984.

SCHWEIZER, E.; THIELEN, R.J.; FRAZER, A. Venlafaxine:a novel antidepressant compound. 1997. **Expert Opin Investig Drugs** v. 6 [1] p. 65-78, 1997.

SHEBAK, S.S.; VARMA, A. Low testosterone levels associated with venlafaxine use: a case report. 2014. **PrimCare Companion CNS Disord** v. 16 p. 16, 2014. doi: 10.4088/PCC.14l01646

SILVA JUNIOR, 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. 2008. **Int. J. Morphol** v. 26 [1] p. 51-62, 2008.

SMITH, L.B.; WALKER, W.H.; The regulation of spermatogenesis by androgens. 2014. **Semin Cell Dev Biol** v. 30 p. 2-13, 2014. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.02.012.

STAHL, S.M.; GRADY, M.M. SNRIs: The Pharmacology, Clinical Efficacy, and Tolerability in Comparison with Other Classes of Antidepressants. 2005. **CNS Spectr**, 2005. 10(9):732-47.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. 2018. **Animal** v. 12(s1) p. 27-35, 2018. doi:10.1017/S1751731118000435.

U.S. NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH (NIMH), MENTAL HEALTH MEDICATIONS. Disponível em: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/mental-health-medications/index.shtml#part_149856 2016>. Acesso em março 2019.

VERHOEVEN, G.; CAILLEAU, J.; Follicle-stimulating hormone and androgens increase the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells. 1998. **Endocrinology** v. 122 p. 1541– 1550, 1998.

VOGL, A.W.; PFEIFFER, D.C.; MULHOLLAND, D.; KIMEL, G.; GUTTMAN, J. Unique an dmultifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. 2000. **Arch Histol Cytol** v. 63 p. 1–15, 2000.

WANG, R.; YEH, S.; CHEN, L.; LIN, H.; ZHANG, C.; NI, J.; WU, C.; DI SANT'AGNESE, A.; DEMESY-BENTLEY, K.L.; TZENG, C.; CHANG, C.; Androgen Receptor in Sertoli Cell Is Essential for Germ Cell Nursery and Junctional Complex Formation in Mouse Testes. 2006. **Endocrinology** v. 147 [12] p. 5624-5633, 2006.

WONG, D. T.; REID, L. R.; AND THRELKELD, P. G. Suppression of food intake in rats by fluoxetine: comparison of enantiomers and effects of serotonin antagonists. 1988. **Pharmacol Biochem Behav** v. 31 p. 475–479, 1988. doi:10.1016/0091-3057(88)90376-0

WYETH PHARMACEUTICALS INC. EFFEXOR XR - venlafaxine hydrochloride capsule, extended release: Highlights of prescribing information. **Philadelphia (PA)**, 2015.

ZHANG, J.; JIN, S.; ZHAO, J.; LI, H. Effect of dibutyl phthalate on expression of connexin 43 and testosterone production of leydig cells in adult rats. 2016. **Environ Toxicol Pharmacol** v. 47 p. 131-135, 2016. doi: 10.1016/j.etap.2016.09.010. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27676332.