

Talita Bonato de Almeida

**“Avaliação de parâmetros morfométricos e morfofuncionais em testículos de ratos  
tratados com fluoxetina e suplementados com vitamina B<sub>12</sub>”**

Araraquara

2014

Talita Bonato de Almeida

**“Avaliação de parâmetros morfométricos e morfofuncionais em testículos de ratos  
tratados com fluoxetina e suplementados com vitamina B<sub>12</sub>”**

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”  
– UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutica-  
Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

Co-orientadora: Dra. Flávia Luciana Beltrame

Araraquara

2014

## **Dedicatória**

À minha mãe, Meire, ao meu pai, Luis, e meus familiares (Olivério, Silene, avós e tios) que são meus exemplos de vida, que sempre me deram amor, me proporcionaram uma excelente e sólida educação e por sempre terem feito o possível e o impossível para que eu concluísse esse curso;

Às meninas da minha república, Carol Véspoli, Carol Giordano, Pati, Mari e Thaís pelos maravilhosos anos de convívio, aprendizado e diversão e por terem se tornado minha segunda família;

Ao meu noivo, Vitor, por estar sempre comigo, me apoiando e me dando força nos momentos de desânimo.

Amo vocês!

## **Agradecimentos especiais**

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Estela Sasso Cerri por me acolher em seu laboratório desde o primeiro semestre de faculdade, pela paciência, ensinamentos, dedicação, por ter acreditado no meu potencial durante esses cinco anos e ter auxiliado no meu desenvolvimento intelectual e pessoal.

Agradeço também a minha co-orientadora Dra. Flávia Luciana Beltrame por me ter sido parte fundamental no desenvolvimento deste trabalho, auxiliando em todas as etapas (desde a escrita do projeto, cuidado com os animais, relatórios, painel para congresso, análises laboratoriais, revisões, artigos) e sanando minhas inúmeras dúvidas, sempre com muito bom humor e franqueza.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri por todas as sugestões, esclarecimentos e auxílio com relatórios, reações e projetos;

Ao Prof. Dr. Breno Henrique Caneguim que se tornou muito importante para a conclusão desse trabalho, mostrando-se sempre disposto a ajudar e solucionar problemas;

À companheira de laboratório Marina Luiza Câmara pela sabedoria e experiência transmitida a mim, por me auxiliar durante todas as etapas do trabalho e por sempre me ajudar quando precisei;

Aos mestrandos e doutorandos José Paulo Pizzol Júnior, Tiago Fonseca, Juliana Damieli, Bruna Rocha, Priscila Oliveira, Dérick Damasceno Barbosa e Guilherme Ferreira pelos conhecimentos transmitidos, mas principalmente pelo apoio e amizade;

Aos técnicos do laboratório da disciplina de Histologia Luis Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões por todo o conhecimento técnico laboratorial adquirido;

À FAPESP pelo auxílio financeiro que proporcionou o desenvolvimento deste

trabalho, através do processo 2013/04867-9;

Agradeço finalmente à Deus por ter me dado saúde, paciência e força para a conclusão desse trabalho e realização do sonho da graduação.

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
1.1. Testículos e espermatogênese.....	12
1.2. O sistema ubiquitina.....	14
1.3. Ação de fármacos sobre os testículos.....	16
1.4. Fluoxetina.....	17
1.5. Vitamina B12.....	19
<b>2. Proposição.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>21</b>
3.1. Animais.....	21
3.2. Grupos de tratamento.....	22
3.3. Processamento para microscopia de luz.....	23
3.4. Análises morfométricas.....	23
3.4.1. Quantificação de células de Sertoli.....	24
3.5. Análises estatísticas.....	24
3.6. Método do TUNEL.....	24
3.7. Imuno-histoquímica para detecção de PGP9.5.....	24
<b>4. Resultados.....</b>	<b>26</b>
4.1. Peso corpóreo.....	26
4.2. Pesos testiculares absolutos e relativos.....	27
4.3. Dosagem de testosterona sérica.....	28
4.4. Resultados morfológicos.....	29
Imuno-histoquímica para detecção de PGP9.5.....	35
Método do TUNEL.....	35
4.5. Resultados morfométricos.....	35
4.5.1. Área tubular total.....	35
4.5.2. Quantificação de células de Sertoli.....	35
<b>5. Discussão.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>42</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>43</b>
<b>Dados finais.....</b>	<b>56</b>

## Resumo

A fluoxetina, um antidepressivo utilizado principalmente no tratamento de depressão, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo, pertence à classe dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que este fármaco causa alterações significantes na histoarquitetura do epitélio seminífero e, portanto, no processo espermatogênico. A vitamina B12 promove a síntese de DNA e favorece, conseqüentemente, a proliferação celular. Sendo assim, foi proposto avaliar se a suplementação com vitamina B12, em ratos tratados com a fluoxetina, é capaz de amenizar as alterações causadas por este fármaco. Foram utilizados 32 ratos adultos distribuídos em 4 grupos: grupo vitamina B12 (GVit), grupo fluoxetina (GF), grupo fluoxetina e vitamina B12 (GF/Vit) e grupo controle (GC). Os animais do GVit receberam injeções de vitamina B12 (3µg), os animais do GF receberam fluoxetina (20mg/kg), os do GF/Vit receberam vitamina e fluoxetina e os animais do GC receberam água destilada. Transcorridos 11 dias de tratamento, os testículos foram fixados e processados para inclusão em historesina e parafina. Foram avaliados os parâmetros morfométricos: área tubular total e número de células de Sertoli. Os resultados foram submetidos à análise estatística para avaliação das diferenças entre os grupos. A fim de avaliar a incidência de ubiquitinação nas células germinativas, os cortes foram submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de UCHL-1 (ubiquitina). O tratamento com fluoxetina causou uma redução significativa do peso corpóreo e redução, embora não significativa, do peso testicular dos animais, além de uma redução acentuada nos níveis séricos de testosterona. A análise dos parâmetros morfométricos mostrou uma redução significativa da área tubular total e do número de células de Sertoli. Nos túbulos seminíferos destes animais, também foram notados vacúolos e espaços intercelulares, desorganização epitelial e contorno tubular irregular. Inúmeras células TUNEL-positivas foram encontradas nos cortes testiculares dos animais do GF e a intensidade na imunoexpressão de UCHL-1 nas

células germinativas foi aparentemente maior nos animais do GF em comparação aos do GC. Os animais do GF/Vit mantiveram o peso corpóreo durante o tratamento e apresentaram uma redução não significativa dos pesos testiculares. Nestes animais, houve um aumento não significativo nos níveis séricos de testosterona, em comparação ao GF. Ainda no GF/Vit, os cortes testiculares mostraram uma aparente redução na frequência de túbulos com alterações morfológicas e verificou-se um leve aumento (significante) na área dos túbulos seminíferos, em comparação ao GF. Entretanto, não foram detectadas diferenças no número de células de Sertoli entre os GF/Vit e GF. Portanto, o tratamento com fluoxetina causa alterações significantes na histoarquitetura dos túbulos seminíferos, bem como redução nos níveis séricos de testosterona. A intensa expressão de ubiquitina nas células germinativas confirma a interferência deste fármaco no processo espermatogênico. A suplementação com vitamina B12 concomitante ao tratamento com fluoxetina, por 11 dias, foi capaz de manter o peso corpóreo dos animais, bem como amenizar as alterações morfológicas e morfométricas causadas por este fármaco nos testículos de ratos adultos.

Palavras-chave: testículos; fluoxetina; vitamina B12.

## Lista de ilustrações

- Figura 1.** Peso corpóreo dos animais dos grupos GC, GVit, GF e GF/Vit durante o tratamento. (\* $P \leq 0,05$ ).....26
- Figura 2.** Dosagem de testosterona sérica dos grupos controle (GC), vitamina B12 (GVit), fluoxetina (GF) e fluoxetina + vitamina B12 (GF/Vit). ( $p \leq 0,05$ ;  $a \neq b \neq c$ ).....29
- Figura 3.** Fotomicrografias de secções testiculares de ratos dos grupos GC (2A), GVit (2B), GF (2C) e GF/Vit (2D) corados pela HE.....31
- Figura 4.** Fotomicrografias de secções testiculares de ratos dos grupos GC (3A), GVit (3B), GF (3C e 3D) e G/Vit (3E e 3F) corados pela HE.....32
- Figura 5.** Fotomicrografias de túbulos seminíferos de ratos do GC e do GF submetidos à imuno-histoquímica para PGP 9.5 (ubiquitina).....33
- Figura 6.** Fotomicrografias de secções testiculares de ratos do grupo GF coradas com H.E. (5A e 5C) e submetidas ao método do TUNEL (5B e 5D).....34
- Figura 7.** Número de células de Sertoli/túbulo seminífero dos animais do grupo controle (GC), fluoxetina (GF) e fluoxetina + vitamina B12 (GF/Vit).....36

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1.** Pesos testiculares absolutos (PTA) e pesos testiculares relativos (PTR) dos animais do grupo controle (GC), do grupo vitamina B12 (GVit), do grupo fluoxetina (GF) e do grupo fluoxetina e vitamina B12 (GF/Vit).....28

**Tabela 2.** Área tubular total (AT) dos animais do grupo controle (GC), grupo vitamina B12 (GVit), fluoxetina (GF) e fluoxetina + vitamina B12 (GF/Vit).....35

## Lista de abreviações

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ng</b>	Nanograma
<b>dL</b>	Decilitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>g</b>	Gramma
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>h</b>	Hora
<b>ABP</b>	Proteína ligante de andrógeno
<b>AR</b>	Receptor de andrógeno
<b>AT</b>	Área tubular total
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EP</b>	Epitélio seminífero
<b>FI</b>	Fator intrínseco gástrico
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>GC</b>	Grupo controle
<b>GF</b>	Grupo fluoxetina

<b>GF/Vit</b>	Grupo fluoxetina e vitamina B12
<b>GVit</b>	Grupo vitamina B12
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HPG</b>	Hipotálamo-hipófise-gônada
<b>IRSS</b>	Inibidor da receptação seletiva de serotonina
<b>L</b>	Luz tubular
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>MAO</b>	Monoaminoxidase
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>PGP 9.5</b>	Protein Gene Product
<b>PTA</b>	Peso testicular absoluto
<b>PTR</b>	Peso testicular relativo
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TI</b>	Tecido intersticial
<b>TOC</b>	Transtorno obsessivo compulsivo
<b>TdT</b>	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling
<b>UCH</b>	Hidrolase
<b>UCHL-1</b>	Ubiquitin C-terminal hydrolase 1

## 1. Introdução

### 1.1. Testículos e espermatogênese

Constituído por um par de testículos, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis, o sistema reprodutor masculino é o responsável por garantir a fertilidade do homem e, conseqüentemente, a manutenção da espécie (MOORE, PERSAUD, 1996). Os testículos são revestidos pela túnica albugínea, uma delgada, porém resistente, cápsula fibrosa (DAVIS et al., 1970); seu parênquima é dividido em túbulos seminíferos e tecido intersticial, responsáveis, respectivamente, pelas atividades espermatogênica e esteroidogênica (SPITERI-GRECH, NIESCHLAG, 1993).

Os túbulos seminíferos são formados por um epitélio germinativo estratificado disposto de forma concêntrica, envolvidos por um tecido peritubular, no qual estão presentes as células mióides (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). As células mióides são células contráteis responsáveis por movimentar e propulsionar os fluidos pelos túbulos seminíferos, cooperando no transporte dos espermatozóides, além de fornecerem apoio estrutural para as células de Sertoli e para as células do compartimento basal do epitélio seminífero (SIU, CHENG, 2008).

No interior dos túbulos encontram-se as células de Sertoli (células de sustentação) e as células germinativas. As células de Sertoli se localizam na base do túbulo seminífero e se estendem até a luz tubular, envolvendo as células germinativas. São células somáticas que possuem núcleo com forma piramidal, nucléolo tripartido e exercem diversas e essenciais funções, como a manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreção de fluidos, regulação do ciclo espermatogênico, fagocitose, e secreção de proteínas como, por exemplo, a ABP (proteína ligante de andrógeno) (RUSSELL et al., 1990; SKINNER et al., 1985; O'DONNELL et al., 2001; TINDALL et al., 1985). Estas células possuem receptores para os

hormônios FSH (hormônio folículo-estimulante) e testosterona (SANBORN et al., 1977; STEINBERGER et al., 1979).

As células germinativas se encontram dispostas em camadas concêntricas, da base para a luz tubular, e passam pela espermatogênese, um processo complexo que ocorre de forma ordenada (CLERMONT, 1972). A espermatogênese pode ser dividida em três fases: a fase proliferativa, a fase meiótica e a espermiogênese. A fase proliferativa engloba as modificações sofridas pelas espermatogônias, células germinativas diplóides localizadas no compartimento basal dos túbulos seminíferos. Três tipos de espermatogônias foram inicialmente descritas com base em sua morfologia nuclear: as espermatogônias do tipo A, tipo intermediário e tipo B (CLERMONT, 1972; MONESI, 1962). As espermatogônias do tipo A permanecem se dividindo, enquanto as do tipo B se diferenciam em espermatócitos primários (pré-leptótenos, leptótenos, zigótenos, paquítenos e diplótenos) (RUSSELL et al., 1990). Durante a fase meiótica, os espermatócitos primários sofrem duas divisões meióticas do ciclo espermatogênico; a primeira dá origem aos espermatócitos secundários e a segunda, às espermatídes haplóides (O'DONNELL et al., 2001; PHILLIPS et al., 2010). Estas células passam por um processo denominado espermiogênese, no qual ocorrem mudanças morfológicas como, por exemplo, o desenvolvimento de flagelo e acrossomo, e se diferenciam em espermatozóides maduros (RUSSEL et al., 1990). De acordo com LEBLOND E CLERMONT (1954), os túbulos seminíferos, em ratos, podem ser classificados, de acordo com o ciclo do epitélio seminífero, em 14 estágios.

O tecido intersticial é um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado por capilares sanguíneos e linfáticos, que atuam como via de transporte de nutrientes e hormônios. Neste tecido são encontrados, principalmente, macrófagos, fibroblastos e as células características desse compartimento, as células de Leydig (O'DONNELL et al., 2001). Estas células podem ser identificadas pelo núcleo arredondado com nucléolo evidente e

heterocromatina espalhada ao longo da membrana nuclear, além de retículo endoplasmático liso abundante e mitocôndrias com cristas tubulovesiculares (DAVIS et al., 1970). A principal função das células de Leydig consiste na síntese e secreção de testosterona, processo que depende do hormônio LH (hormônio luteinizante), secretado pela hipófise anterior. Este hormônio se liga aos receptores específicos da membrana das células de Leydig, desencadeando a atividade esteroidogênica destas células (O'SHAUGHNESSY et al., 2010). A testosterona sintetizada é difundida para os túbulos seminíferos, para os vasos sanguíneos e para as próprias células de Leydig, ligando-se aos seus respectivos receptores (receptores de andrógenos), localizados nas células mióides peritubulares, nas células de Sertoli, nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos e nas próprias células de Leydig (VORNBERGER et al., 1994). Os altos níveis de testosterona intratubular são essenciais para a manutenção de uma espermatogênese normal (RUSSELL et al., 1990).

## **1.2. O sistema ubiquitina**

A proteína citoplasmática ubiquitina está envolvida em aproximadamente 60 diferentes processos celulares, como desenvolvimento progressivo do ciclo celular, degradação de proteínas intracelulares, morte celular programada e endocitose de receptores de membrana, principalmente em tecidos de constante renovação celular (HERSKO, CIECHANOVER, 1998). Para muitos desses processos, a ubiquitinação ocorre de forma regulada, desempenhando papéis importantes para a regulação dos níveis proteicos celulares (BONIFACINO, WEISSMAN, 1998). Está também envolvida no processo de formação das placas características da doença de Alzheimer (PERRY et al., 1987; MANETTO et al., 1988) e na infecção viral pelo HIV (STRACK et al., 2000).

A ubiquitinação é efetuada por uma cascata multi enzimática envolvendo classes de enzimas conhecidas como E1 (ubiquitina ativada), E2 (ubiquitina conjugada) e E3 (ubiquitina

ligante de enzimas), resultando na mono ou poliubiquitinação dos diferentes substratos celulares (BAARENDS et al., 1999; BEBINGTON et al., 2001). Por ser uma proteína reciclável, a ubiquitina é clivada do substrato proteico, antes deste ser degradado no proteossoma por proteases e hidrolases, permitindo que a ubiquitina seja reutilizada num novo processo de ubiquitinação (HERSKO, CIECHANOVER, 1998).

Na espermatogênese, o sistema ubiquitina-proteossoma é responsável pela degradação de proteínas durante todo o desenvolvimento das fases mitótica, meiótica e pós-meiótica (HERSKO et al., 1982), sendo as mitocôndrias um dos principais alvos de ubiquitinação.

O sistema ubiquitina nas espermatogônias atua de forma a minimizar os danos no DNA, quando estas células são expostas ao estresse. Além disso, nas células de Sertoli, este sistema desempenha um importante papel no metabolismo proteolítico durante a espermatogênese normal, principalmente de proteínas defeituosas (KON et al., 1999).

O controle do equilíbrio celular entre o sistema ubiquitina e a degradação proteica é efetuado através de hidrolases (UCH), as quais, segundo estudos, desempenham um importante papel na regulação da espermatogênese e atuam como regulador de apoptose. Portanto, se tal equilíbrio for interrompido, os níveis de apoptose podem reduzir, resultando em proliferação de células germinativas com mutações gênicas incompatíveis com o processo normal da espermatogênese, culminando em infertilidade (KWON et al., 2005).

RAWE et al. (2002) demonstraram que anticorpos anti-ubiquitina são capazes de reconhecer espermatozoides anormais provenientes de distúrbios hereditários na fertilidade masculina. Tal estudo constatou que o nível de ubiquitina foi maior nos espermatozoides anormais em todas as condições estudadas.

A PGP 9.5 (Protein Gene Product) é uma hidrolase UCHL-1 (ubiquitin C-terminal hydrolase 1), usada como marcador geral neuronal e de fibras nervosas (LUNDBERG et al., 1988; TOMITA, 2001). Esta proteína compreende uma família de hidrolases específicas

envolvidas tanto no processamento de precursores de ubiquitina e de proteínas ubiquitinadas quanto no impedimento da degradação de monômeros de ubiquitina pelo proteassoma. Por meio da presença dessas hidrolases, é possível detectar o processo de ubiquitinação nas células de Sertoli e nas espermatogônias (KON et al., 1999).

### **1.3. Ação de fármacos sobre os testículos**

Diversos fatores químicos e/ou físicos podem afetar o desenvolvimento normal da espermatogênese, pois se trata de um tecido em constante renovação celular. Pode-se citar as radiações ionizantes (RAMADAN et al., 2002; TOPCU-TARLADACALISIR et al., 2009), a ação de substâncias oxidantes (PRAHALATHAN et al., 2006), a ausência de vitaminas (MORALES, CAVICCHIA, 2002), o uso de álcool e o hábito de fumar (PASQUALOTTO et al., 2004), por exemplo.

Algumas drogas e medicamentos também podem afetar a fertilidade masculina, alterando o equilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG), causando um declínio na secreção de gonadotrofinas ou uma alteração na concentração de testosterona intratesticular. Podem também causar alterações nos sistemas vascular e neurológico, comprometendo a ereção normal e a libido masculina (PASQUALOTTO et al., 2004; KARASHIMA et al., 1988). Tem sido demonstrado que antineoplásicos, drogas utilizadas no tratamento do câncer, causam alterações hormonais, como redução na produção de testosterona (NARAYANA et al., 2009) e danos à histioarquitetura dos túbulos seminíferos, comprometendo a espermatogênese (STUMPP et al., 2004; UDAGAWA ET al., 2006). O uso de imunossupressores também tem causado alterações na atividade espermatogênica de indivíduos transplantados (MASUDA et al., 2003), bem como em roedores (CANEGUIM et al., 2009). Além disso, drogas antagonistas de receptores de  $H_2$  utilizadas no tratamento de úlceras gástricas, como a cimetidina, também têm causado alterações testiculares, incluindo

danos na estrutura histológica dos túbulos seminíferos e, portanto, na espermatogênese (SASSO-CERRI et al., 2001; SASSO-CERRI, MIRAGLIA, 2002; SASSO-CERRI, CERRI, 2008; BELTRAME et al., 2011).

Uma classe de medicamentos muito utilizada atualmente é a dos antidepressivos. Estudos demonstram que tais fármacos apresentam uma significativa influência na atividade espermatogênica, tanto em nível celular quanto em nível hormonal (TAYLOR et al., 1996; CSOKA et al., 2008). De forma generalizada, os antidepressivos elevam a concentração de prolactina sérica, a qual suprime a secreção dos hormônios gonadotróficos (GnRH) pelo hipotálamo, afetando a produção de testosterona e resultando, assim, numa redução de libido, disfunção erétil e significativa queda na produção espermática (PASQUALOTTO et al., 2004). A fluoxetina, um dos antidepressivos mais prescritos segundo PACHER e KECSKEMETI (2004), e classificado como inibidor da recaptção seletiva de serotonina (IRSSs) (RANG, DALE, 2007), tem apresentado efeitos negativos na fertilidade masculina, além de disfunção erétil e perda da libido (CSOKA et al., 2008).

#### **1.4. Fluoxetina**

A fluoxetina é uma droga que se encaixa na categoria dos antidepressivos inibidores seletivos da captura de monoaminas. As monoaminas, como noradrenalina e serotonina, são neurotransmissores localizados em certos locais do cérebro e seu déficit funcional caracteriza a principal teoria bioquímica para a causa da depressão (BAKER, DEWHURST, 1985; MANJI et al., 2001).

Indicada para tratar depressão de grau moderado, ansiedade, obesidade, fobia social (DAVIDSON et al., 2004), crises de pânico e transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), a fluoxetina é um potente e seletivo inibidor de captura de serotonina (ICS), também conhecida como 5-hidroxitriptamina, a qual caracteriza-se por ser uma substância que atua tanto como

neurotransmissora do sistema nervoso central (SNC) quanto como hormônio local do sistema vascular periférico (BEASLEY et al., 2000; RANG, DALE, 2007; INKIELEWICZ-STÊPNIAK, 2011). Sua origem endógena se dá a partir do aminoácido triptofano e sua degradação ocorre principalmente pela enzima monoaminoxidase (MAO), sendo eliminada na urina (TRAMONTINA, 2008).

A fluoxetina, conhecida comercialmente como Prozac e Serafem, possui uma meia-vida plasmática maior que a dos outros ICS (24-96 horas), e necessita de um período de 2 a 4 semanas para apresentar efeito terapêutico (RANG, DALE, 2007). Entre os efeitos adversos da fluoxetina, foram observadas náuseas, insônia e perda de apetite; entretanto, apresenta baixos efeitos colaterais anticolinérgicos, anti-histaminérgicos e cardiovasculares em comparação aos antidepressivos tricíclicos (PACHER et al, 1999), sendo amplamente prescrita, inclusive durante a gravidez e lactação (EINARSON, KOREN, 2004).

Além de tais efeitos, também têm sido verificados distúrbios sexuais em pacientes do sexo masculino, como anorgasmia e ejaculação precoce (BITRAN, HULL, 1987). Segundo GOCMEZ et al. (2010), o tratamento prolongado com fluoxetina causa queda na taxa de motilidade dos ductos deferentes, pois bloqueia os purinoceptores (receptores do simpático responsáveis pela contratilidade de tais ductos). Um estudo realizado com hamsters machos demonstrou uma queda pelo interesse sexual destes pelas fêmeas, possivelmente causada pelos baixos níveis de serotonina (TAYLOR et al., 1996). GINSBERG (2007) relatou casos de disfunção sexual em homens que faziam uso do medicamento; mesmo após o término do tratamento, a oligospermia e a baixa motilidade espermática, causadas pela fluoxetina, permaneceram.

Além disso, a administração de fluoxetina em doses de 20 e 80 mg/Kg, em ratos, causou decréscimo nos níveis de testosterona sérica e de proteína testicular, alterações no comportamento sexual e queda na contagem espermática, (UNNIKISHNAN et al., 2009).

Outro estudo constatou que uma superdosagem de fluoxetina em ratos (200 mg/kg) resultou numa diminuição do peso do testículo e do epidídimo, além de decréscimo do número de espermatócitos primários, secundários e espermátides, além de alteração nos níveis de FSH e testosterona (BATAINEH, DARADKA, 2007).

### **1.5. Vitamina B12**

A vitamina B12 ou cobalamina é uma vitamina hidrossolúvel, não sintetizada pelo organismo humano, encontrada em praticamente todos os tecidos animais e estocada primariamente no fígado na forma de adenosilcobalamina. As principais fontes dietéticas são carnes (principalmente fígado), ovos e laticínios (STABLER, ALLEN, 2004).

Para ser absorvida pelo organismo, a vitamina B12 precisa ser capturada pela haptocorrina (também denominada transcobalamina I), formando um complexo que é posteriormente degradado pelas proteases pancreáticas, com conseqüente transferência da molécula de vitamina B12 para o fator intrínseco gástrico (FI), uma glicoproteína secretada pelas células gástricas parietais. Esse complexo (vitamina B12 + FI) é absorvido na porção terminal do íleo e lançado na circulação ligada a um transportador plasmático, sendo armazenada no fígado (SINCLAIR, 2000; WATANABE, 2007).

A vitamina B12 age em conjunto com o ácido fólico, promovendo a síntese de DNA e conseqüente proliferação celular (GREEN, 2011). Sendo assim, a deficiência de ambos pode afetar tecidos com renovação celular rápida, como a medula óssea e o epitélio seminífero (BATATA et al., 1967). Qualquer fator que interfira no processo de absorção da vitamina B12 pode desencadear uma deficiência dessa vitamina. A sua deficiência ocorre geralmente na anemia perniciosa, a qual resulta da má absorção causada pela ausência de fator intrínseco no estômago, podendo causar desde anemia simples a doenças neurológicas (WATANABE et al., 2003). Assim, a suplementação com vitamina B12 tem sido indicada a pacientes com

amnésia, depressão, psiquismo, portadores de Parkinson (VOLKOV et al., 2006) e mal de Alzheimer (CLARKE et al., 1998). Se a absorção cessar (como ocorre após gastrectomia total), demorarão de 2-4 anos para que sinais de deficiência se tornem evidentes (RANG, DALE, 2007).

SINCLAIR (2000) demonstrou que o tratamento com vitamina B12 em homens com infertilidade gera resultados positivos, como um considerável aumento na concentração espermática, na mobilidade dos espermatozóides e nos níveis de FSH, LH e testosterona. A forte correlação positiva entre a vitamina B12 plasmática e a espermatogênese é constatada por BOXMEER et al. (2007). Os autores demonstram que a ingestão dessa vitamina, via alimentação, mantém a concentração normal de espermatozóides, sugerindo a deficiência de cianocobalamina como um fator determinante para a subfertilidade masculina. ISOYAWA et al. (1984), em um estudo realizado com pacientes apresentando baixa produção de espermatozóides, exceto azoospermia, demonstraram que a administração diária de vitamina B12 beneficiou 42,3% dos casos apresentados, os quais apresentaram aumento na concentração e mobilidade espermática.

Efeitos benéficos da vitamina B12 também foram verificados em ratos induzidos à oligozoospermia pelo tratamento com doxorubicina por um longo período, tais como restauração do aspecto morfológico normal dos túbulos seminíferos e aumento na taxa de amadurecimento de espermatozóides (OZAKI et al., 1988; OSHIO et al., 1989). YAMADA et al. (2007) demonstraram que ratos com deficiência de vitamina B12, causada por medicamentos ou por ausência dessa vitamina na alimentação, apresentaram sérios danos no tecido testicular, como redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, epitélio desorganizado e aplasia e apoptose de células germinativas, além de redução do peso testicular. Os autores ainda verificaram que o tratamento dos animais com vitamina B12 melhorou o aspecto morfológico da histoarquitetura testicular. Além disso, BELTRAME et al. 2011 verificaram,

também em ratos, que parâmetros testiculares alterados pelo tratamento com cimetidina, como área tubular total e área epitelial dos túbulos seminíferos, foram restaurados aos padrões normais nos animais suplementados com vitamina B12 durante o tratamento, indicando uma eficiente participação desta vitamina no processo espermatogênico.

## **2. Proposição**

Tendo em vista a interferência causada pela fluoxetina na fertilidade masculina e os efeitos sobre a biologia estrutural dos testículos, foi proposto avaliar se as alterações causadas pela fluoxetina nos túbulos seminíferos são amenizadas pelo suplemento com vitamina B12 durante o tratamento.

A fim de investigar o processo de ubiquitinação nas células germinativas dos animais tratados com fluoxetina, foi proposto também avaliar a imunexpressão de ubiquitina (PGP 9.5 ou UCHL-1) nas células do epitélio seminífero.

## **3. Materiais e métodos**

O protocolo referente ao tratamento dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (protocolo número 05/2012).

### **3.1. Animais**

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Holtzmann, com 60 dias de idade, pesando aproximadamente 250g, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Campus de Araraquara. Durante o período de tratamento, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP) em gaiolas de polipropileno forradas com

maravalha, em ambiente a temperatura controlada de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Guabi® (Nutrilabor, Brasil) e água *ad libitum*.

### 3.2. Grupos de tratamento

Os animais foram divididos em 4 grupos, contendo oito animais cada: grupo fluoxetina (GF), grupo vitamina B12 (GVit), grupo fluoxetina e vitamina B12 (GF/Vit) e grupo controle (GC). Os animais do GF receberam, diariamente, injeções intraperitoneais de fluoxetina (diluída em água destilada deionizada), na dose de 20mg/Kg de peso corpóreo. Os animais do GVit receberam doses diárias intraperitoneais de 3 µg de vitamina B12 (Bedozil®, 5000 µg – Bunker). A dose de vitamina foi definida a partir de uma avaliação prévia da quantidade de ração consumida diariamente pelos animais nesta idade, segundo BELTRAME et al. (2011). Os animais do GF/Vit receberam 20mg/Kg de fluoxetina e 3µg de vitamina B12, e os animais do GC receberam injeções intraperitoneais de água destilada deionizada, em volume correspondente ao GF. O tratamento se estendeu por 11 dias consecutivos.

Após o término do tratamento, os animais foram pesados e anestesiados com 80 mg/Kg de peso corpóreo de cloridrato de cetamina (Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda) e 7 mg/Kg de peso corpóreo de cloridrato de xilazina (Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda). Sob efeito da anestesia, a cavidade torácica foi exposta para a coleta de sangue, via punção cardíaca, diretamente dos ventrículos, em tubos com ativador de coágulo e gel para separação do soro (BD Vacutainer Blood Collection Tubes, SST II Plus, BD Biosciences). O soro foi armazenado em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  para a dosagem de testosterona sérica, o qual foi realizada através do método da quimioluminescência. Em seguida, os testículos dos animais foram removidos da bolsa escrotal e pesados numa balança analítica digital Marte (AL 500), obtendo-se, assim, os pesos testiculares absolutos (PTA). O peso

testicular relativo representa o valor percentual do testículo em relação ao peso do animal e este foi obtido a partir da fórmula:

$$PTR = \frac{PTA}{\text{peso do animal}} \times 100$$

### **3.3. Processamento para microscopia de luz**

Os testículos esquerdos foram fixados em solução de formaldeído 4%, tamponada com fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4). Os testículos direitos foram fixados em líquido de Bouin. Após 1 hora de fixação, os testículos foram seccionados na região equatorial e mantidos por mais 48 horas nas suas respectivas soluções fixadoras.

Metade de cada testículo esquerdo foi processada para inclusão em historesina e, posteriormente, cortados em micrótomo (Leica, RM2255) para obtenção de cortes com 3 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a realização das análises morfológicas e morfométricas. As outras metades dos testículos esquerdos e os testículos direitos foram processados para inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo (Leica, RM2125 RTS) para obtenção de cortes com 6 µm de espessura, os quais foram aderidos à lâminas silanizadas e submetidos ao método do TUNEL (item 3.6) e à reação imuno-histoquímica para detecção de PGP 9.5 (item 3.7).

### **3.4. Análises morfométricas**

As análises morfométricas foram realizadas em 5 animais de cada grupo, nos cortes dos testículos incluídos em historesina e corados pela HE. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio de luz (Olympus, BX- 51) e uma câmera de captura (Olympus, DP71).

Dos testículos de cada animal foram obtidos 3 cortes não seriados, com um intervalo de, aproximadamente, 36 $\mu$ m entre eles. Para as análises morfométricas, foram capturadas, ao acaso, aproximadamente, 15 secções transversais circulares de túbulos seminíferos, totalizando 45 túbulos por animal. Utilizando-se um programa de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0; Olympus), foi obtida, em cada secção, a área tubular total.

#### **3.4.1. Quantificação de células de Sertoli**

Foi quantificado o número de células de Sertoli (apresentando morfologia nuclear típica e nucléolo bem evidente) em 30 secções transversais e circulares de túbulos seminíferos por animal dos grupos GC, GF e GF/Vit.

#### **3.5. Análise estatística**

Os resultados foram analisados utilizando-se um programa de análise estatística - SigmaStat (versão 3.2). A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste de variância “one-way” ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi  $p \leq 0,05$ .

#### **3.6. Método do TUNEL**

Para a detecção *in situ* das quebras das cadeias de DNA, que ocorrem durante a apoptose, alguns cortes testiculares incluídos em parafina foram aderidos a lâminas previamente silanizadas e submetidos ao método do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling). Para o desenvolvimento deste método foi utilizado o Kit Apop-Tag Plus Peroxidase *In situ* (Millipore; USA). As etapas da reação foram realizadas segundo o protocolo do fabricante e de acordo com SASSO-CERRI e MIRAGLIA (2002) e BELTRAME et al.(2012).

Para controle positivo da reação, foram utilizados cortes de glândula mamária em involução (provenientes do kit). Para o controle negativo da reação, alguns cortes testiculares foram submetidos à mesma reação, excetuando-se a etapa de incubação em TdT.

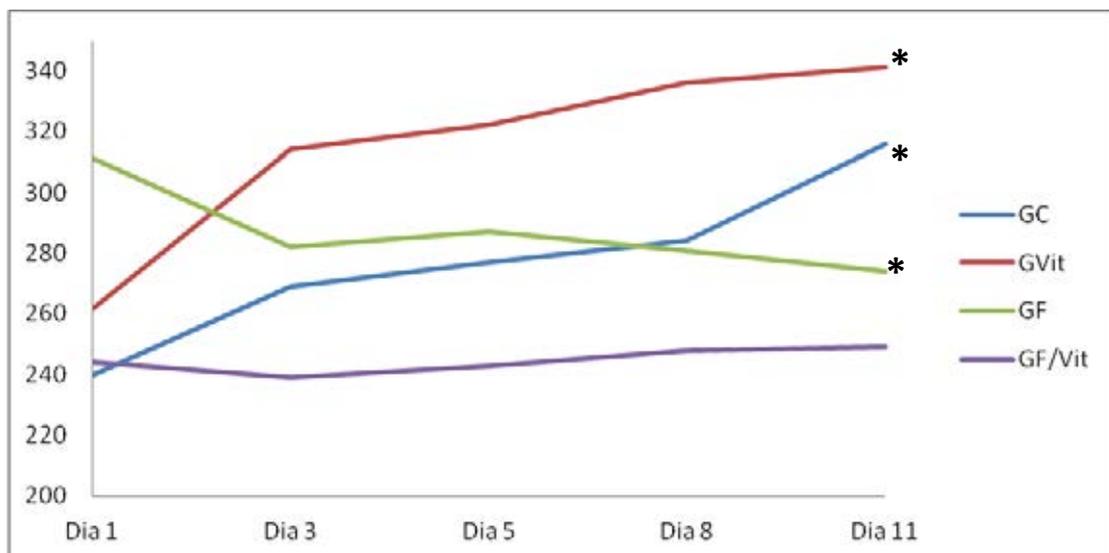
### **3.7. Imuno-histoquímica para detecção de PGP 9.5**

Os cortes testiculares foram aderidos a lâminas silanizadas, desparafinizados e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. A recuperação antigênica foi feita mantendo os cortes em tampão citrato de sódio (0,001M; pH 6,0), em forno de micro-ondas a 90°C, em 2 ciclos de 10 min. cada, totalizando 20 minutos. Para a inativação da peroxidase endógena, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio 9% em metanol durante 20 minutos. Após lavagem em tampão fosfato de sódio (50mM+200mM NaCl, pH 7,3), os cortes foram incubados com BSA 2% por 30 minutos e, posteriormente, incubados a 4°C, overnight, com anticorpo primário anti-ubiquitina PGP 9.5 (CM 329 AK; Biocare Medical, USA), na titulação de 1:800. Os cortes foram, então, incubados com anticorpo secundário biotilado (LSAB+; DAKO; USA) por 30 minutos, lavados com PBS e incubados com estreptavidina-HRP (LSAB+; Dako; USA) por 30 minutos. Após lavagem em PBS, a reação foi revelada com Betazoid DAB (Biocare Medical; USA); em seguida, foi realizada coloração nuclear com hematoxilina de Carazzi e os cortes foram desidratados, diafanizados e montados com resina Permount®. Como controle negativo das reações, alguns cortes foram submetidos às mesmas etapas e condições, excetuando-se a etapa de incubação com o anticorpo primário. Durante esta etapa, os cortes foram incubados em soro não imunizado.

## 4. Resultados

### 4.1. Peso corpóreo

Os animais do GC apresentaram ganho de peso corpóreo no decorrer de todo o período, alcançado, ao término do tratamento, um aumento significativo de, aproximadamente, 32% em relação ao peso que apresentavam no início do tratamento (dia 1). Os animais do GVit apresentaram ganho de peso corpóreo significativo no decorrer tratamento, alcançando, ao término do período, um aumento de 30% em relação ao peso que apresentavam no primeiro dia de tratamento. Os animais do GF apresentaram perda de peso corpóreo no decorrer do tratamento. Ao término do tratamento, houve uma perda significativa de 13% no peso corpóreo destes animais, com relação ao início do tratamento. Entretanto, os animais do GF/Vit mantiveram os pesos corpóreos praticamente estáveis, apresentando um leve ganho de peso, não significativo, de apenas 2%, a partir do oitavo dia de tratamento (Figura 1).



**Figura 1.** Peso corpóreo dos animais dos grupos GC, GVit, GF e GF/Vit durante o tratamento. (\* $P \leq 0,05$ ).

#### **4.2. Pesos testiculares absolutos e relativos**

Os animais do GVit apresentaram uma redução não significativa de, aproximadamente, 11% no peso testicular absoluto (PTA) e uma redução não significativa de 8% no peso testicular relativo (PTR) em relação aos animais do GC.

Os animais do GF apresentaram uma redução de 9% no peso testicular absoluto (PTA) em relação aos animais do GC. Entretanto, essa redução não foi significativa. Em relação ao peso testicular relativo (PTR), os animais do GF apresentaram um aumento, embora não significativo, de 8% quando comparados aos animais de GC (Tabela1).

Os animais do GF/Vit apresentaram uma redução não significativa de 17% no peso testicular absoluto (PTA) em relação aos animais do GC. Já em relação ao peso testicular relativo (PTR), o grupo apresentou um aumento de 8% comparado ao GC, porém este não foi significativo (Tabela 1). Comparado com GVit, o GF/Vit apresentou uma redução não significativa de 7% no peso testicular absoluto (PTA) e um aumento significativo de 17% no peso testicular relativo (PTR) (Tabela 1).

Equiparando com GF, o GF/Vit apresentou uma redução de 8,5% no peso testicular absoluto (PTA), entretanto não significativa. Em relação ao peso testicular relativo (PTR), os animais GF/Vit não apresentaram diferenças quando comparados ao GF (Tabela 1).

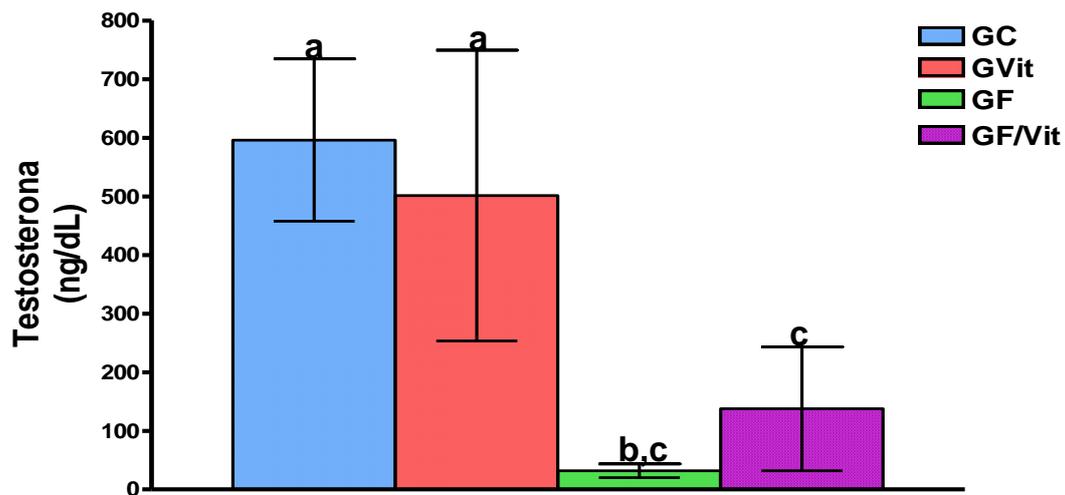
**Tabela 1.** Pesos testiculares absolutos (PTA) e pesos testiculares relativos (PTR) dos animais do grupo controle (GC), do grupo vitamina B12 (GVit), do grupo fluoxetina (GF) e do grupo fluoxetina e vitamina B12 (GF/Vit).

		GRUPOS			
		GC	GVit	GF	GF/Vit
<b>PTA(g)</b>	1	1,74	1,43	1,55	1,37
	2	1,48	1,48	1,29	1,36
	3	1,70	1,55	1,59	1,55
	4	1,67	1,52	1,61	1,30
	5	1,74	1,48	1,56	1,38
	X±DP	1,67±0,11 <sup>a</sup>	1,49±0,09 <sup>a</sup>	1,52±0,13 <sup>a</sup>	1,39±0,09 <sup>a</sup>
<b>PTR (%)</b>	1	0,56	0,50	0,61	0,54
	2	0,49	0,45	0,53	0,55
	3	0,55	0,49	0,53	0,60
	4	0,48	0,46	0,58	0,54
	5	0,46	0,47	0,50	0,51
	X±DP	0,51±0,04 <sup>a</sup>	0,47±0,02 <sup>a,b</sup>	0,55±0,04 <sup>a</sup>	0,55±0,03 <sup>a,c</sup>

Média± DP;  $p \leq 0,05$ ;  $a \neq b \neq c$ .

#### 4.3. Dosagem de testosterona sérica

Os animais dos grupos GF e GF/Vit apresentaram redução significativa (95% e 78%, respectivamente) nos níveis séricos de testosterona em comparação aos animais do GC. Entretanto, embora não tenha sido significativa, houve um aumento nos níveis séricos de testosterona nos animais do grupo GF/Vit em comparação aos animais do grupo GF (Figura 2).



**Figura 2.** Dosagem de testosterona sérica dos grupos controle (GC), vitamina B12 (GVit), fluoxetina (GF) e fluoxetina + vitamina B12 (GF/Vit). ( $p \leq 0,05$ ;  $a \neq b \neq c$ ).

#### 4.4. Resultados morfológicos

Ao microscópio de luz, as secções tubulares dos testículos dos animais do GC apresentaram características morfológicas normais típicas. Os túbulos seminíferos se apresentaram com contorno bem delimitado e definido, possuindo epitélio germinativo organizado em camadas concêntricas da base para luz tubular, assim como luz tubular bem definida e ausência de células descamadas (Figuras 3A e 4A). Os animais que receberam apenas vitamina B12 (GVit) apresentaram aparentemente o mesmo padrão morfológico que os animais do (GC) (Figuras 3B e 4B).

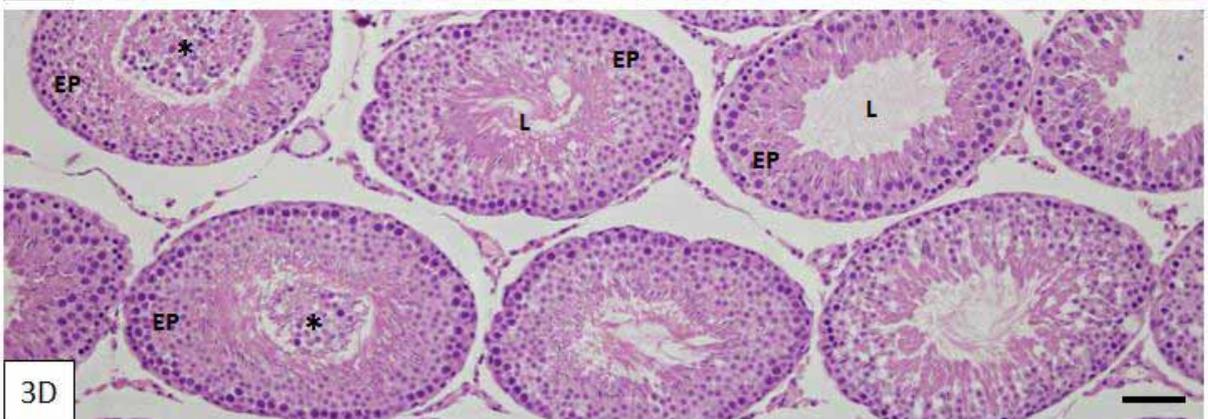
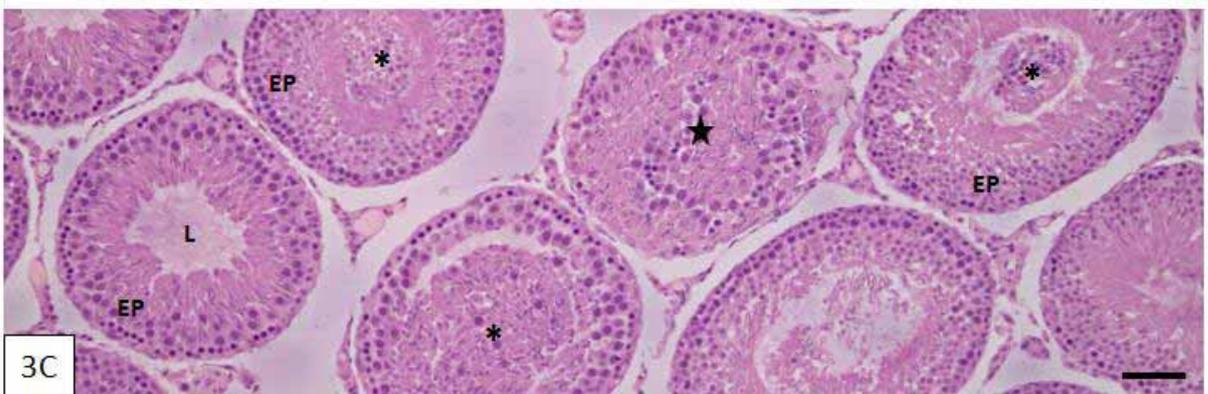
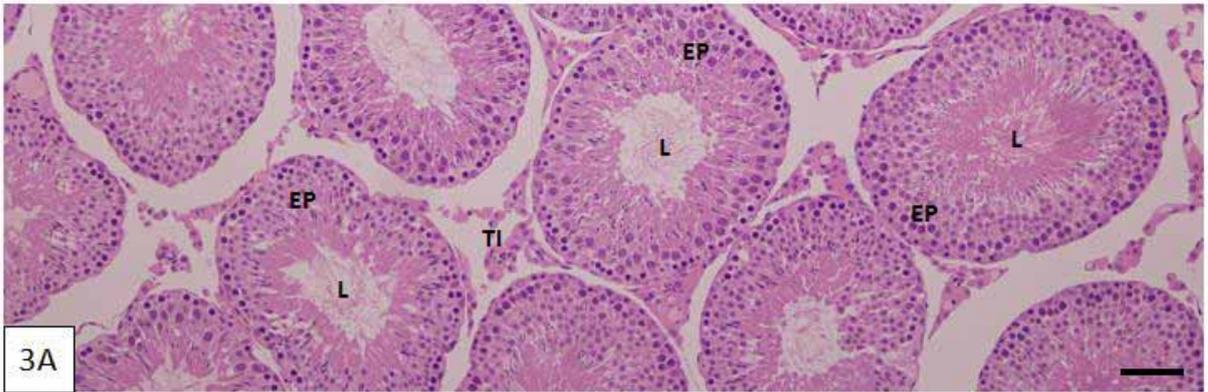
Os animais do GF apresentaram, em sua maioria, túbulos seminíferos de contorno regular e epitélio germinativo aparentemente normal, porém frequentemente foram encontrados túbulos com células germinativas descamadas em sua luz (Figuras 3C e 4C). Constantemente foram encontrados túbulos de contorno irregular (Figura 4D), com intensa desorganização epitelial; em algumas secções, não foi possível distinguir o epitélio da luz

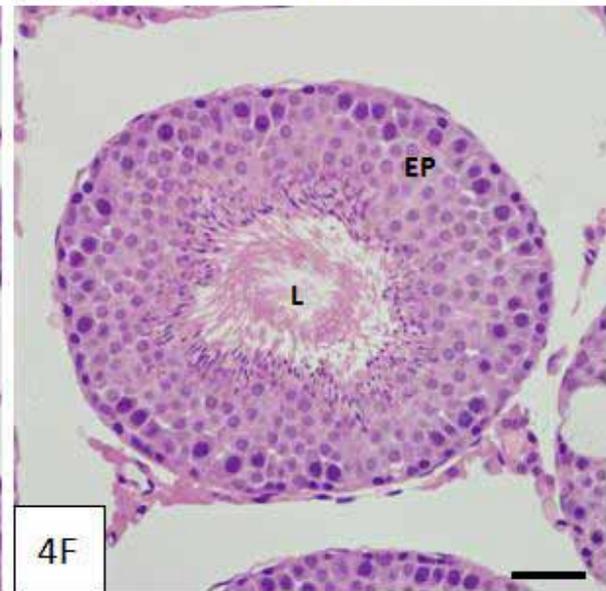
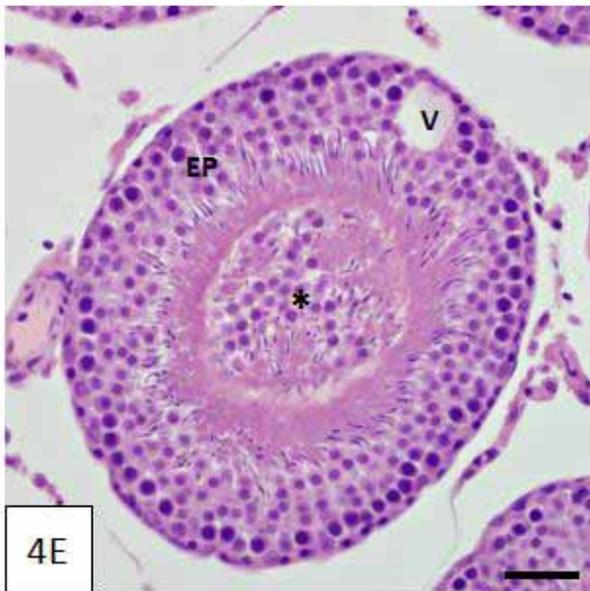
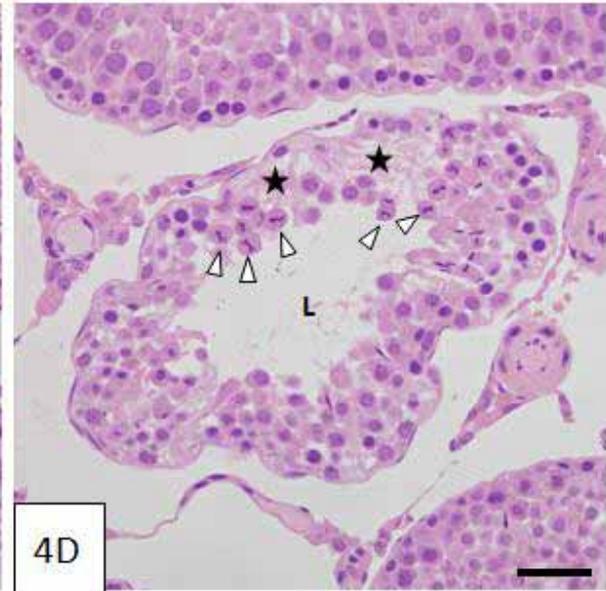
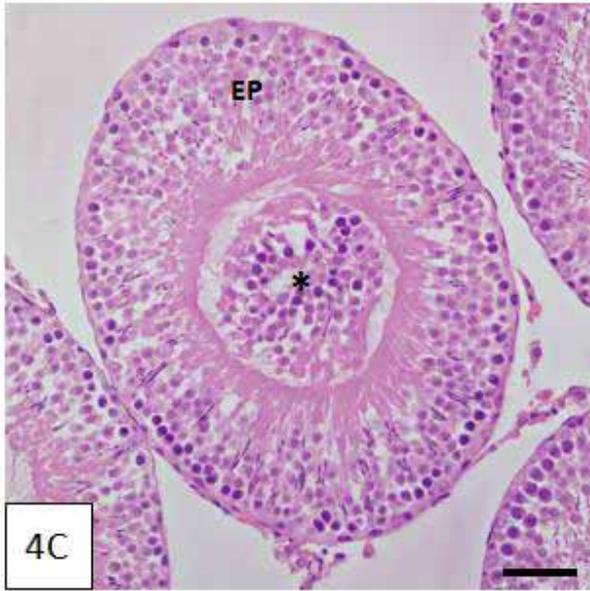
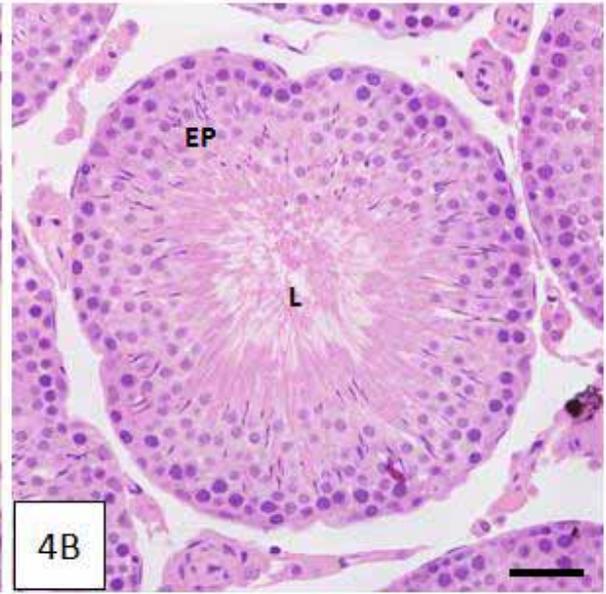
tubular (Figura 3C); vários vacúolos e espaços intercelulares (Figura 4D) foram também observados.

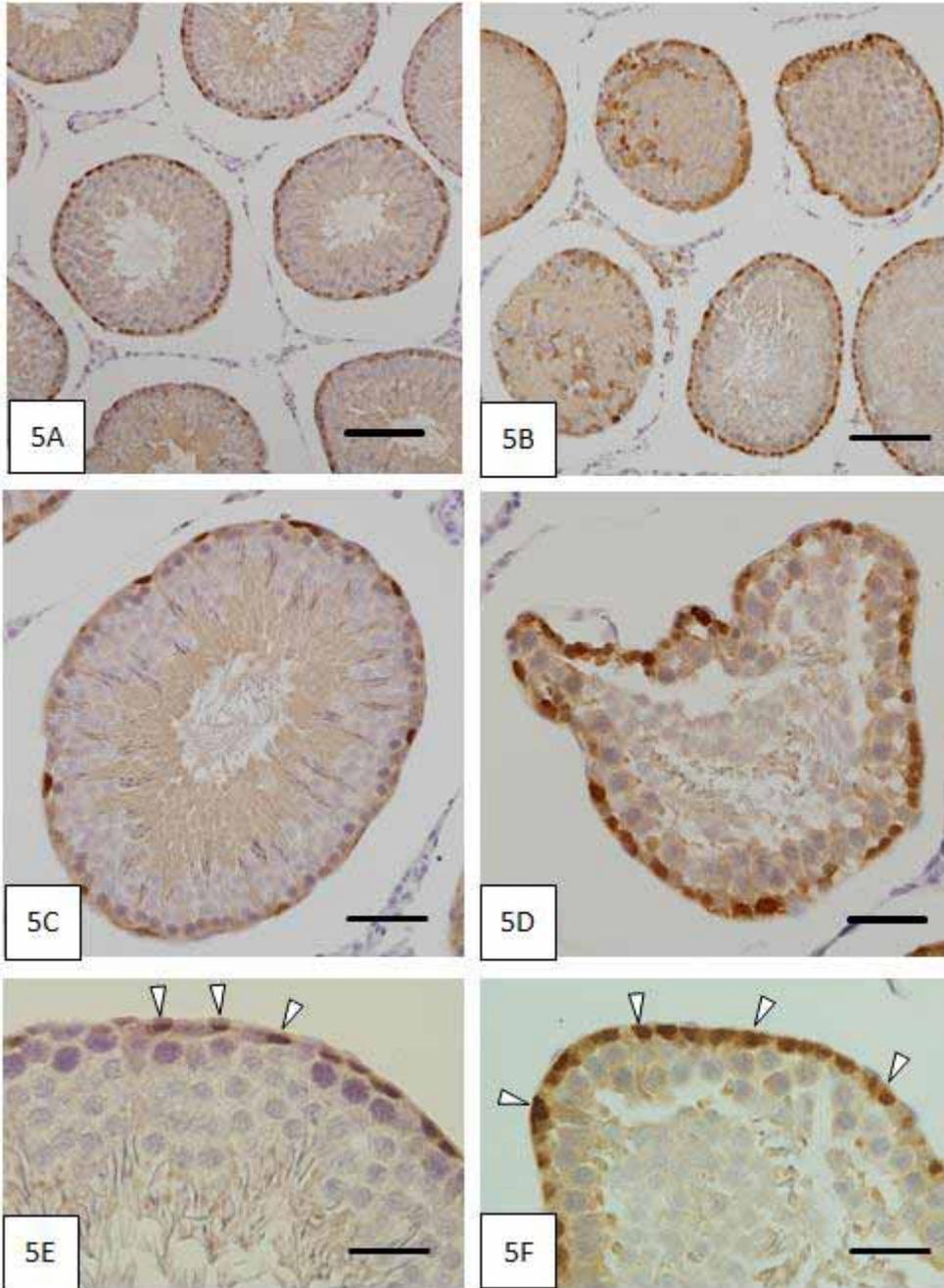
Os animais que receberam o tratamento com cloridrato de fluoxetina e a complementação de vitamina B12 apresentaram alterações semelhantes às relatadas no GF, entretanto, muitos túbulos seminíferos apresentaram-se aparentemente normais (Figuras 3D e 4F). Dentre as alterações encontradas, as mais predominantes foram a presença de vacúolos no epitélio seminífero e de células descamadas na luz tubular (Figura 4E).

Nos cortes histológicos submetidos à imuno-histoquímica para ubiquitina foram observadas células germinativas (principalmente espermatogônias) positivas à reação nos túbulos dos animais de ambos os grupos (GC e GF). Entretanto, nos túbulos alterados pelo tratamento, foi verificada uma maior incidência de células germinativas imunomarcadas quando comparados ao GC (Figura 5).

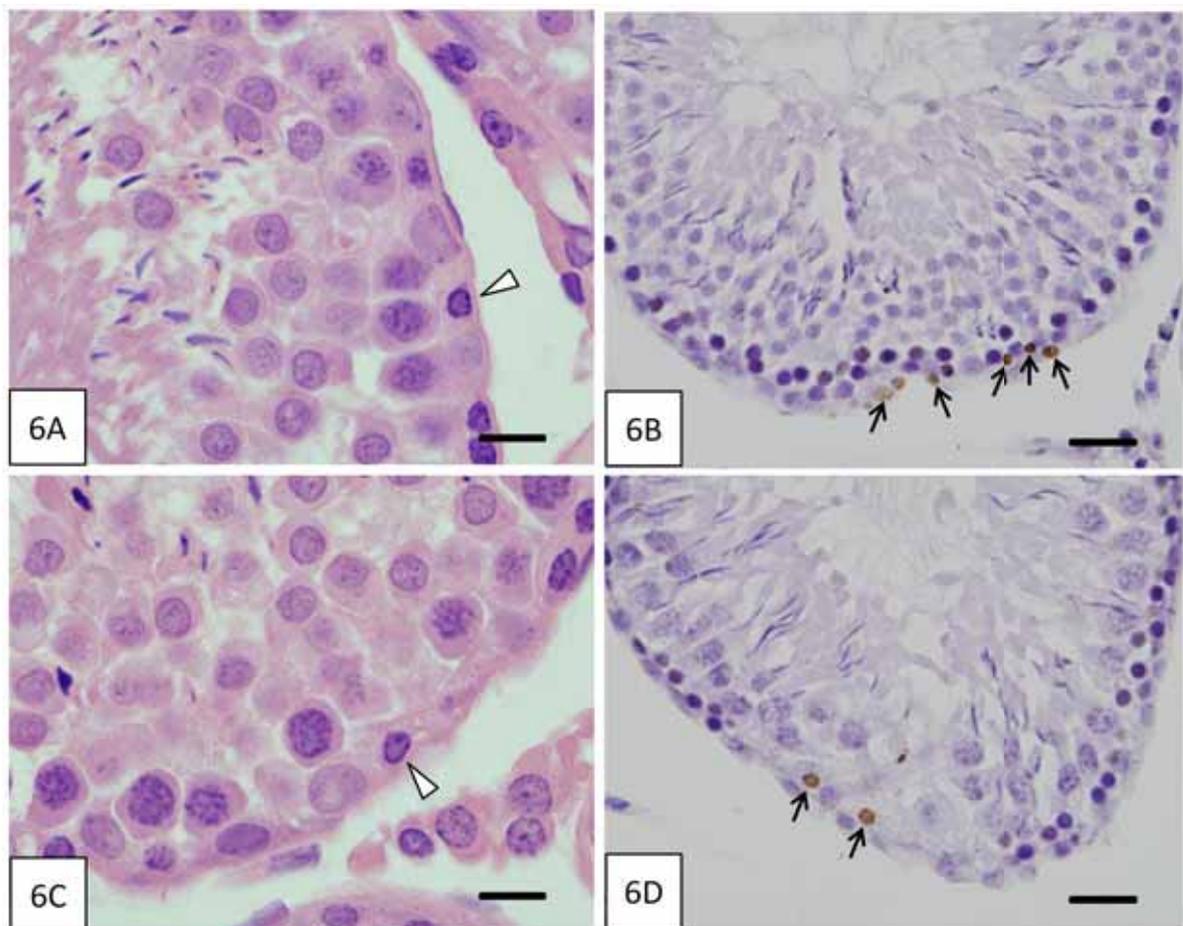
Quanto ao método do TUNEL para detecção de morte celular, o epitélio seminífero dos animais do GF também apresentou uma grande incidência de células germinativas (espermatogônias/espermatócitos) TUNEL-positivas (Figura 6).







**Figura 6. Fotomicrografias de secções testiculares de ratos do grupo GF coradas com HE (6A e 6C) e submetidas ao método do TUNEL (6B e 6D). Em A e C, o epitélio seminífero mostra núcleos de espermatogônias com cromatina condensada na periferia nuclear, sugerindo apoptose (cabeças de seta). Em B e D, células TUNEL-positivas são observadas na base do epitélio seminífero (setas). Barras: 4  $\mu$ m.**



## 4.5. Resultados morfométricos

### 4.5.1. Área tubular total

De acordo com a tabela 2, os animais do GF apresentaram redução significativa na área tubular total (30,5%) quando comparados aos animais do GC. Os animais do GF/Vit, quando comparados aos animais do GC, apresentaram uma redução não significativa de 28% na área tubular total (Tabela 2).

Comparando-se GF/Vit ao GVit, verificou-se uma redução significativa de, aproximadamente, 20% na área tubular total.

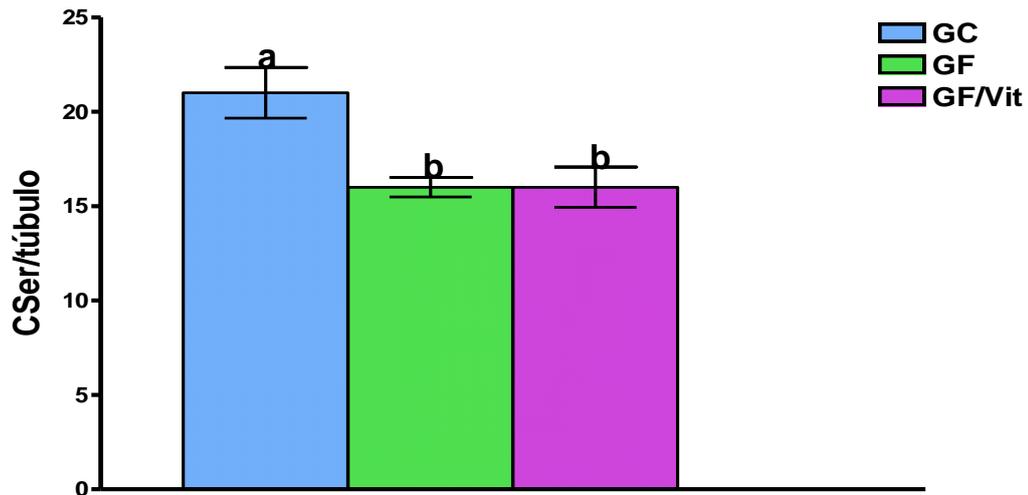
**Tabela 2.** Área tubular total (AT) dos animais do grupo controle (GC), grupo vitamina B12 (GVit), fluoxetina (GF) e fluoxetina + vitamina B12(GF/Vit).

<b>Grupos</b>	<b>AT (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>
GC	97202 $\pm$ 3048 <sup>a</sup>
GVit	84956 $\pm$ 3861 <sup>a</sup>
GF	65176 $\pm$ 5871 <sup>b</sup>
GF/Vit	70420 $\pm$ 8603 <sup>c</sup>

Média  $\pm$  DP;  $p \leq 0,05$ ;  $a \neq b \neq c$ .

### 4.5.2. Quantificação de células de Sertoli

Tanto os animais do grupo GF quanto os do GF/Vit apresentaram redução significativa (33% e 27%, respectivamente) no número de células de Sertoli em comparação aos animais do grupo controle (Figura 7).



**Figura 7.** Número de células de Sertoli/túbulo seminífero dos animais do grupo controle (GC), fluoxetina (GF) e fluoxetina + vitamina B12 (GF/Vit).

## 5. Discussão

Nossos resultados demonstram que no decorrer dos 11 dias de tratamento, os animais do GC e GVit apresentaram ganho de peso corpóreo, enquanto os animais do GF apresentaram perda de peso corpóreo. Estudos clínicos têm relatado resultados semelhantes quanto à ação da fluoxetina sobre o peso corpóreo (HARTO et al., 1988; GOLDSTEIN et al., 1994). Portanto, fica claro que a fluoxetina induziu perda de apetite nos animais. Isso se deve ao fato de que este fármaco atua no hipotálamo e mantém, por maior tempo, a sensação de saciedade (efeito anorexígeno) devido ao aumento dos níveis de serotonina e noradrenalina no sistema nervoso central (SULLIVAN et al., 2002).

Os animais do GF/Vit apresentaram uma redução do peso corpóreo comparando-se aos animais do GC e GVit, porém apresentaram um aumento no peso, quando comparado ao GF. KLIPSTEIN e CORCINO (1977) observaram que um tratamento em curto prazo com vitamina B12 proporciona o retorno do apetite, aumento da ingestão alimentar e, conseqüentemente, ganho de peso em pacientes com psilose. O aumento do apetite induzido pela vitamina B12 e, conseqüentemente, o aumento de fatores nutricionais, pode ter sido a

causa, nos animais tratados com fluoxetina, do leve aumento nos níveis de testosterona sérica, bem como de uma sutil melhora nos parâmetros morfológicos, em comparação aos animais que receberam apenas a fluoxetina. Entretanto, é importante ressaltar que após 11 dias de tratamento com fluoxetina, alguns animais se apresentaram muito debilitados devido à perda de apetite (induzida pela fluoxetina). Sendo assim, o período de 11 dias foi o período máximo e viável de tratamento suportado pelos animais.

Quando comparados aos pesos testiculares do GC, tanto os pesos testiculares absolutos dos animais do GF quanto os do GF/Vit reduziram; enquanto os pesos testiculares relativos apresentaram-se maiores devido à acentuada redução do peso corpóreo dos animais durante o tratamento. Estudos têm demonstrado que a restrição alimentar também causa redução nos pesos testiculares e do epidídimo (CARVALHO et al. 2009; SANTOS et al, 2004). Portanto, a redução nos pesos testiculares dos animais dos grupos que receberam fluoxetina pode estar relacionada à perda de apetite.

Quanto aos aspectos histomorfológicos dos testículos, os animais que receberam apenas a vitamina B12 apresentaram um padrão morfológico e morfométrico semelhante aos animais do GC. Portanto, a vitamina não interfere negativamente na espermatogênese; assim como relatado por SINCLAIR (2000), a vitamina B12 é essencial para a manutenção espermatogênese, pois auxilia na replicação celular, especialmente na síntese de DNA e RNA.

O tratamento com cloridrato de fluoxetina causou algumas alterações na biologia estrutural dos túbulos seminíferos dos animais do GF, como incidência de túbulos de menor tamanho e com contorno irregular dentre túbulos aparentemente normais. Além disso, foram ainda observados túbulos com intensa descamação de células germinativas na luz tubular, vacúolos e espaços intraepiteliais, desorganização das camadas celulares e aparente redução no número de células germinativas. Tais alterações já foram anteriormente relatadas em alguns estudos com outros fármacos, como a cimetidina (SASSO CERRI, MIRAGLIA, 2002;

BELTRAME et al., 2011) e tacrolimus (CANEGUIM et al., 2009). Nesses estudos, os autores relacionaram a perda celular causada pelos fármacos com a morte celular, por apoptose, das células de Sertoli.

Nos animais do grupo GF/Vit também foram encontradas secções de túbulos seminíferos com alterações semelhantes às encontradas nos animais do GF, entretanto, tais alterações morfológicas foram observadas com menor frequência. BELTRAME et al. (2011) demonstraram que a suplementação com vitamina B12 em animais tratados com cimetidina (fármaco com efeito antiandrogênico) foi capaz de recuperar a espermatogênese e o número de células de Sertoli (afetados pela cimetidina), diminuindo o efeito prejudicial do fármaco sobre o epitélio seminífero.

Após análise morfométrica dos animais do GF, verificou-se uma significativa redução da área tubular total dos túbulos seminíferos. Este resultado deve-se, principalmente, à intensa descamação (perda) de células germinativas. Tal fato está, provavelmente, associado à redução no número de células de Sertoli, também verificado neste estudo. Alguns autores já relataram diminuição no número de células de Sertoli, em ratos adultos, causada por uma dose de 200 mg/kg de fluoxetina durante 60 dias de tratamento (BATAIANEH, DARDARAK, 2007). A manutenção e o posicionamento das células de Sertoli na base do epitélio seminífero dependem, principalmente, da proteína vimentina, um tipo de filamento do citoesqueleto celular (FRÖJDMAN et al., 1989; SASSO CERRI, CERRI, 2008). Portanto, quando um tratamento afeta as células de Sertoli e o número desta diminui, a integridade estrutural do compartimento basal é alterada e há perda de contato entre estas células e as células germinativas, as quais descamam para a luz tubular (SASSO CERRI, CERRI, 2008; BELTRAME et al., 2011), provocando uma atrofia tubular. Sendo assim, a diminuição do número de células pode indicar uma interferência direta da fluoxetina na integridade estrutural (citoesqueleto) das células de Sertoli.

Os animais que receberam cloridrato de fluoxetina e suplementação de vitamina B12 (GF/Vit), durante 11 dias de tratamento, apresentaram um aumento na área tubular total, quando comparados aos animais tratados somente com fluoxetina. Além disso, uma aparente redução na frequência de túbulos contendo células descamadas na luz tubular foi observada nos animais do grupo GF/Vit (em comparação ao GF), indicando que a vitamina B12 exerceu algum efeito benéfico sobre o epitélio seminífero. BELTRAME et al. (2011) demonstraram que a suplementação de vitamina B12 aliada ao tratamento com cimetidina, durante 60 dias, causou recuperação do epitélio seminífero afetado pelo fármaco.

Sabendo que as células de Leydig são dependentes das células de Sertoli (O'SHAUGHNESSY et al., 1998; JOHNSTON et al., 2004; REBOURCET et al., 2014), pode-se supor que a redução do número de células de Sertoli causada pela fluoxetina possa ter afetado as células de Leydig, e conseqüentemente, causado a redução nos níveis séricos de testosterona observados no nosso estudo.

A fluoxetina, um antidepressivo que inibe a recaptação seletiva de serotonina, pode ser responsável por problemas relacionados à disfunção sexual masculina (BITRAN, HULL, 1987; TAYLOR et al., 1996; GINSBERG, 2007; UNNIKRIISHNAN et al., 2009; GOCMEZ et al., 2010). No presente estudo, os níveis de testosterona decaíram drasticamente nos animais tratados com fluoxetina (95%) em comparação ao grupo controle. Este efeito pode estar relacionado ao efeito anorexígeno do fármaco. Estudos mostram que animais que sofrem restrição alimentar apresentam redução nos níveis de testosterona (CARVALHO et al., 2009; SANTOS et al., 2004). Esta redução parece ser causada pela redução de LH secretado pela hipófise, causando uma baixa síntese testicular de testosterona e redução nos níveis séricos deste hormônio.

A produção de testosterona pela célula de Leydig é mediada pelo hormônio luteinizante (LH) via eixo hipotálamo-hipófise (WALKER, CHENG, 2005). Sabe-se que a

elevação nos níveis de serotonina no cérebro, causada pela fluoxetina, afeta a secreção dos hormônios LH e FSH por inibição da secreção do fator de liberação de gonadotrofinas (GnRH) que, conseqüentemente, provoca redução dos níveis de testosterona, interferindo nos processos de esteroidogênese e espermatogênese (O'DONNELL et al., 2001; SVECHNIKOV et al., 2010a; SVECHNIKOV et al., 2010b). Portanto, as alterações nos níveis séricos de testosterona, observadas no presente estudo, podem ser responsáveis pelas alterações histomorfométricas dos túbulos seminíferos. Por outro lado, CHEN et al. (2005) constataram que uma supressão alimentar em 40% durante 6 semanas resulta na diminuição da função das células de Leydig (observada *in vitro*) e dos níveis de testosterona séricos. Sendo assim, não podemos descartar a possibilidade de que as alterações hormonais, causadas pelo tratamento com fluoxetina, estejam relacionadas à deficiência nutricional causada pela perda de apetite.

Os receptores de andrógeno (AR) presentes nas células de Sertoli estão envolvidos na regulação deste esteroide sobre as células germinativas (TINDALL et al., 1981). O'SHAUGHNESSY (2014) demonstrou que ratos *knockout* para receptores de andrógenos nas células de Sertoli (SCARKO) apresentaram uma redução no número de espermatócitos e de espermátides, além de uma pequena, porém evidente, desorganização celular do túbulo seminífero. Além do efeito sobre o desenvolvimento das células germinativas, a testosterona possui algumas outras funções, tais como: regulação da barreira hematotesticular, manutenção da função e sobrevivência das células de Leydig e adesão das células germinativas às células de Sertoli por meio da produção de proteínas adesivas e juncionais, bem como participa na liberação de espermátides maduras (WALKER, 2010; SMITH, WALKER, 2014). Portanto, o decréscimo no nível de testosterona, apresentado pelos animais tratados com fluoxetina, com e sem associação com vitamina, pode ser uma das principais causas das alterações morfológicas encontradas, como a perda de células germinativas, descamadas na luz tubular.

Nos animais do GF, além da presença de células germinativas (espermatogônias) com cromatina condensada periféricamente (característica sugestiva de apoptose), foram também observadas células germinativas TUNEL-positivas situadas na base do epitélio seminífero, possivelmente espermatogônias e/ou espermatócitos. FRICK e RAPANELLI (2013) relataram que a fluoxetina, assim com outros antidepressivos, induz a apoptose em células cancerígenas de ovário, através do decréscimo de Bcl2, ativação de caspase 3 e maior regulação da proteína supressora de tumor p53.

Associada à incidência de morte celular, foi também notado uma intensa imunexpressão de ubiquitina (UCHL-1), principalmente nas células germinativas do compartimento basal (espermatogônias/espermatócitos) dos animais do grupo GF, em comparação ao grupo GC. A proteína ubiquitina pode ser encontrada durante toda a espermatogênese, sendo essencial para sua progressão normal (HERSKO, CIECHANOVER, 1998; BEBINGTON et al., 2001). No início do processo, é expressa nas espermatogônias (LUO et al., 2006; VON KOPYLOW et al., 2010; HOU, YANG, 2013), atuando como via de eliminação extra lisossomal de proteínas anormais, e no decorrer da meiose durante o *crossing over* (BAARENDS et al., 2003; HOU, YANG, 2013). TOKUNAGA et al. (1999) demonstraram, em espermatogônias de macaco, que a ubiquitina age principalmente durante a fase celular quiescente, ou seja, na intérfase da mitose. KON et al. (1999) afirmam que o sistema ubiquitina nas espermatogônias atua minimizando danos ao DNA quando estas células são expostas a algum estresse. Considerando a intensa imunexpressão de ubiquitina nas células germinativas dos animais tratados com fluoxetina, poderíamos sugerir que este fármaco pode ter atuado como um agente indutor de estresse no epitélio seminífero.

A apoptose, um processo normal e necessário para a espermatogênese, parece ser modulada pela proteína ubiquitina (UCHL-1). KWON (2007) e KWON et al. (2005) utilizando *gad mice* (camundongos que apresentam diminuição da proliferação de

espermatogônias e aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl2), demonstraram que tais animais apresentam deficiência de UCHL-1, tornando-os resistentes a apoptose. Tal fato foi citado também por HERSHKO e CIECHANOVER (1998), os quais acrescentaram que a relação entre a ubiquitina e a apoptose pode ser diretamente ou inversamente proporcional. Portanto, o aumento na expressão de ubiquitina nos testículos dos animais tratados com fluoxetina pode estar relacionado com a morte das células germinativas. Entretanto, futuros estudos são necessários para confirmar esta possibilidade.

## **6. Conclusão**

Com base nestes resultados, podemos concluir que o tratamento com fluoxetina causa alterações significantes na histoarquitetura dos túbulos seminíferos, bem como redução nos níveis séricos de testosterona. As alterações tubulares estão relacionadas à perda de células germinativas, provavelmente por apoptose, bem como à redução no número de células de Sertoli. A intensa imunoexpressão de ubiquitina nas células germinativas dos animais tratados com fluoxetina indica que este fármaco interferiu no processo espermatogênico. Além disso, os resultados morfométricos indicam que a suplementação de vitamina B12 durante o tratamento com fluoxetina, por 11 dias, foi capaz de manter o peso corpóreo dos animais, bem como amenizar as alterações morfológicas e morfométricas causadas por este fármaco nos testículos de ratos adultos.

## Referências bibliográficas

BAARENDS, W.M.; WASSENAAR, E.; HOOGERBRUGGE, J.W.; VAN CAPPELLEN, G.; ROEST, H.P.; VREEBURG, J.; OOMS, M.; HOEIJMAKERS, J.H.J.; GROOTEGOED, J.A. Loss of HR6B Ubiquitin-Conjugating Activity Results in Damaged Synaptonemal Complex Structure and Increased Crossing-Over Frequency during the Male Meiotic Prophase. *Mol Cell Biol* 2003; 23(4): 1151–1162.

BATAINEH, H.N.; DARADKA, T. Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adult male rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2007; 28(3):321-5.

BATATA, M.; SPRAY, G.H.; BOLTON, F.G.; HIGGINS, G.; WOLNNER, L. Blood and bone marrow changes in elderly patients, with special reference to folic acid, vitamin B12, iron, and ascorbic acid. *Brit Med J* 1967; 2: 667-669.

BEBINGTON, C.; DOHERTY, F.J.; FLEMING, S.D. The possible biological and reproductive functions of ubiquitin. *Human Reproduct Update* 2001; 7(1): 102-111.

BELTRAME, F.L.; CANEGUIM, B.H.; MIRAGLIA, S.M.; CERRI, P.S.; SASSO-CERRI, E. Vitamin B(12) Supplement Exerts a Beneficial Effect on the Seminiferous Epithelium of Cimetidine-Treated Rats. *Cells Tissues Organs* 2011; 193:184-194.

BOXMEER, J.C.; SMIT, M.; WEBER, R.F.; LINDEMANS, J.; ROMIJN, J.C.; EIJKEMANS, M.J.; MACKLON, N.S.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Seminal Plasma Cobalamin Significantly Correlates With Sperm Concentration in Men Undergoing IVF or ICSI Procedures. *J Androl* 2007; 28:521-527.

BUSTAMANTE, J.C.; SETCHELL, B.P. The Permeability of the Microvasculature of the Perfused Rat Testis to Small Hydrophilic Substances. *J Androl* 2000; 21:444-451.

CANEGUIM, B.H.; CERRI, P.S.; SPOLIDÓRIO, L.C.; MIRAGLIA, S.M.; SASSO-CERRI, E. Structural alterations in the seminiferous tubules of rats treated with immunosuppressor tacrolimus. *Reproductive Biol Endocrinol* 2009; 7:19.

CARVALHO, M.; MATEUS, L.; AFONSO, F.; VAN HARTEN, S.; CARDOSO, L.A.; REDMER, D.A.; FERREIRA-DIAS, G. Testicular angiogenic activity in response to food restriction in rabbits. *Reproduction* 2009, 137: 509–515.

CHEN, H.; LUO, L.; LIU, J.; BROWN, T.; ZIRKIN, B.R. Aging and caloric restriction: effects on Leydig cell steroidogenesis. *Experimental Gerontol* 2005, 40: 498–505.

CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; 1449-1455.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol reviews* 1972; 52(1):198-236.

CSOKA, A.; BAHRICK, A.; MEHTONEN, O.P. Persistent Sexual Dysfunction after Discontinuation of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *J Sex Med* 2008; 5:227–233.

DAVIDSON, J.R.T.; FOA, E.B.; HUPPERT, J.D.; KEEFE, F.J.; FRANKLIN, M.E.; COMPTON, J.S.; ZHAO, N.; CONNOR, K.M.; LYNCH, T.R.; GADDE, K.M. Fluoxetine, Comprehensive Cognitive Behavioral Therapy, and Placebo in Generalized Social Phobia. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61:1005-1013.

DAVIS, J.R.; LANGFORD, G.A.; KIRBY, P.J. The testicular capsule. In: Johnson, A. D.; Gomes, W. R. VanDemark, N. L. *The Testis*. vol. 1. Nova York: Academic Press, 1970.

FRICK, L.R.; RAPANELLI, M. Antidepressants: influence on cancer and immunity? *Life Sci* 2013; 92(10):525-32.

FRÖJDMAN, K.; PARANKO, J.; KUOPIO, T.; PELLINIEMI, L.J. Structural proteins in sexual differentiation of embryonic gonads. *Int. J. Dev. Biol.* 1989; 33: 99–103.

GIAMBANCO, P.; BIANCHI, R.; CECCARELLI, P.; MA, G.; SORCI, G.; ANTSNIOLI, S.; BOCCHINI, V.; DORRATO, W. “Neuron –specific” protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is also expressed in glioma cell lines and its expression depends on cellular growth state. *Febs Letters* 1991; 290:131-134.

GINSBERG, D.L. Do antidepressants reduce male fertility? *Primary Psychiatry* 2007; 14 (12):19-23.

GOÇMEZ, S.S.; UTKAN, T.; ULAK, G.; GACAR, N.; ERDEN, F. Effects of long-term treatment with fluoxetine and venlafaxine on rat isolated vas deferens. *Autonomic & Autacoid Pharmacol* 2010; 30:197–202.

GOLDSTEIN, D.J.; RAMPEY, A.H.J.; ENAS, G.G.; et al. Fluoxetine: a randomized clinical trial in the treatment of obesity. *Int J Obes Telat Metab Disord* 1994; 18:129-135.

GRISWOLD, M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell developmental biol* 1998; 9:411-416.

HARTO, N.E.; SPERA, K.F.; BRANCONNIER, R.J. Fluoxetine-induced reduction of body mass in patients with major depressive disorder. *Psychopharmacol Bull* 1988; 24:220-223.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem* 1998; 67:425-479.

HERSHKO, A.; EYTAN, E.; CIECHANOVER, A.; HAAS, A. Immunochemical Analysis of the Turnover of Ubiquitin-Protein Conjugates in Intact Cells - Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J Biol Chem* 1982; 257(25):13964-13970.

HOU, C.C.; YANG, W.X. New insights to the ubiquitin–proteasome pathway (UPP) mechanism during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 2013; 40:3213–3230.

ISOYAMA, R.; KAWAI, S.; SHIMIZU, Y.; HARADA, H.; TAKIHARA, H.; BABA, Y.; SAKATOKU, J. Clinical experience with methylcobalamin (CH3-B12) for male infertility. *Hinyokika Kyo* 1984; 30(4):581-6.

JOHNSTON, H.; BAKER, P.J.; ABEL, M.; CHARLTON, H.M.; JACKSON, G.; FLEMING, L.T.; KUMAR, R.; O'SHAUGHNESSY, P.J. Regulation of Sertoli Cell Number and Activity by Follicle-Stimulating Hormone and Androgen during Postnatal Development in the Mouse. *Endocrinol* 2004, 145(1):318–329.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan: Cap. 21, 2008.

KARASHIMA, T.; ZALATNAI, A.; SCHALLY, A.V. Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against chemotherapy-induced testicular damage in rats. *Med Scien* 1988; 85: 2329-2333.

KIMURA, M.; ORIKASA, S. Effects of cobalamin on spermatogenesis of anticancer drug treated rat. *Clin Rep* 1984; 18: 575-583.

KLIPSTEIN, F.A.; CORCINO, J.J. Factors responsible for weight loss in tropical sprue. *Amer J Clinical Nutrit* 1977; 30: 1703-1708.

KON, J. The new function of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes as reciprocal modulators of germ cells apoptosis. *Exp Anim* 2007; 56(2), 71-77.

KON, Y.; ENDOH, D.; IWANAGA, T. Expression of protein gene product 9.5, a neuronal Ubiquitin C-Terminal Hydrolase, and its developing change in Sertoli cells of mouse testis. *Mol reproduct and develop* 1999; 54:333–341.

KWON, J.; MOCHIDA, K.; WANG, Y.; SEKIGUCHI, S.; SANKAI, T.; AOKI, S.; OGURA, A.; YOSHIKAWA, Y.; WADA, K. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol Reproduction* 2005; 73:29–35.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the ‘periodic acid-fuchsin sulfurous acid’ technique. *Am J Anat* 1952; 90:167-206.

LUNDBERG, L.M.; ALM, P.; WHARTON, J.; POLAK, J.M. Protein gene product (PGP 9.5) – a new neuronal marker visualizing the whole uterine innervations and pregnancy-induced and developmental changes in the guinea pig. *Histochem* 1988; 90:9-17.

LUO, J.; MEGEE, S.; RATHI, R.; DOBRINSKI, I. Protein Gene Product 9.5 Is a Spermatogonia-Specific Marker in the Pig Testis: Application to Enrichment and Culture of Porcine Spermatogonia. *Mol Reproduct Develop* 2006; 73:1531–1540.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Embriologia Básica. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

MORALES, A.; CAVICCHIA, J.C. Spermatogenesis and blood–testis barrier in rats after long-term Vitamin A deprivation. *Tissue & Cell* 2002; 34 (5):349–355.

NARAYANA, K.; VERGHESE, S.; JACOB, S.S. L-Ascorbic acid partially protects two cycles of cisplatin chemotherapy- induced testis damage and oligo-astheno-teratospermia in a mouse model. *Experiment Toxicol Pathol* 2009; 61: 553–563.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2001; 22(3): 289–318.

O'SHAUGHNESSY, P.J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; pii: S1084-9521(14)00022-6. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.02.010.

O'SHAUGHNESSY, P.J.; BAKER, P.; SOHNIUS, U.; HAAVISTO, A-M.; CHARLTON, H.M.; HUHTANIEMI, I. Fetal Development of Leydig Cell Activity in the Mouse Is Independent of Pituitary Gonadotroph Function. *Endocrinol* 1998; 139(3): 1141- 1146.

O'SHAUGHNESSY, P.J.; VERHOEVEN, G.; DE GENDT, K.; MONTEIRO, A.; ABE, M.H. Direct Action through the Sertoli Cells Is Essential for Androgen Stimulation of Spermatogenesis. *Endocrinol* 2010; 151(5): 2343-2348.

OSHIO, S.; OZAKI, S.; TAJIMA, T.; KANEKO, S.; MOHRI, H. Mecobalamin promotes mouse sperm maturation. *Androl* 1989; 21: 167-73.

OZAKI, S.; OHKAWA, I.; KATOH, Y.; TAJIMA, T.; KIMURA, M.; ORIKASA, S. Study on producing rats with experimental testicular dysfunction and effects of mecobalamin. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1988; 91(4):197-207.

PACHER, P.; KECSKEMETI, V. Cardiovascular Side Effects of New Antidepressants and Antipsychotics: New Drugs, old Concerns?. *Curr Pharm Des*. 2004; 10(20): 2463–2475.

PASQUALOTTO, F.F.; LUCON, A.M.; SOBREIRO, B.P.; PASQUALOTTO, E.B.; ARAP, S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo* 2004; 59 (6):375-382.

PEREIRA, M.L.; GARCIA E COSTA, F. O significado biológico da célula de Sertoli na espermatogênese. *Biol S* 2005.

PRAHALATHAN, C.; SELVAKUMAR, E.; VARALAKSHMI, P. Modulatory role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. *Chemico-Biol Interactions* 2006; 160: 108–114.

RAMADAN, L.A.; ABD-ALLAH, A.R.A.; ALY, H.A.A.; SAAD-EL-DIN, A.A. Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacol Research* 2002; 46(4).

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MORRE, P.K. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REBOURCET, D.; O'SHAUGHNESSY, P.J.; PITETTI, J.L.; MONTEIRO, A.; O'HARA, L.; MILNE, L.; TSAI, Y.; CRUICKSHANKS, L.; RIETHMACHER, D.; GUILLOU, F.; MITCHELL, R.T.; VAN 'T HOF, R.; FREEMAN, T.C.; NEF, S.; SMITH, L.B. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Comp Biologists Development* 2014; 141: 2139-2149.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIM, A.P.S.; CLEGG, E.D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1st ed. Clearwater: Cache River Press; 1990. Chapter 1, Mammalian spermatogenesis; p. 1-40.

SANTOS, A.M.S.; FERRAZ, M.R.; TEIXEIRA, C.V.; SAMPAIO, F.J.B.; RAMOS, C.F. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. *Horm Metab Res* 2004, 36:27-33.

SASSO-CERRI, E.; CERRI, P.S. Morphological evidences indicate that the interference of cimetidine on the peritubular components is responsible for detachment and apoptosis of Sertoli cells. *Reproductive Biol Endocrinol* 2008, 6:18.

SASSO-CERRI, E.; GIOVANONI, M.; HAYASHI, H.; MIRAGLIA, S.M. Morphological alterations and intratubular lipid inclusions as indicative of spermatogenic damage in cimetidine-treated rats. *Arch Androl* 2001; 46(1):5-13.

SASSO-CERRI, E.; MIRAGLIA, S.M. *In situ* demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. *Histol Histopathol* 2002; 17: 411-417.

SINCLAIR, S. Male Infertility: Nutritional and Environmental Considerations. *Altern Med Rev* 2000; 5(1):28-38.

SIU, M.K.; CHENG, C.Y. Extracellular matrix and its role in spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 636:74-91.

SMITH, L.B.; WALKER, W.H. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol* 2014; pii: S1084-9521(14)00024-X. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.02.012.

SPITERI-GRECH, J.; NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis - a review. *J Reproduct Fertility* 1993; 98:1-14.

STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu Rev Nutr* 2004; 24:299-326.

STEINBERGER, A.; WALTHER, J.; HEINDEL, J.J.; SANBORN, B.M.; TSAI, Y.;  
STEINBERGER, E. Hormone interactions in the Sertoli cells. *In vitro* 1979; 15(1):23-31.

STUMPP, T.; SASSO-CERRI, E.; FREYMÜLLER, E.; MIRAGLIA, S.M. Apoptosis and Testicular Alterations in Albino Rats Treated With Etoposide During the Prepubertal Phase. *Anatomic Record Part A* 2004; 279A:611–622.

SULLIVAN, S.D.; HOWARD, L.C.; CLAYTON, A.H.; MOENTER, S.M. Serotonergic Activation Rescues Reproductive Function in Fasted Mice: Does Serotonin Mediate the Metabolic Effects of Leptin on Reproduction? *Biol of reproduct* 2002; 66: 1702–1706.

SVECHNIKOV, K.G.; IZZO, G.; SÖDER, O. Endocrine disruptors and leydig cells function. *J Biomed Biotechnol* 2010 [a].

SVECHNIKOV, K.; LANDREH, L.; WEISSER, J.; IZZO, G.; COLÓN, E.; SVECHNIKOVA, I.; SÖDER, O. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr.* 2010; 73(2):93-101[b].

TAYLOR, G.; BARDGETT, M.; CSERNANSKY, J.; EARLY, T.; HALLER, J.; SCHERRER, J.; WOMACK, S. Male reproductive systems under chronic fluoxetine or trimipramine treatment. *Physiol & Behavior* 1996; 59(3): 479-485.

TOPCU-TARLADACALISIR, Y.; KANTER, M.; UZAL, M.C. Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. *Arch Toxicol* 2009; 83:735–746.

TRAMONTINA, A.C. *Efeito da fluoxetina e serotonina sobre a secreção de S100B em culturas de astrócitos e fatias hipocámpais de ratos* 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

TINDALL, D.J.; TASH, J.S.; MEANS, A.R. Factors affecting Sertoli cells function in the testis. *Environmental Health Perspectives* 1981; 38:5-10.

TRIPATHI, R.; MISHRA, D.P.; SHAHA, C. Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reproductive Immunol* 2009; 83: 31–35.

TRIPP, B.M.; LAMB, D.J. Sertoli Cell: Morphology, Function and Regulation. In: Lipshultz LI, Howards SS. Infertility in the Male. 3<sup>th</sup> ed. Saint Louis: Mosby, 1997. p. 71-105.

TOKUNAGA, Y.; IMAI, S.; TORII, R.; MAEDA, T. Cytoplasmic Liberation of Protein Gene Product 9.5 during the Seasonal Regulation of Spermatogenesis in the Monkey (*Macaca fuscata*). *Endocrinol* 1999; 140 (4).

UNNIKRISHNAN, G.; SHIVABALAN, R.; LILLIAN, J. Sub- acute toxicity of fluoxetine hydrochloride on fertility of male wistar rats. *J Herbal Med Toxicol* 2009; 3(1):23-30.

VOLKOV, I.; PRESS, Y.; RUDOY, I. Vitamin B12 Could be A “Master Key” in the Regulation of Multiple Pathological Processes. *J Nippon Med Sch* 2006; 73: 65-69.

VON KOPYLOW, K.; KIRCHHOFF, C.; JEZEK, D.; SCHULZE, W.; FEIG, C.; PRIMIG, M.; STEINKRAUS, V.; SPIESS, A.N. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. *Human Reproduct* 2010; 25(5): 1104–1112.

WALKER, W.H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Phil Trans R Soc B* 2010; 365: 1557–1569.

WATANABE, F. Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Exp Biol Med* 2007; 232:1266-1274.

WATANABE, T.; OHKAWA, K.; KASAI, S.; EBARA, S.; NAKANO, Y.; WATANABE, Y. The effects of dietary vitamin B<sub>12</sub> deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. *Congenital Anomalies* 2003; 43:57-64.

YAMADA, K.; KAWATA, T.; WADA, M.; MORI, K.; TAMAI, K.; TANAKA, N.; TADOKORO, T.; TOBIMATSU, T.; TORAYA, T.; MAEKAWA, A. Testicular injury to rats fed on Soybean protein-based vitamin B<sub>12</sub>-deficient diet can be reduced by Methionine supplementation. *J Nutr Sci Vitaminol* 2007; 53:95-101.

**Dados finais**

De acordo

---

Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

---

Talita Bonato de Almeida

