Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus Araraquara

Marina Luiza Câmara

"Efeitos do antidepressivo cloridrato de fluoxetina na integridade histológica dos túbulos seminíferos de ratos adultos"

Araraquara

2013

Marina Luiza Câmara

“Efeitos do antidepressivo cloridrato de fluoxetina na integridade histológica dos túbulos seminíferos 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 para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

Co-orientadora: Profa. Msc. Flávia Luciana Beltrame

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À minha mãe, Neusa e ao meu pai, Luiz. Vocês são a base de tudo, são pais maravilhosos, exemplos de vida e os responsáveis pela minha educação. Sem toda a dedicação de vocês em sempre fazerem de tudo, mesmo nas situações mais difíceis, para proporcionar um estudo de qualidade, nada disso seria possível. Obrigado por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem, por todos os conselhos e por serem pais incríveis. Amo vocês;

À minha irmã, Mariana, que desde sempre esteve me apoiando e incentivando. Obrigado por ser essa irmã tão linda e dedicada, que sempre ajudou a cuidar de mim, sempre me ensinou as coisas e foi carinhosa. Com o passar do tempo, fomos nos aproximando cada vez mais e nos tornamos irmãs amigas e fico muito feliz por isso. Amo você;

Ao meu namorado, André. Você foi tão especial durante toda essa jornada, sempre me incentivando e me dando apoio quando eu pensava em desistir de alguma coisa. Você sempre me fez ver as coisas de um jeito melhor e nos momentos em que eu precisava ouvir coisas agradáveis você falava, mas também sempre que eu precisava ouvir uma bronca era você quem dava. Obrigado por todo o carinho, paciência, incentivos, por estar ao meu lado em todos os momentos e por ser esse namorado tão perfeito. Sem você tudo seria muito mais difícil. Amo você.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Estela Sasso Cerri, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Esses anos realizando-o foram muito importantes para o meu crescimento pessoal e intelectual. Muito obrigado por todos os ensinamentos, por toda a paciência e dedicação ao nosso trabalho. Você é um exemplo a ser seguido, pessoal e profissionalmente.

Agradeço à minha co-orientadora, Flávia Luciana Beltrame. Você foi muito importante no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por toda a sua dedicação, por ter me ensinado desde o começo como desenvolver um projeto, por ter me auxiliado nos cuidados com os animais, nas análises de resultados, no tratamento das imagens, na escrita dos relatórios, enfim muito obrigado por sempre ter estado disposta a me auxiliar em tudo que eu fosse fazer.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, por todas as sugestões neste trabalho e por ter me auxiliado sempre que eu precisei;

Ao Prof. Dr. Breno Henrique Caneguim, que contribuiu muito no desenvolvimento do meu projeto, sempre me auxiliando nas análises, no cuidado com os animais, na busca por artigos científicos e por todas as sugestões e ensinamentos que sempre esteve disposto a transmitir;

Aos técnicos do laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP), Luiz Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões, por todos os ensinamentos e contribuições na realização das atividades laboratoriais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....12

1.1 Descrição morfofuncional dos testículos.....12

1.2 Ação de fármacos sobre os testículos.....14

1.2.1 Fluoxetina e sua ação sobre o sistema genital masculino.....16

2. OBJETIVO.....19

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....20

3.1 Animais.....20

3.2 Distribuição dos grupos e tratamento dos animais.....20

3.3 Processamento para a microscopia de luz.....20

3.4 Pesos testiculares absolutos e relativos.....22

3.5 Análises morfométricas.....22

3.6 Método do TUNEL.....23

3.7 Análise estastística.....24

4. RESULTADOS.....24

4.1 Peso corpóreo.....24

4.2 Pesos testiculares absolutos e relativos.....25

4.3 Análise hormonal.....26

4.4 Resultados morfológicos.....27

4.5 Resultados morfométricos.....35

4.5.1 Área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero 35

4.5.2 Frequencia de túbulos de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero.....35

4.5.3 Frequencia de túbulos contendo células descamadas na luz tubular

.....36

4.5.4 Número de células de Sertoli por túbulo seminífero.....37

5. DISCUSSÃO.....37

6. CONCLUSÕES.....43

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....44

DADOS FINAIS.....54

RESUMO

A fluoxetina, pertencente à classe dos inibidores da recaptação seletiva de serotonina, é um dos antidepressivos mais amplamente prescritos para o tratamento da depressão e de transtornos da ansiedade, como o transtorno obsessivo compulsivo. Considerando que, dentre os efeitos colaterais causados pela fluoxetina, têm sido relatados distúrbios na função sexual masculina, foi proposto avaliar a ação deste fármaco sobre a integridade morfológica dos túbulos seminíferos. Foram utilizados 16 ratos adultos, distribuídos em 2 grupos: grupo fluoxetina (GF) e grupo controle (GC). Os animais do GF receberam injeções intraperitoneais de fluoxetina (20mg/Kg) e os animais do GC receberam água destilada. O tratamento se estendeu por 11 dias consecutivos e, ao final do tratamento, foram obtidos os pesos corpóreo e testicular dos animais. Os testículos foram fixados e processados para inclusão em historesina e parafina. Nos cortes de historesina, as frequências de túbulos de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero e de túbulos seminíferos contendo células descamadas preenchendo a luz tubular foram obtidas, bem como os seguintes parâmetros morfométricos: área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero. Os cortes em parafina foram submetidos ao método do TUNEL para detecção de morte celular. Os níveis séricos de testosterona também foram avaliados. Os resultados foram submetidos à análise estatística para avaliação das diferenças entre os grupos. O tratamento com fluoxetina causou redução significante do peso corpóreo dos animais e redução, embora não significante, do peso testicular absoluto. Além disso, uma redução significante nos níveis séricos de testosterona foi observada nos animais do GF. Os túbulos seminíferos apresentaram contorno irregular, depleção celular e intensa desorganização epitelial, bem como a presença de vacúolos e espaços

intraepiteliais. Foram encontrados núcleos irregulares de células de Sertoli afastados da porção basal do túbulo ou na luz tubular. No GF, vários núcleos de células de Sertoli e de células germinativas foram positivos ao método do TUNEL. Os resultados morfométricos mostraram um aumento significante na frequência de túbulos com células germinativas descamadas na luz, redução significante das áreas tubular total, da luz tubular e do epitélio seminífero, bem como redução significante de túbulos em estágios VII-VIII. Além disso, também houve redução significante do número de células de Sertoli por túbulo seminífero nos animais do GF. Com base nestes resultados, podemos concluir que o tratamento com fluoxetina durante 11 dias causa alterações estruturais significantes nos túbulos seminíferos de ratos adultos. O aumento de células descamadas na luz tubular associado à redução do tamanho dos túbulos seminíferos e na frequência de túbulos em estágios VII-VIII (andrógeno-dependentes) sugere que essas alterações tenham sido causadas pela interferência do tratamento no controle androgênico da espermatogênese. Considerando que a célula de Sertoli é androgênio-dependente e exerce um papel fundamental para o desenvolvimento e manutenção estrutural do epitélio seminífero, é possível que esta célula tenha sido um dos principais alvos (direto ou indireto) da ação da fluoxetina nos testículos.

Palavras-chave: Fluoxetina. Testículo. Epitélio seminífero. Morfometria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Peso corpóreo dos animais dos grupos GC e GF durante o tratamento com cloridrato com fluoxetina. *p≤0,05.....25

Figura 2 – Níveis séricos de testosterona (ng/dL) dos animais dos grupos GC e GF *p≤0,05.....27

Figura 3 – Fotomicrografias de secções de testículos de ratos do GC (A) e GF (B e C) corados pela HE.....30

Figura 4 – Fotomicrografias de secções de testículos de ratos do GC (A) e GF (B-F) corados pela HE.....32

Figura 5 – Fotomicrografias de túbulos seminíferos de ratos do GC (a) e GF (b-i) coradas por HE (a-e) e submetidas ao método do TUNEL (f-i).....34

Figura 6 – Frequência (%) de túbulos de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero dos animais dos grupos GC e GF *p≤0,05.....36

Figura 7 – Frequência (%) de túbulos com luz preenchida nos animais dos grupos GC e GF *p≤0,05.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pesos testiculares absolutos (PTA) e pesos testiculares relativos (PTR) dos animais do grupo controle (GC) e grupo fluoxetina (GF).....26

Tabela 2 – Área tubular total (AT), área da luz tubular (AL) e área do epitélio seminífero (AE) dos animais dos grupos controle (GC) e do grupo fluoxetina (GF)..35

Tabela 3 – Número de células de Sertoli por túbulo seminífero nos animais do grupo controle (GC) e do grupo fluoxetina (GF).....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
dL	Decilitro
mL	Mililitro
g	Grama
Kg	Quilograma
h	Hora
ABP	Proteína ligante de andrógeno
AE	Área do epitélio seminífero
AL	Área da luz tubular
AT	Área tubular total
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GC	Grupo controle
GF	Grupo fluoxetina
HE	Hematoxilina e Eosina
HPG	Hipotálamo-hipófise-gônada
IRSS	Inibidor da receptação seletiva de serotonina
LH	Hormônio luteinizante
PAS	Ácido periódico reativo de Schiff

PBS Tampão fosfato de sódio

PTA Peso testicular absoluto

PTR Peso testicular relativo

TOC Transtorno obsessivo compulsivo

TdT Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descrição morfofuncional dos testículos

O aparelho reprodutor masculino é constituído por um par de testículos, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis (Junqueira, Carneiro, 2008). Os testículos, responsáveis pela produção de espermatozóides e do hormônio sexual masculino (testosterona), são recobertos por uma resistente cápsula fibrosa, denominada túnica albugínea, e são divididos em dois compartimentos principais: compartimento germinativo e compartimento intersticial (Leesoon, Cookson,1974; Russell et al, 1990).

Os túbulos seminíferos são formados por um epitélio estratificado constituído, basicamente, por células de Sertoli (células de sustentação) e células germinativas, além de um tecido peritubular (Anthony, Skinner, 1989; Junqueira, Carneiro, 2008). As células de Sertoli são células somáticas colunares que se encontram aderidas à membrana basal do túbulo seminífero e se estendem até a luz tubular, envolvendo parcialmente as células da linhagem germinativa. Possuem núcleo grande, com formato irregular e nucléolo tripartido (Fawcett, 1975). Estas células fornecem apoio estrutural e nutricional para o desenvolvimento das células germinativas, ajudam na manutenção da integridade estrutural do epitélio, proporcionam uma comunicação célula-célula, ajudando na sincronia dos eventos da espermatogênese, fagocitam células germinativas que se degeneram durante o processo de espermatogênese, secretam proteínas como, por exemplo, a ABP (proteína ligante de andrógeno) (Anthony, Skinner, 1989; Russel et al, 1990) e são responsáveis por parte do controle do desenvolvimento das células germinativas, uma vez que possuem receptores para os hormônios FSH (hormônio folículo-estimulante) e testosterona (Sanborn et al,

1977; Orth, Christensen, 1978).

As células germinativas, que se organizam em camadas concêntricas da base para a luz tubular, passam por um processo chamado espermatogênese, no qual as espermatogônias dão origem a espermatozóides. Esse processo é dividido em três fases: fase proliferativa, fase meiótica e espermiogênese (Russell et al, 1990). Na fase proliferativa, a espermatogônia sofre numerosas divisões por mitose gerando espermatogônias do tipo A e espermatogônias do tipo B. As primeiras permanecem como “espermatogônias-tronco” e continuam a se dividir, enquanto as do tipo B se diferenciam em espermatócitos primários (Russell et al, 1990). Na fase meiótica da espermatogênese, os espermatócitos sofrem duas divisões meióticas, dando origem, primeiramente (meiose I), aos espermatócitos secundários. Devido às mudanças nucleares que ocorrem durante a Prófase da meiose I, os espermatócitos podem ser classificados em pré-leptótenos, leptótenos, zigótenos, paquítenos e diplótenos (Russell, Frank, 1978). Na meiose II os espermatócitos secundários dão origem às espermátides haplóides (Niederberger, Lamb, 1997). A terceira fase, ou espermiogênese, é um processo de diferenciação celular lento que envolve várias mudanças estruturais nas espermátides, sem que haja nenhuma divisão celular, para que estas se diferenciem em espermatozóides maduros (Junqueira, Carneiro, 2008).

O tecido peritubular é um tecido constituído pelas células mióides peritubulares e pela membrana basal. As células mioides peritubulares são células contráteis e fornecem apoio estrutural para o túbulo seminífero e para o epitélio, cooperando para o transporte dos espermatozóides ao longo dos túbulos e para a síntese dos componentes da matriz extracelular, os quais constituem a membrana basal (Kormano, Hovatta, 1972; Hadley et al, 1985).

O compartimento intersticial constitui-se de um tecido conjuntivo frouxo, rico

em vasos sanguíneos e linfáticos, células de Leydig e outras células, como macrófagos e fibroblastos (Fawcett et al, 1973; Mori, Christensen, 1980). As células de Leydig são as responsáveis pela síntese de testosterona. Estas células podem ser identificadas pela presença de núcleo arredondado, nucléolo proeminente, heterocromatina ao longo da membrana nuclear e um citoplasma eosinófilo rico em inclusões lipídicas (Kretser, Kerr, 1988; Junqueira, Carneiro, 2008). Possuem abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, que contêm as enzimas associadas à síntese de esteróides (Russell et al, 1990). A biossíntese de testosterona pelas células de Leydig adultas depende da ligação do LH (hormônio luteinizante) aos receptores presentes na superfície celular (Ewing, Keeney, 1993; Hall, 1994) e o volume desta célula está relacionado com a capacidade do testículo em produzir testosterona (Keeney et al, 1990; Papadopoulos, 1990). A testosterona produzida pelas células de Leydig se difunde para os vasos sanguíneos e, por meio da circulação sanguínea, atua sobre os órgãos andrógeno-dependentes. Além destes, a testosterona também se difunde para o interior do túbulo seminífero, onde se liga a seus receptores presentes nas células mioides, células germinativas (Vornberger et al, 1994) e de Sertoli (Sanborn et al, 1977; Tindall et al, 1977).

1.2 Ação de fármacos sobre os testículos

O epitélio seminífero tem demonstrado ser um tecido sensível a uma variedade de agentes químicos, incluindo álcool (Gonzales et al, 1994) e antineoplásicos (Oshio et al, 1989; Turek et al, 1998; Stumpp et al, 2004), à deficiência nutricional (Thompson et al, 1964; Huang, Hembree, 1979), à hipertermia (Miraglia, Hayashi, 1993) e às radiações ionizantes (Meistrich, 1986).

Drogas e medicamentos também podem prejudicar a fertilidade do homem,

alterando o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG), prejudicando a ejaculação e a função erétil, diminuindo a libido por exercerem um efeito gonadotóxico nos testículos (Thompson, 1994). Estudos demonstraram que esteroides anabólicos causam infertilidade por agirem sobre o eixo HPG (Buffum,1983), enquanto a maioria dos anti-hipertensivos e alguns antibióticos exercem efeito negativo sobre a fertilidade por prejudicarem a função sexual (Thompson, 1994; King et al, 1997; Monoski et al, 2002). Têm também sido relatadas alterações na atividade espermatogênica causadas por imunossupressores em indivíduos portadores de órgãos transplantados (Masuda et al, 2003; Caneguim et al, 2009). Além disso, drogas antagonistas de receptores H_2, como a cimetidina, utilizados no tratamento de úlceras gástricas, também têm demonstrado efeitos adversos sobre o sistema genital masculino, sobretudo nos testículos, incluindo alterações na histoarquitetura dos túbulos seminíferos e, consequentemente, na espermatogênese (Sasso Cerri et al, 2001; Sasso Cerri, Miraglia, 2002; Sasso Cerri, Cerri, 2008; Beltrame et al, 2011).

Vários estudos relacionam alterações na histoarquitetura de túbulos seminíferos - como perda de células germinativas, desorganização epitelial e destacamento de células germinativas para a luz tubular - à ação prejudicial de medicamentos nas células de Sertoli. Tal ação pode causar redução no número dessas células e provocar alterações morfológicas e estruturais como, por exemplo, deslocamento destes tipos celulares da porção basal do túbulo seminífero e alterações nucleares (Stumpp et al, 2006; Sasso Cerri, Cerri, 2008; Beltrame et al, 2011; Brilhante et al, 2012). Estas alterações podem estar relacionadas ao fato de que as células de Sertoli, as quais fornecem apoio estrutural e nutricional para o desenvolvimento das células germinativas, secretam proteínas como a ABP (proteína ligante de andrógeno) e possuem muitas outras funções que as tornam

essenciais para a manutenção da espermatogênese (Anthony, Skinner, 1989; Russel et al, 1990). As células de Sertoli possuem receptores para FSH e testosterona; assim, seu desenvolvimento, regulação e função são largamente dependentes da presença desses hormônios (Johnston et al, 2004).

Os antidepressivos, uma classe de medicamentos muito utilizada atualmente, vêm sendo estudados e têm causado uma série de alterações na fertilidade. Tem sido relatado que antidepressivos como a paroxetina, a sertralina, o escitalopram e a duloxetina podem causar redução da libido e disfunção erétil, anorgasmia, além de prejudicar a ejaculação (Buffum, 1986; Philipp et al, 2000; Clayton et al, 2007).

De uma forma geral, os antidepressivos provocam um aumento nos níveis de prolactina e inibem, assim, a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e, consequentemente, redução na secreção de LH. Dessa forma, a secreção de testosterona pelas células de Leydig é prejudicada, causando supressão da espermatogênese (Pasqualotto et al, 2004). Entretanto, o maior índice de indivíduos com disfunção sexual causada pelo tratamento com antidepressivos é observado em pacientes que usam a classe dos inibidores da recaptação seletiva de serotonina (IRSSs), os quais, segundo David et al. (2009), são as drogas mais prescritas para o tratamento de depressão e distúrbios de ansiedade. Um exemplo de antidepressivo classificado como IRSS e largamente utilizado é a fluoxetina; entretanto, este fármaco causa uma série de problemas relacionados ao comportamento sexual (Cantor et al, 1999).

1.2.1 Fluoxetina e sua ação sobre o sistema genital masculino

A fluoxetina é um dos antidepressivos mais amplamente prescritos para o tratamento de depressão e de um tipo particular de transtorno de ansiedade conhecido como transtorno obsessivo-compulsivo (TOC). Pertence à classe dos

inibidores da recaptação seletiva de serotonina (IRSS) e tem uma meia-vida plasmática de 24-96 horas, demorando de 2 a 4 semanas para começar a exercer seu efeito terapêutico (Rang et al, 2007). A fluoxetina age inibindo de forma potente e seletiva a recaptação da serotonina por transportadores de recaptação presentes no neurônio pré-sináptico, local em que a serotonina seria metabolizada pela ação de enzimas, resultando no aumento das concentrações de serotonina na fenda sináptica e na potencialização da neurotransmissão serotoninérgica (Moreno et al, 1999). É metabolizada por N-desmetilação à norfluoxetina, outro inibidor específico da recaptação de serotonina (Sommi et al, 1987; DeVane, 1992). A fluoxetina age como um agonista da serotonina de ação indireta, inibindo seletivamente a recaptação pré-sináptica de serotonina (Wong et al, 1974, 1975).

A fluoxetina é amplamente prescrita para depressão durante a gravidez e lactação (Einarson, Koren, 2004), entretanto sabe-se que parte da fluoxetina atravessa a barreira placentária e também é excretada no leite, fazendo com que os fetos tenham contato com altos níveis de serotonina (Pohland et al, 1989; Hendrick et al, 2001). A serotonina tem várias funções no sistema nervoso central de adultos, estando envolvida, por exemplo, na regulação neuroendócrina (Mellow et al, 1988), no humor (Fuller et al, 1991) e na modulação do reflexo (Geyer et al, 1978; Davis et al, 1988).

Efeitos colaterais do uso desse medicamento têm sido relatados, como dor de cabeça, distúrbios do sono, náusea e perda de apetite, podendo, devido a isso, ser utilizado no tratamento de obesidade (Halford et al, 2005; Palamara et al, 2006). Há também evidências de que a fluoxetina inibe diretamente a entrada de Ca^{+2} na musculatura lisa vascular e intestinal, resultando em vasodilatação e relaxamento intestinal (Pacher et al, 1999; Ungvari et al, 1999). Por outro lado, vários estudos têm

demonstrado que a fluoxetina causa menos efeitos colaterais anticolinérgicos, anti-histaminérgicos e cardiovasculares em comparação com os antidepressivos tricíclicos (Pacher et al, 1999; Pacher, Ungvari, 2001). Além disso, também têm sido verificados distúrbios na função sexual (Yells et al, 1994; Crenshaw, Goldberg, 1996; Mehler-Wex, Kolch, 2008), como a indução de anorgasmia e perda do desejo sexual (Cantor et al, 1999; Gouvêa et al, 2008; Giuliano, Hellstrom, 2008). Os inibidores da recaptação seletiva de serotonina, como a fluoxetina, a qual foi classificada como uma toxina reprodutiva pelo Centro de Avaliação de Riscos para Reprodução Humana (Hines et al, 2004), podem causar problemas sexuais devido à inibição dos receptores de serotonina nos nervos periféricos (Frohlich, Meston, 2005). Csoka et al (2008) relataram casos nos quais homens apresentaram disfunção sexual permanente devido ao uso de fluoxetina na dose de 20mg/kg durante a adolescência.

A serotonina parece ter um importante papel na neurofisiologia da ejaculação (Bitran, Hull, 1987; Giuliano, Clement, 2005). Foi sugerido que os baixos níveis sinápticos de serotonina na região do sistema nervoso central estariam relacionados com o problema de ejaculação precoce. Dessa forma, a fluoxetina vem mostrando alguma eficiência no tratamento de ejaculação prematura em doses terapêuticas contínuas (Waldinger et al, 2004). A elevação no nível de serotonina no cérebro afeta a secreção de FSH e LH por inibição na secreção de fator de liberação de gonadotrofinas (GnRH), interferindo nos processos de espermatogênese e esteroidogênese em ratos adultos (Urry, Dougherty,1975; Naumenko, Shishkina, 1978; Das et al, 1985). Nos testículos, a serotonina pode reduzir a esteroidogênese e espermatogênese por meio da redução do fluxo sanguíneo intratesticular devido à constrição arterial ou por inibição das enzimas esteroidogênicas (Kalla, 1979; Das et al, 1985; Hedger et al, 1995).

Bataineh, Daradka (2007) observaram que uma superdose de fluoxetina administrada em ratos, em longo prazo (200mg/kg durante 60 dias), causou diminuição do peso de órgãos reprodutores como testículo, epidídimo e vesícula seminal. Estes autores verificaram redução da espermatogênese, bem como diminuição na quantidade de espermatócitos primários, secundários e espermátides. Além disso, foram observadas redução da motilidade e densidade dos espermatozóides no epidídimo e alteração nos níveis de testosterona e FSH. Administrando fluoxetina em ratos recém-nascidos nas doses de 10 e 20mg/kg, Da Silva Junior et al (2008), observaram uma redução no número de células de Sertoli por testículo nos animais tratados, além de redução no tamanho dos testículos e túbulos seminíferos e da população de espermatogônias.

Vários estudos têm relatado problemas causados pela fluoxetina relacionados à disfunção sexual, como anorgasmia, distúrbios ejaculatórios, disfunção erétil, redução da libido, entre outros distúrbios relacionados ao comportamento sexual. Portanto, com exceção do estudo realizado por Bataineh e Daradka (2007), no qual foi avaliado o efeito de uma dose extremamente alta de fluoxetina sobre as células germinativas, estudos sobre a ação de doses moderadas de fluoxetina na histoarquitetura dos túbulos seminíferos de ratos adultos não têm sido relatados na literatura.

2. OBJETIVO

Considerando o elevado uso clínico dos antidepressivos, incluindo a fluoxetina, amplamente prescrita, e os possíveis efeitos prejudiciais deste fármaco no desempenho sexual masculino, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação da fluoxetina sobre a integridade morfológica dos túbulos seminíferos de ratos adultos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo referente ao tratamento dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOAr (Faculdade de Odontologia de Araraquara) (protocolo número: 02/2011).

3.1 Animais

Foram utilizados 16 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 tratamento, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, em gaiolas plásticas forradas com maravalha, à temperatura ambiente de 23±2°C e fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Guabi® (Nutrilabor, Brasil) e água *ad libitum*. Antes do início do tratamento, os animais passaram por um período (7 dias) de adaptação ao novo local (biotério) e ao manuseio pelo pesquisador.

3.2 Distribuição dos grupos e tratamento dos animais

Os ratos foram distribuídos em dois grupos, contendo oito animais cada: grupo fluoxetina (GF) e grupo controle (GC).

Os animais do grupo fluoxetina (GF) receberam, diariamente, injeções intraperitoneais de fluoxetina (diluída em água destilada deionizada), na dose de 20mg/Kg. Os animais do grupo controle (GC) receberam a mesma quantidade de água destilada deionizada. O tratamento se estendeu por 11 dias consecutivos.

Os animais dos dois grupos tiveram seus pesos corpóreos monitorados durante todo o período de tratamento.

3.3 Processamento para a microscopia de luz

Após 24h do término do tratamento, os animais foram pesados e anestesiados

com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 10% na proporção 0,4 mL/100g de peso corpóreo. 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 a -80°C para dosagens séricas de testosterona. A análise foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Microbiológicas São Lucas, Araraquara (SP).

Em seguida, os testículos dos animais foram removidos da bolsa escrotal e pesados em uma balança analítica e os animais foram eutanasiados por dessangramento, seccionando a artéria aorta.

Os testículos esquerdos foram imersos em solução fixadora contendo formaldeído 4% (preparada a partir do paraformaldeído, MERK - Alemanha) em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4. Os testículos direitos foram imersos em líquido de Bouin. Após 1 hora de fixação, todos os testículos foram seccionados na região equatorial e mantidos por 48 horas nas respectivas soluções fixadoras.

Metade de cada testículo esquerdo foi processada para inclusão em historesina (Historesin-Embedding Kit, JUNG, Alemanha). Os blocos foram cortados em um micrótomo (Leica) para a obtenção de cortes com 3 µm de espessura. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para realização das análises morfométricas e morfológica. As outras metades dos testículos esquerdos e os testículos direitos foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Os cortes, com 6µm de espessura, foram submetidos ao método do TUNEL para a detecção de morte celular **(item 3.6)**.

As análises morfométricas e morfológica, bem como a documentação

fotográfica, foram realizadas utilizando-se uma câmera de captura Olympus (DP71) acoplada a um microscópio Olympus (BX- 51).

3.4 Pesos testiculares absoluto e relativo

Os testículos direitos e esquerdos foram pesados utilizando-se uma 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:

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

3.5 Análises morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas em cinco animais de cada grupo nos cortes de testículos incluídos em historesina e corados pela HE. As imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera de captura de imagens Olympus (DP71) acoplada a um microscópio Olympus (BX- 51). Do testículo de cada animal foram obtidos 3 cortes não-seriados, com um intervalo de, aproximadamente, 40µm entre eles. Para cada parâmetro morfométrico 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), foram realizadas, em cada secção tubular, análises morfométricas para obtenção dos seguintes parâmetros: área tubular total, área epitelial e área da luz tubular.

Durante as análises morfométricas, os túbulos seminíferos foram classificados de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero em que se encontravam. A

frequência dos estágios foi obtida seguindo a seguinte classificação: estágios I-VI, estágios VII-VIII, estágios IX-X e estágios XI-XIV (Leblond, Clermont, 1952). A frequência de túbulos contendo células epiteliais descamadas na luz tubular também foi obtida.

Em 15 túbulos seminíferos de cada animal foram quantificados, em um aumento de 500x, núcleos de células de Sertoli posicionados na camada basal e exibindo morfologia e nucléolo típico (Caneguim et al, 2009; Beltrame et al, 2011).

3.6 Método do TUNEL

Para a detecção *in situ* das quebras das cadeias de DNA, que ocorrem durante a morte celular programada, alguns cortes testiculares incluídos em parafina (6µm), foram aderidos a lâminas previamente silanizadas e submetidos ao método do TUNEL (**T**erminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated d**U**TP-biotin **N**ick **E**nd-**L**abeling). Para o desenvolvimento deste método foi utilizado o Kit Apop-Tag Plus Peroxidase *In situ* (Millipore), e as etapas da reação foram realizadas segundo Sasso-Cerri, Miraglia (2002) e de acordo com o protocolo do fabricante.

Após desparafinização, hidratação e lavagem dos cortes em tampão fosfato de sódio - PBS (50mM + 200mM NaCl; pH 7,2), os cortes foram tratados pela proteinase-K (20µg/ml). Em seguida, foram imersos em peróxido de hidrogênio 3% durante 20 minutos, para a inativação da peroxidase endógena. Após lavagem em PBS, os cortes foram tratados pelo “tampão de equilíbrio” (fornecido pelo Kit) e incubados com a enzima TdT (**T**erminal **d**eoxynucleotidyl **T**ransferase), durante uma hora e meia, a 37ºC em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram imersos em “tampão de bloqueio” (fornecido pelo Kit) a 37ºC por 20 minutos, lavados em PBS e incubados com antidigoxigenina peroxidase por 1 hora, a temperatura ambiente. Após lavagem dos cortes em PBS, a reação foi revelada com 3,3’-diaminobenzidina

(DAB) 0,06% e, para a coloração nuclear, foi utilizada a hematoxilina de Carazzi. Após lavagem, 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). Para o controle negativo da reação, alguns cortes testiculares foram submetidos à mesma reação, excetuando-se a etapa de incubação em TdT.

3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados através de um programa de análise estatística - Jandel Statistical SigmaStat 2.0. Segundo a análise de variância ANOVA, os dados foram submetidos ao teste estatístico t-Student. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$. Quando os grupos não apresentaram normalidade foi realizado o teste Mann-Whitney, sendo o nível de significância aceito $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corpóreo

Os animais do GC apresentaram ganho de peso corpóreo no decorrer de todo o período, alcançando, ao término do tratamento, um aumento de 38,6% em relação ao peso que apresentavam 1 dia antes do início do tratamento (dia 0) (Figura 1). Por outro lado, os animais do GF perderam peso no decorrer do período, apresentando uma diminuição, ao final do tratamento, de 11,6% no peso corpóreo em relação ao peso inicial (dia 1) (Figura 1).

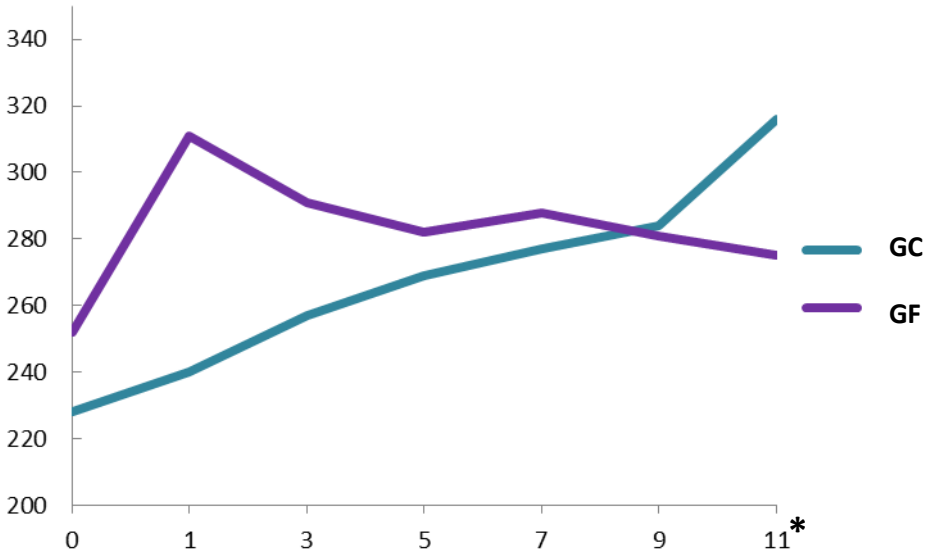


Figura 1 – Peso corpóreo dos animais dos grupos GC e GF durante o tratamento com cloridrato com fluoxetina. *p≤0,05.

4.2 Pesos testiculares absolutos e relativos

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 significante (Tabela 1). Em relação ao peso testicular relativo (PTR), os animais do GF apresentaram um aumento, embora não significante, de 7,8% quando comparados aos animais do GC (Tabela 1).

Tabela 1 – Pesos testiculares absolutos (PTA) e pesos testiculares relativos (PTR) dos animais do grupo controle (GC) e grupo fluoxetina (GF).

ANIMAIS	PTA (g)	PTR(%)
GC1	1,74	0,56
GC2	1,48	0,49
GC3	1,70	0,55
GC4	1,67	0,48
GC5	1,74	0,46
X±DP	1,67±0,11	0,51±0,044
GF1	1,55	0,61
GF2	1,29	0,53
GF3	1,59	0,53
GF4	1,61	0,58
GF5	1,56	0,50
X±DP	1,52±0,13	0,55±0,44

X (média); DP (desvio padrão)

4.3 Análise hormonal

Os animais do GF apresentaram redução significante (95,63%) nos níveis séricos de testosterona em comparação aos animais do GC (figura 2).

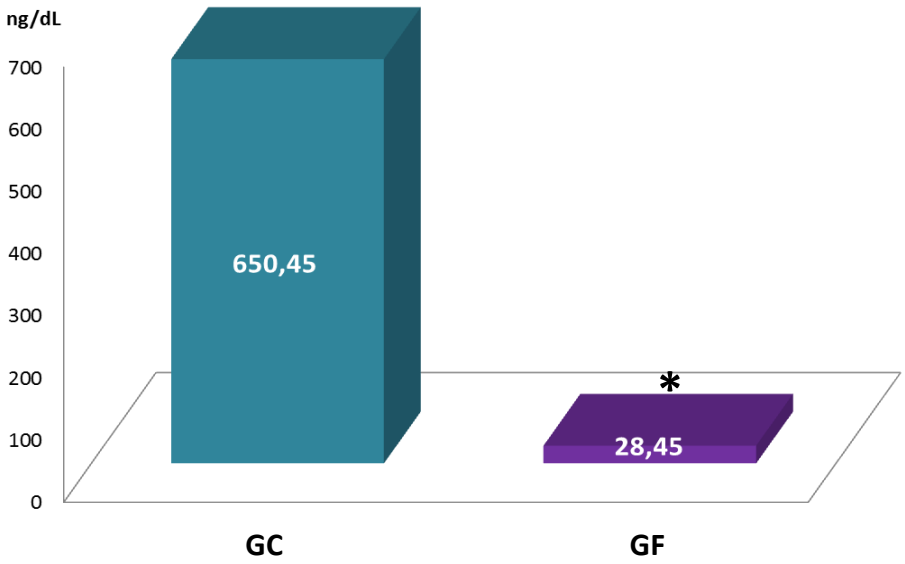


Figura 2 – Níveis séricos de testosterona (ng/dL) dos animais dos grupos GC e GF *p≤0,05.

4.4 Resultados morfológicos

As secções tubulares dos animais do GC, ao microscópio de luz, se apresentaram com características morfológicas normais. Os túbulos seminíferos apresentaram contorno regular e epitélio germinativo bem organizado, com células distribuídas em camadas concêntricas da base para a luz tubular, bem como luz tubular bem definida e com ausência de células descamadas (Figuras 3A e 4A).

Por outro lado, embora os animais do GF tenham apresentado túbulos seminíferos com contorno regular e organização epitelial aparentemente normal, estes se encontravam com grande quantidade de células descamadas na luz tubular (Figuras 3B e 4B). Além disso, frequentemente foram encontrados túbulos seminíferos aparentemente menores e com maior depleção celular (Figuras 3C, 4C-F). Muitos túbulos apresentaram contorno irregular (Figuras 3C, 4D e 4E) e intensa desorganização epitelial, com espermátides localizadas próximas à camada basal do epitélio seminífero e dispostas em posição anormal (Figura 4C). Além disso, alguns túbulos apresentaram redução de células germinativas na porção basal, adluminal, ou em ambas as camadas do epitélio (Figuras 3C, 4E e 4F), inúmeros vacúolos

(Figura 4E) e presença de espaços intraepiteliais (Figura 4F). Frequentemente, foram observadas células germinativas contendo núcleo com cromatina condensada na periferia, características típicas de células em processo de morte celular, provavelmente por apoptose (Figura 4E; porção ampliada).

Nos animais do GC, os núcleos de células de Sertoli apresentaram características típicas como formato triangular, nucléolo bem evidente e estavam justapostos ao tecido peritubular (Figura 5A; porção ampliada). Já nos animais do GF foram observados núcleos de células de Sertoli deslocados da porção basal do túbulo seminífero (Figura 5B; porção ampliada) e posicionados na luz tubular (Figura 5C; porção ampliada). Alguns núcleos ainda apresentaram contorno irregular (Figuras 5D e 5E) e foram observados, também, prováveis núcleos de células de Sertoli (Figura 5F e 5G) e núcleos de células germinativas positivos ao método do TUNEL (Figura 5H e 5I).

Figura 3 – Fotomicrografias de secções de testículos de ratos do GC (A) e GF (B e C) corados pela HE. Em A, túbulos seminíferos com aspecto normal (EP) e luz tubular bem definida (L). Em B, túbulos seminíferos com distribuição aparentemente normal das células germinativas (EP); vários túbulos apresentam luz preenchida por células germinativas descamadas (asteriscos). Na figura C, os túbulos seminíferos se apresentam irregulares e aparentemente menores. Nota-se ausência de células nas porções das camadas basal e adluminal do epitélio (asteriscos). Barras: 86µm (A), 68µm (B) e 65µm (C).

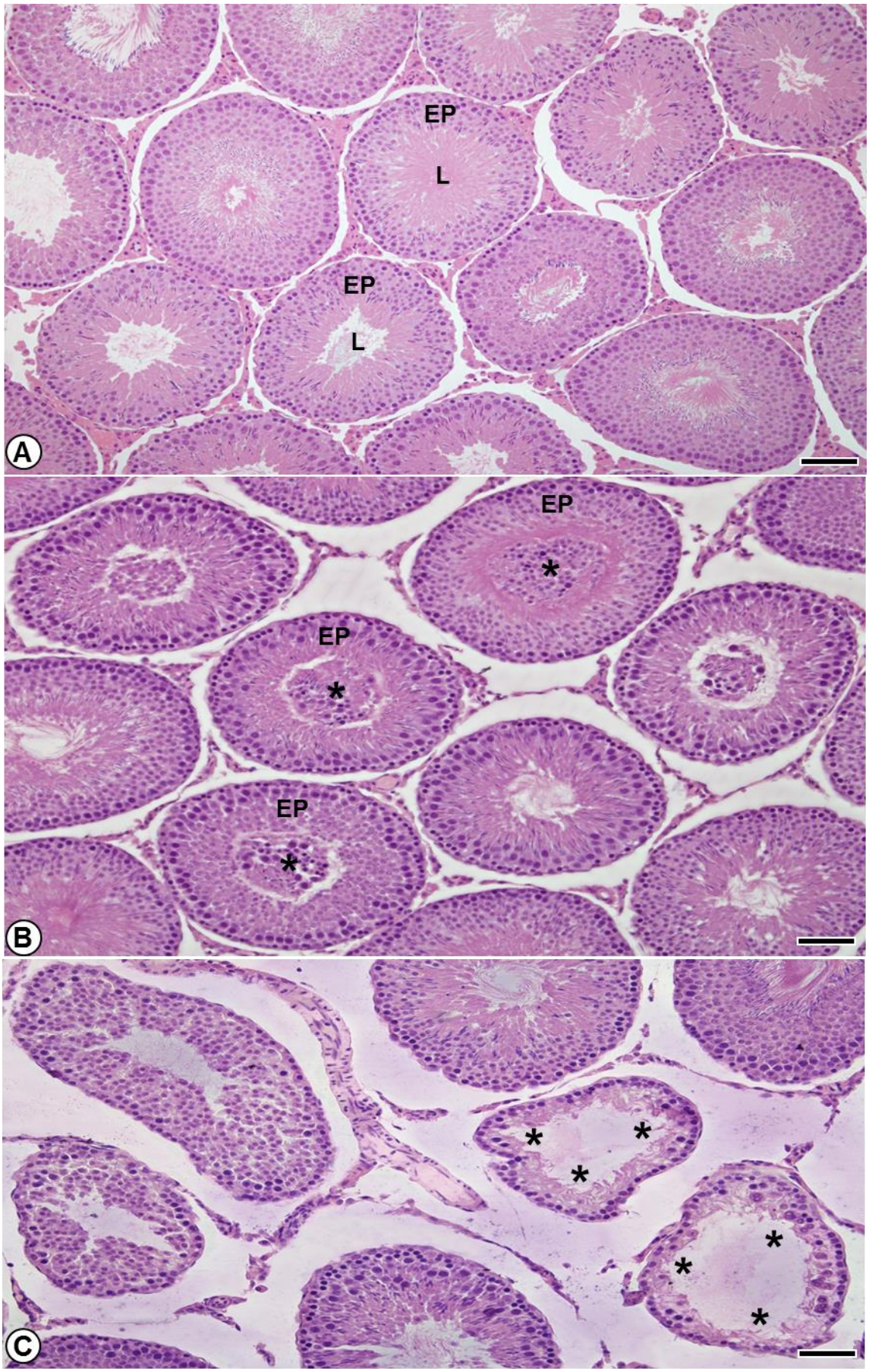

EP
L
EP
L
A
EP
*
EP
*
EP
*
B
*
*
*
*
*
*
C

Figura 4 – Fotomicrografias de secções de testículos de ratos do GC (A) e GF (B-F) corados pela HE. Em A, túbulo seminífero com contorno regular, células germinativas organizadas em camadas concêntricas da base para a luz tubular (EP) e luz bem definida (L). Em B, túbulo apresentando contorno regular, com células germinativas organizadamente distribuídas (EP), e grande quantidade de células germinativas descamadas na luz tubular (asterisco). Na figura C, o túbulo seminífero mostra intensa desorganização epitelial; não há distinção entre epitélio (EP) e luz tubular. Note a presença de espermátides distribuídas irregularmente, próximas à camada basal do túbulo seminífero, e dispostas em posição anormal (cabeças de seta). Em D, o epitélio germinativo apresenta padrão de organização aparentemente normal (EP) e luz bem definida (L), entretanto, o túbulo seminífero apresenta contorno bastante irregular. Em E, túbulo seminífero mostrando contorno irregular, ausência de células na camada adluminal do epitélio (asteriscos) e numerosos vacúolos (setas). Algumas células germinativas apresentam núcleos com cromatina condensada na periferia, sugerindo apoptose (cabeças de seta; porção ampliada). A figura F mostra um túbulo com perda de células germinativas na porção adluminal do epitélio (asteriscos). Barras: 43 µm (A), 45µm (B), 51µm (C), 42 µm (D), 37 µm (E), 53 µm (F), 30µm (E; porção ampliada).

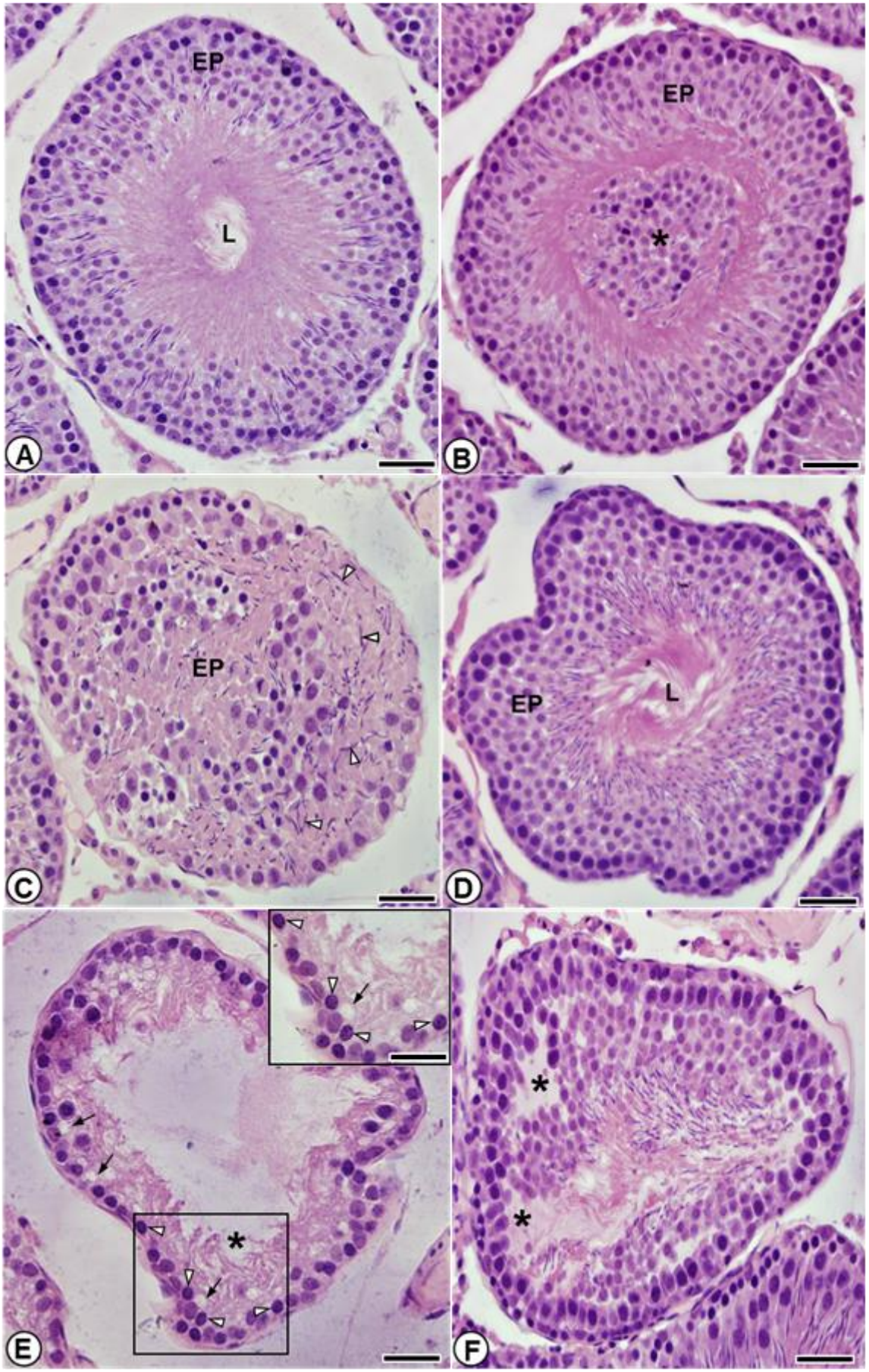
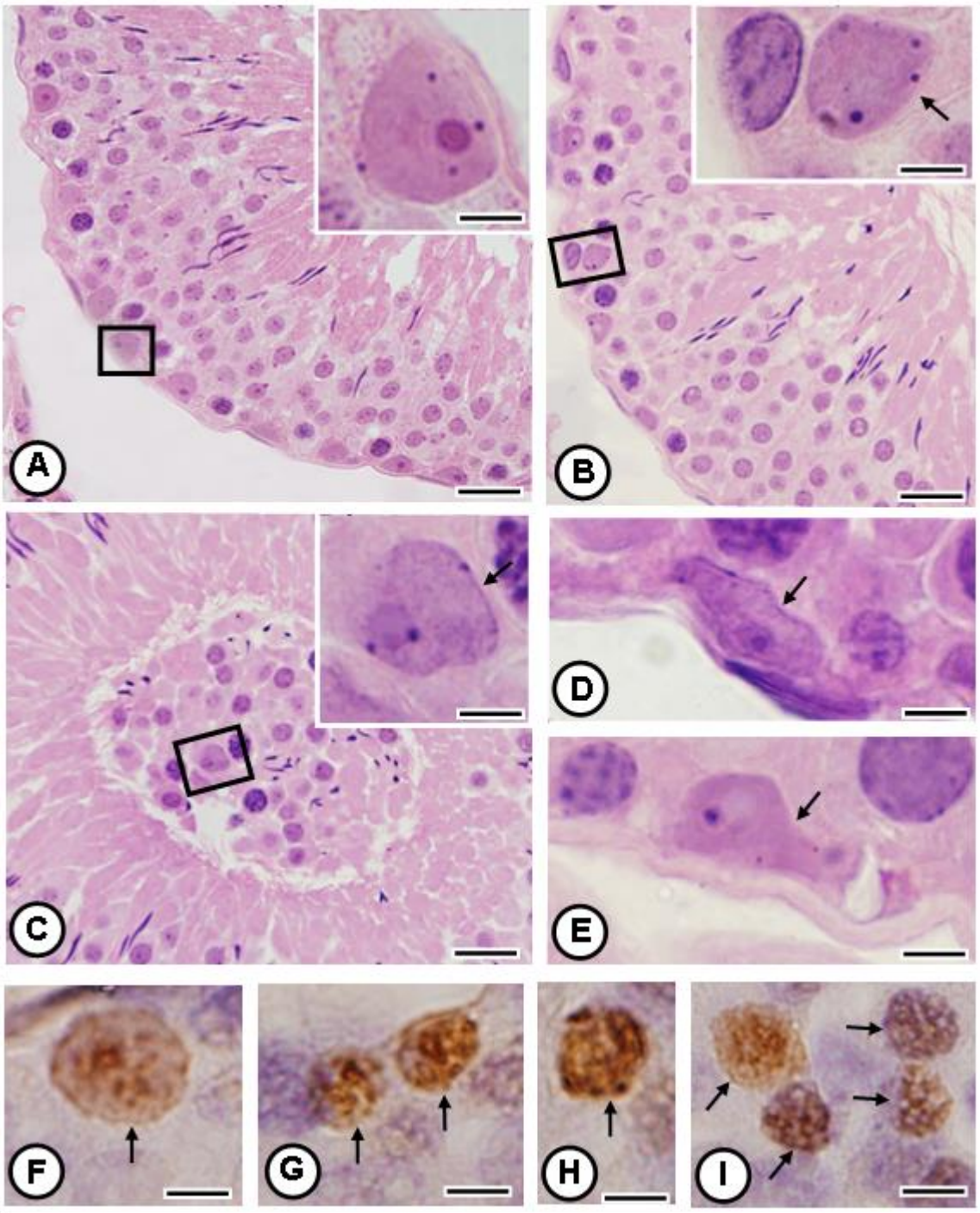

EP
L
A
EP
*
B
EP
C
EP
L
D
*
*
E
F

Figura 5 – Fotomicrografias de túbulos seminíferos de ratos do GC (A) e GF (B-I) coradas por HE (A-E) e submetidas ao método do TUNEL (F-I). A figura A mostra um núcleo de célula de Sertoli justaposto ao tecido peritubular apresentando núcleo triangular e nucléolo evidente (porção ampliada). A figura B mostra um núcleo de célula de Sertoli deslocado da porção basal do túbulo e, em C, posicionado no lúmen tubular (porções ampliadas; setas). As figuras D e E mostram núcleos de células de Sertoli com contorno irregular (setas). Em F e G, núcleos positivos ao método do TUNEL, possivelmente de células de Sertoli, são observados (setas). Nas figuras H e I, células germinativas TUNEL-positivas também são observadas (setas). Barras: 27 µm (A), 4 µm (C; porção ampliada, F, G, H), 25 µm (B), 6 µm (B; porção ampliada, I), 21 µm (C), 5 µm (A; porção ampliada, D, E).


A
B
C
D
E
F
G
H
I

4.5 Resultados morfométricos

4.5.1 Área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero

Os animais do GF apresentaram reduções significantes na área tubular total (32,95%), na área da luz tubular (31,95%) e na área do epitélio seminífero (33,07%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Área tubular total (AT), área da luz tubular (AL) e área do epitélio seminífero (AE) dos animais dos grupos controle (GC) e do grupo fluoxetina (GF).

*p≤0,05

Grupos	AT (µm²)	AL (µm²)	AE (µm²)
GC	97202,54	10508,17	86694,37
GF	65176,2 *	7150,38 *	58025,83 *

4.5.2 Frequência de túbulos de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero

A frequência dos túbulos nos estágios do ciclo do epitélio seminífero encontra-se expressa na figura 6.

O GF apresentou um aumento significante (63,9%) na frequência de túbulos nos estágios XI-XIV e uma redução significante (24,3%) na frequência de túbulos nos estágios VII-VIII. Embora tenha sido observada redução na frequência de túbulos nos estágios I-VI e aumento na frequência de túbulos nos estágios IX-X, tais diferenças não foram significantes quando comparadas ao GC.

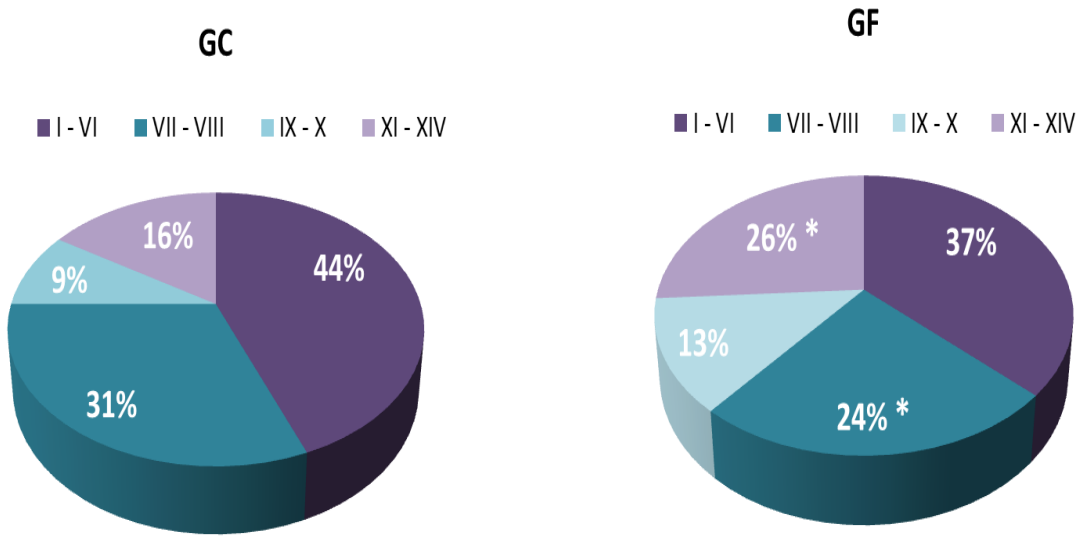


Figura 6 – Frequência (%) de túbulos de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero dos animais dos grupos GC e GF. *p≤0,05

4.5.3 Frequência de túbulos contendo células descamadas na luz tubular

O GF apresentou um aumento significante na frequência de túbulos com células descamadas na luz quando comparado ao GC (Figura 7).

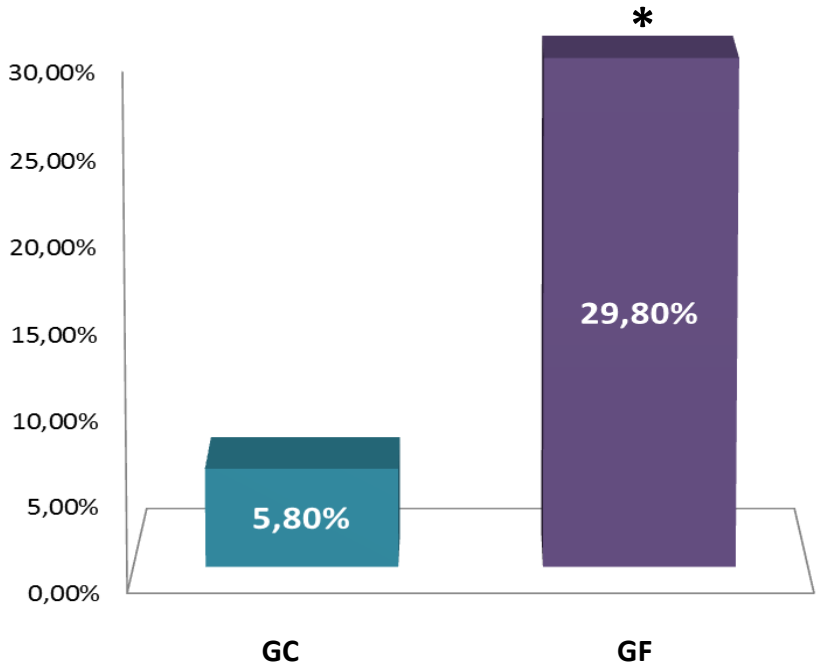


Figura 7 – Frequência (%) de túbulos com luz preenchida nos animais dos grupos GC e GF. *p≤0,05

4.5.4 Número de células de Sertoli por túbulo seminífero

Os animais do GF apresentaram redução significante (10%) no número de células de Sertoli por túbulo seminífero quando comparados ao GC (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de células de Sertoli por túbulo seminífero nos animais do grupo controle (GC) e do grupo fluoxetina (GF).

Animais	N° de células de Sertoli / túbulo seminífero
GC 1	19
GC 2	20
GC 3	22
GC 4	22
GC 5	19
X±DP	20 ± 1,517
GF 1	17
GF 2	19
GF 3	18
GF 4	18
GF 5	17
X±DP	18 ± 0,837 *****

X (média); DP (desvio padrão); *p≤0,05

5. DISCUSSÃO

A fluoxetina, um antidepressivo da classe dos inibidores da recaptação seletiva de serotonina (IRSS), é amplamente utilizada para o tratamento de depressão e transtornos de ansiedade. Vários estudos têm relatado problemas relacionados à disfunção sexual causados por este fármaco (Yells et al, 1994; Crenshaw, Goldberg, 1996; Cantor et al, 1999; Giuliano, Hellstrom, 2008; Gouvêa et al, 2008; Mehler-Wex, Kolch, 2008).

Nossos resultados mostraram que, no decorrer dos 11 dias de tratamento, os animais do GC tiveram um aumento de 38,6% no seu peso corpóreo, enquanto os animais do GF já apresentaram perda de peso a partir do primeiro dia de tratamento, tendo uma diminuição, ao final do tratamento, de 11,6% no peso corpóreo em relação ao peso inicial. Estudos clínicos têm relatado uma diminuição do peso corpóreo, relacionada à dose de fluoxetina, em humanos (Li et al, 2005; Li, Cheung, 2009). Além disso, a administração crônica de fluoxetina nas doses de 5 e 10mg/Kg em ratos também causou redução do peso corpóreo dos animais (Cantor et al, 1999). A perda de peso corpóreo nos animais tratados deveu-se, provavelmente, à ação da fluoxetina sobre o controle da fome, pois este fármaco atua sobre os neurotransmissores no sistema nervoso central e provoca uma sensação de saciedade e redução da ingestão de alimentos (Li et al, 2005; Li, Cheung, 2009).

Embora tenha sido observada uma pequena redução (9%) no peso testicular absoluto dos animais do GF, o peso testicular relativo destes animais apresentou-se maior (7,8%) quando comparado ao GC. Isto se deve à significante diminuição do peso corpóreo que os animais do GF apresentaram durante o tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos (Da Silva Junior et al, 2008).

Schultz et al (2011) observaram alterações morfológicas nos testículos de peixes que foram expostos a baixas concentrações dos antidepressivos fluoxetina e sertralina. Em nosso estudo, o tratamento com cloridrato de fluoxetina causou várias alterações morfológicas na histoarquitetura dos túbulos seminíferos dos ratos. Entre alguns túbulos, cujo epitélio estava aparentemente normal, foram encontrados vários túbulos menores e irregulares com frequente descamação de células germinativas na luz tubular, intensa desorganização epitelial e redução de células germinativas

nas camadas basal e adluminal do epitélio. A presença de vacúolos e espaços intraepiteliais associados à presença de células germinativas destacadas na luz tubular indicam uma interferência do fármaco sobre a integridade estrutural que mantém as células germinativas aderidas às células de Sertoli. É importante ressaltar que em animais adultos, a célula de Sertoli tem um importante papel para promover e manter o desenvolvimento das células germinativas e dar apoio à histoarquitetura tubular (Abel et al, 2008). Em alguns túbulos, foram observadas células germinativas apresentando núcleo com cromatina condensada na periferia, características típicas de morte celular, provavelmente por apoptose. O processo de morte celular nestas células foi comprovado pelo método do TUNEL.

Vários estudos têm relacionado a perda celular, causada por alterações estruturais e funcionais, com um aumento na frequência de morte celular por apoptose das células de Sertoli (Sasso-Cerri, Miraglia, 2002; Benbrahim-Tallaa et al, 2008; Sasso-Cerri, Cerri, 2008; Caneguim et al, 2009; Maschio et al, 2010; Beltrame et al, 2011). Células de Sertoli com características morfológicas alteradas, apresentando núcleos irregulares, afastados da porção basal e localizados na luz tubular foram encontradas nos testículos alterados pela fluoxetina. Além disso, estes tipos celulares foram positivos ao método do TUNEL e uma redução significante no número de células de Sertoli por túbulo seminífero foi verificada. Alguns autores têm relatado diminuição do número de células de Sertoli por túbulo seminífero, causada pela fluoxetina (Bataineh, Daradka, 2007; Da Silva Junior et al, 2008). Da Silva Junior et al (2008) sugeriram que a diminuição do número de células de Sertoli por túbulo seminífero em ratos neonatos ocorreu, provavelmente, devido ao aumento dos níveis de serotonina, causado pelo tratamento; os autores sugerem, ainda, que a serotonina seria responsável por inibir a proliferação dessas células. Por outro

lado, sabe-se que o posicionamento das células de Sertoli no túbulo seminífero é mantido por filamentos de vimentina, um tipo de filamento do citoesqueleto celular (Aumuller et al, 1992; Sasso Cerri, Cerri, 2008). Sendo assim, a presença de células deslocadas da porção basal do túbulo, com aspectos morfológicos alterados e TUNEL-positivas pode indicar uma possível interferência do tratamento no citoesqueleto das células de Sertoli, alteração já verificada em outros estudos utilizando diferentes tratamentos (Stumpp et al, 2006; Sasso Cerri, Cerri, 2008; Brilhante et al, 2012).

Por apresentarem receptores para andrógeno, as células de Sertoli são alvos diretos da ação da testosterona. Portanto, alterações no controle androgênico, causadas, por exemplo, por fármacos anti-androgênicos podem provocar alterações funcionais nessas células, que resultam no aumento do processo de morte das células germinativas (You, Sar, 1998; Benbrahim-Tallaa et al, 2008). Johnston et al (2004) relataram que ratos adultos *knockout* para receptores de andrógeno apresentaram redução significante no número de células de Sertoli, sugerindo que andrógenos são necessários para manutenção do número de células de Sertoli em animais adultos. Portanto, é possível que as alterações descritas neste trabalho, como a perda de células germinativas e atrofia tubular, tenham sido causadas, também, por danos morfológicos, estruturais e funcionais nas células de Sertoli.

No presente estudo, os animais tratados com fluoxetina apresentaram redução drástica (95,63%) dos níveis séricos de testosterona em comparação aos animais controle. Sabe-se que a elevação no nível de serotonina no cérebro afeta a secreção de FSH e LH por inibição na secreção do fator de liberação de gonadotrofinas (GnRH) que, consequentemente, provoca redução nos níveis de testosterona, interferindo nos processos de espermatogênese e esteroidogênese em

ratos adultos (Urry, Dougherty,1975; Naumenko, Shishkina, 1978; Das et al, 1985). Estudos têm demonstrado que injeções de serotonina na dose de 10 mg/Kg causam danos aos túbulos seminíferos de ratos, resultando em um aumento na degeneração das células germinativas (Hedger et al, 1995). O processo espermatogênico e a inibição da apoptose nas células germinativas dependem da ação de hormônios como FSH, LH e testosterona, sendo a testosterona, um fator crítico para a sobrevivência de células germinativas (Sofikitis et al, 2008) e que também está relacionada à expressão de proteínas presentes em junções oclusivas (Maschio et al, 2010). Com base nessas informações, é provável que as alterações encontradas, tais como: a frequente descamação de células germinativas na luz tubular, desorganização epitelial, presença de túbulos seminíferos menores e irregulares e presença de núcleos de células germinativas positivas ao método do TUNEL, tenham sido causadas pela significante redução nos níveis séricos de testosterona nos animais submetidos ao tratamento com fluoxetina.

Estudos sugerem que a atividade, função e sobrevivência de células de Leydig adultas são dependentes da presença de células de Sertoli (Johnston et al, 2004). Assim, é possível que a redução do número de células de Sertoli por túbulo seminífero nos animais tratados com fluoxetina tenha afetado as células de Leydig e, consequentemente, provocado redução dos níveis séricos de testosterona, observada em nosso estudo. Futuros estudos, analisando a histofisiologia das células de Leydig, serão necessários para confirmar esta hipótese.

Após a análise da área tubular total, área da luz tubular e área do epitélio seminífero, verificou-se uma redução significante nesses parâmetros nos animais tratados com fluoxetina. Esse resultado se deve às várias alterações morfológicas que ocorreram na histoarquitetura tubular citadas anteriormente, principalmente à

intensa descamação de células germinativas na luz tubular. Da Silva Junior et al (2008) relataram redução do diâmetro e do volume dos túbulos seminíferos de ratos tratados com 5, 10 e 20mg/Kg de fluoxetina.

Os cortes transversais dos túbulos seminíferos foram classificados de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero em que se encontravam, a fim de verificar alguma relação estágio-dependente na ação da fluoxetina sobre o epitélio germinativo. Para isso, os estágios foram divididos em 4 grupos: I-VI, VII-VIII, IX-X e XI-XIV. Nossos resultados demonstraram uma redução na frequência de túbulos nos estágios I-VI e VII-VIII, nos animais tratados com fluoxetina; no entanto, somente a frequência de túbulos nos estágios VII-VIII apresentou diferença significante quando comparada aos animais controle. Segundo Hess et al (1988), as mudanças na frequência de túbulos em determinado estágio, interferem na frequência dos outros estágios. Portanto, o aumento significante na frequência de túbulos nos estágios XI-XIV pode ser consequência da redução significante na frequência de túbulos nos estágios VII-VIII. Considerando que os estágios VII-VIII são estágios cujas células expressam receptores de andrógenos (estágios andrógeno-dependentes), é provável que tais estágios tenham sido afetados devido à significante redução dos níveis séricos de testosterona nos animais tratados com fluoxetina.

Neste estudo, portanto, pudemos verificar que o tratamento com fluoxetina causou várias alterações, morfológicas e morfométricas, nos túbulos seminíferos de ratos adultos. As seguintes hipóteses são sugeridas: a) o tratamento com fluoxetina afetou as células germinativas do epitélio seminífero, causando dano secundário às células de Sertoli; ou b) o tratamento com fluoxetina pode ter afetado diretamente as células de Sertoli e, conseqüentemente, causado a perda de células germinativas, uma vez que as células de Sertoli são essenciais para a manutenção estrutural e

funcional da espermatogênese. Sabendo-se que a testosterona é essencial para a manutenção tanto das células germinativas quanto das células de Sertoli, é provável que as alterações observadas neste estudo tenham sido causadas pela interferência da fluoxetina no controle androgênico da espermatogênese.

6. CONCLUSÕES

1- O tratamento com o antidepressivo cloridrato de fluoxetina causou redução do peso corpóreo dos animais, bem como alterações significantes nos túbulos seminíferos e nos níveis séricos de testosterona;

2- As alterações estruturais dos túbulos seminíferos, incluindo a morte das células germinativas, associadas à redução na frequência de túbulos em estágios VII-VIII (andrógeno-dependentes), podem ter sido decorrentes da redução nos níveis séricos de testosterona nos ratos tratados com fluoxetina;

3- O tratamento com fluoxetina também causou morte das células de Sertoli e, consequentemente, redução significante no número destas células por túbulo seminífero. Tais alterações podem estar direta ou indiretamente relacionadas à redução nos níveis séricos de testosterona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, M. H. et al. Spermatogenesis and sertolli cell activity in mice lacking sertolli cell receptors for follicle stimulating hormone and androgen. **Endocrinology**., v 149(7), p. 3279-3285, 2008.

AUMULLER, G.; SCHULZE, C.; VIEBAHN, C. Intermediate filaments in Sertoli cells. **Microsc Res Tech**., v 20, p. 50-72, 1992.

ANTHONY, C. T.; SKINNER, M. K. Cytochemical and Biochemical Characterization of testicular peritubular myoid cells. **Byology of Reproduction**., v 40, p. 811-823, 1989.

BATAINEH, H. N.; DARADKA, T. Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adult male rats. **Neuro Endocrinol Lett**., v 28(3), p. 321-325, 2007.

BELTRAME, F. L. et al. Vitamin B12 supplement exerts a beneficial effect on the seminiferous epithelium of Cimetidine-treated rats. **Cells Tissues Organs**., v 193(3), p. 184-194, 2011.

BENBRAHIM-TALLAA, L. et al. Alterations of sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. **Journal of Endocrinology**., v 196, p. 21-31, 2008.

BITRAN, D.; HULL, E. M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neurosci Biobehav Rev**., v 11, p. 365-389, 1987.

BRILHANTE, O. et al. Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**., v 10, p. 79-94, 2012.

BUFFUM, J. Pharmacosexology: the effects of drugs on sexual function a review. **J Psychoactive Drugs**., v 14, p. 5-44, 1983.

BUFFUM, J. Pharmacosexology update: prescription drugs and sexual function. **J Psychoactive Drugs**., v 18(2), p. 97-106,1986.

CANEGUIM, B. H. et al. Structural alterations in the seminiferous tubules of rats treated with immunosuppressor tacrolimus. **Reproductive Biology and**

Endocrinology., v 7, p. 19-27, 2009.

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

CLAYTON, A. et al. Changes in sexual functioning associated with Duloxetine, Escitalopram, and Placebo in the treatment of patients with major depressive disorder. **J Sex Med**., v 4, p. 917-929, 2007.

CRENSHAW, T. L.; GOLDBERG, J. P. **Sexual pharmacology: drugs that affect sexual function**. New York, NY, US: W W Norton & Co. 1996. xxi 596 pp

CSOKA, A.; BAHRICK, A.; MEHTONEN, O. P. Persistent sexual dysfunction after discontinuation of selective serotonin reuptake-inhibitors. **J Sex Med**., v 5, p. 227-233, 2008.

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

DAVID, D. J. et al. Behavioral effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression are mediated by both neurogenesis-dependent and independent mechanisms. **Neuron**., v 62(4), p. 479-493, 2009.

DA SILVA JUNIOR, V. A. et al. Neonatal administration of Fluoxetine decreased final Sertoli cell number in Wistar rats. **Int J Morphol**., v 26(1), p. 51-62, 2008.

DAVIS, M.; CASSELLA, J. V.; KEHNE, J. H. Serotonergic modulation of sensorimotor reactivity and conditioned fear as measured with the acoustic startle reflex. In **5-HT Agonists as Psychoactive Drugs**., p. 163-184, 1988. NPP Books, Ann Arbor, MI.

DE KRETSER, D. M.; KERR, J. B. The cytology of the testis. In: KNOBIL E, NEILL JD. **The physiol of reproduct**. vol.1. Nova York: Raven Press: 1988, p. 1177-1290.

DE VANE, C. L. Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitors. **J**

Clin Psychiatry., v 53, p. 13-20, 1992.

EINARSON, A.; KOREN, G. New antidepressants in pregnancy. **Can Fam Physician**., v 50, p. 227-229, 2004.

EWING, L. L.; KEENEY, D. S. Leydig cells: structure and function. In Desjardins C, Ewing LL: **Cell and molecular biology of the testis** 1993. Nova Yorque, Oxforf University Press.

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

FAWCETT, D. W. Ultrastructure and function of the Sertoli Cell. In: **Handbook of Physiology** (DW Hamilton and RO Greep). Male Reproductive System. American Physiology Society, Wash., D.C., v 5, p. 21-55, 1975.

FROHLICH, P. F.; MESTON, C. M. Fluoxetine-induced changes in tactile sensation and sexual functioning among clinically depressed women. **J Sex Marital Ther**., v 31, p. 113-128, 2005.

FULLER, R. W.; WONG, D. T.; ROBERTSON, D. W. Fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake. **Med Res Rev**., v 11, p. 17-34, 1991.

GEYER, M. A. et al. The effects of lysergic acid diethylamide and mescaline-derived hallucinogens on sensory-integrative function: Tactile startle. **J Pharmacol Exp Ther**., v 207, p. 837-847, 1978.

GIULIANO, F.; CLEMENT, P. Physiology of ejaculation: emphasis on serotonergic control. **Eur Urol**., v 48, p. 408-417, 2005.

GIULIANO, F.; HELLSTROM, W. J. G. The pharmacological treatment of premature ejaculation. **BJU International**., v 102, p. 668-675, 2008.

GONZALES, R. E. et al. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on gonadal function and histology. **Alcohol**., v 11, p. 355-360, 1994.

GOUVÊA, T. S. et al. Maternal exposure to the antidepressant Fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. **Pharmacol Biochem Behav**., v 90, p. 416-419, 2008.

HADLEY, M. A. et al. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation and germ cell development in vitro. **J Cell Biol**., v 101(4), p. 1511-1522, 1985.

HALFORD, J. C. et al. Serotonin (5-Ht) drugs: effect on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Curr Drug Targets**., v 6, p. 201-213, 2005.

HALL, P. F. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In Knobil E, Neill JD. **The physiology of reproduction**., v 2, 1994. Nova Yorque, Raven Press.

HEDGER, M. P. et al. Acute and short-term action of serotonin administration on the pituitary-testicular axis in the adult rat. **Reprod Fertil Dev**., v 7, p. 1101-1109, 1995.

HENDRICK, V. et al. Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. **Biol Psychiatry**., v 50, p. 775-782, 2001.

HESS, R. A. et al. Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat II. Quantitative and qualitative histopathology of the testis. **J Androl**., v 9, p. 327-342, 1988.

HINES, R. N. et al. Toxicology Program-Center for The Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR). **Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of fluoxetine**. NIH Publication No.05-4471.2004:1-211. Disponível em: <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/fluoxetine/fluoxetine_monograph.pdf>.

HUANG, H. F. S.; HEMBREE, W. C. Spermatogenic response to vitamin A in vitamin A deficient rats. **Biol of Reproduct**., v 21, p. 891-904, 1979.

JOHNSTON, H. et al. Regulation of Sertoli Cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. **Endocrinology**., v 145, p. 318-329, 2004.

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

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

KEENEY, D. S. et al. Reversal of long-term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. **J Endocrinol**., v 127, p. 47, 1990.

KING, K. et al. Antibiotics: effects on cryopreserved-thawed human sperm motility in vitro. **Fertil Steril**., v 67(6), p. 1146-1151, 1997.

KORMANO, M.; HOVATTA, O. Contractility and histochemistry of the myoid cell layer of the rat seminiferous tubules during postnatal development. **Z Anat Entwickl**., v 137(3), p. 239-248, 1972.

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

LEESON, T. S.; COOKSON, F. B. The mammalian testicular capsule and its muscle elements**. J Morph**., v 144(2), p. 237-354, 1974.

LI, Z. et al. Meta-analysis pharmacologic treatment of obesity. **Ann Intern Med**., v 142, p. 532-546, 2005.

LI, M.; CHEUNG, B. M. Y. Pharmacotherapy for obesity. **British Journal of Clinical Pharmacology**., v 68(6), p. 804-810, 2009.

MASCHIO, L. R. et al. Short-term antiandrogen flutamide treatment causes structural alterations in somatic cells associated with premature detachment of spermatids in the testis of pubertal and adult guinea pigs. **Reprod Dom Anim**., v 45, p. 516-524, 2010.

MASUDA, H. et al: Ultrastructural study on cytotoxic effects of cyclosporine A in spermiogenesis in rats. **Med Electron Microse**., v 36, p. 183-191, 2003.

MEHLER-WEX, C.; KOLCH, M. Depression in children and adolescents. **Dtsch Arztebl Int**., v 105(9), p. 149-155, 2008.

MEISTRICH, M. L. Critical Components Of Testicular Function And Sensitivity To Disruption. **Biol Of Reproduct**., v 34, p. 17-28, 1986.

MELLOW, A. M.; AULAKH, C. S.; MURPHY, D. l. Neuroendocrine Effects Of Serotonergic Agents: Applications To The Study Of Central Serotonin Function In Humans. In **5-HT Agonists As Psychoactive Drugs**. 1988, p. 259-282. NPP Books, Ann Arbor, MI.

MIRAGLIA, S. M.; HAYASHI, H. Histomorphometry of Immature Rat Testis After Heating. **J Morphol**., v 217, p. 65-74, 1993.

MONOSKI, M.; NUDELL, D. M.; LIPSHULTZ, LI. Effects Of Medical Therapy, Alcohol, And Smoking On Male Fertility. **Contemporary Urology**., p. 57-63, June 2002.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; MACEDO SOARES, M. B. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev Bras Psiquiatr**., v 21, p. 24-40, 1999.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testes. **J Cell Biol**., v 84, p. 340-354, 1980.

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

NIEDERBERGER, C. S.; LAMB, D. J. Spermatogenesis in the adult. In: LIPSHULTZ, L. I.; HOWARDS, S. S, editores. **Infertility in the male**. Mosby. St Louis; 3ªed; p. 106-116, 1997.

ORTH, J.; CHRISTENSEN, A. K. Localization of ^{125}I-labeled FSH in the testes of hypophysectomized rats by autoradiography at the light and electron microscope levels. **Endocrinol**., v 101, p. 262-278, 1978.

OSHIO, S. et al. Mecobalamin promotes mouse sperm maturation. **Androl**., v 21, p.

167-173, 1989.

PACHER, P. et al. Speculations on difference between tricyclic and selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants on their cardiac effects. Is there any? **Curr Med Chem**., v 6, p. 469-480, 1999.

PACHER, P. et al. Serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, dilates isolated skeletal muscle arterioles. Possible role of altered Ca^{+2} sensitivity. **Br J Pharmacol**., v 127, p. 740-746, 1999.

PACHER, P.; UNGVARI, Z. Selective serotonin-reuptake inhibitor antidepressants increase the risk of falls and hip fractures in elderly people by inhibiting cardiovascular ion channels. **Med Hypotheses**., v 57, p. 469-471, 2001.

PALAMARA, K. L. et al. Obesity: new perspectives and pharmacotherapies. **Cardiol Rev**., v 14, p. 238-258, 2006.

PAPADOPOULOS, V. et al. The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. **J Biol Chem**., v 265, p. 3772, 1990.

PASQUALOTTO, F. F. et al. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. **Rev Hosp Clín Fac Med S. Paulo**., v 59(6), p. 375-382, 2004.

PHILIPP, M. et al. Comparison of moclobemide with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on sexual function in depressed adults. **European Neuropsychopharmacology**., v 10, p. 305-314, 2000.

POHLAND, R. C. et al. Placental transfer and fetal distribution of Fluoxetine in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**., v 98, p. 198-205, 1989.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6ªed. Rio de janeiro: Elsevier; 2007. Capítulo 39, O Sistema Nervoso; p. 557-574.

RUSSELL, L. D. et al. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.** 1ªed. Cache River Press, 1990. cap.1.

RUSSELL, L. D.; FRANK, B. Characterization of rat spermatocytes after plastic embedding. **Arch Androl**., v 1, p. 5, 1978.

SANBORN, B. M. et al. Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cells. **Steroids**., v 29, p. 493-502, 1977.

SASSO-CERRI, E. Morphological alterations and intratubular lipid inclusions as indicative of spermatogenic damage in cimetidine-treated rats. **Arch Androl**., v 46(1), p. 5-13, 2001.

SASSO-CERR, E.; MIRAGLIA, S. M. *In situ* demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. **Histol Histopathol**., v 17(2), p. 411-417, 2002.

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 Biology and Endocrinology**., v 6, p. 18, 2008.

SCHULTZ, M. M. et al. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. **Aquatic toxicology**., v 104, p. 38-47, 2011.

SOFIKITIS, N. et al. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**., v 109, p. 323-330, 2008.

SOMMI, R. W.; CRISMON, M. l.; BOWDEN, C. L. Fluoxetine: A serotonin-specific, second-generation antidepressant. **Pharmacotherapy**., v 7, p. 1-15, 1987.

STUMPP, T. et al. Apoptosis and testicular alterations in albino rats treated with etoposide during the prepubertal phase. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**., v 279(1), p. 611-622, 2004.

STUMPP, T.; FREYMULLER, E.; MIRAGLIA, S. M. Sertoli cell function in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. **Histochem Cell Biol**., v 126, p. 353-361, 2006.

THOMPSON, J. N.; HOWELL, J. McC.; PITT, G. A. J. Vitamin A and reproduction in

rats. **Proc Roy Soc (B)**., v 159, p. 510-535, 1964.

THOMPSON, S. T. Prevention of male infertility: an update. **Phenothiazines**., v 21(3), p. 365-376, 1994.

TINDALL, D. J.; MILLER, D. A.; MEANS, A. R. Characterization of androgen receptors in Sertoli cell enriched testis. **Endocrinol**., v 101, p. 13-23, 1977.

TUREK, P. J.; LOWTHER, D. N.; CARROL, P. R. Fertility issues and their management in man with testis cancer. **Urol Clin North Am**., v 25, p. 5217-5231, 1998.

UNGVARI, Z. et al. Fluoxetine dilates isolated small cerebral arteries of rats and attenuates constrictions to serotonin, norepinephrine, and a voltage-dependent Ca^{+2} channel opener. **Stroke**., v 30, p. 949-954,1999.

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

VORNBERGER, W. et al. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. **Endocrinology**., v 134(5), p. 2307-2316, 1994.

WALDINGER, M. D. et al. Relevance of methodological design for the interpretation of efficacy of drug treatment of premature ejaculation: a systematic review and meta-analysis. **Int J Impot Res**., v 16, p. 369-381, 2004.

WONG, D. T. et al. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140,3-(*p*-Trifluoromethylpehnoxy)-*N*-methyl-3-phenylpropylamine. **Life Sci**., v 15, p. 471-479, 1974.

WONG, D. T. et al. A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synaptosomes of rat brain: 3-(*p*-trifluoromethylpehnoxy)-*N*-methyl-3-phenylpropylamine. **J Pharmacol Exp Ther**., v 193, p. 804-811, 1975.

YELLS, D.P. et al. Fluoxetine-induced inhibition of male rat copulatory behavior:

modification by lesions of the nucleus paragigantocellularis. **Pharmacol Biochem Behav**., v 49, p. 121-127, 1994.

YOU, L.; SAR, M. Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. **Endocrine**., v 9, p. 253-261, 1998.

DADOS FINAIS

Araraquara, 12 de dezembro de 2013

"De Acordo"

Aluna: Marina Luiza Câmara

Orientadora: Profa. Dra. Estela Sasso Cerri