

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

LUIZ ANDRÉ RODRIGUES DE LIMA

**EFEITOS DA OLANZAPINA VIA LEITE MATERNO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE RATOS WISTAR PRÉ-PÚBERES
E SUA REPERCUSSÃO SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES E
ENDÓCRINOS EM ADULTOS**

RECIFE

2017

LUIZ ANDRÉ RODRIGUES DE LIMA

EFEITOS DA OLANZAPINA VIA LEITE MATERNO SOBRE O DESENVOLVIMENTO
TESTICULAR DE RATOS WISTAR PRÉ-PÚBERES E SUA REPERCUSSÃO SOBRE
PARÂMETROS TESTICULARES E ENDÓCRINOS EM ADULTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Área de Concentração em Morfofisiologia
Animal, como requisito para obtenção do título de
Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

RECIFE

2017

Ficha catalográfica

L732e Lima, Luiz André Rodrigues de
 Efeitos da olanzapina via leite materno sobre o desenvolvimento
 Testicular de ratos Wistar pré-púberes e sua repercussão sobre
 Parâmetros testiculares e endócrinos em adultos/
 Luiz André Rodrigues de Lima. -- 2017.
 101 f.: il.

 Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Junior.
 Tese (Doutorado em Biociência Animal) –
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
 de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2017.
 Referências.

 1. Olanzapina 2. Espermatogênese 3. Rato
 4. Testosterona 5. Prolactina 6. Antipsicótico I. Silva Junior, Valdemiro
 Amaro da, orientador II. Título

CDD 636.089

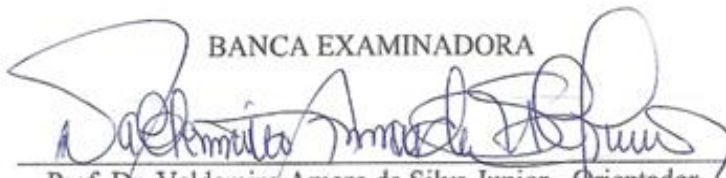
LUIZ ANDRÉ RODRIGUES DE LIMA

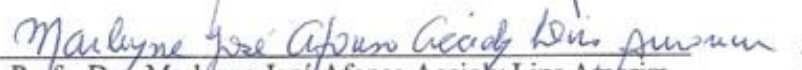
Efeitos da olanzapina via leite materno sobre o desenvolvimento testicular de ratos Wistar pré-púberes e sua repercussão sobre parâmetros testiculares e endócrinos em adultos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Área de Concentração em Morfofisiologia Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 20/02/2017.

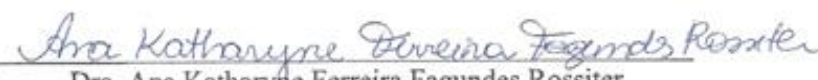
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior - Orientador
Universidade Federal Rural de Pernambuco


Profa. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
Universidade Federal Rural de Pernambuco


Prof. Dr. Bruno Mendes Tenorio
Universidade Federal da Paraíba


Profa. Dra. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenorio
Universidade Federal de Pernambuco


Dra. Ana Katharyne Ferreira Fagundes Rossiter
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico esta conquista a Deus.

“A vitória pertence aos mais perseverantes.”

Napoleão Bonaparte

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser supremo, por ter me iluminado, por estar continuamente me guiando e me dando forças em toda e qualquer caminhada.

Aos meus pais Luiz Joel e Iracilda Rodrigues por me ensinarem o ofício de viver.

A minha família pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao meu orientador Professor Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior pela oportunidade, pelos conhecimentos ensinados, pela atenção, dedicação e disponibilidade e principalmente pela confiança que em mim foi depositada.

As amigas Simone Macêdo, Sandra Torres e Fabiana Félix pela ajuda e dedicação em todas as fases desta pesquisa, e principalmente pela amizade construída. Serei eternamente grato.

Aos integrantes do Laboratório de Histopatologia, Alluanan Silva, Jéssica Santana, Ana Katharyne, Giselle Wolley, Suellen Silva e Vinicius Oliveira pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal por terem contribuído para minha formação.

Aos animais que tiveram suas vidas sacrificadas nos experimentos, meu respeito.

A todos os amigos que presentes ou distantes contribuíram com seu apoio.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela possibilidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pela concessão de bolsa de Doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

A olanzapina (OLNZ) é um antipsicótico atípico que se liga a receptores de dopamina D₂ e serotonina 5HT₂ amplamente prescrito para o tratamento de esquizofrenia e psicoses pós-parto. Tem sido relatada sua transferência através do leite materno para recém-nascidos. Consequentemente neonatos são susceptíveis aos seus efeitos secundários adversos. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da olanzapina via leite materno sobre o desenvolvimento testicular de ratos Wistar pré-púberes e sua repercussão sobre parâmetros morfométricos testiculares e endócrinos adultos. A histopatologia testicular, a análise morfométrica dos testículos, o peso de órgãos androgênio-dependentes e os níveis de prolactina e testosterona foram os parâmetros estudados. Vinte e quatro ratas prenhes (idade 3 meses) foram utilizadas neste estudo. Elas foram mantidas em quatro grupos (grupo I ao IV). Após o nascimento, quarenta e oito ratos neonatos foram distribuídos aleatoriamente para composição dos seguintes grupos: I) grupo controle – solução salina NaCl 0,9% (n = 12); II) grupo tratados com 2,5 mg/kg de OLNZ (n = 12); III) grupo tratado com 5 mg/kg de OLNZ (n = 12) e IV) grupo tratado com 10 mg/kg de OLNZ (n = 12). Aos 21º dia pós-parto, os animais foram separados das respectivas mães, durante os quais o tratamento com o antipsicótico foi interrompido. Os filhotes de cada grupo foram aleatoriamente selecionados e processados para o estágio 1 do estudo: verificar o efeito da exposição antipsicótica durante a lactação sobre o desenvolvimento testicular de ratos púberes aos 21 dias de idade. A metade restante dos filhotes de cada grupo foi mantida até a idade adulta da maturidade sexual (90 dias) para o estágio 2 do estudo. No estágio 1 deste estudos, os achados histopatológicos e alterações nos parâmetros morfométricos testiculares de ratos pré-púberes, com consequente hipogonadismo, podem estar relacionados à hiperprolactinemia induzida pela OLNZ com repercussões endócrinas negativas sobre a testosterona, o que justifica a atrofia resultante do uso dessa droga durante o período crítico de desenvolvimento testicular. No estágio 2 deste estudo (90 dias), a análise histopatológica e histomorfométrica da espermatogênese indicou degeneração testicular. O hipogonadismo assim observado pode ser mediado pela hiperprolactinemia induzida por OLNZ, que inibe ainda mais a secreção de testosterona. Tal impacto adverso foi persistente até a idade adulta com doses mais elevadas do fármaco, como evidenciado pela análise do peso testicular, histologia e perfis hormonais de ratos pós-púberes expostos lactacionalmente como recém-nascidos e pubescentes. O presente estudo revelou que a exposição lactacional à olanzapina interferiu com a hipófise-gônada influenciando de forma proeminente os níveis do hormônio hipofisário prolactina que afeta adversamente os níveis de testosterona e a histopatologia testicular.

Palavras chave: Olanzapina. Espermatogênese. Ratos. Testosterona. Prolactina.

ABSTRACT

Olanzapine (OLNZ) is an atypical antipsychotic that binds to dopamine (D₂) and serotonin (5HT₂) receptors, widely prescribed for the treatment of schizophrenia and postpartum psychosis. Its transfer through breast milk to newborns has been reported. Consequently, neonates are susceptible to their adverse side effects. In the present study, aims to evaluate the effects of OLNZ administered through breast milk on the testicular development of newborn rats exposed to lactation. The testicular histopathology, the morphometric analysis of the testes, androgen-dependent organs weights and the levels of prolactin and testosterone were the several end points studied. Twenty-four pregnant rats (age 3–4 months) and their pups were used in this study. After birth, forty-eight pup rats were randomly assigned to the following groups: I) control group – saline solution NaCl 0.9% (n = 12), II) treated group with 2.5 mg/kg OLNZ (n = 12), III) treated group with 5 mg/kg (n = 12) and IV) treated group with 10 mg/kg of OLNZ (n = 6). Each mother along with their pups was housed singly in PVC cages. On the 21st day postpartum, the animals were separated from their respective mothers, during which treatment with the antipsychotic was stopped. The pubertal rats of each group were randomly selected and processed for stage 1 of the study: to verify the effect of antipsychotic exposure during lactation on the testicular development of pubertal rats at 21 days of age. The remaining half of the male offspring of each group were maintained until adulthood of sexual maturity (90 days) for stage 2 of the study. At stage 1 of this study, Histopathological findings, and changes in testicular morphometric parameters of pubescent rats, with consequent hypogonadism, may be related to OLNZ-induced hyperprolactinemia with negative endocrine repercussions on testosterone, which justifies the atrophy resulting from the use of OLNZ during the critical period of testicular development. At stage 2 of the study (90 days), the histopathologic and histomorphometric analysis of spermatogenesis indicated testicular degeneration. The hypogonadism thus observed might be mediated by OLNZ-induced hyperprolactinemia, which further inhibited secretion of testosterone. Testicular degenerative processes associated with hormonal changes in adult rats have a significance for this irreversible event even after discontinuation of the antipsychotic after weaning. Thus, adverse impact was persistent until adulthood with higher doses of the drug as evidenced by the analysis of testicular weight, histology and hormonal profiles of post-pubertal rat lactationally exposed as neonates and pubescents. The present study thus revealed that the lactational exposure to OLNZ interfered with the pituitary– testicular axis by prominently influencing blood levels of pituitary hormone prolactin and adversely affecting testosterone levels and testicular histopathology.

Keywords: Olanzapine. Spermatogenesis. Rat. Testosterone. Prolactin.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Peso corporal e de órgãos andrógeno-dependentes (g) e índice gonadossomático - IGS (%) de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal avaliados aos 21 dias de idade.....	49
Tabela 2	Volume (µL) dos componentes testiculares de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliado aos 21 dias de idade.....	50
Tabela 3	Mediada de diâmetro tubular (µm), altura de epitélio seminífero (µm) e Comprimento total de túbulo seminífero (m) de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal avaliados aos 21 dias de idade.....	51
Tabela 4	Medida de diâmetro nuclear de célula de Leydig (µm), volume de célula de Leydig (µm ³) e população de células de Leydig (x10 ⁷)/ grama de testículo de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade.....	52

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Peso corporal e de órgãos sexuais (g) e índice gonadossomático - IGS (%) de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal avaliados aos 90 dias de idade.....	80
Tabela 2	Volume (µL) dos componentes testiculares de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliado aos 90 dias de idade.....	81
Tabela 3	Medida de diâmetro tubular (µm), altura de epitélio seminífero (µm), comprimento total de túbulo seminífero (m) e população de células de Sertoli (x10 ⁷) de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal avaliados aos 90 dias de idade.....	82

Tabela 4	Medida de diâmetro de núcleo de célula de Leydig (μm), volume de célula de Leydig (μm^3) e população de células de Leydig ($\times 10^7$)/ grama de testículo de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal avaliados aos 90 dias de idade.....	83
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) e prolactina (ng/mL) de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal avaliada aos 21 dias de idade..... 52
- Figura 2 Fotomicrografias de parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes dos grupos controle e tratados com 2,5 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal avaliadas aos 21 dias de idade..... 54
- Figura 3 Fotomicrografias de parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes dos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal avaliadas aos 21 dias de idade..... 55

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) e prolactina (ng/mL) de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliada aos 90 dias de idade... 84
- Figura 2 Fotomicrografia de parênquima testicular de ratos Wistar adultos dos grupos controle e tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 90 dias de idade.. 85
- Figura 3 Fotomicrografia de parênquima testicular de ratos Wistar adultos dos grupos tratados com 5 mg/kg e 10 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 90 dias de idade.. 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HPG	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada
LH	Hormônio luteinizante
<i>p</i>	Nível de significância estatístico
5HT ₂	5-Hidroxitriptamina 2
®	Marca registrada
OLNZ	Olanzapina
PRL	Prolactina
mg	Miligrama
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
P53	Proteína supressora de gene tumoral
TNFα	Fator de Necrose Tumoral
IGS	Índice Gonadossomático
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 ANTIPSICÓTICOS.....	17
2.2 OLANZAPINA E EFEITOS REPRODUTIVOS	19
2.3 TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE.....	23
3 OBJETIVOS	32
3. 1 OBJETIVO GERAL.....	32
3. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
REFERÊNCIAS	33
 CAPÍTULO 2.....	 40
EFEITOS DA OLANZAPINA VIA LEITE MATERNO SOBRE O DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE RATOS WISTAR PRÉ-PÚBERES E SUA REPERCUSSÃO SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES E ENDÓCRINOS.....	 40
RESUMO.....	40
ABSTRACT	41
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL	44
2.2 PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	44
2.3 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (%) E VOLUME DOS COMPONENTES DO TESTÍCULO	45
2.4 DIÂMETRO TUBULAR, ALTURA DE EPITÉLIO SEMINÍFERO E COMPRIMENTO TOTAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	46
2.5 MORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG	46
2.6 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA	47
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4 RESULTADOS	48
4.1 PESO CORPORAL, PESO DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO	48
4.2 HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR	49
4.3 HISTORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG.....	51
4.4 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA	52
4.5 HISTOPATOLOGIA TESTICULAR.....	53
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO.....	63

REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 3.....	71
AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA TESTICULAR E ENDÓCRINA DE RATOS WISTAR ADULTOS APÓS TRATAMENTO COM OLANZAPINA DURANTE PERÍODO LACTACIONAL	71
RESUMO.....	71
ABSTRACT	72
1 INTRODUÇÃO	73
2 MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL	74
2.2 PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	75
2.3 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (%) E VOLUME DOS COMPONENTES DO TESTÍCULO	76
2.4 DIÂMETRO TUBULAR, ALTURA DE EPITÉLIO SEMINÍFERO E COMPRIMENTO TOTAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	76
2.5 CONTAGEM DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DE SERTOLI POR SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS	77
2.6 MORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG	78
2.7 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA	78
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
4 RESULTADOS	79
4.1 PESO CORPORAL, PESO DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO	79
4.2 HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR	80
4.3 HISTOMORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG	82
4.4 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA	83
4.5 HISTOPATOLOGIA TESTICULAR	84
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXO I.....	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A função sexual em pacientes que sofrem de desordens mentais, como a esquizofrenia, tem recebido pouca atenção ou reconhecimento como um aspecto a ser cuidado (KELLY; CONLEY, 2004).

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica grave, multifatorial e complexa com prevalência ao longo da vida de aproximadamente 1% da população (BUGALHO et al., 2006; PERÄLÄ et al. 2007). Estudos têm sugerido que o funcionamento sexual é qualitativamente e quantitativamente diferente em pessoas com esquizofrenia quando comparado com outras sem a doença. Muitos indivíduos não relatam espontaneamente suas disfunções sexuais aos médicos, pois a natureza do comportamento sexual geralmente é tida como particular (KELLY; CONLEY, 2004). No entanto, esses distúrbios são mais frequentemente reportados quando os pacientes em tratamento fazem o uso de drogas antipsicóticas convencionais. É possível que os antipsicóticos induzam disfunções sexuais, porém seu uso pode melhorar o desempenho sexual devido à redução dos sintomas positivos e negativos em casos de esquizofrenia (COSTA et al., 2007).

Alta incidência dessas disfunções sexuais mostra-se presente em ambos os tratamentos com psicóticos típicos e atípicos. Entretanto, os antipsicóticos atípicos, conhecidos como de segunda geração, apresentam menos alterações clínicas como melhor eficácia contra os sintomas psicóticos da esquizofrenia (COSTA et al., 2007).

A dopamina é um importante regulador das funções orgânicas centrais e periféricas (MISSALE et al., 1998). Além disso, a presença de receptores dopaminérgicos em testículos de ratos pode sugerir uma interação desconhecida entre o sistema nervoso e o reprodutivo (HYUN et al., 2002; OTTH et al., 2007).

A olanzapina é um antipsicótico atípico que atua através do antagonismo de ambos os receptores de dopamina D₂ e serotonina 5HT₂ podendo causar disfunções sexuais por causar elevação dos níveis de prolactina (PRL) (OWEN et al., 1984; KRIECKHAUS et al., 1992; ITAKOWA et al., 1993). Efeitos não específicos, como sedação e ganho de peso podem levar a diminuição do interesse sexual podem ser observados durante tratamento com antipsicóticos (KELLY; CONLEY, 2004).

Ela é amplamente prescrita para o tratamento de psicoses pós-parto, porém é transferida através do leite para recém-nascidos. Consequentemente neonatos são susceptíveis aos seus efeitos secundários adversos (GOLDSTEIN et al., 2000; GARDINER et al., 2003; ILETT et al., 2004).

Em adição, elevação dos níveis de prolactina causado por antipsicóticos também pode contribuir para a disfunção sexual (WONG et al., 1993). A prolactina tem sido apontada como responsável pela indução e proliferação das células de Leydig em ratos. A hiperprolactinemia em animais adultos possui um efeito negativo sobre a produção de testosterona por ação da secreção reduzida de LH. Ela pode causar hipogonadismo e diminuição dos níveis de testosterona (WILLIAMS et al., 2007).

São limitados ainda, os estudos sobre a segurança dos antipsicóticos na gestação e amamentação (BABU; DESAI; CHANDRA, 2015). Neste sentido, entender os riscos da exposição lactacional aos antipsicóticos pode ser benéfico na escolha terapêutica das psicoses. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de diferentes doses de olanzapina via leite materno sobre os parâmetros testiculares e endócrinos durante o período lactacional de desenvolvimento testicular em ratos pré-púberes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANTIPSICÓTICOS

Os neurolépticos típicos foram os primeiros fármacos lançados para controle das psicoses. Eles bloqueiam receptores dopaminérgicos D_2 em todas as quatro vias dopaminérgicas. A via mesolímbica é relacionada com os sinais e sintomas positivos das psicoses (delírios, alucinações, alterações de pensamentos, hostilidade e desconfiança). O bloqueio da via mesocortical pode levar a piora dos sintomas negativos da esquizofrenia (afeto diminuído, isolamento emocional e social, pobreza de linguagem). A via tuberoinfundibular bloqueada leva à hiperprolactinemia; e bloqueio da via nigroestriatal provoca discinesia aguda e tardia e síndrome parkinsoniana (STHAL, 2014).

Esses antipsicóticos típicos também são bloqueadores de receptores muscarínicos do sistema colinérgico, que podem ocasionar: boca seca, visão turva, constipação intestinal e déficit cognitivo (ALMEIDA, 2006).

Os antipsicóticos atípicos, também conhecidos como de segunda geração, apresentam melhores propriedades clínicas contra os sintomas psicóticos da esquizofrenia, melhoram o déficit neurocognitivo e têm propensão mais baixa para causar sintomas extrapiramidais (SEP) como parquisonismo, distonia aguda e discinesia tardia quando comparados aos antipsicóticos típicos (KAPUR; REMINGTON, 2001; ALMEIDA, 2006; GINOVART; KAPUR, 2012).

Costa et al. (2007) mostraram que os antipsicóticos atípicos têm uma baixa afinidade por receptores dopaminérgicos D_2 , mas apresentam boa afinidade por receptores serotoninérgicos $5HT_{2A}$.

Os antipsicóticos atípicos são farmacologicamente antagonistas de serotonina e dopamina (ASD). Atualmente, em todo o mundo, existem cinco antipsicóticos considerados atípicos utilizados na prática psiquiátrica, que são: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina e ziprasidona. Estes, classificados de acordo com critérios clínicos e farmacológicos: (1) os antipsicóticos atípicos têm propriedades farmacológicas antagonistas de $5HT_{2A}$ e D_2 , enquanto os convencionais são apenas antagonistas a D_2 ; (2) os atípicos causam menos SEP do que os convencionais; e (3) ambos melhoram igualmente os sintomas positivos (STAHL, 2014).

Para Almeida (2006), os receptores adrenérgicos são alvo de diversos estudos, pois participam da regulação de muitos processos fisiológicos como manutenção da pressão arterial sistêmica, proliferação e crescimento celular, termogênese e metabolismo.

A serotonina exerce grande influência na dopamina, pois inibe a sua liberação nos axônios terminais e nos corpos celulares, porém em grau diferente, em cada uma das quatro vias dopaminérgicas: nigroestriatal, mesocortical, tuberoinfundibular e mesolímbica (ALMEIDA, 2006; STAHL, 2014).

De modo geral, pessoas que fazem uso de psicotrópicos o nível de prolactina pode estar elevado. A hiperprolactinemia provocada pelo uso de fármacos pode resultar em galactorreia e disfunção sexual ocorrendo em 35% dos casos (NAHAS et al., 2006).

Os efeitos da redução no sistema dopaminérgico são demência e depressão. E quando ativado conduz à psicose, à ansiedade e à agressividade (GIROS et al., 1996; PACKARD; KNOWLTON, 2002; LOURENCO et al., 2005)

A importância funcional dos receptores dopaminérgicos D_2 é demonstrada através da sua afinidade pelos antipsicóticos típicos e atípicos (STRANGE, 2001).

A presença de receptores dopaminérgicos em testículos de ratos e células germinativas pode sugerir uma interação desconhecida entre os sistemas nervoso e reprodutivo (HYUN et al., 2002; OTTH et al., 2007).

A dopamina é um importante regulador das funções orgânicas centrais e periféricas. A localização de receptores dopaminérgicos periféricos tem efeitos fisiológicos significantes (MISSALE et al. 1998).

O antagonismo por receptores $5HT_{2A}$ é capaz de reverter o antagonicamente os receptores D_2 na via tuberoinfundibular. Existe uma relação de antagonismo e reciprocidade no controle da secreção de prolactina nas células lactotróficas da pituitária; ou seja, a dopamina inibe e a liberação de prolactina pela estimulação dos receptores D_2 , enquanto a serotonina promove liberação de prolactina pela estimulação dos receptores $5HT_{2A}$ (STAHL, 2014).

Existe uma inibição simultânea dos receptores $5HT_{2A}$; logo a serotonina não consegue estimular por muito tempo a liberação de prolactina. Isso tende a diminuir a hiperprolactinemia por bloqueio do receptor D_2 . Embora esta seja uma teoria farmacológica interessante, na prática nem todo antagonista de serotonina e dopamina reduz a secreção de prolactina na mesma extensão e alguns não reduzem nada (STAHL, 2014).

Assim, apesar de todas as propriedades adicionais favoráveis aos antipsicóticos atípicos que incluem a capacidade de melhorar os sintomas negativos e positivos em pacientes esquizofrênicos (mais do que fazem os antipsicóticos convencionais) de provocar elevação discreta nos níveis de prolactina; existem também muitos efeitos colaterais, que podem incluir ganho de peso, sedação, convulsões e agranulocitose (STAHL, 2014).

2.2 OLANZAPINA E EFEITOS REPRODUTIVOS

A olanzapina é um antipsicótico atípico que pertence à classe das tienobenzodiazepina. Quimicamente é o 2-metil-4-[4-metil-1-piperazinil]-10H-tieno-[2,3-B][1,5] benzodiazepina (SPROUSE et al., 1999) com fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4S$ e um peso molecular de 312,43 gramas (FROTA, 2001).

Em 1996, esse fármaco tornou-se disponível no mercado como antipsicótico e, em 2000, recebeu licenciamento na indicação de tratamento em curto prazo dos episódios maníacos do transtorno afetivo bipolar e em longo prazo da esquizofrenia, como o primeiro dos novos antipsicóticos atípicos a ter comprovada sua eficácia e segurança terapêutica, tornando-se líder em prescrição e vendas entre todos os antipsicóticos (típicos e atípicos) nos países desenvolvidos (FROTA, 2001).

Olanzapina se consagrou pela alta efetividade no tratamento de indivíduos com esquizofrenia, tanto nos sintomas positivos como nos negativos, quando comparado com antipsicóticos tradicionais (BEASLEY, TOLLEFSON; TRAN, 1996; CALLAGHAN, 1999). Ela provoca menor incidência de sintomas extrapiramidais e mínima perturbação na prolactina. Confirmando as pesquisas sobre ação dos antipsicóticos atípicos. Estas vantagens conduziram para um uso cada vez maior de olanzapina no tratamento da esquizofrenia (STEPHENSON; PILOWSKY, 1999; CONLEY; MELTZER, 2000).

Segundo Frota (2001), a olanzapina é intensamente metabolizada com apenas 7% excretada inalterada por via renal. E aproximadamente 57% da olanzapina é eliminada como metabólitos na urina. Apresenta indicação de dosagem única diária, com pico de concentração em torno de 6 a 7 horas, e com meia-vida variando de 21 a 54 horas.

Meltzer e McGurk (1999) afirmaram que seu bloqueio serotoninérgico $5HT_{2A}$ é cerca de oito vezes mais intenso que o bloqueio dopaminérgico D_2 , parâmetro importante para definir a grau de atipicidade de um antipsicótico.

Suas propriedades de bloqueio muscarínico e histamínico são superiores aos demais atípicos com exceção de clozapina, e exerce menos antagonismo em receptores α_2

adrenérgicos que esta. Também possui propriedades de agonismo nos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), bloqueando os efeitos da feniclidina, uma substância narcótica de abuso com ação de antagonismo nestes receptores e com efeitos clínicos semelhantes à sintomatologia positiva, negativa e cognitiva da esquizofrenia (FROTA, 2001).

Tohen et al. (2003) confirmam que este antipsicótico atípico é indicado para o tratamento agudo e de manutenção da esquizofrenia, reduzindo recaídas maníacas e depressivas e outras psicoses, em que os sintomas positivos e/ou sintomas negativos são proeminentes.

Estudos conduzidos por Beasley, Tollefson, Tran (1996) e Callaghan et al. (1999) confirmaram que a olanzapina reduz os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia e alivia também os sintomas afetivos secundários comumente associados com esquizofrenia e transtornos relacionados.

Os efeitos adversos mais comuns em curto prazo incluem ganho de peso, sonolência e/ou sedação, constipação diminuição da salivação (boca seca), acatisia, hipotensão ortostática, edema vascular periférico, aumento do apetite, aumento da prolactina, galactorreia e disfunção erétil (FROTA, 2001; ALMEIDA, 2006).

Frota (2001) acrescenta que, com o uso da droga, observa-se uma intolerância à glicose com indução de hiperglicemia, que nas formas mais graves costuma levar ao diabetes mellitus insulino-dependente. Este efeito foi significativamente maior com a olanzapina do que com a risperidona. Existe também alguma evidência de que diminuição do metabolismo e consumo energético basal que podem estar envolvidos neste fato.

Dentre outras reações adversas, a olanzapina pode provocar síndrome neuroléptica maligna, que se traduz, segundo Almeida (2006), por rigidez muscular severa, hipertermia, taquicardia, hipertensão arterial e alteração dos níveis de consciência. Segundo Frota (2001), pode haver discinesia tardia, distonia tardia e convulsão.

Estudos realizados pelo laboratório Eli Lilly & Company 2005, constataram que os parâmetros de reprodução foram influenciados em ratos que receberam 3 mg/kg (nove vezes a dose máxima humana), e ainda constatou que a sedação ocasionada pelo uso da olanzapina afetou o desempenho no acasalamento dos ratos machos, os ciclos de estro foram afetados com doses de 1,1 mg/kg (três vezes a dose máxima humana). Na ninhada de ratos que receberam olanzapina, foram observados atrasos no desenvolvimento fetal e diminuições transitórias nos níveis de atividade da prole.

Olanzapina causa elevações transitórias nos níveis plasmáticos de prolactina. (KELLY; CONLEY, 2004; WIECK; HADDAD, 2004). Quando comparado com antipsicóticos convencionais e com risperidona, essa droga mostra efeitos discretos na prolactina (BEASLEY; TOLLEFSON; TRAN, 1996). David et al. (2000) observaram em suas pesquisas o aumento de prolactina com uso de olanzapina, assim como também risperidona e haloperidol.

A prolactina é um hormônio proteico produzido na adenohipófise pelos lactotrófos que desempenha um importante papel na secreção do leite ou lactogênese (FREEMAN et al., 2000; GUYTON; HALL 2002;).

No hipotálamo ocorre a síntese de dopamina, que é um importante fator de inibição da prolactina (PIF), que atua através da ligação com receptores do tipo D₂ na membrana celular dos lactotrófos (LAMBERTS et al., 1990; NAHAS, 2006). Outros PIF são o GABA e o peptídeo associado à gonadotropina (GAP) (CASTRO E SILVA; SILVA, 2005). Quando a síntese de dopamina é bloqueada, e os neurônios do núcleo paraventricular são estimulados a produzir o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), ocorre um aumento do nível plasmático de prolactina.

Para Serri et al. (2003), a prevalência da hiperprolactinemia na população adulta está em torno de 1% a 10%. E pode ser de origem fisiológica, patológica, ou ainda produzida por fármacos, sendo esta última a etiologia mais comum (MAH et al., 2002; ZILBEBERG, 2005).

O nível de PRL circulante considerado necessário para manutenção da função reprodutiva em roedores varia de 0,003 a 0,015 ng/mL (SERRI et al., 2003; EGLI et al., 2010). Manifestações como hipogonadismo no homem devido à hiperprolactinemia, são: diminuição da libido, infertilidade, disfunção erétil, incapacidade de manter a ereção, oligoespermia e ginecomastia (SCHLECHTE, 2003).

Para Schlechte (2003), a galactorreia, manifestação mais característica dessa disfunção, ocorre entre 14 e 33% dos homens. Por sua vez, Petty (1999) observou que no homem a elevação de prolactina pode causar impotência, diminuição da libido e hipoespermato gênese.

Kingsbury, Castelo e Abulseoud (2002) observaram casos de galactorreia devido à hiperprolactinemia com olanzapina. Apesar disso, relatos sugerem que a olanzapina é um antipsicótico seguro e alternativo para tratamento para de casos com hiperprolactinemia induzida por outros antipsicóticos (JOHNSON et al., 2003).

Costa et al. (2007) relacionaram o uso de antipsicóticos atípicos com disfunção da ereção e diminuição da libido; ao passo que Frota (2001) relaciona a olanzapina à disfunção erétil.

O impacto da esquizofrenia e seu tratamento na sexualidade e assuntos reprodutivos recebem atenção inadequada em todo mundo (BOBES, et al., 2003; KELLY; CONLEY, 2004). A infertilidade e a disfunção sexual são as manifestações clínicas mais relevantes em ambos os sexos (BRONSTEIN, 2005).

A resposta sexual pode ser dividida em três fases, são elas: libido, excitação- ereção e orgasmo-ejaculação. Qualquer uma dessas fases pode sofrer alterações um quarto fator de disfunção, que seria a dor sexual, dispareunia e vaginismo (ALMEIDA 2006).

A libido é o primeiro estágio e está ligado ao desejo sexual, constituindo-se hipoteticamente em fenômeno mediado pelo “centro de recompensa” dopaminérgico mesolímbico. Esse local pode não apenas mediar o orgasmo, mas também a libido (STAHL, 2014).

Acredita-se que a prolactina tenha influência negativa no desejo sexual, fato interessante porque existe relação geralmente recíproca entre dopamina e prolactina. Como os antipsicóticos tendem a provocar aumento da prolactina, pressupõe-se que com o seu uso, o desejo sexual possa estar diminuído. Para Wong et al. (1993), a hiperprolactinemia causa hipogonadismo e diminuição dos níveis da testosterona tendo efeito direto na atividade sexual.

Segundo Molitch (2001) e Nahas et al. (2006), a prolactina é importante no processo de lactação e exerce influência na função reprodutiva.

Sedação e aumento de peso podem levar a diminuição do interesse sexual, fatos observados pelas pesquisas com o uso de antipsicóticos. Efeitos extrapiramidais e discinesia tardia também diminuem a função sexual (YASSA; LAL, 1985). A serotonina tem sido mostrada como facilitadora ou inibidora do comportamento sexual, dependendo do receptor estimulado (MESTON; GORZALKA, 1992).

O mecanismo da excitação é o segundo estágio que é caracterizado pela ereção e lubrificação nos homens. Geralmente esta associada à libido e também pode sofrer alterações de origem psíquica e/ou somática. Essa excitação prepara a genitália para a penetração e o intercurso sexual e envolve tanto a ação colinérgica quanto do óxido nítrico em sua farmacologia (ALMEIDA, 2006; STAHL, 2014).

Os impulsos parassimpáticos dilatam as artérias pudendas, permitindo assim que o sangue arterial seja armazenado sob alta pressão no tecido erétil do corpo cavernoso e do corpo esponjoso do pênis. Além disso, estímulos parassimpáticos estimulam as glândulas bulbouretrais a secretarem seu líquido lubrificativo (GUYTON; HALL, 2002).

As fibras serotoninérgicas espinhais descendentes exercem ações inibitórias sobre o orgasmo por meio dos receptores 5HT_{2A}. As fibras noradrenérgicas espinhais descendentes e a inervação sináptica noradrenérgica da genitália facilitam a ejaculação e o orgasmo (STAHL, 2014).

No SNC a serotonina age como neurotransmissor, mas na periferia, sua ação principal é vasoconstricção, devido a isto, pode estar relacionada com a função sexual. Aproximadamente 50% de pacientes relataram deficiência sexual durante tratamento com antipsicóticos convencional (KELLY; CONLEY, 2004).

Antagonismo colinérgico e bloqueio alfa-adrenérgico têm sido relacionados com distúrbios ejaculatórios e disfunções orgásmicas (POLLACK; ROSENBAUM 1992; TAMMINGA, 1997). Bloqueio dos canais de cálcio também pode contribuir para a deficiência orgânica sexual (POLLACK; ROSENBAUM 1992).

Meston e Gorzalka (1992) afirmam que 2 a 75% dos pacientes que utilizam drogas inibidoras seletas da recaptação de serotonina, mostram efeitos colaterais na função sexual (ALMEIDA, 2006). Estudos conduzidos por Bobes et al. (2003) demonstraram que homens que fizeram uso de antipsicóticos, a disfunção erétil foi a mais frequente alteração encontrada, além da diminuição da libido.

2.3 TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE

As gônadas masculinas localizam-se externamente à cavidade pélvica, no escroto ou bolsa escrotal, que as protege e as mantém sob temperatura ideal. O testículo é envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Esta túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, envia septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos, cada lóbulo apresenta cerca de quatro túbulos seminíferos, feixes vasculonervosos e células intersticiais ou de Leydig (NEVES, 2001). Este órgão apresenta-se de forma ovalada e possui funções endócrinas e exócrinas (SETCHELL, 1991). O tecido intersticial é um importante local de produção de andrógenos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Segundo Asatiani et al. (2002), ele apresenta além da

produção de andrógeno, a função de produção de gametas, sob a regulação do hormônio folículo estimulante e do hormônio luteinizante.

Cada testículo humano apresenta um peso médio de 20 gramas, comprimento de 4 cm e largura de 2 cm (SCHÜNKE, et al. 2007). O testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, também chamado de espaço intertubular, e o compartimento de túbulos seminíferos (RUSSELL et al. 1990). Com exceção das células germinativas que se originam do epiblasto, a grande maioria das células somáticas constituintes dos testículos são procedentes dos ductos mesonéfricos e do epitélio celomático (KARL; CAPEL, 1998; MERCHANT-LARIOS; MORENO-MENDOZA, 1998).

Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (SETCHELL, 1991; RUSSELL et al., 1990).

Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (FRANÇA; RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente neste compartimento (SILVA JUNIOR, 2000). O percentual ocupado por elas no testículo de animais sexualmente maduros no período reprodutivo pode variar de aproximadamente 1% em carneiros até 35% em capivaras (FRANÇA; RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

Segundo Otth et al. (2007), Guyton e Hall (2002), as gônadas masculinas são reguladas por hormônios gonadotrópicos e também estão sujeitas a regulação de fatores produzidos localmente, como neurotransmissores. A produção de andrógenos é importante para a diferenciação sexual, o desenvolvimento das características sexuais secundárias e comportamento sexual, e para a regulação da espermatogênese (GAO et al. 2005).

A testosterona é produzida nas células de Leydig (ZIRKIN, 1998; GUYTON; HALL, 2002; HAENDLER, 2005). Receptores para o LH (hormônio luteinizante) produzidos na adenohipófise são encontrados na membrana dessas células e estimulam a produção de testosterona (SHUPNIK; SCHREIHOFFER, 1997; ZIRKIN, 1998; GUYTON; HALL, 2002; WALKER; CHENG, 2005). Este hormônio esteroide é sintetizado principalmente por enzimas existentes nas mitocôndrias das células Leydig, cujo número e atividade dependem de estímulos hormonais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) a partir do colesterol (MOURA,

2003). Grande parte da testosterona produzida é convertida numa forma mais ativa do hormônio nos tecidos - alvo, a diidrotestosterona (HAENDLER, 2005).

A capacidade secretora de testosterona é correlacionada com o volume das células de Leydig e com o seu número por testículo e não com o número destas por grama de testículo (SILVA JUNIOR, 2000).

A concentração de testosterona plasmática diminui progressivamente para 0,2 ng/mL durante 8 a 24 dias de vida. De 30 a 55 dias, os níveis de testosterona estabilizam nos índices de ratos adultos, 1-2 ng/mL (WALKER; CHENG, 2005).

As concentrações intratesticulares de testosterona em ratos adultos são muito superior do que a encontrada em níveis séricos. Embora as vantagens de níveis elevados de testosterona no testículo não sejam bem entendidas, sugere-se que os maiores níveis testicular de testosterona são importantes porque a capacidade espermatogênica plena requer aproximadamente 70 ng/mL e a espermatogênese é bastante comprometida quando a concentração de testosterona está abaixo de 20 ng/mL (ZIRKIN, 1998).

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

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero ou germinativo e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mioides ou peritubulares e matriz extracelular. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológicas distintas: as células germinativas originárias do epiblasto e as células de Sertoli provenientes do epitélio celomático (KARL; CAPEL, 1998).

Em geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180 µm a 300 µm (ROOSEN-RUNGE, 1977). Cada testículo humano tem de 250 a 1000 túbulos seminíferos, que medem de 150 a 250 micrômetros de diâmetro, podem ter de 20 a 70 cm de comprimento se forem estirados e enovelados, como se apresentam, possuem cerca de 3 cm (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SCHÜNKE et al., 2007).

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

Juntamente com as células mioides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois compartimentos, o compartimento basal onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos e leptótenos), e o compartimento adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermatídes. Desta forma, o compartimento adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e imunoprivilegiado essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994).

As células de Sertoli, além da formação da barreira hematotesticular, desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas: o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas, mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermatídes para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Estas células secretam ainda fluido em direção ao lume tubular, o qual possui substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides. A secreção de fluido também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como células mioides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (RUSSELL; GRISWOLD, 1993; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994; FRANÇA; RUSSELL, 1998).

A concentração intratesticular de testosterona no fluido dos túbulos seminíferos (FTS) é aproximadamente 50-60 ng/mL em relação ao número de RA. Sugere-se que essa alta

concentração seja para manter a espermatogênese no rato adulto. Alguns estudos relacionam a concentração intratesticular de testosterona com o número de espermátide por testículo. Estudos mostram que para o processo de espermatogênico completo a concentração de testosterona no FTS deva ser maior de 20 ng/mL. Essa concentração é elevada possivelmente devido ao fato de que nem toda testosterona do FTS é livre para o RA (ZIRKIN, 1998).

A diidrotestosterona é o maior regulador esteroide na reprodução masculina, pois tem maior afinidade pelos receptores de andrógenos. Em estudos experimentais observou-se que a concentração de diidrotestosterona pode ser um terço da concentração de testosterona no FTS para manter a espermatogênese (ZIRKIN, 1998).

O período de proliferação dos diversos tipos celulares encontrados no testículo ocorre em épocas distintas, sendo cada um deles regulado por fatores específicos, os quais têm origem tanto intra quanto extratesticular (ORTH, 1993). As células de Sertoli são as primeiras células somáticas a se diferenciarem no testículo e expressam o Sry, o gene responsável pela determinação do sexo masculino, o qual desempenha um papel fundamental na diferenciação e remodelação das gônadas (KARL; CAPEL, 1998).

Já nesta fase, as interações das células de Sertoli com elas próprias e com as células germinativas, via fator neural de adesão celular, são cruciais para a formação dos cordões testiculares e os eventos iniciais que propiciarão o estabelecimento do processo espermatogênico (ORTH; JESTER, 1995). Também neste período as células de Sertoli produzem o hormônio anti-Mülleriano (AMH) responsável pela regressão dos ductos de Müller ou paramesonéfricos (PELLENIEMI et al., 1993).

Em ratos, a proliferação das células de Sertoli ocorre principalmente na fase final do período fetal e se estende por duas a três semanas após o nascimento (ALMIRÓN; CHEMES, 1988; BORTOLUSSI et al., 1990; VERGOUWEN et al., 1991), coincidindo o encerramento das divisões mitóticas das células de Sertoli com o início de proliferação dos espermátócitos primários, formação das junções de oclusão, início de maturação das células de Sertoli, secreção de fluido e formação do lume tubular (RUSSELL et al., 1998).

Como cada célula de Sertoli possui uma capacidade de suporte para células germinativas relativamente fixa para cada espécie, o tamanho potencial do testículo e da produção espermática é estabelecido já nesta etapa do desenvolvimento testicular (ORTH et al., 1988; ORTH, 1993). Estudos envolvendo o homem e várias espécies de mamíferos domésticos (GONDOS; BERNDTSON, 1993) sugerem que o período de proliferação das

células de Sertoli, à semelhança do observado em ratos, ocorre predominantemente no período perinatal.

Em humanos, as células de Sertoli não se dividem durante a vida sexual madura, mas são bastante resistentes a infecções, desnutrição e radiação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As células que constituem população testicular se expandem em períodos particulares do desenvolvimento e, em relação às células de Sertoli e às células espermatogênicas, esses períodos são distintos e inversamente correlacionados. Além de distintos, estes períodos de multiplicação das células testiculares são controlados por fatores específicos para cada população (ORTH, 1993).

O número de células de Sertoli em qualquer espécie é importante para determinar a capacidade espermatogênica e o tamanho do testículo (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Portanto, a população de células de Sertoli se correlaciona linear e positivamente com o peso do testículo, volume e comprimento total de túbulos seminíferos, população de espermatogônias A_1 e com a produção espermática diária (JOHNSON et al., 1984; BERNDTSON et al., 1987; FRANÇA; RUSSELL, 1998).

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

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

É importante salientar que, além das diferentes extensões, nos períodos proliferativos, pós-natais entre as espécies, a intensidade de proliferação é outro fator que deve ser levado em consideração durante este período (COOKE et al., 1994).

Portanto, os mamíferos podem apresentar longos períodos de proliferação de células de Sertoli com uma baixa média mitogênica e diminuição gradual desta média. Por outro lado, outros podem apresentar períodos mais condensados de proliferação de células de Sertoli, caracterizados por altos índices mitóticos, porém, que declinam rapidamente e culminam com a maturação das células de Sertoli (COOKE et al., 1994).

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

No homem a produção de espermatozoides se inicia entre 12 e 13 anos, pela ação hormonal e dura durante toda a vida (GUYTON; HALL, 2002). E o parâmetro de normalidade para o número de espermatozoides no fluido ejaculado é de 20 a 200 milhões/mL. A população de células de Sertoli aumenta gradativamente no período pós-natal até atingir um platô entre 25 e 40 anos (GONDOS; BERNDTSON, 1993). Por outro lado, a partir dos 40 anos se observa um declínio gradativo na população de células de Sertoli acompanhado também por uma diminuição na produção espermática (JOHNSON et al., 1984).

Trabalhos envolvendo tanto a administração de FSH quanto à supressão desse hormônio, no período de proliferação das células de Sertoli, mostram que o número de células está reduzido ou aumentado (ROCHA et al., 1999).

O FSH é uma glicoproteína que se liga a receptores específicos localizados na membrana plasmática das células de Sertoli (WALKER; CHENG 2005), sendo considerado como o principal fator mitogênico para estas células. Este hormônio é sintetizado e secretado pelos gonadotrofos localizados na adenohipófise (ZIRKIN, 1998; GUYTON; HALL, 2002; WALKER; CHENG, 2005) sob a ação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido no hipotálamo, sendo seu controle “feedback” negativo exercido pela inibina secretada pelas células de Sertoli.

O efeito mitogênico do FSH sobre as células de Sertoli imaturas é mediado pelo aumento dos níveis intracelulares do AMP cíclico (ORTH; BOEHM, 1990). O estrógeno, produzido pela aromatização de andrógenos nas células de Sertoli imaturas, sob o estímulo do FSH, pode exercer um papel mediador importante na divisão celular (ULISSE et al., 1994). A ação da inibina neste processo via células de Leydig também é possível (ORTH, 1993; SHARPE, 1994; DE KRETZER; MCFARLANE, 1996).

As respostas das células de Sertoli ao FSH variam de acordo com o período de desenvolvimento testicular em que o animal se encontra (GRISWOLD, 1993). Sua ação depende da idade (ASATIANI, 2002). Durante o período fetal e neonatal do desenvolvimento testicular o FSH é considerado o fator regulador de maior relevância na mitogênese da população de células de Sertoli (HOCHEREAU-DE-REVIERS e COUROT, 1978; ORTH, 1984; ORTH, et al. 1988; VAN VORSTENBOSCH et al. 1987; ORTH, 1993; SHARPE, 1994; MEACHEM et al. 1996).

Ao longo destes períodos, os níveis séricos normais de FSH são cruciais para a determinação do tamanho adequado da população de células de Sertoli do testículo no indivíduo adulto (ORTH, 1984; ORTH et al., 1988).

O número de receptores de FSH por células de Sertoli é relativamente constante de 2 a 21 dias após o nascimento. No entanto, tende a aumentar cada vez mais até 60 dias após o nascimento (WALKER; CHENG, 2005).

A proliferação das células de Sertoli diminui continuamente após o nascimento, encerrando a atividade mitótica entre 20 e 30 dias após o nascimento em ratos (ORTH, 1982) e camundongos (JOYCE; PORCELL; COOKE, 1993; VERGOUWEN et al., 1993).

Alguns estudos sugerem que o FSH é importante para a manutenção quantitativa da espermatogênese (RUSSEL et al., 1990; MEACHEM et al., 1999).

A espermatogênese é um complexo e bem organizado processo o qual ocorre nos túbulos seminíferos e dura de 40 a 60 dias, na maioria dos mamíferos investigados (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Este processo pode ser definido em três fases baseado em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica (espermátides), na qual as espermátides sofrem enormes modificações, transformando-se em células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (RUSSELL et al., 1990).

Espermiogênese é a fase final de produção de espermatozoides, considerada bastante complexa, pois engloba a formação acrossômica, condensação e alongamento do núcleo, desenvolvimento do flagelo e a perda de grande parte do citoplasma, que resulta nos chamados corpos residuais. Esses são fagocitados pelas células de Sertoli e os espermatozoides, liberados para o lúmen do túbulo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Cada uma destas fases dura aproximadamente 1/3 do processo espermatogênico.

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados e usualmente existe somente um estágio por secção transversal de túbulos seminíferos (RUSSELL et al., 1990). Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta sequência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (ORTAVANT et al., 1977; RUSSELL et al., 1990).

O processo espermatogênico é controlado por fatores extra e intratesticulares. Os hormônios hipofisários glicoproteicos o FSH e o LH são considerados os principais fatores extratesticulares e exercem controle sobre a espermatogênese (WALKER; CHENG, 2005). Inúmeros são os fatores intratesticulares produzidos pelos componentes o compartimento tubular e intersticial que também influenciam o processo espermatogênico, entre os quais podemos citar a testosterona, inibina, endorfina, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e serotonina (TINAJERO et al., 1992; SHARP, 1994).

Os testículos de um adulto jovem que formam em média 120 milhões de espermatozoides por dia, que podem ser armazenados no epidídimo e na ampola do canal deferente (GUYTON; HALL, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração de olanzapina via leite materno sobre o desenvolvimento testicular de ratos Wistar pré-púberes e sua repercussão sobre parâmetros morfométricos testiculares e endócrinos em ratos adultos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos da administração de diferentes doses de olanzapina (2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg), via leite materno, em ratos pré-púberes durante os primeiros 21 dias pós-natal, sobre os parâmetros endócrinos e histomorfométricos testiculares e suas repercussões na idade adulta, considerando os seguintes parâmetros:

- A. Peso líquido testicular, peso testicular, epididimário, prostático e de glândula seminal aos 21 e 90 dias de idade.
- B. Proporções volumétricas entre componentes do parênquima testicular, diâmetro e altura de túbulos seminíferos.
- C. Proporções volumétricas de células de Leydig.
- D. Níveis plasmáticos de testosterona e prolactina em ratos pré-púberes e adultos.
- E. Achados histopatológicos testiculares.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia**. Fundamentos práticos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- ALMIRÓN, I.; CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. **Int. J. Androl.**, v. 11, p. 235-246, 1988.
- ASATIANI, K. et al. Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. **Andrologia**, v. 34, p.172-176, 2002.
- BABU, G. N.; DESAI, G; CHANDRA, P. S. Antipsychotics in pregnancy and lactation. **Indian J. Psychiatry.**, v. 57, Suppl. 2, p. 303-307, 2015.
- BEASLEY, C. M. J. R.; TOLLEFSON, G. D.; TRAN, P. V. Efficacy of olanzapine: an overview of pivotal clinical trials. **J. Clin. Psychiatry**. v. 58, suppl. 10, p.7-12, 1996.
- BOBES, J. et al. Frequency of sexual dysfunction and other reproductive side-effects in patients with schizophrenia treated with risperidone, olanzapine, quetiapine, or haloperidol: the results of the EIRE study. **J. Sex. Marital Ther.**, v. 29, n. 2, p.125–147, 2003.
- BORTOLUSSI, M. et al. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotrophin receptors in rat testis from birth to puberty. **Cell Tissue Res.**, v. 260, p. 185-191, 1990.
- BRINGEL, S. S. et al. Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. **J. Appl. Toxicol.**, v. 33, n. 1, p. 24-31, 2013.
- BRONSTEIN, M. Hiperprolactinemia. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K.; CASTRO, M (eds). **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2005.
- BUGALHO, P. et al. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: bases científicas e modelos de estudo. **Acta Méd. Port.**, v. 19, p. 257–268, 2006
- CALLAGHAN, J. T. et al. Olanzapine: pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 37, p.177-193, 1999.
- CASTRO E SILVA, E.; CASTRO, L. Regulação da secreção de prolactina. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K.; CASTRO, M. (eds). **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Ed. Guanabara- Koogan: Rio de Janeiro, 2005.
- CONLEY, R. R.; MELTZER H. Y. Adverse events related to olanzapine. **J. Clin. Psychiatry**. v. 61, suppl. 8, p. 26-29, 2000.
- COOKE, P. S. et al. Neonatal propylthiouracil (PTU) treatment as a model system for studying factors controlling testis growth and sperm production. In: ANDREZEJ, B. **Function of the somatic cells in the testis**. New York: Springer Verlag, Bartke, A (Ed.), p. 400- 407, 1994., New York.

COSTA, A. M. N. et al. A naturalistic, 9-month follow-up, comparing olanzapine and conventional antipsychotics on sexual function and hormonal profile for males with schizophrenia Brazil. **J. Psychopharmacol.**, v. 21, n. 2, p. 165-170, 2007.

CRESPILHO, A. M.; ALVARENGA, F. C. L.; PAPA, F. O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1507-1510, 2006.

DE KRETZER, M.; McFARLANE, J. R. Inhibin in the male. **J. Androl.**, v. 17, n. 3, p.179-182, 1996.

EGLI, M.; LEENERS, B.; KRUGER, T. H. C. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction. **Reproduction**, v. 140, p. 643–654, 2010.

FISHER, D. New light shed on fluid formation in the seminiferous tubules of the rat. **J. Physiol.**, v. 542, n. 2, p. 445–452, 2002.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: Male reproduction; a multidisciplinary overview. Ed. Madrid: **Churchill ComUNICATIONS Europe España**. cap 16, p. 197-213, 1998.

FROTA, L. H. Cinquenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria. **J. Bras. Psiquiat.** v. 50, p. 298-317, 2001.

GAO, W.; BOHL, C. E.; DALTON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chem Rev** v. 105, p. 3352-3370, 2005.

GARDINER, S. J. et al. Transfer of olanzapine into breast milk calculation of infant drug dose and effect on breast fed infants. **Am. J. Psychiatry**, v. 160, p. 1428–1431, 2003.

GINOVART, N.; KAPUR, S. Role of dopamine D (2) receptors for antipsychotic activity. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 212, p. 27-42, 2012.

GODINHO, C. L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros**. 1999. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GOLDSTEIN, D. J. et al. Olanzapine exposed pregnancies and lactation: early experience. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 20, p. 399–403, 2000.

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

GRISWOLD, M. D. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: RUSSEL, L. D.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993, cap. 23, p. 493-508.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

HAENDLER, B. Androgens e pharmacology. corpore research oncology, Achering AG, Berlin, Germany. **Andrologia**, v. 37, p. 213-215, 2005.

HYUN, J. S. et al. Localization of peripheral dopamine D1 and D2 receptors in rat corpus cavernosum. **BJU Int.**, v. 90, p. 105-112, 2002.

ILETT, K. F., et al. Transfer of risperidone and 9-hydroxy risperidone into human milk. **Ann. Pharmacother.**, v. 38, p. 273-276, 2004.

JOHNSON, B. A. et al. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. **Lancet**, 2003.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Texto e atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 415-430, 2004.

KAPUR, S.; REMINGTON, G. Dopamine D (2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. **Biol. Psychiat.**, v. 50, p. 873-883, 2001.

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

KELLY, D. L.; CONLEY, R. R. Sexuality and schizophrenia: a review. **Schizophr. Bull.**, v. 30, n. 4, p. 796-779, 2004.

KINGSBURY, J. K.; CASTELO, C.; ABULSEOUD, O. Quetiapine for olanzapine-induced galactorrhea. **Am. J. Psychiatry**, v. 1059, n. 6, p. 1061, 2002.

LAMBERTS, S. W. et al. Regulation of prolactine secretion at the level of the lactotroph. **Physiol. Rev.**, v.70, p. 279-318, 1990.

LESAGE, J. et al. Hypothamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and gonadal and adrenal activities during early postnatal period in the rat. **Neurochem. Res.**, v. 21, p. 87-96, 1996.

MAH, P. M. et al. Hyperprolactinemia: etiology, diagnosis, and management. **Semin. Reprod. Med.**, v. 20, n. 4, p.365 - 374, 2002.

MELTZER, H. Y.; MC GURK, S. R. The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive functions in schizophrenia. **Schizophr. Bull.**, v. 25, p. 233-255, 1999.

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

MESTON, C. M.; GORZALKA, B. B. Psychoactive drugs and human sexual behavior: the role of serotonergic activity. **J. Psychoactive Drugs**, v. 24, n. 1, p. 1-40, 1992.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

MOLITCH, M. E. Disorders of prolactin secretion. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 30, p. 585-610, 2001.

MOURA, C. S. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 5, p. 799-808, 2006

NAHAS, E. A. P. et al. Estados hiperprolactinêmicos: inter-relações com o psiquismo. **Rev. Psiq. Clín.**, v.33, n. 2, p. 68-73, 2006.

NEVES, E. S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermato gênico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*)**. 2001. 135 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ORTAVANT, R. et al. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H. H., CUPS, P. T. (eds). **Reproduction in domestic animals**. 3 ed. New York: Academic Press. Cap.8, p. 203-221, 1977.

OTTH, C. et al. Novel identification of peripheral dopaminergic D₂ receptor in male germ cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 100, p.141-150, 2007.

ORTH, J. M.; BOEHM, R. Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cell by a perfusion toxin-sensitive mechanism. **Anat. Rec.**, v. 226, p. 230-327, 1990.

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

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

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

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

PAULA, T. A. R. **Análise histométrica e funcional dos testículos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas**. 1999. 84 f. Tese (Doutorado Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PERÄLÄ, J. et al. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 64, jan., p. 19-28, 2007.

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

PETTY, R.G. Prolactin and antipsychotic medications: mechanism of action. **Schizophr. Res.**, v. 35, Suppl. p.67–73, 1999.

POCCIA, D. Molecules of the somatic cells. In: POCCIA, D. *Molecular biology intelligence unit; molecular aspects of spermatogenesis*. Austin: **R. G. Landes Company**. cap. 4, p. 75-90, 1994.

REMINGTON, G; KAPU, R. S.; ZIPURSKY, R. B. Pharmacotherapy of first-episode schizophrenia. **Br. J. Psychiatry**, v. 172 (S33), p. 66-70, 1998.

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

RIJCHEN, C. A. W. et al. Schizophrenia care and the Dutch community pharmacy: the unmet needs. **Int. J. Pharm. Pract.** v. 11, p. 97–104, 2003.

ROCHA, D. M. C. et al. Testis size, Sertoli cell population and daily sperm in adult wistar rats treated neonatally with FSH and PTU. In: *Testis Workshop, XV, 1999, Louiseville. The testis: from stem cell to sperm function*. Norwell. Serono USA, Inc. April 7-10, 1999, p. 60 (II-16)a.

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

RUSSELL, L. D.; BARTKE, A.; GOH, J. C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. **Am. J. Anat.**, v. 184, p. 179-189, 1998.

RUSSELL, D. L. et al. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D. L. et al. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. **Bolesta: Cache River Press**. cap.1, p. 1-40, 1990.

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

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. *The Sertoli Cell*. Clearwater: **Cache River Press**, 801p, 1993.

SCHLECHTE, J. A. Prolactinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 2035-2041, 2003.

SCHÜNKE, M. et al. **Atlas de anatomia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan: p. 256-260, 2007.

SERRI, O.; CHIK, C. L.; UR, E. et al. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. **CMAJ**, v. 169, p. 575–581, 2003.

SETCHELL, B. P. Male reproduction organs and semen. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, Inc, 1991, cap. 6, p. 221-250.

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

SHUPNIK, M. A.; SCHREIHOFFER, D. A. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 341-344, 1997.

SILVA JUNIOR, V. A. **Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular em suínos**. 2000. 191 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SMALL, J.G. et al. Quetiapine in patients with schizophrenia: a high and low-dose double-blind comparison with placebo. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 54, p. 549-557, 1997.

SOUZA, B. R. **A Modulação da via Camp/Pka pelo sensor neuronal de cálcio-1 independe de receptores de dopamina**. 2007. Tese. (Doutorado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SPROUSE, J. S. et al. Comparison of the novel antipsychotic ziprasidone with clozapine and olanzapine: inhibition of dorsal raphe cell firing and the role of 5-HT_{1A} receptor activation. **Neuropsychopharmacology**. v. 21, n. 5, p. 622-631, 1999.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia**: base neurocientífica e aplicações práticas. 4. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 617p., 2014.

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

STEPHENSON, C. M.; PILOWSKY, L. S. Psychopharmacology of olanzapine: a review. **Brit. J. Psychiatry**, v. 174, suppl. 38, p. 52-58, 1999.

STILLE, G.; HIPPIUS, H. Kritische Stellungnahme zum begriff der neuroleptika anhand von pharmakologischen und klinischen befunden mit clozapin. **Pharmakopsychiatry**, v. 4, p.182-911.

STRANGE, P. G. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. **Pharmacol Rev.**, v. 53, n. 1, p. 119-133, 2001.

TAMMINGA, C. A. Gender and schizophrenia. **J. Clin. Psychiatry**, v. 58, suppl. 15, p. 33-37, 1997.

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

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

TOHEN, M. et al. Efficacy of olanzapine and olanzapine-fluoxetine combination in the treatment of bipolar i depression. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 60, n. 11, p. 1079-1088, 2003.

ULISSE, S. et al. Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. **J. Endocrinol.**, v. 140, p. 431-436, 1994.

VAN HAASTER, L. H. et al. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v. 131, p. 1574-1576, 1992.

VERGOUWEN, R. P. et al. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. **J. Reprod. Fertil.**, v. 93, p. 233-243, 1991.

YASSA, R.; LAL, S. Impare Sexual Intercourse as a complication of tardie dyskinesia. **The Am. J. Psychiatry**, 1985.

WALKER, H. W.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, p. 15-28, 2005.

WIECK, A.; HADDAD, P. M. Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia in women: pathophysiology, severity and consequences - Review Article. **Brit. J. Psychiatry**, v. 182, p. 199-204, 2004.

WILLIAMS, V. L. Common and specific effects of two major forms of prolactin in the rat testis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 293, p. 1795-1802, 2007.

WONG, E. M. et al. Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 19004-19012, 1993

ZILBEBERG, D. **Comportamento dos níveis de Igf-I em pacientes com hiperprolactinemia**. 2005. 198 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

ZIRKIN, B. R. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. **Cell Dev. Biol.**, v. 9, p. 417-421, 1998.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA OLANZAPINA VIA LEITE MATERNO SOBRE O DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE RATOS WISTAR PRÉ-PÚBERES E SUA REPERCUSSÃO SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES E ENDÓCRINOS

RESUMO

A olanzapina é um antipsicótico atípico prescrito para o tratamento de esquizofrenia e psicoses pós-parto, porém é transferida através do leite para recém-nascidos. Consequentemente neonatos são susceptíveis aos seus efeitos secundários adversos. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de olanzapina pela amamentação sobre o desenvolvimento testicular de ratos Wistar pré-púberes e sua repercussão sobre o peso de órgãos androgeno-dependentes, parâmetros testiculares e endócrinos. Vinte e quatro ratos Wistar machos foram distribuídos de acordo com o tratamento: I) grupo controle – solução salina NaCl 0,9% (n = 6); II) grupo tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina (n = 6); III grupo tratado com 5 mg/kg = 6) e IV) grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina (n = 6). Os animais receberam a droga através do leite materno desde o nascimento até 21 dias pós-natal, quando foram submetidos à eutanásia. Os testículos foram rotineiramente processado para inclusão em resina plástica (metacrilato de glicol). Secções histológicas com 4 µm de peso foram coradas por azul de toluidina/borato de sódio 1% e analisadas histometricamente. Foram colhidas amostras de sangue para dosagens de testosterona e prolactina. Os resultados mostraram ganho de peso corporal e diminuição do peso testicular em animais tratados com olanzapina; Diminuição do índice gonadossomático e do peso do epidídimo em ratos tratados com 5 e 10 mg/kg. O peso da próstata e das glândulas seminais não diferiram entre si. Parâmetros volumétricos, tais como: cordões testiculares/túbulos seminíferos, epitélio seminífero e células de Leydig foram reduzidos nos grupos tratados com olanzapina. O lúmen tubular, as células do tecido conjuntivo e os vasos sanguíneos do parênquima testicular não apresentaram alterações significativas na sua volumetria. Houve aumento de túnica própria e espaço linfático no grupo tratado com 10 mg/kg. Redução do diâmetro tubular nos grupos 5 e 10 mg/kg. A olanzapina reduziu significativamente o comprimento total dos túbulos seminíferos. O volume individual de células de Leydig mostrou uma diminuição significativa no grupo tratado com 10 mg/kg. Os animais tratados com 10 mg/kg de olanzapina mostraram uma redução significativa nos níveis plasmáticos de testosterona. Por outro lado, verificou-se que os níveis de prolactina eram significativamente mais elevados em ratos pré-púberes tratados com a mesma dose. A análise histopatológica dos testículos mostrou lesões patológicas compatíveis com degeneração testicular em ratos tratados com maior dose de olanzapina. Observou-se a presença de aglomerados de detritos de células germinais no lúmen tubular e células germinativas em processo de morte celular, com núcleo picnótico e destacado no lúmen. Os achados histopatológicos e alterações nos parâmetros morfométricos testiculares de ratos pré-púberes, com consequente hipogonadismo, podem estar relacionados à hiperprolactinemia induzida pela olanzapina com repercussões endócrinas negativas sobre a testosterona, o que justifica a atrofia resultante do uso da olanzapina durante o período crítico de desenvolvimento testicular.

Palavras chave: Olanzapina. Antipsicótico. Ratos Pré-púberes. Testosterona. Prolactina.

ABSTRACT

Olanzapine is an atypical antipsychotic prescribed for the treatment of schizophrenia and post-partum psychosis, but it is transfer through milk to the neonates. Hence, neonates are susceptible to their adverse side effects. The present study aimed to evaluate the effects of olanzapine administration by breast feeding on testicular development of pubescent Wistar rats and their repercussion on weight of androgen-dependent organs and testicular and endocrine parameters. Twenty-four male Wistar rats were distributed per treatment: I) control group – saline solution NaCl 0.9% (n = 6), II) treated group with 2.5 mg/kg olanzapine (n = 6), III) treated group with 5 mg/kg (n = 6) and IV) treated group with 10 mg/kg of olanzapine (n = 6). Animals received the drug through breast milk from birth to 21 postnatal days when they were submitted to euthanasia. Testis were routinely processed for inclusion in plastic resin (glycol methacrylate). Histological sections with 4 µm of the weight and stained by toluidine blue/sodium borate 1% and analyzed histometrically. Blood samples were collected for testosterone and prolactin dosages. The results showed body weight gain and decreased testicular weight in animals treated with olanzapine; decrease in gonadosomatic index and epididymal weight in rats treated with 5 and 10 mg/kg. Weight of prostate and seminal glands did not differ from each other. Volumetric parameters, such as: testicular cords/seminiferous tubules, seminiferous epithelium and Leydig cells were reduced in the olanzapine treated groups. Tubular lumen, connective tissue cells and blood vessels of the testicular parenchyma did not exhibit significant changes in their volumetry. There was an increase of own tunic and lymphatic space in the group treated with 10 mg/kg. Reduction of tubular diameter in groups 5 and 10 mg/kg. Olanzapine significantly reduced the overall length of the seminiferous tubules. The individual volume of Leydig cells showed a significant decrease in the 10 mg/kg treated group. Animals treated with 10 mg/kg olanzapine showed a significant reduction in plasma testosterone levels. On the other hand, prolactin levels were found to be significantly higher in pubescent rats treated with the same dose. The histopathological analysis of the testes showed pathological lesions compatible with testicular degeneration in rats treated with a higher dose of olanzapine. Presence of germ cell debris clusters in the tubular lumen and germ cells from process of cell death, with pyknotic nucleus and detached into the lumen were observed. Histopathological findings and changes in testicular morphometric parameters of pubescent rats, with consequent hypogonadism, may be related to olanzapine-induced hyperprolactinemia with negative endocrine repercussions on testosterone, which justifies the atrophy resulting from the use of olanzapine during the critical period of testicular development.

Keywords: Olanzapine. Antipsychotic. Pubescent Rat. Testosterone. Prolactin.

1 INTRODUÇÃO

A sexualidade é um componente natural do comportamento humano amplamente estudado (SIMONS; CAREY, 2001). Entretanto para aqueles pacientes que sofrem de distúrbios mentais, como a esquizofrenia, a função sexual tem recebido pouca atenção ou reconhecimento como um aspecto a ser cuidado. Paradoxalmente a isso, as doenças mentais vêm crescendo nos últimos anos (DOSSENBACH, 2005).

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica grave, multifatorial e complexa, com prevalência ao longo da vida de cerca de 1% (BUGALHO et al., 2006). Estudos têm sugerido que o funcionamento sexual é qualitativamente e quantitativamente diferente em pessoas com esquizofrenia, tratadas com antipsicóticos quando comparado com outras sem a doença. (KELLY; CONLEY, 2004).

É possível que antipsicóticos induzam disfunções sexuais, porém seu uso pode melhorar o desempenho sexual devido à redução dos sintomas positivos e negativos em casos de esquizofrenia. A alta incidência dessas disfunções sexuais mostra-se presente em ambos os tratamentos com psicótico típicos e atípicos. Entretanto, os antipsicóticos atípicos, conhecidos como de segunda geração, apresentam menos alterações clínicas com melhor eficácia contra os sintomas psicóticos da esquizofrenia (COSTA et al., 2007).

A olanzapina é um antipsicótico atípico que se liga aos receptores de serotonina 5HT₂, e de dopamina D₂ (NASRALLAH, 2008; PARK et al., 2010).

A dopamina é um importante regulador das funções orgânicas centrais e periféricas (MISSALE et al., 1998). Além disso, a presença de receptores dopaminérgicos em testículos de ratos pode sugerir uma interação desconhecida entre o sistema nervoso e o reprodutivo (HYUN et al., 2002; OTTH et al., 2007).

A classe de droga antipsicótica atípica tem mostrado ser terapeuticamente útil no tratamento da esquizofrenia e do transtorno bipolar quando comparado às outras drogas da classe dos antipsicóticos típicos ou convencionais porque elas evitam efeitos debilitantes e reduzem efeitos extrapiramidais. Diversos mecanismos podem causar disfunção sexual durante a terapia antipsicótica. Efeitos não específicos, como sedação e ganho de peso podem levar a diminuição do interesse sexual (KELLY; CONLEY, 2004). Aumento dos níveis de prolactina (MISHRA; MOHANTY, 2010) e redução de testosterona (WALKER; CHENG, 2005; BRINGEL et al., 2013; SOLIMAN et al., 2014) também foram associados ao uso da olanzapina.

Em adição, elevação dos níveis de prolactina causado por antipsicóticos como a olanzapina pode contribuir para a disfunção sexual, causar hipogonadismo e diminuição dos níveis de testosterona (WONG et al., 1993). A prolactina tem sido apontada como responsável pela indução e proliferação das células de Leydig em ratos. A hiperprolactinemia em animais adultos possui um efeito negativo sobre a produção de testosterona por ação da secreção reduzida de LH (WILLIAMS et al., 2007; KONARZEWSKA et al., 2009).

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

Neste sentido, preocupações têm sido levantadas em particular com o uso da olanzapina na gestação, a qual pode estar associada ao ganho significativo de peso, assim como aumento da taxa de defeitos congênitos, em particular defeitos do tubo neural, e aumento de complicações obstétricas (KOREN et al., 2002). Do mesmo modo, Ösz et al. (2014) também reportaram alterações no desenvolvimento fetal de ratos Wistar tratados com olanzapina.

São limitados ainda, os estudos sobre a segurança dos antipsicóticos na gestação e amamentação (BABU; DESAI; CHANDRA, 2015). Relatos de anormalidades congênitas em bebês de mulheres que tomaram antipsicóticos típicos foram descritos. Entretanto, não existe estudo aprofundado sobre os riscos do uso de antipsicóticos atípicos na literatura (KENNEDY, 2007).

Tem sido relatada sua transferência de olanzapina através do leite materno, sendo uma droga amplamente prescrita como medicamento para a psicose pós-parto (GOLDSTEIN et al., 2000; GARDINER et al., 2003; ILETT et al., 2004; AYDIN; NAYIR, 2015). Deste modo, neonatos tornam-se susceptíveis aos efeitos adversos dessa droga. No entanto, estudos pré-clínicos que abordem os efeitos desta da olanzapina em recém-nascidos através da exposição lactacional durante o período pós-natal de desenvolvimento são raros ou quase ausentes (MISHRA; MOHANTY, 2010).

Entender os riscos da exposição neonatal aos antipsicóticos pode ser benéfico na escolha terapêutica das psicoses. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de diferentes doses de olanzapina via leite materno sobre os parâmetros testiculares e endócrinos durante o período lactacional de desenvolvimento testicular em ratos pré-púberes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 12 ratas Wistar prenhes (*Rattus norvegicus*, var. albinus) pesando entre 230-280g pertencentes ao biotério da Área de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, as quais foram mantidas em temperatura $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e comida (Labina Purina®, Brasil) foram oferecidas *ad libitum* até o final do experimento.

Diariamente, as mães passaram a receber, via sonda orogástrica, tratamento com dose única de olanzapina diluída em solução salina - NaCl 0,9% ou veículo como controle (solução salina NaCl 0,9%), de modo que, os ratos neonatos recebessem indiretamente a olanzapina, via leite materno. Os ratos machos permaneceram com suas mães durante todo o período lactacional de tratamento (do 1º dia pós-parto até o 21º dia).

Vinte e quatro ratos neonatos machos foram escolhidos ao acaso para composição dos seguintes grupos: I) grupo controle de neonatos cujas mães receberam solução salina NaCl 0,9% (n=6); II) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 2,5 mg/kg de olanzapina (n = 6); III) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 5 mg/kg de olanzapina (n=6); e IV) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 10 mg/kg de olanzapina (n=6).

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Protocolo nº 23082008993/2013, sob Registro de Licença nº 073/2013 - CEUA/UFRPE em conformidade com os princípios básicos para pesquisa com animais.

2.2 PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Aos 21 dias pós-natal, ratos pré-púberes de cada grupo foram heparinizados (125 UI/100g de peso corporal) e após 15 minutos, anestesiados via intramuscular com associação de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). Posteriormente foi realizada coleta sangue total por punção no seio venoso (confluência das veias cavas), centrifugação, acondicionamento de duas alíquotas de 1 mL de plasma sanguíneo em tubos plásticos de 2 mL e estocados – 20°C para posterior dosagem de testosterona e prolactina. Após coleta de sangue, realizou-se perfusão intracardíaca com solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de heparina sódica (500 UI/L) e nitroprussiato (100 mg/L), por um período de tempo entre 5 e 10

minutos. Após lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído a 4% (Vetec®, Brasil), em tampão fosfato de sódio (pH 7,2/ 0,01M) durante 25 minutos. Após a perfusão com solução fixadora foram removidos e pesados em balança digital (Kern® 410, Brasil) com precisão de quatro casas decimais: testículos, epidídimos, próstata e glândula seminal. Após as medidas, os órgãos coletados foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à refixação na mesma solução de perfusão. Para estudo ao microscópio de luz, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Leica®, Brasil). Foram realizados cortes histológicos de 4 µm em micrótomo rotativo de lâmina de vidro, corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados morfolologicamente e morfometricamente em microscópio (Leica ICC 50®, Brasil). Após preparação das lâminas histológicas, fotos dos componentes testiculares foram capturadas usando esse microscópio óptico acoplado ao computador. Para análise histomorfométrica foi usado o software ImageJ.

O índice gonadossomático foi calculado de acordo com Tenório et al. (2011) com a seguinte fórmula ($IGS = [\text{peso testicular} / \text{peso corporal}] \times 100$). Esse índice corresponde a uma relação percentual entre o peso testicular o peso corporal (CALDEIRA et al., 2010).

A análise histomorfométrica dos testículos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (2015).

2.3 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (%) E VOLUME DOS COMPONENTES DO TESTÍCULO

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de grátula micrométrica (Olympus®) com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400x. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente, totalizando 6615 pontos para cada animal.

De acordo com Valença et al. (2013), o volume de cada componente testicular (mL) foi criado pelo o produto de pontos percentuais dos componentes testiculares (densidade volumétrica %) e volume dos testículos (testículos líquido do testículo).

O testículo foi dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lúmen; enquanto no segundo foram investigados: células de Leydig, células do tecido conjuntivo,

vasos sanguíneos e espaço linfático. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04, o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo, expresso em μL foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido do testículo (g). O valor deste último foi obtido pela subtração de 6,5% da albugínea do peso testicular bruto (BRINGEL et al. 2013).

2.4 DIÂMETRO TUBULAR, ALTURA DE EPITÉLIO SEMINÍFERO E COMPRIMENTO TOTAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidos em aumento de 100x usando retículo micrométrico linear (10 mm/100 - Olympus®) calibrado com um micrômetro padrão. A medida do diâmetro tubular médio para cada rato foi obtida a partir da mensuração de 15 túbulos escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, tomaram-se duas medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lúmen e epitélio germinativo determinando-se, desta forma, a altura média do epitélio seminífero.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada conforme descrita por Tenorio et al. (2011).

$$CT = VTS/\pi R^2$$

Em que VTS = Volume total de túbulos seminíferos.

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

2.5 MORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG

Para o cálculo do diâmetro nuclear de células de Leydig, 30 perfis nucleares de células de Leydig foram capturados em objetiva de ampliação de 1000x e analisados com o software LAZ EZ 1.6.0. O diâmetro nuclear foi obtido por meio de duas medições diametralmente opostas, de acordo com a metodologia proposta por Saraiva et al. (2006).

No tocante à densidade volumétrica de células de Leydig (%), utilizou-se um retículo com 441 pontos (acoplado em microscópio) ampliados 1000x. Mil pontos foram contados, considerando núcleo e citoplasma da célula. Depois disto, o volume individual da célula de Leydig foi determinado com modelos matemáticos, utilizando os valores de diâmetro nuclear e do volume da esfera $\frac{4}{3} \pi R^3$. A partir dessa proporção foram calculados o volume citoplasmático e o volume celular:

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig se obteve o número total destas células por testículo. A divisão desse valor pelo peso líquido do testículo forneceu o número de células de Leydig por grama de testículo.

2.6 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA

O sangue coletado foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a fim de preparar o soro para medições de testosterona e prolactina. A determinação quantitativa de testosterona e prolactina foi realizada pela técnica de quimioluminescência empregando-se kits comerciais (Beckman Coulter®, EUA) e os ensaios foram realizados através do equipamento Beckman Coulter Access 2.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos através da estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão); e quando necessárias estas médias foram avaliadas mediante técnica de análise de variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações com o intuito de analisar quais grupos diferiram entre si. Para dados que não seguiram as tendências de normalidade, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com posterior teste post-hoc de Dunn. Para as construções gráficas, utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL, PESO DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

Resultados do peso corporal, peso dos órgãos andrógeno-dependentes e índice gonadossomático podem ser observados na Tabela 1.

Com relação ao peso corporal de ratos pré-púberes aos 21 dias pós-natal expostos à terapia com antipsicótico durante o período lactacional, houve um aumento significativo neste parâmetro entre o animais dos grupo tratado com 10 mg/kg em relação ao grupo controle ($p = 0,0015$). De modo semelhante, animais tratados com 5 mg/kg de olanzapina exibiram ganho de peso estatisticamente superior àqueles animais tratados com menor dose ou mesmo com o controle (Tabela 1).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, o peso testicular dos ratos aos 21º dia de vida mostraram redução significativa nos três grupos tratados em relação ao grupo controle ($p = 0,0017$), diferindo em 27,85% do grupo 2,5 mg/kg ($p < 0,001$), 25,31% do grupo 5 mg/kg ($p < 0,001$) e 35,35% do grupo 10 mg/kg ($p < 0,001$). Não houve diferenças estatísticas nesse parâmetro entre os três grupos tratados com a olanzapina. Da mesma forma, houve redução significativa no peso líquido testicular nos grupos tratados com olanzapina em relação ao grupo controle.

O peso epididimário dos grupos tratados com olanzapina nas doses de 5 e 10 mg/kg, conforme mostrado na Tabela 1, exibiu redução significativa nesse parâmetro em relação ao grupo controle e 2,5 mg/kg.

O pesos prostáticos não mostraram diferenças significativas entre grupos experimentais (Tabela 1). Contudo, observou-se tendência à redução desse parâmetro nos animais tratados com maiores doses de olanzapina em relação ao grupo controle. Animais dos grupos 2,5 e 5 mg/kg apresentaram tendência à diminuição no peso prostático de 23% e 19%, respectivamente. De forma análoga, animais do grupo de 10 mg/kg exibiram maior tendência de diminuição no peso desse órgão, cerca de 43% em relação ao grupo controle.

No que tange ao peso da glândula seminal, não se evidenciaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).

O índice gonadossomático, conforme mostrado na Tabela 1, mostrou diferença significativa entre os três grupos tratados com olanzapina em relação ao grupo controle. O índice gonadossomático do grupo controle foi o maior entre os grupos experimentais,

diferindo em 23,2 % do grupo 2,5 mg/kg, em 32,6% do grupo 5 mg/kg e em 41,9% do grupo 10 mg/kg. Entre os grupos tratados não houve diferença significativa.

Tabela 1 - Peso corporal (g), peso de órgãos andrógeno-dependentes (g) e índice gonadossomático - IGS (%) de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Peso corporal	58,67 ± 2,73 ^a	56,17 ± 3,06 ^a	64,00 ± 0,80 ^b	67,00 ± 6,99 ^b
Testículo	0,25 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,03 ^b	0,19 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,05 ^b
Peso líquido testicular	0,23 ± 0,04 ^a	0,17 ± 0,03 ^b	0,17 ± 0,01 ^b	0,15 ± 0,04 ^b
Epidídimo	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01 ^b
Próstata	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Glândula seminal	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,012	0,05 ± 0,031	0,06 ± 0,03
IGS (%)	0,43 ± 0,05 ^a	0,33 ± 0,04 ^b	0,29 ± 0,04 ^b	0,25 ± 0,06 ^b

Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

4.2 HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR

Na Tabela 2, são apresentados os dados referentes ao volume dos constituintes do parênquima testicular de ratos pré-púberes controles e tratados com diferentes doses de olanzapina, via leite materno durante 21 dias. Dentre esses parâmetros, notou-se redução significativa no volume de túbulos seminíferos dos animais que receberam tratamento com olanzapina em relação ao grupo controle. Os grupos tratados com olanzapina não diferiram entre si.

De modo semelhante, houve redução significativa no volume total de epitélio seminífero dos ratos tratados com olanzapina em relação ao grupo controle. O volume do epitélio seminífero do grupo controle foi o maior entre os grupos experimentais, diferindo em 26,90% do grupo 2,5 mg/kg, 24,37% do grupo 5 mg/kg e 28,93% do grupo 10 mg/kg. Ainda em relação a esse parâmetro, não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com o antipsicótico.

Tabela 2 – Volume (μL) dos componentes testiculares de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina, via leite materno, durante os 21^o dias pós-natal e avaliado aos 21 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Túbulo seminífero	0,215 $\pm$ 0,0037 ^a	0,158 $\pm$ 0,027 ^b	0,165 $\pm$ 0,010 ^b	0,140 $\pm$ 0,036 ^b
Epitélio seminífero	0,197 $\pm$ 0,034 ^a	0,144 $\pm$ 0,026 ^b	0,149 $\pm$ 0,009 ^b	0,125 $\pm$ 0,032 ^b
Lúmen tubular	0,0063 $\pm$ 0,0024	0,0071 $\pm$ 0,0023	0,0087 $\pm$ 0,0160	0,0080 $\pm$ 0,0026
Túnica própria	0,0116 $\pm$ 0,0018 ^a	0,0073 $\pm$ 0,0008 ^b	0,0072 $\pm$ 0,0007 ^b	0,0070 $\pm$ 0,0011 ^b
Células de Leydig	0,0042 $\pm$ 0,0011 ^a	0,0020 $\pm$ 0,0011 ^b	0,0027 $\pm$ 0,0008 ^{ab}	0,0018 $\pm$ 0,0007 ^b
Células do tecido conjuntivo	0,0010 $\pm$ 0,0001	0,0005 $\pm$ 0,0005	0,0005 $\pm$ 0,0005	0,0006 $\pm$ 0,0005
Vaso sanguíneo	0,0025 $\pm$ 0,013	0,030 $\pm$ 0,0011	0,0027 $\pm$ 0,0017	0,0028 $\pm$ 0,0017
Espaço linfático	0,0168 $\pm$ 0,0043 ^a	0,0092 $\pm$ 0,044 ^b	0,0075 $\pm$ 0,0025 ^b	0,0095 $\pm$ 0,0048 ^b

Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

O volume de lúmen tubular de ratos pré-púberes não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 2). Por outro lado, foram constatadas diferenças significativas no volume de túnica própria de ratos pré-púberes aos 21 dias entre os grupos tratados com diferentes doses de olanzapina e o grupo controle.

No que tange ao volume total de células de Leydig apresentado na Tabela 2, observou-se diminuição extremamente significativa desse parâmetro nos grupos tratados com olanzapina nas doses de 2,5 mg/kg e 10 mg/kg em relação ao grupo controle. No entanto, grupos que receberam tratamento com o antipsicótico não diferiram significativamente entre si.

Ainda conforme demonstrado na Tabela 2, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais no tocante aos parâmetros volumétricos: células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos presentes no parênquima testicular de ratos. Por outro lado, em relação ao volume de espaço linfático, houve redução muito significativa desse parâmetro em todos os grupos tratados com olanzapina em relação ao grupo controle. Grupos experimentais que receberam tratamento com o antipsicótico não diferiram significativamente entre si.

No tocante à medida de diâmetro tubular apresentado na Tabela 3, os ratos pré-púberes avaliados aos 21 dias pós-natal do grupo tratado com 5 e 10 mg/kg de olanzapina

apresentaram os menores valores diferindo significativamente em relação ao grupo controle ($p = 0,0131$).

Com relação à medida da altura de epitélio seminífero os animais do grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina apresentaram as menores médias em relação ao grupo controle diferindo significativamente neste parâmetro. De modo análogo, animais tratados com a dose maior, grupo 10 mg/kg, também diferiu estatisticamente dos animais pertencentes aos grupos de 2,5 e 5 mg/kg. Os demais grupos não exibiram diferenças significativas entre si.

Aos 21 dias de idade, o grupo controle apresentou as maiores médias com relação ao comprimento total dos túbulos seminíferos, exibindo extrema diferença significativa em relação aos grupos de 2,5 mg/kg, 5mg/kg e 10 mg/kg (Tabela 3).

Tabela 3 – Diâmetro tubular (μm), altura de epitélio seminífero (μm) e comprimento total de túbulos seminíferos (m) de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Diâmetro tubular	162,90 $\pm$ 5,39 ^a	146,80 $\pm$ 18,18 ^{ab}	137,80 $\pm$ 11,38 ^b	137,3 $\pm$ 15,98 ^b
Altura de epitélio	54,55 $\pm$ 5,87 ^a	51,22 $\pm$ 9,30 ^a	54,71 $\pm$ 5,04 ^a	41,56 $\pm$ 4,83 ^b
Comprimento tubular	14,62 $\pm$ 3,68 ^a	9,43 $\pm$ 1,58 ^b	7,95 $\pm$ 0,42 ^b	9,34 $\pm$ 0,70 ^b

Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

4.3 HISTORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG

De acordo com os dados da Tabela 4 a medida de diâmetro nuclear das células de Leydig nos animais tratados com diferentes doses de olanzapina apresentou uma diminuição significativa ($p = 0,0004$) quando comparados com os animais do grupo controle. De modo análogo, o volume individual das células de Leydig também apresentou redução muito significativa nos grupos tratados com olanzapina em relação ao grupo controle ($p = 0,0015$). Por outro lado, não se observaram diferenças significativas na população de células de Leydig/ grama de testículo nos grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4 – Diâmetro nuclear de célula de Leydig (μm), volume de célula de Leydig (μm^3) e população de células de Leydig ($\times 10^7$)/ grama de testículo de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Diâmetro nuclear de Leydig	$6,65 \pm 0,84^a$	$5,44 \pm 0,10^b$	$5,83 \pm 0,43^b$	$5,28 \pm 0,19^b$
Volume de célula de Leydig	$461,0 \pm 21,0^a$	$209,7 \pm 10,7^b$	$266,6 \pm 35,6^b$	$187,4 \pm 32,7^b$
População de célula de Leydig/ grama de testículo	$4,02 \pm 1,38$	$5,61 \pm 2,04$	$5,45 \pm 2,2$	$6,15 \pm 1,1$

Fonte - O autor, 2017.

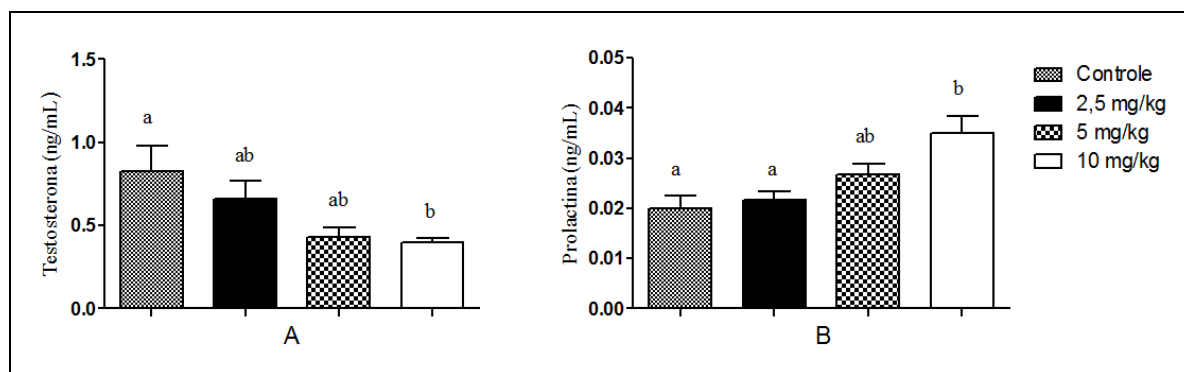
Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

4.4 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA

Dados de testosterona plasmática e prolactina estão demonstrados na Figura 1. A maior redução dos níveis plasmáticos de testosterona foi encontrada nos animais que receberam, via leite materno, 10 mg/kg de olanzapina durante os 21º dias pós-natal, em comparação com o grupo controle ($p = 0,021$) (Figura 1A). Evidenciou-se tendência de diminuição nos níveis plasmáticos de testosterona, mas não significativamente reduzida nos animais tratados com as demais doses.

Quanto aos níveis plasmáticos de prolactina, apresentados na Figura 1B, estes se encontraram significativamente elevados nos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina em relação aos grupos controle e tratado com 2,5 mg/kg ($p = 0,002$).

Figura 1 – Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) e prolactina (ng/mL) de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade.



Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística $p < 0,05$.

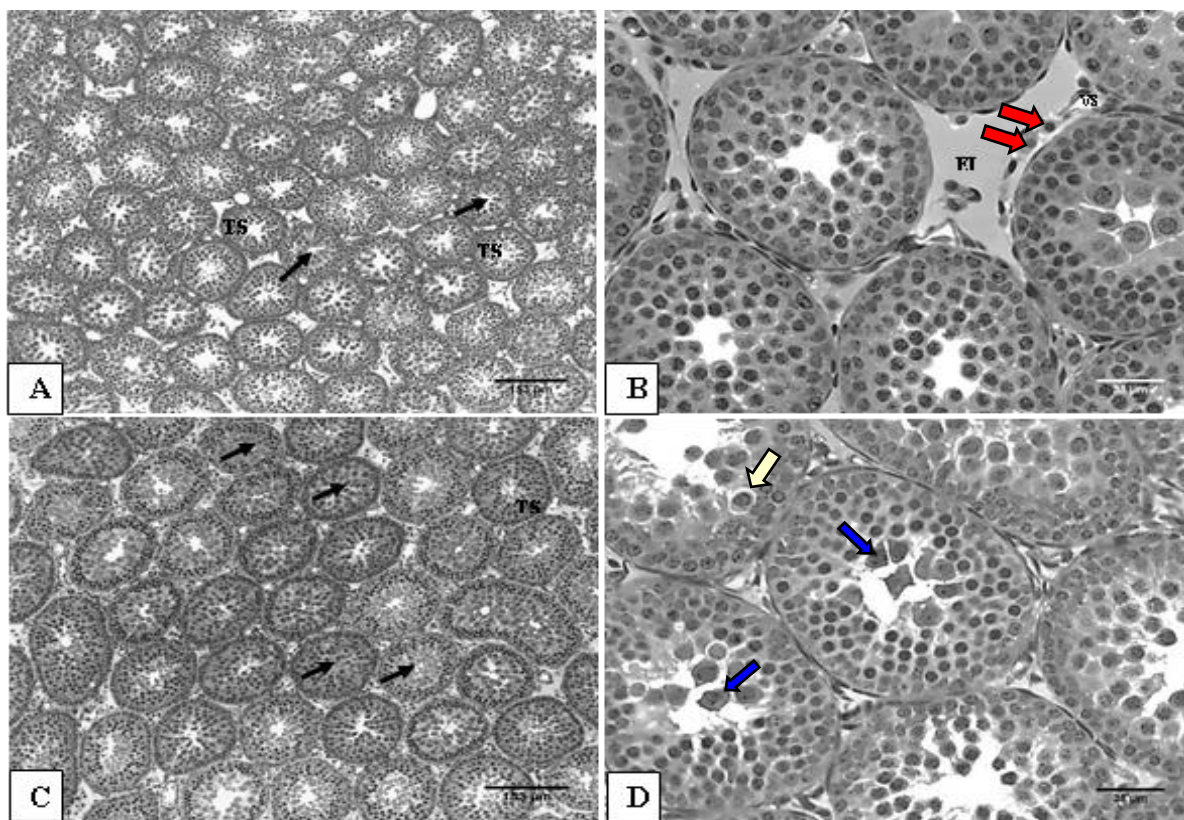
4.5 HISTOPATOLOGIA TESTICULAR

A análise histopatológica de parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes tratados ou não com diferentes doses de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade estão apresentados nas Figuras 2 (A-D) e 3 (A-D).

O grupo controle mostrou parênquima testicular normal, com túbulos seminíferos luminados e não luminados contendo células germinativas preservadas (Figura 2 A-B). Grupo de ratos pré-púberes tratados com 2,5 mg/kg de olanzapina mostrou túbulos seminíferos luminados e não luminados, porém alguns túbulos seminíferos apresentaram células germinativas em processo de morte celular, com núcleo picnótico e descamadas no interior do lume do cordão seminífero (Figura 2 C-D).

No grupo tratado com 5 mg/kg, notou-se a presença de células germinativas em processo de morte celular, com núcleo picnótico e descamadas no lúmen do cordão seminífero (Figura 3 A-B). As principais lesões histopatológicas observadas no grupo tratado com 10 mg/kg foram: espermatogônias em processo de morte celular, células germinativas em descamação para o interior do lúmen, célula gigante sincicial e debris celulares no lúmen. (Figura 3 C-D)

Figura 2 - Fotomicrografias de parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes do grupo controle e grupo tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade.

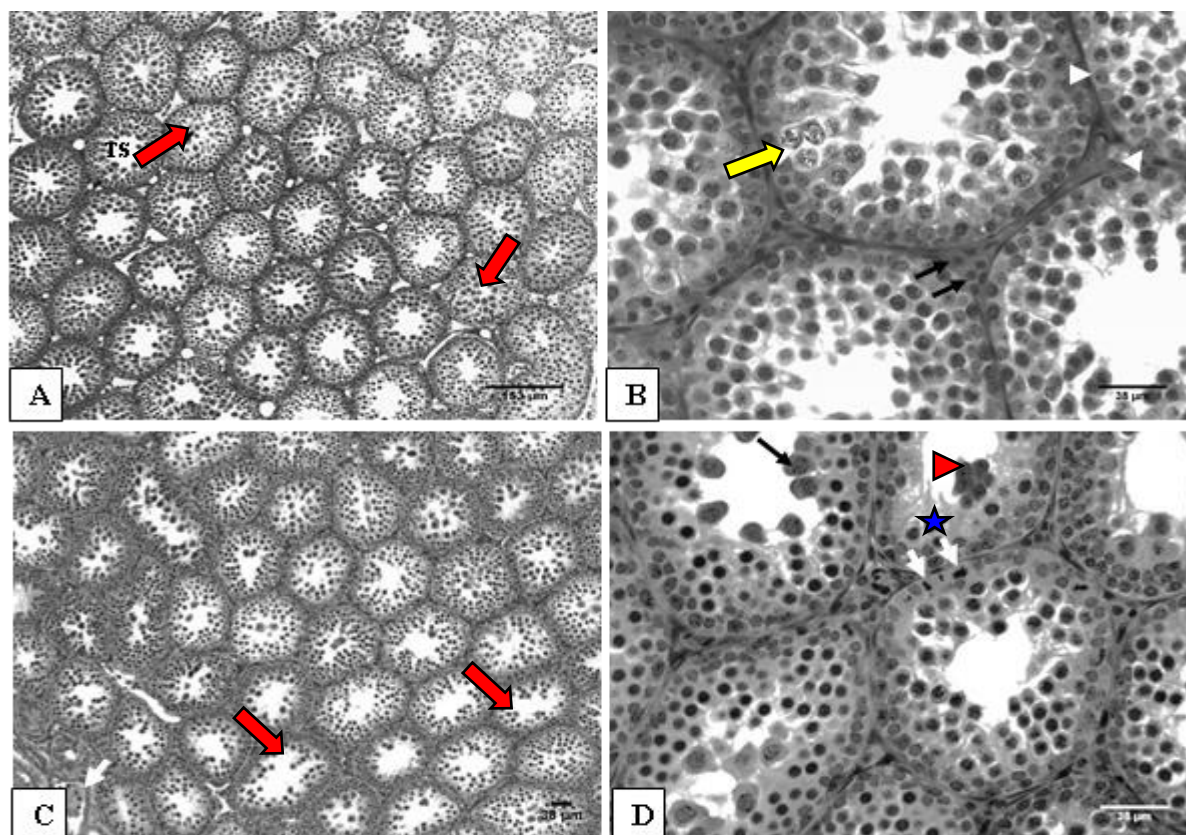


Fonte - O autor, 2017.

Nota:

- A – Parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes do grupo controle. Notar a presença de vários túbulos seminíferos luminados (TS) e em processo de luminação (seta).
- B – Detalhe da secção transversal de túbulos seminíferos de ratos Wistar pré-púberes do grupo controle. Notar a presença de espaço intertubular (EIT), células de Leydig (seta vermelha) e vasos sanguíneos (VS) delimitados por túbulos seminíferos com morfologia normal.
- C – Parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes do grupo tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina. Notar a presença de túbulos seminíferos (TS) e túbulos seminíferos não-luminados (seta).
- D – Detalhe de túbulo seminífero de ratos Wistar pré-púberes do grupo tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina. Notar a presença de células germinativas em processo de morte celular, com núcleo picnótico e descamadas no lúmen do cordão seminífero (seta azul). Observar espermátócito1 em paquíteno (seta amarela).

Figura 3 - Fotomicrografias de parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes dos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 21 dias de idade.



Fonte - O autor, 2017.

Nota:

- A – Parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes do grupo tratado com 5 mg/kg de olanzapina. Observar a presença de túbulos seminíferos e em processo de luminação (seta vermelha).
- B – Detalhe em corte transversal de túbulos seminíferos de ratos Wistar pré-púberes do grupo tratado com 5 mg/kg de olanzapina. Notar a presença de túbulos seminíferos circundados por espaço linfático reduzido apresentando várias células de Leydig (seta). Na região tubular, notar a presença de células de Sertoli (cabeça de seta) e células germinativas em processo de morte celular (seta amarela).
- C – Parênquima testicular de ratos Wistar pré-púberes do grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina. Notar a presença de túbulos seminíferos com baixa celularidade germinativa (seta) e vasos sanguíneos (seta vermelha).
- D – Detalhes de túbulos seminíferos, em secção transversal, de ratos Wistar pré-púberes do grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina. Notar, em secção transversal de túbulos seminíferos, a presença de células germinativas basais - espermatogônias em processo de morte celular (seta branca), células germinativas em descamação para o interior do lúmen (seta), célula gigante sincicial (cabeça de seta vermelha) e debris celulares no lúmen (estrela azul).

5 DISCUSSÃO

A transferência de olanzapina, antipsicótico atípico, através do leite materno foi reportada (GOLDSTEIN et al., 2000; GARDINER et al., 2003; MISHRA; MOHANTY, 2010; AYDIN; NAYIR, 2015). O tratamento com olanzapina é frequentemente associado a várias anomalias metabólicas, incluindo obesidade, dislipidemia, diabetes mellitus (VIDARSDOTTIR et al., 2010).

No presente estudo, ratos pré-púberes tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina durante período lactacional, exibiram, aos 21 dias de idade, aumento significativo em seu peso corporal em relação ao grupo controle. O ganho de peso, em curto período de exposição à terapia antipsicótica com olanzapina, é frequentemente reportado pela literatura (FROTA, 2001; ALMEIDA, 2006; ZHANG, 2014). Conforme descrito por Davey et al. (2012) e Van der Zwaal (2014), o tratamento com olanzapina via ingestão oral ou infusão por minibombas osmóticas afetou significativamente a ingestão alimentar e hídrica e reduziu a locomoção em ratos. Aumento de adiposidade com consequente ganho de peso em ratos também foi reportado por Correll et al. (2011). Em particular, o antagonismo pelo receptor histamínico H1 foi identificado como o principal efeito colateral contribuinte para ganho de peso corporal/obesidade induzida por olanzapina (MATSUI-SAKATA et al., 2005; CORRELL, 2008; LIAN et al., 2014).

O peso testicular é um parâmetro importante para avaliação reprodutiva dos machos, devido à sua alta correlação positiva com a produção de espermatozoides (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Em nosso estudo houve redução significativa do peso testicular de ratos pré-púberes tratados via leite materno com olanzapina nas doses de 5 e 10 mg/kg quando comparado ao grupo controle. Do mesmo modo, Mishra e Mohanty (2010) obtiveram redução neste parâmetro ao tratar camundongos neonatos com olanzapina nas doses de 4, 8 e 10 mg/kg durante o período lactacional.

O peso epididimário dos animais ao 21º dia pós-natal exibiu redução significativa nos animais dos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg em relação ao grupo controle e ao tratado com 2,5 mg/kg. O peso e o tamanho do epidídimo possuem correlação direta com os níveis de testosterona, o que determina não apenas o seu desenvolvimento, mas também, sua atividade funcional (COPPENOLLE et al., 2001; DOHLE, 2003). Deste modo, conforme observado no presente estudo, a hiperprolactinemia decorrente da ingestão via leite materno de olanzapina promoveu diminuição do peso epididimário nos grupos tratados com maiores doses.

O baixo nível de testosterona plasmática no grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina suporta as alterações nos pesos dos testículos e do epidídimo. A próstata igualmente ao epidídimo depende da testosterona para o seu crescimento, diferenciação e manutenção de sua estrutura e função. É na próstata que ocorre a conversão da testosterona ao seu metabólito mais ativo, 5 α -diidrotestosterona, pela atividade de 5 α -redutase (LEE; JANULIS, 1998).

Embora os pesos de órgãos andrógeno-dependentes como a próstata e a glândula seminal não tenham mostrado diferenças significativas entre os grupos experimentais, notou-se, contudo, no primeiro, uma tendência à redução desse parâmetro em todos os grupos de neonatos tratados via leite materno cujas mães tinham recebido olanzapina, via oral, em relação ao grupo controle. Por outro lado, no que tange ao peso da glândula seminal não se evidenciou diferenças significativas entre os grupos estudados.

O índice gonadossomático se caracteriza pelo percentual de massa corporal alocada no testículo (CALDEIRA et al., 2010). Neste trabalho, a diminuição no IGS pode ser justificada pelo aumento médio do peso corporal dos animais e diminuição do peso testicular. Sabe-se que a olanzapina induz substancialmente o ganho de peso de maneira dose-dependente, decorrente de hiperfagia (COOPER et al., 2007). De acordo com Gomendio et al. (2006), o IGS está diretamente relacionado com a produção relativa de espermatozoides em espécies de roedores. Além disso, o peso testicular tem correlação positiva com a população de células de Sertoli e produção espermática diária (FRANÇA et al., 2005). Portanto, nesta fase do desenvolvimento gonadal é bastante provável que a hiperprolactinemia causada pela olanzapina tenha reduzido a população de células de Sertoli e aumentado a degeneração de células germinativas principalmente no grupo de animais tratados com 10 mg/kg o que justifica sobremaneira o baixo IGS deste grupo.

Estudos conduzidos por Mishra e Mohanty (2010), em camundongos neonatos de ambos os sexos, expostos à terapia com olanzapina nas doses de 4, 8 e 10 mg/kg, durante período lactacional, reportaram elevado ganho de peso corporal, assim como significativo aumento da prolactina e redução de testosterona, o que corrobora com nossos achados para roedores.

Parâmetros biométricos como peso testicular e os pertencentes ao compartimento tubular tais como: volume de túbulos seminíferos, de epitélio seminífero e de túnica própria tiveram redução significativa em sua volumetria em ratos pré-púberes expostos à olanzapina,

via leite materno, nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg de olanzapina em relação ao grupo controle, exceto lúmen tubular.

Com relação ao lúmen dos túbulos seminíferos de ratos pré-púberes não foram notadas diferenças significativas em sua volumetria. O retardo no desenvolvimento de células de Sertoli durante o desenvolvimento pós-natal ocasiona atraso na maturação testicular (STOKER et al., 2000), na formação das junções de oclusão, na secreção de fluido e na formação do lúmen tubular (RUSSELL et al., 1998). A interação entre células de Sertoli e destas com as células germinativas são cruciais para a transformação dos cordões seminíferos em túbulos para que ocorra luminação e estabelecimento do processo espermatogênico (ORTH; JESTER, 1995).

Em ratos, a proliferação das células de Sertoli se inicia durante a vida fetal, estendendo-se por duas a três semanas após o nascimento (ORTH, 1982; BORTOLUSSI et al., 1990), coincidindo o encerramento das divisões mitóticas das células de Sertoli com o início de proliferação dos espermátócitos primários (RUSSELL et al., 1998).

Grupo tratado com maior dose de olanzapina, 10 mg/kg, possuiu redução da altura do epitélio germinativo, assim como, células germinativas descamadas para o lume tubular, o que corrobora alterações histopatológicas encontradas neste trabalho, bem como àquelas reportadas por Mishra e Monhanty (2010) ao tratar camundongos neonatos com olanzapina nas doses de 8 e 10 mg/kg.

A regressão significativa do peso testicular nos ratos pré-púberes tratados com olanzapina durante período lactacional e as alterações histopatológicas nesse órgão também foram refletidas pela diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos e do comprimento tubular.

No presente estudo, alterações histopatológicas de parênquima testicular de ratos pré-púberes expostos à olanzapina nas menores doses, via leite materno, durante 21 dias, mostrou a presença de túbulos seminíferos luminados e não luminados, porém alguns túbulos seminíferos apresentaram células germinativas em processo de morte celular, com núcleo picnótico e descamadas no lume do cordão seminífero. Os principais achados histopatológicos observados no grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina foram: espermatogônias em processo de morte celular, células germinativas em descamação para o interior do lúmen, célula gigante sincicial e debris celulares no lúmen, o que corrobora com alguns achados histopatológicos testiculares descritos por Mishra e Mohanty (2010), entre eles, redução da

camada de células germinativas e do diâmetro tubular, assim como presença de células em necrose descamadas no lume.

Sabe-se que processo espermato gênico é regulado por uma complexa inter-relação de sinais endócrinos e parácrinos tendo como principal regulador hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A produção de sinais pulsáteis deste hormônio liberador hipotalâmico sobre as células gonadotrópicas da adenohipófise promove incremento na síntese e secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), os quais agem no testículo (WALKER; CHENG, 2005). A hiperprolactinemia está associada com supressão pulsátil de GnRH (COLAO et al., 2000). Isto resulta na diminuição de FSH e LH com consequente infertilidade (GRATTAN et al., 2007) e disfunção reprodutiva (DICKSON et al., 2000).

No presente estudo, infere-se que a alteração qualitativa do parênquima testicular de ratos pré-púberes, com consequente hipogonadismo testicular, pode estar relacionada à hiperprolactinemia induzida pela olanzapina com repercussões endócrinas negativas sobre o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal.

Sabe-se que esse antipsicótico causa redução dos níveis de LH e de testosterona por supressão do GnRH (GRATTAN et al., 2007). Embora, neste trabalho, não se tenha mensurado os níveis plasmáticos de LH, há evidências de que a supressão da testosterona encontrada, sobretudo, nos animais tratados com a dose mais elevada de olanzapina tenha reduzido os níveis circulantes desse hormônio. Tal entendimento, coaduna-se com os resultados obtidos por Mishra e Mohanty (2010), em que a contínua administração de olanzapina via leite materno por 28 dias aos camundongos neonatos diminuiu significativamente os níveis plasmáticos de LH e de testosterona, tornando esses animais vulneráveis aos efeitos da elevação de prolactina. Vale destacar, que esses autores também reportaram persistência dos efeitos adversos desse fármaco nas doses de 8 e 10 mg/kg em camundongos púberes, aos 63 dias, em que também houve elevação dos níveis prolactina e diminuição dos níveis de LH e testosterona.

Deve-se destacar ainda, a maior sensibilidade dos roedores à hiperprolactinemia (ROURKE et al., 2006). Assim, neste experimento, a exposição dos ratos durante período de desenvolvimento testicular, à terapia com olanzapina via leite materno, do 1º ao 21º dia de vida, tornaria esses animais mais vulneráveis aos efeitos da prolactina. Contudo, esses efeitos sobre a hiperprolactinemia não podem ser totalmente preditivos para seres humanos (HARVEY; EVERETT; SPRINGALL, 2008) pois, para roedores, o mecanismo de interação

desse antipsicótico com a prolactina são diferentes para seres humanos (ROURKE et al., 2006). O grau de disrupção foi reportado ser variável de acordo com a classe de droga antipsicótica e a idade do rato. Efeitos mediados pela olanzapina são mais intensos em ratos juvenis quando comparados a ratos adultos (FELL et al. 2004; 2005).

No compartimento intertubular de todos os grupos de experimentais que receberam doses de olanzapina, via leite materno, houve redução no volume líquido das células de Leydig. O volume líquido das células de Leydig é um parâmetro fortemente correlacionado com a população celular e ou atividade esteroidogênica destas células (SILVA JUNIOR; FRANÇA, 2001). Além disso, França et al. (2005) relacionaram a quantidade e o tamanho de células de Leydig, bem como o volume do retículo endoplasmático a capacidade destas células quanto à produção de testosterona. De acordo com os nossos resultados de volume individual médio de células de Leydig em ratos pré-púberes, a olanzapina, administrada indiretamente, via leite materno, reduziu este parâmetro em todos os grupos tratados.

Sabe-se que testosterona diminui os níveis de receptores de prolactina (SHIMON; MELMED, 2005). Camundongos machos, submetidos à terapia com olanzapina durante período lactacional, mostraram um aumento na imunoreatividade e hipertrofia das células produtoras de prolactina, o que indica grande síntese e liberação de prolactina na circulação (MISHRA; MOHANTY, 2010).

Embora alterações hormonais possam influenciar os mecanismos relacionados com a proliferação, a diferenciação e a função das células de Leydig, promovendo alteração no seu número (KHAKI et al., 2010; SCHOELLER et al., 2012; NASROLAHI et al., 2013), neste experimento, a população de células de Leydig por grama de testículo não foi alterada pelo tratamento, e sim sua função esteroidogênica, a qual foi associada aos baixos níveis plasmáticos de testosterona, sobretudo nos animais tratados com a maior dose do antipsicótico.

Neste estudo, houve redução do diâmetro e do volume individual das células de Leydig em todos os grupos de ratos pré-púberes tratados com olanzapina. O retículo endoplasmático liso (REL) ocupa cerca de 60% da área citoplasmática das células de Leydig (KIANIFARD et al., 2011), sendo a organela mais abundante desta célula (SHIRAI et al., 2013). Portanto, as reduções do volume individual dessas células podem estar relacionadas à diminuição da área ocupada por essa organela. Além disso, o REL possui relação direta com a produção de andrógenos, sendo um dos locais de estoque de enzimas envolvidas na esteroidogênese (KIANIFARD et al., 2011).

A concentração plasmática de testosterona diminui progressivamente para 0,2 ng/mL durante 8 a 24 dias de vida. De 30 a 55 dias, os níveis de testosterona se estabilizam nos ratos adultos (1 - 2 ng/mL) (WALKER; CHENG, 2005). Estudo conduzido Bringel et al. (2013) destacou a importância da testosterona na manutenção qualitativa e quantitativa da espermatogênese. Deste modo, a redução de níveis de testosterona em ratos pré-púberes, sobretudo nos aminaais tratados com 10 mg/kg de olanzapina, aliada à possível diminuição de atuação do FSH sobre as células de Sertoli pode ter levado à diminuição da altura do epitélio seminífero, com descamação de células germinativas para interior do lúmen.

Ademais, Ricci et al. (2009) observaram reduções no compartimento tubular atribuídas à diminuição no tamanho dos túbulos e atrasos no processo espermatogênico. Sabe-se que o efeito mitogênico do FSH sobre as células de Sertoli imaturas é mediado pelo aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (ORTH; BOEHM, 1990). Após este período, as células de Sertoli perdem sua habilidade mitótica e permanecem numericamente estáveis (GONDOS; BERNDSTON, 1993).

A olanzapina é um antipsicótico atípico que se liga a receptores de serotonina 5HT₂, assim como receptores de dopamina D₂ (KELLY; CONLEY, 2004; NASRALLAH, 2008; PARK et al., 2010). Evidências farmacológicas demonstraram que a serotonina no cérebro exerce importante controle na secreção de FSH e LH, por agir na inibição da liberação de GnRH (HEDGER et al., 1995). A inibição desse processo ocorre devido à necessidade de ação sinérgica do FSH e da testosterona na manutenção qualitativa e quantitativa da espermatogênese (GRISWOLD, 1993; SHARPE, 1994). Além disso, a hiperprolactinemia decorrente do tratamento com olanzapina ocasiona supressão dos níveis de GnRH (GRATTAN et al., 2007). Como as gonadotrofinas estão presumidamente diminuídas em função da elevação dos níveis cerebrais de serotonina (HEDGER et al., 1995) e dopamina (FITZGERALD; DINAN, 2008) decorrente do tratamento com olanzapina, infere-se que esse antipsicótico tenha influenciado indiretamente na população de células de Sertoli, o que reduziu o comprimento total dos túbulos seminíferos em todos os grupos tratados.

A prolactina tem sido apontada como responsável pela indução e proliferação das células de Leydig em ratos pré-púberes. O nível de prolactina (PRL) circulante considerado necessário para manutenção da função reprodutiva em roedores varia de 0,003 a 0,015 ng/mL (SERRI et al., 2003; EGLI et al., 2010).

Entretanto, a hiperprolactinemia em animais adultos possui um efeito negativo sobre a produção de testosterona devido à redução na secreção de LH (WILLIAMS et al., 2007).

Segundo Wong et al. (1993) ela pode causar hipogonadismo e diminuição dos níveis de testosterona conforme obtido em nosso estudo, sobretudo nos animais tratados com 10 mg/kg de olanzapina.

No hipotálamo ocorre a síntese de dopamina, que é um importante fator de inibição da prolactina (PIF), atuando através da ligação com receptores do tipo D₂ na membrana celular dos lactotrófos (LAMBERTS et al., 1990; NAHAS, 2006;). Outros PIF são o GABA e o peptídeo associado à gonadotrofina (GAP) (CASTRO E SILVA; CASTRO, 2005). O bloqueio na síntese de dopamina estimula e os neurônios do núcleo paraventricular a produzir o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), promovendo aumento do nível plasmático de prolactina.

Em nosso estudo, a redução no volume total das células de Leydig em ratos pré-púberes tratados com olanzapina pode estar associado à maior estimulação e síntese de prolactina conforme reportado por Williams et al. (2007). Níveis elevados de prolactina promoveram diminuição da concentração de testosterona no grupo tratados com 10 mg/kg durante período lactacional. Essa diminuição plasmática de testosterona está relacionada com a elevação da prolactina e provável redução dos níveis de GnRH e por conseguinte, diminuição de LH e FSH com repercussões negativas sobre o epitélio germinativo.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a olanzapina administrada durante o período lactacional, sobretudo em doses mais elevadas, interferiu sobre eixo hipotálamo-hipófise-gônada de ratos pré-púberes.

A disrupção desse eixo ocasionada pelo antipsicótico atípico em doses mais elevadas reduziu a testosterona e promoveu a hiperprolactinemia. Estas alterações hormonais promoveram ganho de peso corporal, repercussões negativas sobre o peso epididimário e testicular.

A utilização de olanzapina durante o período crítico do desenvolvimento testicular ocasionou alterações de parâmetros morfométricos relacionados diretamente com a população de células de Sertoli e células germinativas bem como, alterações degenerativas e atrofia tubular.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia**. Fundamentos práticos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 40– 313, 2006.
- AYDIN, B.; NAYIR, T. Olanzapine and quetiapine use during breastfeeding excretion into breast milk and safe breastfeeding strategy. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 35, n. 2, p. 206-207, 2015.
- BABU, G. N.; DESAI, G; CHANDRA, P. S. Antipsychotics in pregnancy and lactation. **Indian J. Psychiatry.**, v. 57, Suppl. 2, p. 303-307, 2015.
- BORTOLUSSI, M. et al. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotrophin receptors in rat testis from birth to puberty. **Cell Tissue Res.**, v. 260, p. 185-191, 1990.
- BRINGEL, S. S. et al. Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. **J. Appl. Toxicol.**, v. 33, n. 1, p. 24-31, 2013.
- BUGALHO, P.; CORREA, B.; BAPTISTA, M. V. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: bases científicas e modelos de estudo. Artigo de revisão, **Acta. Med. Port.**, v. 19, p. 257-268, 2006.
- CALDEIRA, B. C. et al. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyonthus*, Linnaeus, 1766). **Rev. Ceres**, v. 57, n. 5, p. 569-575, 2010.
- CASTRO E SILVA, E.; CASTRO, L. Regulação da secreção de prolactina. In: Antunes-Rodrigues, J, Moreira, AC, Elias, L. L. K, Castro, M (eds). **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 2005.
- CAMERON, D. F. et al. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. **Anat. Rec.**, v. 213, n. 1, p. 53-62, 1985.
- COLAO, A. et al. Prolactinomas in adolescents: persistent bone loss after 2 years of prolactin normalisation. **Clin. Endocrinol.**, v. 32, p. 319-327, 2000.
- COSTA, A. M. N. et al. A naturalistic, 9-month follow-up, comparing olanzapine and conventional antipsychotics on sexual function and hormonal profile for males with schizophrenia Brazil. **J. Psychopharmacol.**, v. 21, n. 2, p.165-170, 2007.
- COOPER, G. D. et al. Effects of olanzapine in male rats: enhanced adiposity in the absence of hyperphagia, weight gain or metabolic abnormalities. **J. Psychopharmacol.**, v. 21, n. 4, p. 405-413, 2007.
- COPPENOLLE, V. F. Effects of hyperprolactinemia on rat prostat growth: evidence of andrógeno-dependence. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, p. 120-129, 2001.
- CORRELL, C. Monitoring and management of antipsychotic-related metabolic and endocrine adverse events in pediatric patients. **Int. Rev. Psychiatry**, v. 20, p. 195–201, 2008.

CORRELL, C. U.; LENCZ, T.; MALHOTRA, A. K. Antipsychotic drugs and obesity. **Trends Mol. Med.**, v. 17, p. 97–107, 2011.

CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the society of toxicology pathology. **Brith Defects Research**, v. 68, p. 408-415, 2003.

DAVEY, K. J. Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. **Psychopharmacology**, v. 221, p. 155-169, 2012.

DICKSON, R. et al. Hormonal side effects in women: typical versus atypical antipsychotic treatment. **J. Clin. Psychiatry**, v. 61, suppl. 3, p. 10-15, 2000.

DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. Androgens and male fertility. **World J. Urol.**, v. 21, p. 341-345, 2003.

DOSSENBACH, M. et al. Prevalence of sexual dysfunction in patients with schizophrenia: international variation and underestimation. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 8, p. 195-201, 2005.

EGLI, M.; LEENERS, B.; KRUGER, T. H. C. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction. **Reproduction**, v. 140, p. 643–654, 2010.

FELL, M. J.; MARSHALL, K. M.; NEILL, J. C. Effects of the classical antipsychotic haloperidol and atypical antipsychotic risperidone on weight gain, the oestrous cycle and uterine weight in female rats. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 14, p. 385–392, 2004.

FELL, M. J.; NEILL, J. C.; RAO, C.; MARSHALL, K. M. Effects of sub-chronic antipsychotic drug treatment on body weight and reproductive function in juvenile female rats. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 499–507, 2005.

FITZGERALD, P.; DINAN, T. G. Prolactin and dopamine: what is the connection? a review article. **J. Psychopharmacol.**, v. 22, Suppl. 2, p. 12–19, 2008.

FOSTER, R. A. **Pathology of scrotal contents and accessory sex glands of domesticated animals**. Proceeding of the Reproductive Symposium American College of Theriogenology and Society Theriogenology Hating NE, USA, p. 37-49, 1997

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

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: RUSSEL, L. D. **Male reproduction; a multidisciplinary overview**. Ed. Madrid: Churchill Comunitions Europe España. cap 16, p.197-213, 1998.

FROTA, L. H. Cinquenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria. **J. Bras. Psiquiat.**, v. 50, p. 298-317, 2001.

GARDINER, S. J. et al. Transfer of olanzapine into breast milk calculation of infant drug dose and effect on breast fed infants. **Am. J. Psychiatry**, v. 160, p. 1428–1431, 2003.

GOLDSTEIN, D. J. et al. Olanzapine exposed pregnancies and lactation: early experience. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 20, p. 399–403, 2000.

GOMENDIO, M. et al. Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, n. 41, p. 15113–15117, 2006.

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

GRATTAN, D. R. et al. Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. **Endocrinology**, v. 148, p. 4344–4351, 2007.

GRIWOLD, M. D. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: RUSSEL, L. D.; GRISWOLD, M. D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993, cap. 23, p. 493–508.

HARVEY, P. W., EVERETT, D. J., SPRINGALL, C. J. Adverse effects of prolactin in rodents and humans: breast and prostate cancer. **J. Psychopharmacol.**, v. 22, p. 20–27, 2008.

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

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; LINCOLN, G. A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 54, p. 209–213, 1978.

HYUN, J. S. et al. Localization of peripheral dopamine D1 and D2 receptors in rat corpus cavernosum. **BJU Int.** v. 90, p.105–112, 2002.

KHAKI, A. et al. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. **Phytotherapy Res.**, v. 24, n. 9, p. 1285–1291, 2010.

KELLY, D. L.; CONLEY, R. R. Sexuality and schizophrenia: a review. **Schizophr. Bull.**, v. 30, n. 4, p. 767–779, 2004.

KIANIFARD, D. et al. The histological, histomorphometrical and histochemical changes of testicular tissue in the metmorfin treated and untreated streptozotocin-induced adult diabetic rats. **Vet. Res. Forum**, v. 2, n. 1, p. 13–24, 2011.

KONARZEWSKA, B. et al. Effects of risperidone and olanzapine on reproductive hormones, psychopathology and sexual functioning in male patients with schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 129–139, 2009

LAMBERTS, S. W. et al. Regulation of prolactine secretion at the level of the lactotroph. **Physiol. Rev.**, v.70, p.279 - 318, 1990.

LEE, C.; JANULIS, L. Prostate gland. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**. Ed. Inchief. v. 4, p.77-85, 1998.

LESAGE, J. et al. Hypothamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and gonadal and adrenal activities during early postnatal period in the rat. **Neurochem. Res.**, v. 21, p. 87-96, 1996.

LIAN, J. et al. Betahistine ameliorates olanzapine-induced weight gain through modulation of histaminergic, NPY and AMPK pathways. **Psychoneuroendocrinology**, v. 48, p. 77-86, 2014.

MATSUI-SAKATA, A.; OHTANI, H.; SAWADA, Y. Receptor occupancy-based analysis of the contributions of various receptors to antipsychotics-induced weight gain and diabetes mellitus. **Drug Metab. Pharmacokinet.**, v. 20, p. 368–37, 2005.

MEACHEM, S. J. et al. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 145, p. 561-571, 2001.

MISHRA, A. C.; MOHANTY, B. Lactational exposure to atypical antipsychotic drugs disrupts the pituitary-testicular axis in mice neonates during post-natal development. **J. Psychopharmacol.**, v. 24, n. 7, p. 1097-1104, 2010.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

NAHAS, E. A. P. et al. Estados hiperprolactinêmicos: inter-relações com o psiquismo. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 33, n. 2, p. 68-73, 2006.

NASRALLAH, H. A. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. **Mol. Psychiatr.**, v. 13, p. 27–35, 2008.

NASROLAHI, O. et al. Honey and metmorfin ameliorated diabetesinduced damages in testes of rat: correlation with hormonal changes. **Iran. J. Reprod. Med.**, v. 11, n. 12, p. 1013-1020, 2013.

OLIVEIRA, J. S. et al. Protein restriction during intrauterine and lactation periods: effects on testicular development in pre-puberty rats. **Acta Scient. Biol. Science**, Maringá, v. 37, n. 1, p. 107-112, Jan.Mar., 2015.

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

ORTH, J. M.; BOEHM, R. Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cell by a perfusion toxin-sensitive mechanism. **Anat. Rec.**, v. 226, p. 230-327, 1990.

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

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

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

ÖSZ, B. E. et al. Olanzapine and risperidone influence on gestation and fetal development in wistar rats. **Farmacia**, v. 62, n. 2, p.413-421, 2014,

OTTH, C. et al. Novel identification of peripheral dopaminergic D2 receptor in male germ cells. **J. Cell. Bioch.**, v. 100, p.141-150, 2007.

PARK, S. et al. Olanzapine, not resperidone, exacerbates b-cell function and mass in ovariectomized diabetic rats and estrogen replacement reverses them. **J. Psychopharmacol.**, v. 24, n. 7, p. 1105–1114, 2010.

RAGGI, M. A. et al. Therapeutic drug monitoring: chemical-clinical correlations of atypical antipsychotic drugs, **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p. 1397-1409, 2002.

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

RICCI, G. et al. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. **Andrologia**, v. 41, n. 6, p. 361-368, 2009.

RIJCHEN, C. A. W. et al. 2003. Schizophrenia care and the Dutch community pharmacy: the unmet needs. **Int. J. Pharm. Pract.**, v. 11, p. 97–104, 2003.

ROURKE, C.; STARR, K. R.; REAVILL, C. et al. Effects of the atypical antipsychotic olanzapine and risperidone on plasma prolactin levels in male rats: a comparison with clinical data. **Psychopharmacology**, v. 184, p. 107–114, 2006.

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

SARAIVA, K. L. A. et al. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. **Reprod. Toxicol.**, v. 22, n. 4, p. 754-759, 2006.

SCHOELLER, E. L. et al. Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1869-1878, 2012.

SERRI, O.; CHIK, C. L.; UR, E.; EZZAT, S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. **CMAJ**, v. 169, p. 575–581, 2003.

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

SHIMON, I.; MELMED, S. Anterior pituitary hormones. In: _____. **Endocrinology human** Press, 2005. p. 197-210.

SHIRAI, M. et al. Male Sprague-dawley rats exposed to in utero di(n-butyl) phthalate dose dependent and age-related morphological changes in Leydig cell smooth endoplasmic reticulum. **Toxicologic Pathology**, v. 41, n. 7, p. 984-991, 2013.

SILVA JUNIOR, V. A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 46, n. 2, p. 157-166, 2006.

SILVA JUNIOR, V. A.; FRANÇA, L. F. Ultra-estrutura de células de Leydig e esteroidogênese em diferentes espécies de mamíferos. **Ciênc. Vet. Tróp.**, Recife, v. 3, n. 3, p. 117-134, 2001.

SOLIMAN, H. M. et al. Light and electron microscopic study on the effect of antischizophrenic drugs on the structure of seminiferous tubules of adult male albino rat. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 52, n. 4, p. 335-349, 2014.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: base neurocientífica e aplicações práticas**. 4. ed, Rio de Janeiro: Medsi, 617p., 2014.

STOKER, T. E. et al. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. **Toxicol. Sci.**, v. 58, p. 50-59, 2000.

TENORIO, B. M. et al. Testicular development evaluation in rats exposed to 60Hz and 1mT electromagnetic field. **J. Appl. Toxicol.**, v. 31, p. 223-30, 2011.

VALENÇA, R. M. B. et al. Morphometry and histomorphometry of testis in crossbred pigs fed diets with different proteins levels. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 5, p. 1329-1338, 2013.

VAN DER ZWAAL, E. M. Modelling olanzapine-induced weight gain in rats. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 17, p. 169-186, 2014.

VIDARSDOTTIR, S. et al. Short-term treatment with olanzapine does not modulate gut hormone secretion: olanzapine disintegrating versus standard tablets. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 162, p. 75-83, 2010.

YASSA, R.; LAL, S. Impaired sexual intercourse as a complication of tardive dyskinesia. **Am. J. Psychiatry**, v. 142, n. 12, p. 1514-1515, 1985.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, p. 15-28, 2005.

WONG, E. M. et al. Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 19004-19012, 1993.

WILLIAMS, V. L. Common and specific effects of two major forms of prolactin in the rat testis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 293, p. 1795-1802, 2007.

ZHANG, Q. et al. Effects of olanzapine on the elevation of macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in female rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 28, n. 12, p. 1161-1169, 2014.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA TESTICULAR E ENDÓCRINA DE RATOS WISTAR ADULTOS APÓS TRATAMENTO COM OLANZAPINA DURANTE PERÍODO LACTACIONAL

RESUMO

A olanzapina é um antipsicótico atípico com ação antagonista para receptores de serotonina e dopamina utilizados na prática psiquiátrica. Com base na evidência farmacológica de que esta droga pode interferir no controle das funções reprodutivas do macho, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de olanzapina, via leite materno, e suas repercussões nos parâmetros morfométricos testicular e endócrino de ratos Wistar adultos após exposição lactacional. Após o nascimento, vinte e quatro ratos recém-nascidos foram selecionados aleatoriamente para a composição dos seguintes grupos: I) grupo controle de neonatos cujas mães receberam solução salina a 0,9% NaCl (n = 6); II) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 2,5 mg/kg de olanzapina (n = 6); III) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 5 mg/kg de olanzapina (n = 6); e IV) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com olanzapina 10 mg/kg (n = 6). Após o desmame, os animais foram separados das respectivas mães, durante os quais o tratamento com o antipsicótico foi interrompido. Aos 90 dias de idade, estes animais foram sacrificados e tiveram seus órgãos sexuais e perfis endócrinos avaliados. Os testículos foram rotineiramente processados para inclusão em resina plástica (metacrilato de glicol). Secções histológicas com 4 µm de peso foram coradas por azul de toluidina/borato de sódio 1% e analisadas histometricamente. Foram colhidas amostras de sangue para dosagens de testosterona e prolactina. Os resultados mostraram ganho de peso corporal nas doses mais elevadas e pesos reduzidos nos testículos, epidídimo, próstata e glândula seminal. A análise histopatológica e histomorfométrica da espermatogênese indicou degeneração testicular. O hipogonadismo assim observado pode ser mediado pela hiperprolactinemia induzida por olanzapina, que inibe ainda mais a secreção de testosterona. Os processos degenerativos testiculares associados às alterações hormonais nos ratos adultos nos levam a acreditar que este evento é irreversível mesmo após a interrupção do antipsicótico após o desmame. Assim, impacto adverso foi persistente até a idade adulta com doses mais elevadas do fármaco, como evidenciado pela análise do peso testicular, histologia e perfis hormonais de ratos pós-púberes expostos lactacionalmente como recém-nascidos e pubescentes.

Palavras chave: Olanzapina. Espermatogênese. Rato. Leite. Testosterona. Prolactina.

ABSTRACT

Olanzapine is an atypical antipsychotic with antagonistic action for serotonin and dopamine receptors used in psychiatric practice. Based on the pharmacological evidence that this drug may interfere in the control of male reproductive functions, the present study aims to evaluate the effects of administration of olanzapine via maternal milk and its repercussions on the testicular and endocrine morphometric parameters of lactational exposed adult Wistar rats. After birth, twenty-four male neonate rats were randomly selected for the composition of the following groups: I) control group of neonates whose mothers received 0.9% NaCl saline solution (n = 6); II) group of neonates whose mothers were treated with 2.5 mg/kg olanzapine (n = 6); III) group of neonates whose mothers were treated with 5 mg/kg olanzapine (n = 6); And IV) group of neonates whose mothers were treated with olanzapine 10 mg/kg (n = 6). After weaning, the animals were separated from their respective mothers, during which treatment with the antipsychotic was stopped. At 90 days of age, these animals were sacrificed and had their sex organs and endocrine profiles evaluated. Testis were routinely processed for inclusion in plastic resin (glycol methacrylate). Histological sections with 4 μ m of the weight and stained by toluidine blue/sodium borate 1% and analyzed histometrically. Blood samples were collected for testosterone and prolactin dosages. The results showed body weight gain at the highest doses, and reduced testis, epididymis, prostate and seminal gland weights. Histopathologic and histomorphometric analysis of spermatogenesis indicated testicular degeneration. The hypogonadism thus observed might be mediated by olanzapine-induced hyperprolactinemia, which further inhibited secretion of testosterone. Testicular degenerative processes associated with hormonal changes in adult rats have a significance for this irreversible event even after discontinuation of the antipsychotic after weaning. Thus, adverse impact was persistent until adulthood with higher doses of the drug as evidenced by the analysis of testicular weight, histology and hormonal profiles of post-pubertal rat lactationally exposed as neonates and pubescents.

Keywords: Olanzapine. Spermatogenesis. Rat. Milk. Testosterone. Prolactin

1 INTRODUÇÃO

A olanzapina é um agente antipsicótico atípico de segunda geração amplamente empregado na prática psiquiátrica. Esses antipsicóticos se ligam aos receptores de serotonina (5HT_{2A-2B-2C}) e de dopamina D₂ (SWEETMAN, 2005; PARK et al., 2010; NASRALLAH, 2008). Ela tem sido usada para tratamento da esquizofrenia (KAPUR; REMINGTON, 2001) e do transtorno bipolar (DE OLIVEIRA; JURUENA, 2006) devido aos efeitos extrapiramidais reduzidos. No entanto, o ganho de peso corporal e a disfunção sexual/reprodutiva são dois efeitos adversos que causam preocupação (HADDAD, 2005; WETTERLING, 2001).

Adicionalmente, estudos clínicos e laboratoriais comprovaram a transferência de olanzapina através do leite materno por meio de cromatografia líquida (AYDIN; NAYIR, 2015; GARDINER et al., 2003; GOLDSTEIN et al., 2000; ILETT et al., 2004).

Evidências farmacológicas demonstraram que a serotonina no cérebro exerce importante controle na secreção de FSH e LH, por agir na inibição da liberação de GnRH (HEDGER et al., 1995). A inibição desses processos ocorre devido à necessidade de ação sinérgica do FSH e da testosterona na manutenção qualitativa e quantitativa da espermatogênese (GRISWOLD, 1993; SHARPE, 1994). Sabe-se que a olanzapina causa elevação nos níveis plasmáticos de prolactina (MISHRA; MOHANTY, 2010). Assim, tem-se que hiperprolactinemia decorrente do tratamento com olanzapina ocasiona supressão dos níveis de GnRH (GRATTAN et al., 2007). Como esses hormônios estão presumidamente diminuídos em função da elevação dos níveis cerebrais de serotonina (HEDGER et al., 1995) e de dopamina (FITZGERALD; DINAN, 2008) provocado pelo tratamento com olanzapina, infere-se que esse antipsicótico possa influenciar indiretamente na população de células de Sertoli nos animais tratados com olanzapina com repercussões sobre a espermatogênese.

Estudos conduzidos por Hyun et al. (2002) e Otth et al. (2007) relataram que a presença de receptores dopaminérgicos em testículos de ratos pode sugerir uma interação desconhecida entre o sistema nervoso e o reprodutivo. Considerando que os receptores de dopamina estão presentes em células germinativas dos túbulos seminíferos os efeitos da olanzapina sobre a espermatogênese pode se dar dois mecanismos: a redução do nível de testosterona ou de uma ação direta nas células germinais (SOLIMAN, et al., 2014).

Há relatos conflitantes sobre o efeito que drogas antipsicóticas causam na função do eixo hipófise-gonadal, incluindo distúrbios nas concentrações de hormônios sexuais e desenvolvimento dos órgãos genitais (ZHANG et al., 2007; SMITH et al., 2002).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de diferentes doses de olanzapina no período lactacional e suas repercussões sobre os parâmetros morfométricos testiculares e endócrinos em ratos Wistar adultos; sobretudo com investigação sobre alterações qualitativas e quantitativas da espermatogênese.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 12 ratas Wistar prenhes (230-280g) (*Rattus norvegicus*, var. albinus) pertencentes ao biotério da Área de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, as quais foram mantidas em temperatura $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e comida (Labina, Purina®, Brasil) foram oferecidas *ad libitum* até o final do experimento. Diariamente, as mães passaram a receber dose única de olanzapina diluída em solução salina NaCl 0,9 % ou veículo (solução salina NaCl 0,9%) via oral, por meio de gavagem. Esse tratamento foi instituído durante o período de 1º ao 21º dia pós-parto, de modo que os animais recebessem, indiretamente, a olanzapina via leite materno até o desmame.

A dose foi calculada como a base peso equivalente e administrada às mães de acordo com o seguinte protocolo: I) grupo controle solução salina NaCl 0,9%; II) grupo tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina; III) grupo tratado com 5 mg/kg de olanzapina; e grupo IV) tratado com 10 mg/kg de olanzapina.

Vinte e quatro ratos neonatos machos foram escolhidos ao acaso para a composição dos seguintes grupos: I) grupo controle de neonatos cujas mães receberam solução salina NaCl 0,9% (n=6); II) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 2,5 mg/kg de olanzapina (n = 6); III) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 5 mg/kg de olanzapina (n=6); e IV) grupo de neonatos cujas mães foram tratadas com 10 mg/kg de olanzapina (n=6).

Após o desmame, os ratos neonatos foram separados de suas respectivas mães, período em que foi interrompido o tratamento com o antipsicótico. Somente aos 90 dias de idade, esses animais foram sacrificados e tiveram seus órgãos sexuais e perfis endócrinos avaliados.

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Protocolo nº 23082008993/2013, sob Registro de Licença nº 073/2013 - CEUA/UFRPE em conformidade com os princípios básicos para pesquisa com animais.

2.2 PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Aos 90 dias de idade, os ratos Wistar machos de cada grupo foram heparinizados (125 UI/100g de peso corporal) e após 15 minutos, anestesiados via intramuscular com associação de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). Posteriormente foi realizada coleta sangue total por punção no seio venoso (confluência das veias cavas), centrifugação, acondicionamento de alíquotas de plasma sanguíneo em tubos plásticos de 2 mL e estocados a -20 °C para posterior dosagem de testosterona e prolactina. Após coleta de sangue feita realizada perfusão intracardiaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L) e nitroprussiato (100 mg/L), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Após lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído a 4% (Vetec®, Brasil), em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos. Após a perfusão com solução fixadora foram removidos e pesados em balança digital (Kern® 410, Brasil) com precisão de quatro casas decimais os testículos, epidídimos, próstata e glândula seminal. Após as medidas, os órgãos coletados foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à refixação na mesma solução de perfusão. Para estudo ao microscópio de luz, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Leica®, Brasil). Foram realizados cortes histológicos de 4 µm em micrótomo rotativo de lâmina de vidro, corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados morfolologicamente e morfometricamente em microscópio (Leica ICC50®, Brasil). Após preparação das lâminas histológicas, fotos dos componentes testiculares foram capturadas usando o microscópico óptico acoplado ao computador. Para análise histomorfométrica testicular foi usado o software (ImageJ, EUA).

O índice gonadossomático (IGS), que corresponde a uma relação percentual entre o peso testicular o peso corporal, foi calculado a partir dos pesos corporal e testicular obtidos no dia da eutanásia de acordo Tenorio et al. (2011) com a seguinte fórmula:

$$\text{IGS (\%)} = [\text{peso testicular} / \text{peso corporal}] \times 100$$

A análise histométrica dos testículos e a determinação do número de células de Sertoli foi realizada através da histologia quantitativa dos testículos, executadas de acordo com a metodologia descrita por Bringel (2013).

2.3 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (%) E VOLUME DOS COMPONENTES DO TESTÍCULO

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de grátula micrométrica (Olympus®) com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400x. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente totalizando 6615 pontos para cada animal.

De acordo com Valença et al. (2013), o volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi criado pelo o produto de pontos percentuais dos componentes testiculares (densidade volumétrica %) e volume dos testículos (testículos líquido do testículo).

O testículo foi dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lúmen; enquanto no segundo foram investigados: células de Leydig, células do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e espaço linfático. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04, o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo, expresso em μL foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido do testículo (g). O valor deste último foi obtido pela subtração de 6,5% da albugínea do peso testicular bruto (BRINGEL et al. 2013).

2.4 DIÂMETRO TUBULAR, ALTURA DE EPITÉLIO SEMINÍFERO E COMPRIMENTO TOTAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidos em aumento de 100x usando retículo micrométrico linear (10 mm/100 - Olympus®) calibrado com um micrômetro padrão. A medida de diâmetro tubular médio para cada rato foi obtida a partir da mensuração de 15 túbulos escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. A altura do epitélio

foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, tomaram-se duas medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lúmen e epitélio germinativo determinando-se, desta forma, a altura média do epitélio seminífero.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada conforme demonstrada por Tenorio et al. (2011).

$$CT = VTS/\pi R^2$$

Em que VTS representa o volume total de túbulos seminíferos e πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

2.5 CONTAGEM DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DE SERTOLI POR SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS

A estimativa da população de células de Sertoli em ratos adultos foi estabelecida de acordo com o método proposto por Russell et al. (1990). Nestas contagens, foram utilizadas cinco secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Contaram-se nucléolo de células de Sertoli por túbulo seminífero.

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

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

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de retículo micrométrico linear (10 mm/100 - Olympus) adaptado a uma das oculares de 10x e acoplada à objetiva de 100x, propiciando um aumento final de 1000x.

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

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

2.6 MORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG

Para o cálculo do diâmetro nuclear de células de Leydig, 30 perfis nucleares de células de Leydig foram capturados em objetiva de ampliação de 1000x e analisados com o software LAZ EZ 1.6.0. O diâmetro nuclear foi obtido por meio de duas medições diametralmente opostas, de acordo com a metodologia proposta por Saraiva et al. (2006).

No tocante à densidade volumétrica de células de Leydig (%), utilizou-se um retículo com 441 pontos (acoplado em microscópio), e ampliados 1000x. Mil pontos foram contados, considerando núcleo e citoplasma da célula. A partir dessa proporção foram calculados o volume citoplasmático e o volume celular:

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig se obteve o número total destas células por testículos. A divisão desse valor pelo peso líquido do testículo forneceu o número de células de Leydig por grama de testículos.

2.7 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA

O sangue coletado dos ratos adultos pelo método intracardíaco foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a fim de preparar o soro para medições de testosterona e prolactina. A determinação quantitativa de testosterona e prolactina foi realizada pela técnica de quimioluminescência empregando-se kits comerciais (Beckman Coulter®, EUA), e os

ensaios foram realizados através do equipamento Beckman Coulter Access 2. Os resultados foram reportados como ng/mL.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos através da estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão); e quando necessárias estas médias foram avaliadas mediante técnica de análise de variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações com o intuito de analisar quais grupos diferiram entre si. Para dados que não seguiram as tendências de normalidade, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com posterior teste post-hoc de Dunn. Para as construções gráficas, utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL, PESO DE ÓRGÃOS ANDRÓGENO-DEPENDENTES E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

O peso corporal de ratos adultos dos grupos controle e tratados com olanzapina são apresentados na Tabela 1. Aos 90 dias pós-natal houve um aumento extremamente significativo neste parâmetro entre os animais dos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg em relação aos grupos controle e de 2,5 mg/kg.

O peso do testículo e peso líquido testicular do grupo tratado com 10 mg/kg mostraram redução significativa nesses parâmetros em relação aos grupos controle e tratados com 2,5 e 5 mg/kg. Com relação ao índice gonadossomático - IGS (%) mostrado na Tabela 1 houve redução extremamente significativa entre o grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina em relação ao grupo controle. Notou-se também redução significativa desse parâmetro entre o grupo tratado com 5 mg/kg e o grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com 2,5 mg/kg e grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Peso corporal (g), peso de órgãos sexuais (g) e índice gonadossomático - IGS (%) de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 90 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Peso corporal	260,20 ± 6,17 ^a	273,2 ± 7,02 ^a	288,0 ± 15,9 ^b	302,8 ± 7,50 ^b
Testículo	1,57 ± 0,13 ^a	1,53 ± 0,10 ^a	1,41 ± 0,05 ^a	1,21 ± 0,22 ^b
IGS (%)	1,20 ± 0,10 ^a	1,12 ± 0,08 ^{ab}	0,99 ± 0,10 ^b	0,80 ± 0,14 ^c
Peso líquido testicular	1,46 ± 0,12 ^a	1,43 ± 0,09 ^a	1,34 ± 0,05 ^a	1,13 ± 0,21 ^b
Epidídimo	0,61 ± 0,13 ^a	0,60 ± 0,14 ^a	0,62 ± 0,05 ^a	0,41 ± 0,04 ^b
Próstata	0,68 ± 0,17 ^a	0,50 ± 0,16 ^a	0,56 ± 0,12 ^a	0,44 ± 0,08 ^b
Glândula Seminal	1,98 ± 0,43 ^a	1,45 ± 0,18 ^a	1,13 ± 0,13 ^b	1,14 ± 0,22 ^b

Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

Conforme mostrado na Tabela 1, o peso de epidídimo e da próstata de ratos adultos quando tratados com 10 mg/kg de olanzapina exibiram redução significativa em relação aos grupos controle e tratados com 2,5 e 5 mg/kg. No que tange ao peso da glândula seminal mostrado na Tabela 1 houve diferença significativa entre os grupos tratados com 5 e 10 mg/kg com olanzapina em relação aos grupos controle e tratado com dose de 2,5 mg/kg.

4.2 HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR

Dados referentes aos parâmetros volumétricos dos constituintes do parênquima testicular de ratos Wistar adultos, aos 90 dias de idade, dos grupos controle e tratados com diferentes doses de olanzapina durante o período lactacional são apresentados na Tabela 2.

Conforme demonstrado na Tabela 2, a administração de olanzapina reduziu significativamente o volume ocupado por túbulos seminíferos em animais do grupo experimental tratados com 10 mg/kg em relação aos grupos controle e de 2,5 mg/kg ($p = 0,002$). Entre os grupos tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina não houve diferença significativa.

De modo análogo, pode-se notar na Tabela 2 que houve redução significativa da volumetria total de epitélio seminífero em ratos tratados com a maior dose de olanzapina, 10 mg/kg, em relação aos grupos controle e tratado com 2,5 mg/kg.

O volume de lúmen tubular de ratos adultos não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais. No tocante à volumetria de túnica própria, houve aumento muito significativo desse parâmetro nos animais do grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina em relação ao grupo controle ($p = 0,0001$). Grupos tratados com olanzapina não diferiram entre si (Tabela 2).

Constou-se redução significativa no volume total das células das células de Leydig no grupo de ratos adultos tratados com 10 mg/kg de olanzapina em relação aos grupos controle e tratados com 2,5 e 5 mg/kg (Tabela 2). No tocante à volumetria de vasos sanguíneos do parênquima testicular de ratos adultos, não foram constatadas alterações significativas entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Com relação à volumetria do espaço linfático do parênquima testicular, notou-se aumento significativo no grupo tratado 10 mg/kg de olanzapina em relação ao grupo controle. Entretanto todos grupos tratados não diferiram em relação ao grupo controle.

Em relação ao volume de células do tecido conjuntivo presente no parênquima testicular dos ratos adultos, houve aumento significativo do grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina com relação aos demais grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2 - Volume (μL) dos componentes testiculares de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 90 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Túbulo seminífero	$1,31 \pm 0,13^a$	$1,25 \pm 0,08^a$	$1,20 \pm 0,05^{ab}$	$1,00 \pm 0,19^b$
Epitélio seminífero	$1,10 \pm 0,09^a$	$1,04 \pm 0,08^a$	$0,99 \pm 0,06^{ab}$	$0,83 \pm 0,17^b$
Lúmen tubular	$0,16 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,03$
Túnica própria	$0,028 \pm 0,003^a$	$0,034 \pm 0,005^{ab}$	$0,035 \pm 0,007^{ab}$	$0,042 \pm 0,007^b$
Células de Leydig	$0,031 \pm 0,005^a$	$0,024 \pm 0,003^a$	$0,027 \pm 0,005^a$	$0,020 \pm 0,001^b$
Vaso sanguíneo	$0,055 \pm 0,049$	$0,044 \pm 0,048$	$0,030 \pm 0,003$	$0,017 \pm 0,013$
Espaço linfático	$0,08 \pm 0,02^a$	$0,07 \pm 0,03^a$	$0,10 \pm 0,01^a$	$0,13 \pm 0,01^b$
Células do tecido conjuntivo	$0,006 \pm 0,002^a$	$0,006 \pm 0,003^a$	$0,006 \pm 0,002^a$	$0,010 \pm 0,003^b$

Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

Em ratos adultos, redução extremamente significativa foi observada na medida dos diâmetros dos túbulos seminíferos nos grupos tratados com olanzapina durante período

lactacional em relação ao grupo controle ($p = 0,004$) (Tabela 3). Do mesmo modo, em relação à altura de epitélio seminífero, observou-se redução significativa nos grupos tratados com olanzapina em relação ao grupo controle (Tabela 3).

No que tange ao comprimento total dos túbulos seminíferos dos ratos adultos apresentado na Tabela 3, houve redução significativa desse parâmetro no grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina durante o período lactacional em relação aos demais grupos. (Tabela 3).

Com relação à população de células de Sertoli ($\times 10^7$) por secção transversal de túbulo seminífero em estágio VII do ciclo do epitélio seminífero dos ratos adultos apresentado na Tabela 3, observou-se que houve redução significativa dos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg em relação ao grupo controle. Adicionalmente, entre os grupos tratados com olanzapina não houve diferenças significativas.

Tabela 3 – Diâmetro tubular (μm), altura de epitélio seminífero (μm), comprimento total de túbulo seminífero (m) e população de células de Sertoli ($\times 10^7$) de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 90 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Diâmetro tubular	$330,20 \pm 15,60^a$	$288,10 \pm 27,84^b$	$289,30 \pm 10,59^b$	$287,30 \pm 24,69^b$
Altura de epitélio	$131,40 \pm 11,87^a$	$94,83 \pm 7,28^b$	$86,15 \pm 7,89^b$	$80,42 \pm 16,04^b$
Comprimento tubular	$19,66 \pm 1,70^a$	$17,14 \pm 1,67^a$	$17,99 \pm 1,55^a$	$13,22 \pm 1,50^b$
População de células de Sertoli	$5,46 \pm 1,28^a$	$4,40 \pm 1,87^{ab}$	$3,88 \pm 1,08^b$	$3,09 \pm 2,70^b$

Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

4.3 HISTOMORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG

De acordo com os dados da Tabela 4 houve redução extremamente significativa do diâmetro nuclear das células de Leydig (μm) nos ratos adultos tratados com diferentes doses de olanzapina durante o período lactacional ($p < 0,0001$) quando comparados com os animais do grupo controle.

De modo análogo, pode-se observar que o volume de células de Leydig apresentou uma redução muito significativa em todos os grupos de ratos adultos tratados com diferentes doses de olanzapina durante período lactacional em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

Não se observaram diferenças significativas na população de células de Leydig/ grama de testículo entre os grupos experimentais.

Tabela 4 – Diâmetro de núcleo de célula de Leydig (μm), volume de célula de Leydig (μm^3) e população de células de Leydig ($\times 10^7$)/ grama de testículo de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal avaliados aos 90 dias de idade.

	Grupos Experimentais			
	Controle	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Diâmetro nuclear de célula de Leydig	9,03 $\pm$ 0,49 ^a	7,13 $\pm$ 0,44 ^b	6,99 $\pm$ 0,66 ^b	6,85 $\pm$ 0,34 ^b
Volume de célula de Leydig	942,2 $\pm$ 120,1 ^a	514,0 $\pm$ 101,8 ^b	460,7 $\pm$ 131,1 ^b	452,7 $\pm$ 70,6 ^b
População de célula de Leydig/g de testículo	3,35 $\pm$ 1,00	2,33 $\pm$ 1,67	3,73 $\pm$ 1,18	4,19 $\pm$ 1,40

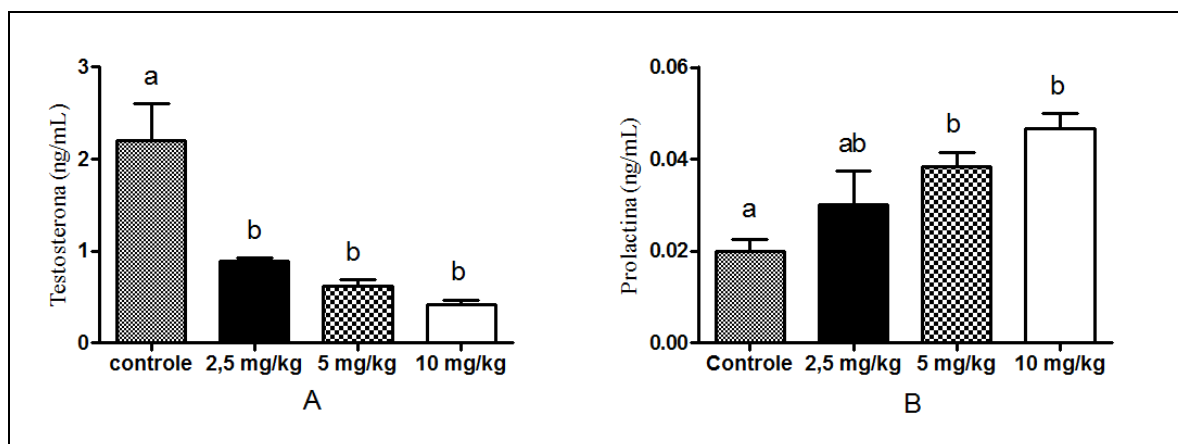
Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística $p < 0,05$.

4.4 DOSAGEM DE TESTOSTERONA E PROLACTINA

Dados de testosterona plasmática e prolactina estão demonstrados na Figura 1 (A-B). Houve redução extremamente significativa dos níveis de testosterona nos ratos adultos tratados com olanzapina durante o período lactacional nas doses de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). No tocante aos níveis plasmáticos de prolactina, estes se encontraram significativamente elevados nos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina em relação ao grupo controle ($p = 0,00031$).

Figura 1 – Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) e prolactina (ng/mL) de ratos Wistar adultos tratados ou não com olanzapina via leite materno durante os 21º dias pós-natal e avaliada aos 90 dias de idade.



Fonte - O autor, 2017.

Nota - Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística $p < 0,05$.

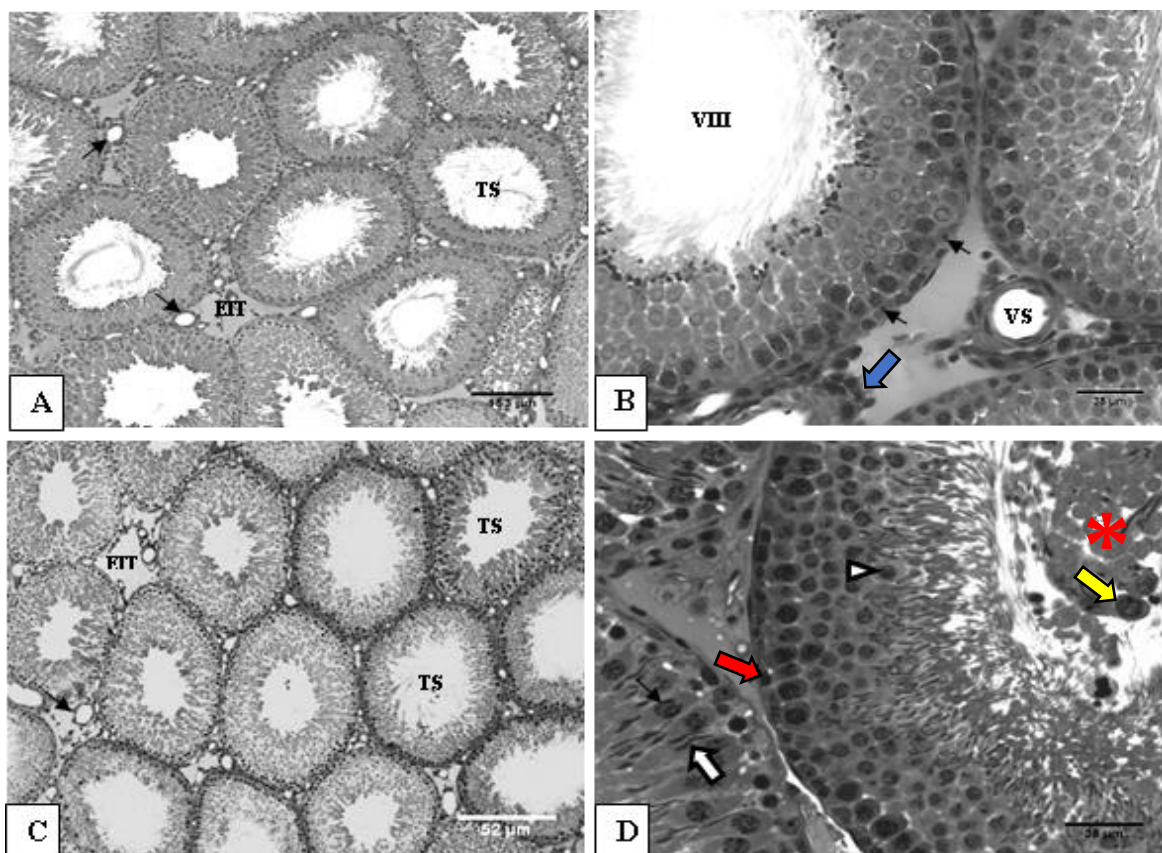
4.5 HISTOPATOLOGIA TESTICULAR

A análise histopatológica de parênquima testicular de ratos Wistar adultos tratados ou não com diferentes doses de olanzapina, via leite materno avaliadas aos 90 dias de idade estão apresentados nas Figuras 2 (A-D) e 3 (A-D).

O grupo controle mostrou parênquima testicular com estrutura preservada, contendo túbulos seminíferos, células de Leydig, vasos sanguíneos adequadamente dispostos (Figura 2 A-B). Grupo de ratos tratados com 2,5 mg/kg de olanzapina mostrou diversas células germinativas em distintos estádios de desenvolvimento, assim como notou-se presença de célula descamada em processo de morte celular no lúmen tubular (Figura 2 C-D).

No grupo de ratos tratado com 5 mg/kg, notou-se vacuolizações no epitélio seminífero, presença de células germinativas do estágio pré-meiótico da espermatogênese, assim como espermátides arredondadas descamadas no lúmen tubular (Figura 3 A-B). Por sua vez, as principais lesões histopatológicas observadas no grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina foram: várias vacuolizações do epitélio germinativo, túbulos seminíferos com baixa celularidade no epitélio germinativo, aglomerado de restos celulares no lúmen tubular, assim como túbulo seminífero com afrouxamento e descamação de células germinativas (Figura 3 C-D).

Figura 2 - Fotomicrografia de parênquima testicular de ratos Wistar adultos dos grupos controle e tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 90 dias de idade.

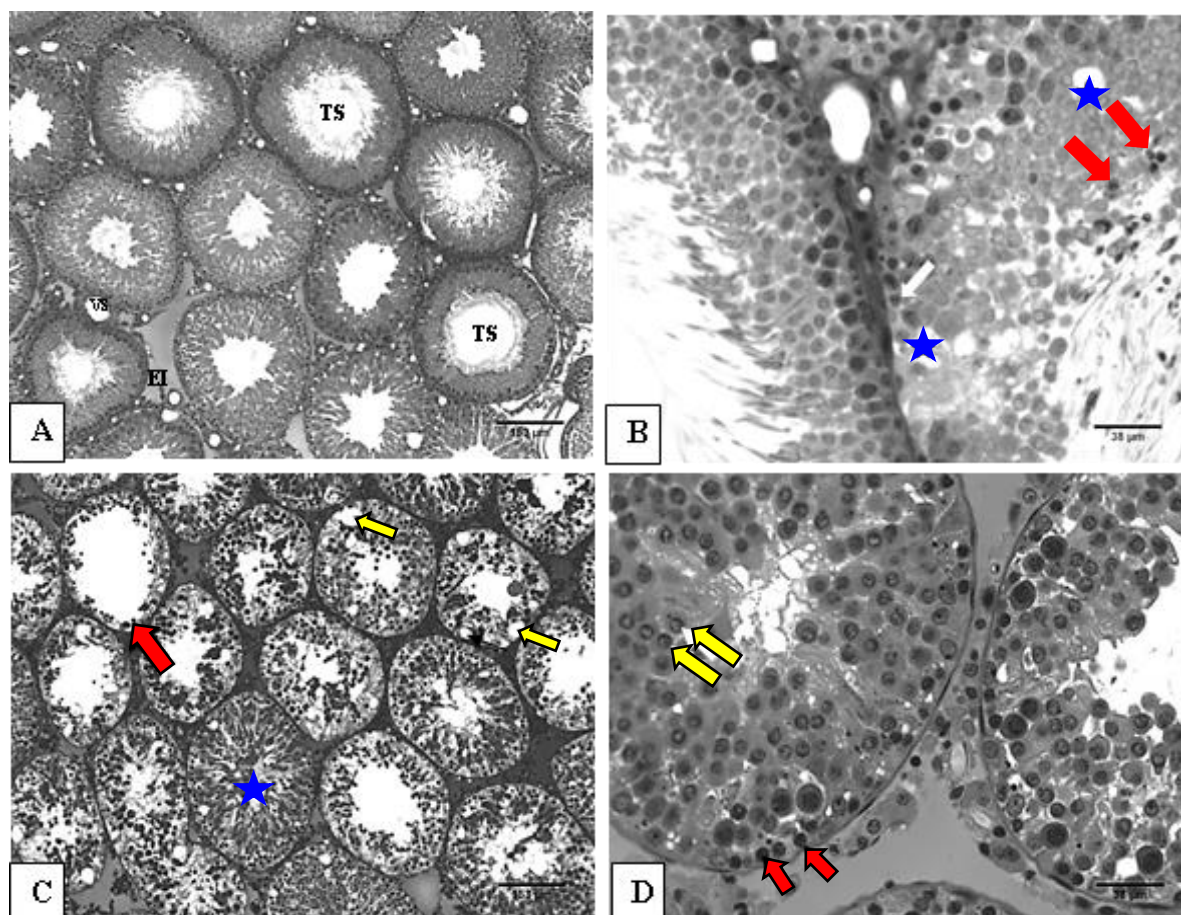


Fonte - O autor, 2017.

Nota:

- A – Parênquima testicular de ratos Wistar adultos do grupo controle. Túbulos seminíferos (TS) em secção transversal e espaço intertubular (EIT). Notar a presença de vários vasos sanguíneos (seta).
- B – Detalhe normal de túbulo seminífero no estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero de ratos adultos do grupo controle. Notar células de Sertoli (seta). No intertúbulo observar vaso sanguíneo (VS) e várias células de Leydig (seta azul).
- C – Parênquima testicular de ratos adultos do grupo tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina. Túbulos seminíferos (TS) em secção transversal mostrando vários estágios do ciclo do epitélio seminífero e espaço intertubular (EIT) contendo vaso sanguíneo (seta).
- D – Detalhe de túbulo seminífero de ratos adultos do grupo tratado com 2,5 mg/kg de olanzapina. Notar a presença de túbulo seminífero no estágio VIII do ciclo do epitélio germinativo contendo células germinativas descamadas no lume tubular (*). Nos túbulos seminíferos, observar diferentes fases de maturação das células germinativas: espermatócito primário em pré-leptóteno/leptóteno (seta vermelha), espermatócito primário em paquíteno (seta preta) espermátide arredondada (cabeça de seta vazia) e espermátide alongada (seta branca). Notar célula descamada em processo de morte celular no lúmen tubular (seta amarela).

Figura 3 – Fotomicrografia de parênquima testicular de ratos Wistar adultos dos grupos tratados com 5 mg/kg e 10 mg/kg de olanzapina, via leite materno, durante os 21º dias pós-natal e avaliados aos 90 dias de idade.



Fonte - O autor, 2017.

Nota:

- A – Parênquima testicular de ratos Wistar adultos do grupo tratado com 5 mg/kg de olanzapina. Observar a presença de espaço intertubular (EIT) e vasos sanguíneos (VS) delimitados por túbulos seminíferos (TS).
- B – Detalhe de túbulos seminíferos de ratos adultos do grupo tratado com 5 mg/kg de olanzapina. Notar vacuolizações no epitélio seminífero (estrela azul) e presença de células germinativas do estágio pré-meiótico da espermatogênese (seta branca), espermátides arredondadas descamadas no lúmen tubular (seta vermelha).
- C – Parênquima testicular de ratos adultos do grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina. Notar várias vacuolizações do epitélio germinativo (seta), túbulos seminíferos com baixa celularidade no epitélio germinativo (seta vazia) e aglomerado de restos celulares (estrela vermelha) no lúmen tubular.
- D – Detalhes de túbulos seminíferos, em secção transversal, de ratos adultos do grupo tratado com 10 mg/kg de olanzapina. Notar túbulo seminífero com afrouxamento e descamação de células germinativas. Presença de células germinativas do estágio pré-meiótico (seta vermelha) e pós-meiótico (seta amarela) da espermatogênese.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliaram-se, em ratos Wistar adultos, os efeitos da administração de olanzapina, via leite materno, durante os primeiros 21º dias pós-natal sobre os parâmetros morfométricos testiculares e endócrinos.

A olanzapina é um agente antipsicótico atípico de segunda geração que se liga a receptores de serotonina 5HT₂, assim como receptores de dopamina D₂ (PARK et al., 2010; NASRALLAH, 2008; WIECK; HADDAD, 2004). A transferência desse fármaco através do leite materno já fora reportada. Evidências já foram apresentadas para os potenciais efeitos adversos decorrentes da exposição de antipsicóticos (GARDINER et al. 2003; GOLDSTEIN et al. 2000).

Como outros agentes antipsicóticos atípico, a olanzapina pode induzir significativo ganho de peso (BUSTILLO et al., 2003). No presente trabalho, o ganho de peso corporal foi maior em ratos machos adultos aos 90 dias de idade pertencentes aos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina durante o período lactacional. É importante destacar que o ganho de peso verificado na idade adulta pode ser decorrente da modificação das vias dopaminérgicas relacionadas à saciedade ocorrida durante os 21º dias de idade.

Soliman et al. (2014) observaram aumento de 43,7% no peso corporal de ratos adultos tratados com 0,5 mg/kg de olanzapina. Esse fármaco bloqueia os receptores de dopamina, assim, é concebível que a modulação desta via pode resultar em hiperfagia (ALBAUGH et al., 2006), ocasionando elevação do peso corporal. Sabe-se que esse ganho de peso, em curto período de exposição à terapia antipsicótica com olanzapina, é frequentemente reportado pela literatura (ALMEIDA, 2006; FROTA, 2001; ZHANG, 2014). Conforme descrito por Davey et al. (2012) o tratamento com olanzapina via oral afetou significativamente a ingestão alimentar e hídrica, assim como reduziu a locomoção em ratos promovendo ganho de peso corporal. Adicionalmente, segundo Correll et al. (2011), a olanzapina promove aumento de adiposidade com consequente ganho de peso em ratos.

Melzter et al. (1989) afirmaram que o bloqueio serotoninérgico 5HT_{2A} é cerca de 8 vezes mais intenso que o bloqueio dopaminérgico D₂ na modulação do apetite, parâmetro este importante na definição do grau de atipicidade de um antipsicótico. Por outro lado, receptores centrais de serotonina 5HT_{2C} e de histamina H1 desempenham um papel importante na regulação do apetite, e interferem no balanço energético de longo prazo (LAM et al., 2008; MASAKI et al., 2004; TSUDA et al., 2002). De modo geral, tratamento com antipsicóticos

tem sido implicado no ganho de peso (DENG et al., 2010;. KROEZE et al., 2003;. REYNOLDS et al., 2006) e a olanzapina devido a sua alta afinidade aos receptores anteriormente citados tem forte relação com o ganho de peso corporal (ELLINGROD et al., 2005).

Pesquisas demonstraram que em ratos machos, mesmo na ausência de ganho de peso, há inúmeros efeitos metabólicos prejudiciais (ALBAUGH et al., 2011; MINET-RINGUET et al., 2007; VICTORIANO et al., 2009) podendo até mesmo incorrer em ganho de peso, com a extensão dos protocolos de tratamento (SHOBO et al., 2011). Por outro lado, Bringel et al. (2013) não evidenciaram ganho de peso em ratos adultos tratados com diferentes doses de olanzapina, mas sim manutenção desse parâmetro, mesmo na terapia antipsicótica com olanzapina na dose mais elevada, 10 mg/kg.

O peso testicular é um parâmetro importante para avaliação reprodutiva dos machos, devido à sua alta correlação positiva com a produção de espermatozoides (FRANÇA, 2005). Em nosso estudo houve redução dos pesos testicular bruto e líquido dos animais tratados durante período lactacional com olanzapina e avaliados na idade adulta, aos 90 dias, na dose de 10 mg/kg quando comparado aos grupos controle, 2,5 e 5 mg/kg. Do mesmo modo, estudo conduzido por Soliman et al. (2014) obteve redução do peso testicular em ratos adultos tratados com olanzapina nas doses de 0,5 e 2,0 mg/kg por 14 semanas. Os resultados indicam que este antipsicótico, quando administrado durante o período lactacional, promoveu regressão testicular com significativa redução no peso do testículo com evidentes alterações histopatológicas e morfométricas, acarretando efeitos adversos sobre as funções reprodutivas em ratos adultos.

Os pesos epididimário, próstático e da glândula seminal foram reduzidos na dose mais elevadas de olanzapina. De acordo com Lanning et al. (2002) e Creasy (2003) a redução do peso epididimário é indicativa de diminuição da espermatogênese no testículo, redução do conteúdo no epidídimo e dos níveis adequados de testosterona que alcançam este órgão via ducto epididimário e hematógena. A próstata igualmente ao epidídimo depende da testosterona para o seu crescimento, diferenciação e manutenção de sua estrutura e função. É na próstata que ocorre a conversão da testosterona ao seu metabólito mais ativo, 5 α -diidrotestosterona, pela atividade de 5 α -redutase (LEE; JANULIS, 1998).

Os baixos em níveis de testosterona plasmática têm sido relacionados a utilização de antipsicóticos em ratos (BRINGEL et al., 2013; ZHANG et al., 2007) e humanos (KONARZEWSKA et al., 2014). Neste estudo, nos grupos tratados com olanzapina durante o

período lactacional houve redução desse hormônio na idade adulta. Deste modo, as alterações encontradas nos pesos testicular, epididimário e prostático podem ser atribuídas à redução dos níveis plasmáticos de testosterona como efeito colateral do tratamento com olanzapina durante o período juvenil do tratamento.

O percentual volumétrico de túbulos seminíferos no parênquima testicular em ratos corresponde a 89%, e tem correlação direta com peso testicular, comprimento tubular, produção espermática e população de células de Sertoli (FRANÇA; RUSSELL, 1998). No presente trabalho, o diâmetro tubular e o comprimento dos túbulos seminíferos também foram afetados negativamente pela utilização da olanzapina no período lactacional. Volumes de túbulos seminíferos e de epitélio germinativo também tiveram redução de sua volumetria nos animais tratados com 10 mg/kg de olanzapina via leite materno, em relação ao grupo controle. Isto demonstra que a olanzapina administrada via leite materno durante o período lactacional produziu efeito colateral definitivo em parâmetros testiculares relacionados com a espermatogênese. Efeitos similares observados neste trabalho foram descritos por Mishra e Mohanty (2010) quando da exposição neonatal a olanzapina em camundongos adultos.

A população de células Sertoli nos animais adultos sofreu redução significativa de 29 e 43% nas doses de 5 e 10 mg/Kg, respectivamente nos ratos tratados com olanzapina durante o período lactacional.

As respostas das células de Sertoli ao FSH variam de acordo com o período de desenvolvimento testicular em que o animal se encontra (ASATIANI, 2002). Durante o período fetal e neonatal do desenvolvimento testicular o FSH é considerado o principal fator mitogênico das células de Sertoli, influenciando diretamente na população destas células de no testículo de indivíduo adultos assim como na produção espermática (ORTH, 1984; ORTH, et al. 1988; ORTH, 1993; SHARPE, 1994; MEACHEM et al. 1996)

Evidências farmacológicas demonstraram que a serotonina no cérebro exerce importante controle sobre a liberação de GnRH, inibindo a secreção de FSH e LH, (HEDGER et al., 1995). Como esses hormônios estão presumidamente diminuídos em função da elevação dos níveis cerebrais de serotonina (HEDGER et al. 1995) e de dopamina (FITZGERALD; DINAN, 2008) provocado pelo tratamento com olanzapina, podemos inferir que esse antipsicótico, administrado durante o período lactacional, tenha influenciado na redução da população de células de Sertoli nos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg e comprimento total dos túbulos seminíferos do grupo tratado com a maior dose.

Experimento conduzido por Konarzewska et al. (2009) sugere que a ação direta da olanzapina sobre as células de Sertoli no testículo está correlacionada à diminuição dos níveis de inibina B. Sabe-se que os níveis séricos de inibina B estão fortemente correlacionados com volume testicular e com contagem espermática. Em indivíduos inférteis, os níveis baixos de inibina B trazem prejuízo à espermatogênese (MEACHEM et al., 2001).

Dentre os efeitos colaterais relacionados ao uso olanzapina, a hiperprolactinemia tem sido bastante relatada (GRATTAN et al., 2007). Segundo De Rosa et al. (2003), a hiperprolactinemia em humanos induz ao hipogonadismo decorrente da redução de GnRH e consequentemente de gonadotrofinas e testosterona. É importante destacar que os níveis de prolactina, neste experimento, permaneceram elevados nos ratos adultos tratados com 5 e 10 mg/kg de olanzapina durante o período lactacional, mesmo após a suspensão do tratamento aos 21 dias de idade. Isto nos leva a acreditar que a administração da olanzapina nessas dosagens, durante o período lactacional, pode ter provocado um desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Este desequilíbrio provavelmente perdurou até a idade adulta, justificando os níveis de elevados prolactina mesmo na ausência do antipsicótico.

O aumento no volume de células do conjuntivo de ratos adultos tratados com 10 mg/kg em relação aos demais grupos experimentais provavelmente está relacionado ao aumento na população de células de Leydig. As células mesenquimais do interstício testicular estão diretamente relacionadas ao surgimento de novas células de Leydig (TEERDS; HUHTANIEMI, 2015). Segundo Chapin et al. (2016) a prolactina é capaz de aumentar a fosforilação da proteína STAT-5 (Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição -5) e os níveis de RNAm para receptor de LH. Além disso, de acordo Dombrowicz et al. (1996), a prolactina influencia o aumento das células mesenquimais e do número de células de Leydig. Estudos com roedores associaram o aumento de infiltração de macrófagos e a elevação dos marcadores pró-inflamatórios à olanzapina (DAVEY et al., 2012; VICTORIANO et al., 2010) resultando em aumento de células do tecido conjuntivo o que justificaria, no presente experimento, nosso achado.

Neste estudo houve aumento do volume de túnica própria no grupo de ratos tratados com maior dose de olanzapina, o que corrobora com os resultados obtidos por Soliman et al. (2014) que notaram elevado aumento da espessura da membrana basal, bem como a deposição de fibras de colágeno em grupo de ratos tratados com o mesmo fármaco. Além disso, em processos degenerativos testiculares ocorre espessamento da túnica própria, caracterizada por estímulo a deposição da matriz extracelular (TRISTÃO, 1986). Reforçando

o autor citado anteriormente, o espessamento da lâmina própria de túbulos seminíferos degenerados ocorre devido ao aumento do conteúdo de fibras colágenas e de glicoconjugados (PINART et al., 2001).

O aumento no espaço linfático do parênquima testicular foi constatado nos animais adultos que receberam 10 mg/kg de olanzapina durante o período lactacional. Este resultado pode decorrer da diminuição volumétrica dos túbulos seminíferos que ocorreu nos demais tratamentos.

O volume líquido das células de Leydig é um parâmetro que indica fortemente a população celular e ou atividade esteroidogênica destas células (SILVA JUNIOR; FRANÇA, 2001). Além disso, França et al. (2005) relacionaram a quantidade e o tamanho de células de Leydig, bem como o volume do retículo endoplasmático a capacidade destas células quanto à produção de testosterona.

As células de Leydig constituem-se na fonte de andrógenos testiculares que são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol. Baseado em inúmeros trabalhos realizados em diferentes laboratórios, pode-se observar diferenças na população de células de Leydig por grama de testículo, como também no volume da célula em várias espécies de mamíferos (SILVA JUNIOR; FRANÇA, 2001).

No presente estudo foram observadas reduções no diâmetro nuclear e no volume individual das células de Leydig em todos os grupos tratados com olanzapina. No entanto, a população de células de Leydig/grama de testículo não diferiram entre os grupos experimentais. O volume individual das células de Leydig está diretamente relacionado com o retículo endoplasmático liso (FRANÇA et al., 2005). Além disso, o retículo endoplasmático liso possui relação direta com a produção de andrógenos, sendo um dos locais de estoque de enzimas envolvidas na esteroidogênese (KIANIFARD et al., 2012). Portanto, a redução do volume individual dessas células observadas neste estudo pode estar associada à diminuição da área ocupada por essas organelas.

A prolactina tem sido apontada como responsável pela indução e proliferação das células de Leydig em ratos. A hiperprolactinemia em animais adultos possui um efeito negativo sobre a produção de testosterona por ação da secreção reduzida de LH (WILLIAMS et al., 2007).

Em ratos adultos a concentração de testosterona permanecem estabilizados entre 1-2 ng/mL (WALKER; CHENG, 2005). Em nosso estudo, a redução de níveis de testosterona em animais adultos diminuíram de 2 ng/mL no grupo controle para 0,4 a 0,8 ng/mL nos grupos

tratados. A olanzapina administrada no período lactacional influenciou negativamente nos níveis de testosterona na idade adulta, sobretudo nos animais tratados com a maior dose de olanzapina, 10 mg/kg.

Vários estudos têm demonstrado a importância da testosterona na manutenção qualitativa e quantitativa da espermatogênese (BRINGEL et al., 2013; WALKER; CHENG, 2005). A diminuição dos níveis de testosterona, em pacientes com distúrbios psicóticos tratados com risperidona e olanzapina possui uma forte relação com episódios de hiperprolactenemia e disfunção sexual (KONARZEWSKA et al., 2009)

No presente trabalho, os níveis de prolactina determinados na idade adulta aumentaram nos grupos tratados com doses mais elevadas de olanzapina, 5 e 10 mg/kg. Contudo, torna-se importante ressaltar que a exposição dos ratos à olanzapina ocorreu somente durante o período de aleitamento materno. Desta maneira, os indivíduos adultos, permaneceram com os níveis elevados de prolactina e reduzidos de testosterona como consequência desta exposição neonatal à olanzapina. Portanto, a exposição neonatal a esse fármaco parece ter modificado o eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada de tal maneira que os níveis de prolactina e testosterona permaneceram alterados mesmo após a suspensão da exposição aos 21 dias pós-natal.

A prolactina tem sido apontada como responsável pela proliferação das células de Leydig em ratos pré-púberes. Contudo, a hiperprolactinemia em animais adultos possui um efeito negativo sobre a produção de testosterona por inibir a secreção de LH (WILLIAMS et al. 2007). Embora neste trabalho não se tenha determinado os níveis de LH, os altos níveis de prolactina provocado pela administração de olanzapina pode ter induzido a inibição de GnRH com consequente diminuição de LH e de testosterona (DE ROSA et al. 2003).

No hipotálamo ocorre a síntese de dopamina, que é um importante fator de inibição da prolactina (PIF), que atua através da ligação com receptores do tipo D₂ na membrana celular dos lactotrófos (LAMBERTS et al., 1990; NAHAS, 2006). Outros PIF são o GABA e o peptídeo associado à gonadotropina (GAP) (CASTRO E SILVA; CASTRO, 2005). Quando a síntese de dopamina é bloqueada, os neurônios do núcleo paraventricular são estimulados a produzir o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ocorrendo um aumento do nível plasmático de prolactina.

Embora haja relato que a hiperprolactinemia seja um efeito colateral pouco frequente em relação a utilização de antipsicóticos atípicos, dentre eles a olanzapina, e por esta razão, ela tem sido usada frequentemente para tratamento de esquizofrenia (WIECK; HADDAD,

2004). Por outro lado, e corroborando com nossos achados, a elevação nos níveis de prolactina está associada ao emprego de olanzapina (KONARZEWSKA et al., 2009).

Neste estudo, o hipogonadismo observado, pode ser mediado pelo aumento dos níveis plasmáticos de prolactina e redução da testosterona induzido pelo uso de olanzapina durante o período lactacional. Níveis elevados de prolactina como encontrado nos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg promoveram diminuição da concentração de testosterona em todos os grupos tratados. Essa diminuição plasmática de testosterona foi possivelmente uma consequência da hiperprolactinemia e provável diminuição nos níveis de LH com repercussões negativas sobre a espermatogênese.

No presente estudo, alterações histopatológicas em testículos de ratos tratados com olanzapina foram compatíveis com degeneração testicular. Notaram-se presença de túbulos seminíferos com baixa celularidade, assim como, afrouxamento e descamação de células germinativas, aglomerado de restos celulares no lúmen tubular, células germinativas sinciciais e vacuolizações do epitélio germinativo. Tais achados foram mais expressivos no grupo de animais tratados com doses mais elevadas de olanzapina.

A dopamina é um importante regulador das funções orgânicas centrais e periféricas (MISSALE et al., 1998). A presença de receptores dopaminérgicos em testículos de ratos pode sugerir uma interação desconhecida entre o sistema nervoso e o reprodutivo. Considerando também que receptores de dopamina estão presentes em células germinativas dos túbulos seminíferos (HYUN et al., 2002; OTTH et al., 2007), os efeitos da olanzapina como agente bloqueador de receptores 5HT e D₂, pode ocorrer por dois mecanismos: pela redução do nível de testosterona ou por uma ação direta sobre as células germinativas (SOLIMAN et al., 2014).

Alguns autores sugerem que a vacuolização de células de Sertoli é atribuída à degeneração anormal de células germinativas. Esses vacúolos correspondem a dilatações do espaço extracelular, resultantes da descamação de células germinativas. Contudo, a vacuolização das células de Sertoli pode estar associada ao acúmulo de lipídios intracelular decorrente do processo de degeneração de células germinativas fagocitadas (PANIAGUA et al., 1991). Esses achados também foram detectados em ratos tratados com antipsicótico e carbonato de lítio (ALI et al., 2008). Resultados semelhantes ao nosso estudo foram obtidos por Soliman et al. (2014) e Bringel et al. (2013) que ao tratar ratos adultos com dose diária de olanzapina evidenciaram descamação de espermátócitos e espermátides para o lúmen tubular, desprendimento de espermatogônias da membrana basal em alguns túbulos e aumento do

espaço intercelular entre células espermatogênicas e células de Sertoli. Deste mesmo, o tratamento com olanzapina promoveu alterações na espermatogênese compatíveis com degeneração testicular.

6 CONCLUSÃO

A utilização de olanzapina durante o período lactacional alterou permanentemente o eixo HPG em ratos adultos. Isto se refletiu pela permanência de elevados níveis de prolactina e baixos níveis de testosterona, sobretudo nas doses mais elevadas.

A olanzapina administrada via leite materno alterou definitivamente parâmetros morfométricos relacionados à espermatogênese, como comprimento total de túbulos seminíferos. Os processos degenerativos testiculares associados às alterações hormonais nos indivíduos adultos nos leva a acreditar que este evento pode ser irreversível mesmo após a interrupção do antipsicótico após o desmame.

Os baixos níveis de testosterona, sobretudo nos animais adultos que receberam as maiores doses no período lactacional, tiveram relação inversa com os níveis de prolactina e população de células de Leydig embora estas células possuam redução do volume citoplasmáticos quando doses mais elevadas de olanzapina são empregadas neonatalmente.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anat. Rec.**, v. 94, p. 238-249, 1946.
- AGRAWAL, P. et al. Post-partum psychosis: a clinical study. **Int. J. Social Psychiatry**, v. 43, p. 217–222, 1997.
- ALBAUGH, V. L. et al. Hormonal animal and metabolic effects of olanzapine and clozapine related to body weight in rodents. **Obesity**, v. 14, n. 1, p. 36–51, 2006.
- ALBAUGH, V. L. et al. Olanzapine promotes fat accumulation in male rats by decreasing physical activity, repartitioning energy and increasing adipose tissue lipogenesis while impairing lipolysis. **Mol. Psychiatry**, v. 16, p. 569–581, 2011.
- ALI, A. et al. Ultrastructural changes of the testicular tissues of immature and mature mice under the effect of lithium carbonate. **Bull. Alex. Fac. Med.**, v. 44, p. 805–815, 2008.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia**. Fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 40– 313, 2006.
- AMANN, R. P.; ALMIQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **J. Dairy Sci.**, v. 45, p. 774-7841, 1962.
- ASATIANI, K. et al. Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. **Andrologia**, v. 34, p. 172-176, 2002.
- AYDIN, B.; NAYIR, T. Olanzapine and quetiapine use during breastfeeding excretion into breast milk and safe breastfeeding strategy. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 35, n. 2, p. 206-207, 2015.
- BOBES J. et al. Frequency of sexual dysfunction and other reproductive side-effects in patients with schizophrenia treated with risperidone, olanzapine, quetiapine, or haloperidol: the results of the eire study. **J. Sex Marital Ther.**, v. 29, n. 2, p. 125–147, 2003.
- BRINGEL, S. S. et al. Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. **J. Appl. Toxicol.**, v. 33, n. 1, p. 24-31, 2013.
- BUGALHO, P. et al. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: bases científicas e modelos de estudo. **Acta Méd. Port.**, v. 19, p. 257–268, 2006.
- BUSTILLO, J. R. et al. Treatment of weight gain with fluoxetine in olanzapine-treated schizophrenic outpatients. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 527-529, 2003.
- CALDEIRA, B. C. et al. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyonthous*, Linnaeus, 1766). **Rev. Ceres**, v. 57, n. 5, p. 569-575, 2010.
- CAMERON, D. F. et al. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. **Anat. Rec.**, v. 213, n. 1, p. 53-62, 1985.

CASTRO E SILVA, E.; CASTRO, L. Regulação da secreção de prolactina. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K, CASTRO, M (eds). **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 2005.

CHAPIN, R. E. Effects of the janus kinase inhibitor, tofacitinib, on testicular Leydig cell hyperplasia and adenoma in rats, and on prolactin signaling in cultured primary rat Leydig cells. **Tox. Sci.**, v. 5, p.1-37, oct., 2016.

CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the society of toxicology pathology. **Brith Defects Res.**, v. 68, p. 408-415, 2003.

DAVEY, K. J. Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. **Psychopharmacology**, v. 221, p. 155-169, 2012.

DE ROSA, M. et al. Hyperprolactinemia in men. **Endocrine**, v. 20, p. 75–82, 2003.

DE OLIVEIRA, I. R.; JURUENA, M.F. Treatment of psychosis: 30 years of progress. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 31, p. 523–534, 2006.

DENG, C.; WESTON-GREEN, K.; HUANG, X. F. The role of histaminergic H1 and H3 receptors in food intake: a mechanism for atypical antipsychotic-induced weight gain? **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 34, p. 1–4, 2010.

DOMBROWICZ, D. et al. Pituitary control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. **J. Androl.**, v. 17, n. 6. nov./dec., 1996.

ELLINGROD, V. L. et al. Weight gain associated with the -759C/T polymorphism of the 5HT2C receptor and olanzapine. **Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.**, v. 134, p. 76–78, 2005.

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

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**, 1. ed. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. v. 1, p. 197-219.

FITZGERALD, P.; DINAN, T. G. Prolactin and dopamine: what is the connection? a review article. **J. Psychopharmacol.**, v. 22, suppl. 2, p. 12–19, 2008.

FROTA, L. H. Cinquenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria. **J. Bras. Psiquiat.**, v. 50, p. 298-317, 2001.

GARDINER, S. J. et al. Transfer of olanzapine into breast milk calculation of infant drug dose and effect on breast fed infants. **Am. J. Psychiatry**, v. 160, p. 1428–1431, 2003.

GOLDSTEIN, D. J. et al. Olanzapine exposed pregnancies and lactation: early experience. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 20, p. 399–403, 2000.

GRATTAN, D. R. et al. Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. **Endocrinology**, v. 148, p. 4344–4351, 2007.

GRIWOLD, M. D. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: RUSSEL, L. D.; GRISWOLD, M. D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993, cap. 23, p. 493-508.

HADDAD, P. Weight change with atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. **J Psychopharmacol.**, v. 19, p. 16–27, 2005.

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

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

HYUN J. S. et al. Localization of peripheral dopamine D1 and D2 receptors in rat corpus cavernosum. **BJU Int.**, v. 90, p. 105-112, 2002.

ILETT, K. F., et al. Transfer of risperidone and 9-hydroxy risperidone into human milk. **Ann. Pharmacother.**, v. 38, p. 273–276, 2004.

KAPUR, S.; REMINGTON, G. Dopamine D (2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. **Biol. Psychiat.**, v. 50, p. 873–883, 2001.

KIANIFARD, D. et al. The histological, histomorphometrical and histochemical changes of testicular tissue in the metmorfin treated and untreated streptozotocin-induced adult diabetic rats. **Vet. Res. Forum**, v. 2, n. 1, p. 13-24, 2011.

KONARZEWSKA, B. et al. Effects of risperidone and olanzapine on reproductive hormones, psychopathology and sexual functioning in male patients with schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 129–139, 2009.

KROEZE, W. K. et al. H1 histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 519–526, 2003.

LAM, D. D. et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. **Endocrinology**, v. 149, p. 1323–1328, 2008.

LAMBERTS, S. W. et al. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. **Physiol. Rev.**, v. 70, p. 279 - 318, 1990.

LANNING, L. L. et al. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. **Toxicol. Pathol.**, v. 30, p. 507–520, 2002.

LEE, C.; JANULIS, L. Prostate gland. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**. Ed. Inchief. v. 4, p.77-85, 1998.

MASAKI, T. et al. Involvement of hypothalamic histamine H1 receptor in the regulation of feeding rhythm and obesity. **Diabetes**, v. 53, p. 2250–2256, 2004.

MEACHEM, S. J. et al. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 145, p. 561-571, 2001.

MINET-RINGUET, J. et al. Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. **Molecular Psychiatr.**, v. 12, p. 562–571, 2007.

MISHRA, A. C; MOHANTY, B. Lactational exposure to atypical antipsychotic drugs disrupts the pituitary-testicular axis in mice neonates during post-natal development. **J. Psychopharm.**, v. 24, n. 7, p. 1097-1104, 2010.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

NAHAS, E. A. P. et al. Estados hiperprolactinêmicos: inter-relações com o psiquismo. **Rev Psiq. Clín.**, v. 33, n. 2, p. 68-73, 2006.

NASRALLAH, H. A. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. **Mol. Psychiatr.**, v. 13, p. 27–35, 2008.

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

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

ORTH, J. M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C., EWING, L. L. (Eds.). **Cell and molecular biology of the testis**. New York: Oxford University Press. 1993, Cap.1, p. 3-42.

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

OTTH, C. et al. Novel identification of peripheral dopaminergic D₂ receptor in male germ cells. **J. Cell. Bioch.**, v. 100, p. 141-150, 2007.

PANIAGUA, R. et al. Ultrastructure of the aging human testis. **J. Electron. Microsc. Tech.**, v. 19, p. 241-260, 1991.

PARK, S. et al. Olanzapine, not risperidone, exacerbates b-cell function and mass in ovariectomized diabetic rats and estrogen replacement reverses them. **J. Psychopharmacol.**, v. 24, n. 7, p. 1105–1114, 2010.

PINART, E. et al. Morphological and histochemical characteristics of the lamina propria in scrotal and abdominal testes from postpubertal boars: correlation with the appearance of the seminiferous epithelium. **J. Anat.**, p. 435-48. 2001.

REYNOLDS, G. P.; HILL, M. J.; KIRK, S. L. The 5-HT_{2C} receptor and antipsychotic-induced weight gain - mechanisms and genetics. **J. Psychopharmacol.**, v. 20, p. 15–8, 2006.

RIJCHEN, C. A. W. et al. Schizophrenia care and the Dutch community pharmacy: the unmet needs. **Int. J. Pharm. Pract.**, v. 11, p. 97–104, 2003.

RUSSELL, D. L. et al. Mammalian spermatogenesis. In: _____. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press. 1990, cap.1, p. 1-40.

SARAIVA, K. L. A. et al. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 754-759, 2006.

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

SHOBO, M. et al. Two models for weight gain and hyperphagia as side effects of atypical antipsychotics in male rats: validation with olanzapine and ziprasidone. **Behav. Brain Res.**, v. 216, p. 561–568.

SILVA JUNIOR, V. A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 46, n. 2, p. 157-166, 2006.

SILVA JUNIOR, V. A.; FRANÇA, L. F. Ultra-estrutura de células de Leydig e esteroidogênese em diferentes espécies de mamíferos. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v. 3, n. 3, p. 117-134, 2001.

SMITH, S. et al. The effects of antipsychotic-induced hyperprolactinaemia on hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 22, p. 109-114, 2002.

SOLIMAN, H. M. et al. Light and electron microscopic study on the effect of antischizophrenic drugs on the structure of seminiferous tubules of adult male albino rat. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 52, n. 4, p. 335–349, 2014.

SWEETMAN, S. C. (Ed.), Martindale. The complete drug reference, 34 ed., 457 Pharmaceutical Press, London, 2005, p. 710.

TEERDS, K. J.; HUHTANIEMI, I. T. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. **Hum. Reprod. Update**, v. 21, n. 3, p. 310–328, 2015.

TENORIO, B. M. et al. Testicular development evaluation in rats exposed to 60Hz and 1mT electromagnetic field. **J. Appl. Toxicol.**, v. 31, p. 223-30, 2011.

TRISTÃO, M. A. P. Estudo histopatológico e ultra-estrutural do testículo criptorquídico. **Arq. Bras. Med.**, v. 60, n. 3, p. 197-202, 1986.

TSUDA, K. et al. Hypothalamic histamine neurons activate lipolysis in rat adipose tissue. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 208–213, 2002.

VALENÇA, R. M. B. et al. Morphometry and histomorphometry of testis in crossbred pigs fed diets with different proteins levels. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 5, p. 1329-1338, 2013.

VICTORIANO, M. et al. Olanzapine induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. **Brain Res.**, v. 1350, p. 167–175, 2010.

WALKER, H. W.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, p. 15–28, 2005.

WETTERLING, T. Body weight gain with atypical antipsychotics, A comparative review. **Drug Safety**, v. 24, p. 59–73, 2001.

WIECK, A; HADDAD, P. M. Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: Mechanisms, clinical features and management. **Drugs**, v. 64, p. 2291–2314, 2004.

WILLIAMS, V. L. Common and specific effects of two major forms of prolactin in the rat testis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 293, p. 1795-1802, 2007.

WUDARSKY, M. et al. Elevated prolactin in pediatric patients on typical and atypical antipsychotics. **J. Child Adolesc. Psychopharmacol.**, v. 9, p. 239–245, 1999.

ZHANG, Q. et al. Effects of olanzapine on the elevation of macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in female rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 28, n. 12, p. 1161-1169, 2014.

ZHANG, X. et al. The effect of chronic antipsychotic treatment on sexual behaviour, hormone and organ size in the male rat. **J. Psychopharm.**, v. 21, n. 4, p. 428-434, 2007.

ANEXO IFORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO
PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO E/OU PESQUISA

LICENÇA N°. 073/2013

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

USO EXCLUSIVO DA
COMISSÃO

PROTOCOLO N° 23082.008993/2013

RECEBIDO EM:

16/05/2013

B16

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf.

1. FINALIDADE

Ensino	☐
Pesquisa	☒
Treinamento	☐

Início: 15/07/2013

Término: 15/10/2013

2. TÍTULO DO PROJETO/AULA PRÁTICA/TREINAMENTO

AÇÃO FARMACOLÓGICA DA OLANZAPINA SOBRE O EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-GÔNADA E ESPERMATOGÊNESE DE RATOS WISTAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO TESTICULAR PRÉ E PÓS-NATAL.

Área do conhecimento: Ciências Agrárias

Lista das áreas do conhecimento disponível em:

