



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SIMONE FORCATO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À
SULFASSALAZINA EM ASPECTOS REPRODUTIVOS DA
PROLE DE RATAS WISTAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS (PPGMCF)**

Londrina – PR
2023

SIMONE FORCATO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À
SULFASSALAZINA EM ASPECTOS REPRODUTIVOS DA PROLE DE
RATAS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada para ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela C. C. Gerardin

Londrina – PR

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F383a Ferreira, Simone Forcato.
Avaliação dos efeitos da exposição materna à Sulfassalazina em aspectos reprodutivos da prole de ratas wistar / Simone Forcato Ferreira. - Londrina, 2023.
138 f. : il.

Orientador: Daniela Cristina Ceccatto Gerardin.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Exposição materna - Tese. 2. Desenvolvimento sexual - Tese. 3. Comportamento reprodutivo - Tese. 4. Sistema Xc- - Tese. I. Gerardin, Daniela Cristina Ceccatto . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

SIMONE FORCATO FERREIRA

Avaliação dos efeitos da exposição materna à Sulfassalazina em aspectos reprodutivos da prole de ratas Wistar

Tese de Doutorado apresentada para ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora

Profa. Dra. Daniela C. Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina

• *Membros da Banca*

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Gabriel Adan Araújo Leite
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Arielle Cristina Arena
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

- *Suplentes*

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Milene Leivas Vieira
Pontifícia Universidade Católica

Londrina, 10 de março de 2023.

Ao meu pai Arcilio (*in memoriam*) que não pôde estar ao meu lado nesse momento tão importante. Mas, desde o início da minha vida estudantil nunca aceitou menos do que o máximo que eu poderia oferecer e assim me ensinou a buscar excelência em tudo que eu fosse fazer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida. Por ter me presenteado com a melhor família que eu poderia ter. Por todos os dons e bênçãos recebidas. Por ter me moldado a ser quem sou e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que tornaram possível a obtenção desse tão sonhado e aguardado título.

À minha mãe Sebastiana, pelo incentivo, pelo apoio financeiro, pelo amparo emocional, pelo amor incondicional, pela presença constante em todos os momentos da minha vida e pela ajuda na criação e educação dos meus filhos, sem o qual não teria sido possível concretizar mais essa etapa da minha vida.

Ao meu esposo Marcos que me mostrou através da sua história de vida e superação que o dia mais importante é sempre “o hoje”. Graças a você eu renovei e fortaleci a minha fé em Deus.

À minha filha Alice (Presente de Deus em nossas vidas) que é minha dose diária de cortisol, mas também meu coquetel de ocitocina e endorfina. Você foi ao mesmo tempo o principal motivo pelo qual eu quase desisti e por eu não ter desistido.

Ao meu filho Bruno Henrique, que esteve presente em toda minha trajetória acadêmica e por isso suportou meus momentos de ausência (e sei que foram muitos). Tenho muito orgulho do homem incrível que você se tornou. Você e a Alice são a razão pelo qual eu tenho buscado incessantemente me tornar uma pessoa melhor. Agradeço também a Deus pelo seu dom com desenhos e à você pelas maravilhosas ilustrações que contribuíram tanto para enriquecer meus artigos quanto minhas apresentações.

À minha orientadora, Profa. Daniela, pela oportunidade, pela confiança no meu trabalho e por todos os ensinamentos que me ajudaram na construção de um conhecimento imensurável que adquiri desde o mestrado. Sou extremamente grata pela disponibilidade, compreensão e pelos sábios conselhos sempre que a procurei pra conversar e, acima de tudo, obrigada por me ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, pelo conhecimento compartilhado e por toda contribuição ao longo do curso.

Agradeço também as Professoras Ana Carolina Inhasz Kiss, Flávia Alessandra Guarnier e Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, e as colegas de pós-graduação Hannah Hamada Mendonça Lens e Rafaela Pires Erthal pelas valiosas contribuições nas metodologias empregadas nesse trabalho.

Aos colegas de laboratório Bruno Montagnini, Nathália Orlandini Costa e Lorena Ireno Borges pelo trabalho em equipe, por tornarem o trabalho e a rotina mais leve e acima de tudo pela amizade.

Às alunas de iniciação científica Ana Beatriz de Oliveira Aquino, Júlia Oliveira Bilibio, Nathaly de Moura Camparoto e Maria Luiza Francisconi Lubanco Thomé pelas contribuições fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À técnica de laboratório Fujiko Eliana Morinaga pela ajuda imprescindível na manutenção do Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas e acima de tudo pela disponibilidade e dedicação com o qual nos auxiliou sempre que necessário.

Aos meus ex-alunos, por ter me inspirado a buscar meios de me tornar uma profissional melhor e por tudo que aprendi com eles ao longo desses anos dedicados a educação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que não foram aqui citadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

A todos os animais utilizados para o desenvolvimento desse trabalho.

Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.

(Dalai Lama)

Ferreira, Simone Forcato. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À SULFASSALAZINA EM ASPECTOS REPRODUTIVOS DA PROLE DE RATAS WISTAR**. 2023. 130 folhas. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A Sulfassalazina (SAS) é o fármaco de primeira linha no tratamento de doenças inflamatórias reumáticas e intestinais crônicas em mulheres grávidas e lactantes. Tanto a SAS quanto seus metabólitos atravessam a membrana placentária e assim chegam ao embrião/feto. Além disso, a SAS também pode ser transferido para o bebê através do leite materno. Sabe-se que o tratamento com SAS altera as concentrações de hormônios sexuais e induz infertilidade transitória, em homens e ratos adultos. No entanto, ainda não há estudos na literatura sobre as consequências a longo prazo para o sistema reprodutivo da geração F1 de ratas expostas a SAS durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Assim, o objetivo do nosso estudo foi investigar os efeitos do tratamento com SAS durante os períodos gestacional e lactacional sobre o cuidado materno das mães e as consequências no desenvolvimento reprodutivo da geração F1 durante os períodos neonatal, infância, puberdade e vida adulta. Ratas Wistar (n=10/grupo) receberam 300mg/kg/dia de SAS dissolvida em carboximetilcelulose (CMC), por gavagem, do dia gestacional (DG) 0 ao dia lactacional (DL 21). O grupo controle recebeu apenas CMC. No DPN 21, foi realizado o desmame dos filhotes. Na geração F1, foram avaliados: a instalação da puberdade, peso, análise histológica e parâmetros de estresse oxidativo nos órgãos reprodutivos. Além disso, as ratas F1 também foram analisados quanto a ciclicidade estral, comportamento reprodutivo e fertilidade. Enquanto, os ratos F1 também tiveram a concentração plasmática de testosterona e os parâmetros espermáticos avaliados. Nas ratas F0, o tratamento com SAS diminuiu a motivação para a recuperação dos filhotes. As ratas F1, apresentaram aumento no escore de lordose, na frequência de lordose de magnitude 3 e na peroxidação lipídica do ovário tanto na infância quanto na vida adulta. Em relação aos ratos F1, durante a puberdade, a exposição materna à SAS levou a um aumento no comprimento total dos túbulos seminíferos, e foram observadas presença de células redondas no lúmen da cabeça e cauda do epidídimo. Além disso, a SAS também induziu alterações relacionadas ao estresse oxidativo nos testículos dos ratos F1 durante a infância e da puberdade. Os efeitos da SAS observados no presente estudo representam uma preocupação relevante para a saúde pública, pois demonstraram que o tratamento com SAS comprometeu a motivação materna das ratas F0 e induziu alterações reprodutivas tanto em

ratas quanto em ratos da geração F1. Além disso, é importante ressaltar que para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a investigar as consequências da exposição materna à SAS nos parâmetros reprodutivos da geração F1 de ratos. Assim, este estudo fornece informações para uma melhor compreensão do tratamento com SAS durante os períodos críticos de desenvolvimento.

Palavras-chave: exposição materna, desenvolvimento sexual, comportamento reprodutivo, sistema Xc⁻

Ferreira, Simone Forcato. **EVALUATION OF THE EFFECTS OF MATERNAL EXPOSURE TO SULFASALAZINE ON THE REPRODUCTIVE ASPECTS OF WISTAR RAT OFFSPRING.** 2023. 130 folhas. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Sulfasalazine (SAS) is the first line drug in the treatment of chronic inflammatory bowel and rheumatic diseases in pregnant and breastfeeding women. Both SAS and its metabolites cross the placental membrane and thus reach the embryo/fetus. In addition, SAS can also be transferred to the baby through breast milk. SAS treatment alters the sex hormone levels and induces transitory infertility, in both adult men and male rats. However, there are currently no studies in the literature regarding the long-term consequences on the reproductive system of the F1 generation of rats exposed to SAS during the early stages of development. Thus, the aim of our study was to investigate the effects of SAS treatment during gestational and lactational periods on maternal care in F0 and the consequences in the reproductive development in F1 at neonatal, infant, puberty, and adulthood. Wistar female rats (n=10/group) received 300mg/kg/day of SAS dissolved in carboxymethyl cellulose (CMC), by gavage, from gestational day 0 to lactation day 21. The control group received CMC only. On PND 21, the pups were weaned. In F1, were evaluated the installation of puberty, weight, histological analysis, and oxidative stress parameters in the reproductive organs. Moreover, also were analyzed the estrous cyclicity, sexual behavior, and fertility, in F1 females; and plasma testosterone levels, and sperm parameters, in F1 males. SAS treatment decreased the retrieving behavior in dams. The F1 females presented an increase in the lordosis score, frequency of lordosis of magnitude 3, and lipid peroxidation of ovarian membranes in both infancy and adult life. Regarding the F1 males, during puberty, maternal SAS exposure led to increases in the total length of seminiferous tubules, and round cells were observed in the lumen of caput and cauda epididymis. Moreover, SAS also induces oxidative stress-related changes in testis in both infants and adolescent rats. The SAS effects observed in the current study represent a relevant concern for public health, as they demonstrated that treatment with SAS compromised the maternal motivation of F0 and induced reproductive alterations in F1 female and male rats. Thus, this study provides information for a better understanding of SAS treatment during critical periods of development, once that to our knowledge, this is the first study to investigate the consequences of maternal exposure to SAS in the reproductive parameters in F1 rats.

Keywords: maternal exposure, sexual development, reproductive behavior, System

Xc-

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de um embrião humano de 5 semanas que ilustra a migração de células germinativas primordiais do saco vitelino para o interior do embrião.....	22
Figura 2. Esquema mostrando a diferenciação da gônada bipotencial de um embrião humano de 5 semanas em ovários ou testículos	23
Figura 3. Síntese de hormônios sexuais a partir do colesterol.	24
Figura 4. Fórmula estrutural da molécula de testosterona.....	25
Figura 5. Desenvolvimento inicial dos ovários e útero.	26
Figura 6. Desenvolvimento da genitália externa humana	27
Figura 7. Período sensível para a diferenciação sexual hipotalâmica em ratos..	29
Figura 8. Fórmula estrutural da Sulfassalazina	31
Figura 9. Figura representativa do Sistema Xc^- em neurônios	34
Figura 10. Fluxograma do protocolo experimental empregado nas ratas F0.	38
Figura 11. Fluxograma do protocolo experimental empregado nas ratas F1.	42
Figura 12. Imagens representando os diferentes graus de lordose e pontuação empregada para avaliação do escore de lordose em ratas.	48
Figura 13. Fluxograma do protocolo experimental empregado nos ratos F1.....	50
Figura 14. Ingestão alimentar das ratas da geração F0.....	59
Figura 15. Ganho de peso corporal (g) do dia pós-natal (DPN) 1 ao DPN 21 das ratas da geração F1 expostas matematicamente à Sulfassalazina.	62
Figura 16. Efeito da exposição materna à Sulfassalazina (SAS) sobre a concentração de hidroperóxido lipídico e concentração de glutathiona reduzida (GSH) no ovário das ratas da geração F1.	65
Figura 17. Ingestão alimentar das ratas expostas à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação.....	69
Figura 18. Ganho de peso corporal (g) do dia pós-natal (DPN) 1 ao DPN 21 dos ratos da geração F1 expostos à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação.....	72
Figura 19. Análise histopatológica da cabeça e cauda do epidídimo dos ratos da geração F1..	80
Figura 20. Efeito da exposição materna à Sulfassalazina (SAS) sobre a concentração de hidroperóxido lipídico e de glutathiona reduzida (GSH) no testículo de ratos da geração F1.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ganho de peso corporal durante a gestação (DL1-DG0), lactação (DL21-DL1), número de filhotes por ninhada e razão sexual das ratas da geração F0	58
Tabela 2. Avaliação do comportamento materno das ratas da geração F0.....	60
Tabela 3. Peso corporal e peso de órgãos reprodutivos no dia lactacional (DL) 21 das ratas da geração F0.....	61
Tabela 4. Peso corporal ao nascer e DAG no DPN 1 e DPN 21 das ratas da geração F1.....	61
Tabela 5. Distância anogenital (DAG), peso corporal e peso de órgãos reprodutivos das ratas da geração F1 no dia pós-natal 21	63
Tabela 6. Distância anogenital (DAG), peso corporal e peso de órgãos reprodutivos das ratas F1 adultas (DPN 89-95)	63
Tabela 7. Análise histomorfométrica do útero, número de corpos lúteos e folículos ovarianos das ratas F1 adultas (DPN 89-95).....	64
Tabela 8. Distância anogenital (DAG) relativa, peso corporal, dia em que as ratas F1 apresentaram abertura vaginal e dia de ocorrência do primeiro estro.....	66
Tabela 9. Coeficientes dos diferentes estágios do ciclo estral e duração do ciclo estral das ratas F1 adultas (DPN 75-89)	67
Tabela 10. Parâmetros avaliados durante o comportamento sexual das ratas da geração F1.....	68
Tabela 11. Ganho de peso corporal durante a gestação (DL1-DG0), lactação (DL6-DL1), número de filhotes por ninhada e razão sexual das ratas da geração F1	69
Tabela 12. Análise da motivação materna das ratas da geração F1	70
Tabela 13. Parâmetros de fertilidade das ratas adultas da geração F1	71
Tabela 14. Peso corporal ao nascer e DAG no DPN 1 e DPN 21 dos ratos da geração F1.....	72
Tabela 15. Peso corporal e peso de órgãos reprodutivos dos ratos da geração F1 no DPN 21	73
Tabela 16. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona dos ratos da geração F1 durante a puberdade (DPN 45-60).....	73
Tabela 17. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona dos ratos F1adultos (DPN 90-95).....	74

Tabela 18. Distância anogenital (DAG) relativa, peso corporal e dia em que os animais apresentaram descolamento do prepúcio.....	75
Tabela 19. Parâmetros histomorfométricos do testículo dos ratos da geração F1 durante a infância (DPN 21).....	75
Tabela 20. Parâmetros histomorfométricos do testículo dos ratos da geração F1 durante a puberdade (DPN 45-60).....	76
Tabela 21. Parâmetros histomorfométricos do testículo dos ratos da geração F1 durante a vida adulta (DPN 120-125).....	77
Tabela 22. Análise estereológica do epidídimo dos ratos da geração F1 durante a puberdade (DPN 45-60)	78
Tabela 23. Análise estereológica do epidídimo dos ratos da geração F1 durante a vida adulta (DPN 120-125)	79
Tabela 24. Número de espermátides e produção diária de espermatozoides testicular, número de espermatozoides e tempo de trânsito espermático no epidídimo e, contagem de espermatozoides no ducto deferente de ratos F1 adultos (DPN 90-95).	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF – Ácido fólico

AVPV – Núcleo periventricular anteroventral

HAM – Hormônio antimülleriano

CMC – Carboximetilcelulose

CTR – Controle

CTTS – Comprimento total dos túbulos seminíferos

DAG – Distância anogenital

DG – Dia gestacional

DHT – Di-hidrotestosterona

DSH – Diferenciação sexual hipotalâmica

DL – Dia lactacional

DPN – Dia pós-natal

FSH – Hormônio folículo estimulante

GSH – Glutathiona reduzida

QL – Quimioluminescência

LH – Hormônio luteinizante

LHRH – Hormônio liberador das gonadodrofinas

LQ – Coeficiente de lordose

NF- κ B – Fator nuclear Kappa B

POA – Área pré-óptica

SAS – Sulfassalazina

SX_c – Sistema X_c

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

UEL – Universidade Estadual de Londrina

URL – Unidades relativa de luz

VTS – Volume total dos túbulos seminíferos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	Metodologia	38
3.1	Delineamento experimental	38
3.2	Animais e tratamento	38
3.3	Avaliação de toxicidade materna	41
3.3.1	Avaliação da motivação materna	41
3.4	Avaliação da toxicidade reprodutiva na prole feminina	42
3.4.1	Desenvolvimento físico e sexual	43
3.4.2	Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo	45
3.4.3	Análise da instalação da puberdade	46
3.4.4	Avaliação da ciclicidade estral	46
3.4.5	Avaliações comportamentais (sexual e motivação materna)	47
3.4.5.1	Avaliação do comportamento sexual	47
3.4.5.2	A avaliação da motivação materna	49
3.4.6	Teste de fertilidade	49
3.5	Avaliação da toxicidade reprodutiva na prole masculina	50
3.5.1	Desenvolvimento físico e sexual	50
3.5.2	Quantificação da concentração plasmática de testosterona	51
3.5.3	Análise histológica dos testículos	51
3.5.4	Análise morfométrica e histopatológica do epidídimo	52
3.5.5	Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo nos testículos	53

3.5.6	Parâmetros espermáticos	54
3.5.6.1	Motilidade espermática.....	54
3.5.6.2	Contagem espermática no ducto deferente	54
3.5.6.3	Contagem espermática e produção diária espermática testicular e trânsito espermático no epidídimo	55
3.5.6.4	Morfologia espermática	56
4	Análise estatística.....	57
5	Resultados.....	58
5.1	Parâmetros avaliados nas mães (geração F0)	58
5.1.1	Avaliação da motivação materna da geração F0	59
5.2	Parâmetros analisados na prole feminina (geração F1)	61
5.2.1	Parâmetros de desenvolvimento físico e sexual	61
5.2.2	Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo nos ovários.....	64
5.2.3	Análise da instalação da puberdade e da ciclicidade estral	66
5.2.4	Avaliação dos comportamentos reprodutivos (sexual e motivação materna).....	67
5.2.4.1	Avaliação do comportamento sexual.....	67
5.2.4.2	Avaliação da motivação materna.....	70
5.2.5	Avaliação da fertilidade.....	70
5.3	Parâmetros analisados na prole masculina (geração F1)	71
5.3.1	Desenvolvimento físico e sexual	71
5.3.2	Peso corporal, pese de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona.....	72
5.3.3	Instalação da puberdade	74
5.3.4	Análise histomorfométrica do testículo.....	75
5.3.5	Análise histopatológica do epidídimo	79
5.3.6	Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo nos testículos	80
5.3.7	Parâmetros espermáticos	81

6	Discussão	83
6.1	Ratas da geração F0 e Ratas F1	83
6.2	Ratos F1	87
7	Considerações Finais	93
8	Referências Bibliográficas	94
	APÊNDICE A- Resumo gráfico das alterações reprodutivas induzidas pela SAS nas ratas F0 e F1.	107
	APÊNDICE B- Resumo gráfico das alterações reprodutivas induzidas pela exposição materna à SAS em ratos F1.	108
	ANEXO A- Aprovação da Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina.....	109
	ANEXO B – Artigo referente aos dados das ratas da geração F0 e F1	110
	ANEXO C - Aceite do artigo referente aos dados dos ratos da geração F1.....	130

1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos, a migração de células germinativas que levam a morfogênese das gônadas, das estruturas internas do sistema genital assim como o desenvolvimento da genitália externa são influenciados por hormônios esteroides e ocorrem durante o período gestacional (HO et al., 2017).

Em humanos, o desenvolvimento embrionário pode ser dividido em 3 fases: crescimento, morfogênese e diferenciação. Durante o crescimento ocorre intensa divisão celular culminando com a formação de três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma. A morfogênese é caracterizada por intensa interação entre as células que levam a formação de tecidos e órgãos e, finalmente a diferenciação que é marcada pela maturação dos tecidos formados tornando-os capazes de executar funções especializadas de maneira coordenada originando os sistemas fisiológicos. Cada camada germinativa possui especificidades e ao se diferenciar originam os diferentes sistemas de órgãos (organogênese) (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

O sistema reprodutor é constituído por órgãos e estruturas que compõe as gônadas, sistema genital interno e genitália externa. As gônadas produzem hormônios sexuais e possuem células indiferenciadas denominadas de células germinativas que após passar pelo processo de desenvolvimento e diferenciação originam as células reprodutivas - os gametas. No sexo feminino, os ovários constituem as gônadas e originam os ovócitos. No sexo masculino, os espermatozoides (gametas) são originados nos testículos (gônadas). O sistema genital interno é constituído por ductos e glândulas acessórias que conectam as gônadas à genitália externa. No sexo feminino, todas as estruturas que compõe o sistema genital interno estão localizadas dentro da cavidade pélvica. A genitália externa é constituída pelo conjunto de estruturas que compõe os órgãos sexuais externos (SILVERTHORN, 2010)

Em mamíferos, o desenvolvimento dos órgãos e estruturas que compõe o sistema reprodutor, se inicia a partir da morfogênese das gônadas. Diferentemente da organogênese que culmina com a formação de todos os outros sistemas fisiológicos, o desenvolvimento do sistema reprodutor ocorre de maneira singular, pois apesar de ter uma origem comum para ambos os sexos, o primórdio gonadal é um órgão bipotencial, ou seja, têm o potencial para desenvolver tanto os testículos quanto os ovários. Em humanos, o primórdio gonadal é formado durante a quarta semana do desenvolvimento embrionário e têm início a partir do espessamento do epitélio celômico na superfície dos mesonefros que após passar por uma

série de modificações, promove a determinação do sexo gonadal e este o direciona para uma das duas vias de desenvolvimento levando à diferenciação sexual entre os indivíduos (LECLUZE et al., 2020; MOORE; PERSAUD, 2008).

Na espécie humana, o desenvolvimento sexual primário é determinado geneticamente. Com exceção dos gametas, cada célula nucleada, contém 46 ou 23 pares de cromossomos. O sexo genético ou genotípico de um indivíduo é determinado no momento da fecundação e depende da constituição cromossômica do 23º par de cromossomos designado como cromossomos sexuais. Os cromossomos sexuais são denominados de X ou Y. Estes cromossomos contêm genes que determinam o desenvolvimento das gônadas e demais órgãos e estruturas que compõe o sistema genital interno e a genitália externa. Os outros 22 pares de cromossomos são denominados de cromossomos autossômicos e possuem em sua constituição genes que determinam o desenvolvimento de todos os tecidos, órgãos e sistemas orgânicos de um indivíduo (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2001).

No sexo feminino, ambos os cromossomos que formam o par de cromossomo sexual são X, enquanto o sexo masculino possui um cromossomo X e um Y. Cada célula gamética (ovócito II ou espermatozoide), possui 23 cromossomos (22 autossômicos e 1 sexual). Dessa forma, após o processo normal de gametogênese (nome dado ao processo de formação de gametas pelas gônadas), cada ovócito apresenta um cromossomo X, enquanto cada espermatozoide possui um cromossomo X ou um cromossomo Y. Durante a fertilização, o núcleo dos gametas masculino e feminino se fundem formando a célula ovo ou zigoto e passa a apresentar 46 cromossomos. Portanto, é a constituição genética do cromossomo sexual encontrado no espermatozoide que determina o sexo do indivíduo (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2001).

Os órgãos que compõe o sistema urogenital são derivados da mesoderma. Durante os estágios iniciais da organogênese, o tecido conjuntivo do mesoderma embrionário ao migrar ventralmente forma elevações longitudinais ao lado de cada aorta dorsal originando a crista urogenital que é composta pelo cordão nefrogênico (que ao se diferenciar dá origem ao sistema urinário) e pela crista gonadal (que se forma durante a quinta semana de desenvolvimento embrionário- Figura 1) que ao se diferenciar origina o sistema genital interno (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

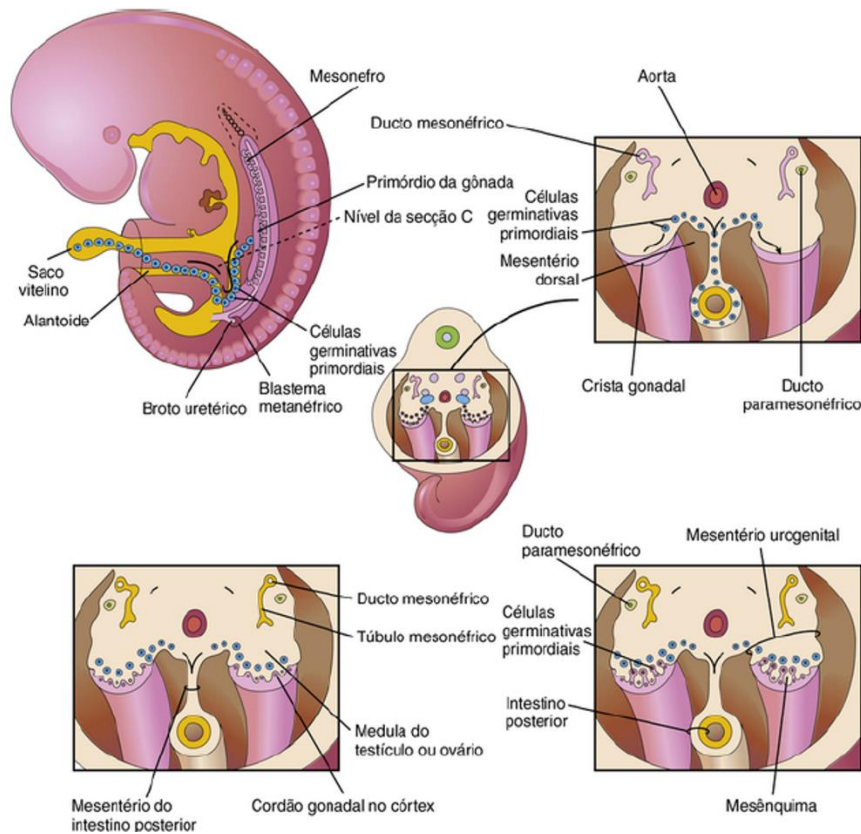


Figura 1. Esquema de um embrião humano de 5 semanas que ilustra a migração de células germinativas primordiais do saco vitelino para o interior do embrião (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

Até a sétima semana do desenvolvimento embrionário, as gônadas indiferenciadas são constituídas por um córtex externo e uma medula interna e é formada pela proliferação e espessamento do epitélio mesodérmico que em conjunto com o mesênquima subjacente formam uma protuberância na região mediana dos mesonefros. A medula das gônadas indiferenciadas cujos embriões possuem os cromossomos sexuais XY, ao se desenvolver darão origem aos testículos, nesses indivíduos a região cortical se degenera. Enquanto as gônadas indiferenciadas dos embriões que possuem ambos os cromossomos sexuais X, o córtex se diferencia originando os ovários e a medula regride (MOORE; PERSAUD, 2008).

Além de um par de gônadas indiferenciadas, o sistema genital interno de ambos os embriões (XX ou XY) é constituído por dois pares de ductos: um par de ductos mesonéfricos também denominados de ductos de Wolff e um par de ductos paramesonéfricos também denominados de ductos de Müller. As células germinativas primordiais se tornam visíveis entre as células endodérmicas próximas à origem do alantoide, por volta da quarta semana do desenvolvimento embrionário. A migração das células germinativas primordiais ao longo do

mesentério dorsal do intestino posterior em direção a crista gonadal é orientada pelos genes *estella*, *fragilis* e *BMP-4*. Ao penetrar o mesênquima subjacente, durante a sexta semana, essas células são incorporadas pelos cordões gonádicos (MOORE; PERSAUD, 2008).

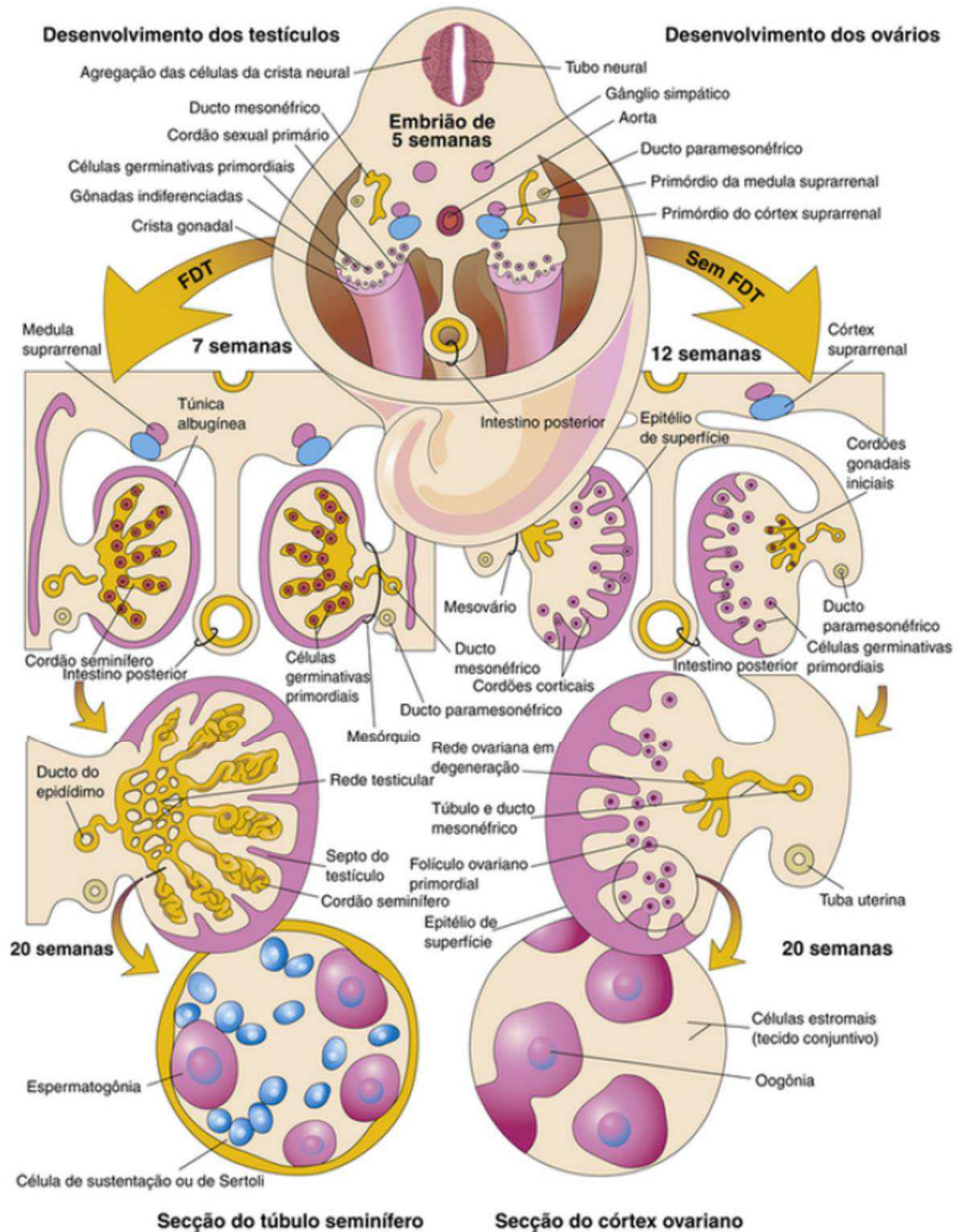


Figura 2. Esquemas mostrando a diferenciação da gônada bipotencial de um embrião humano de 5 semanas (topo) em ovários ou testículos (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

A partir da sétima semana, em embriões XY, um gene localizado próximo a região pseudoautossomal do braço curto do cromossomo Y conhecido como *SRY* (Região determinante do sexo do cromossomo Y) passa a ser transcrito nas células somáticas da crista genital e as direciona para o desenvolvimento dos testículos a partir da síntese de produtos proteicos específicos denominado de fator determinante do testículo (FDT). O FDT (Figura 2) atua nas células de suporte da medula da gônada indiferenciada promovendo sua diferenciação em células de Sertoli e estas formam os cordões sexuais primários (DOMENICE et al., 2002). Esses cordões ao se condensar e adentrar na medula da gônada bipotencial originam a rede testicular. Os demais cordões sexuais primários formam os cordões gonadais que posteriormente se diferenciam em túbulos seminíferos e possui seu epitélio quase que totalmente revestido por células de Sertoli. As células germinativas primordiais após serem incorporadas pelo cordões gonadais originam as espermatogônias. As células intersticiais de Leydig são formadas pela diferenciação das células precursoras esteroideogênicas presentes no mesênquima da gônada primitiva (MOORE; PERSAUD, 2008).

Durante o desenvolvimento testicular fetal, a esteroideogênese (Figura 3) se inicia a partir da sinalização exercida pelo Gonadotrofina coriônica humana (hCG) e posteriormente, por volta da décima sexta semana, as células de Leydig passam a ser também estimuladas também pelo hormônio luteinizante (LH) e a testosterona atinge concentrações semelhantes às encontradas em indivíduos adultos. Ambos hCG e LH atuam sobre o mesmo receptor (acoplado a proteína G), cujo gene está localizado no cromossomo 2 (LATRONICO et al., 1996; LATRONICO; SEGALOFF, 1999).

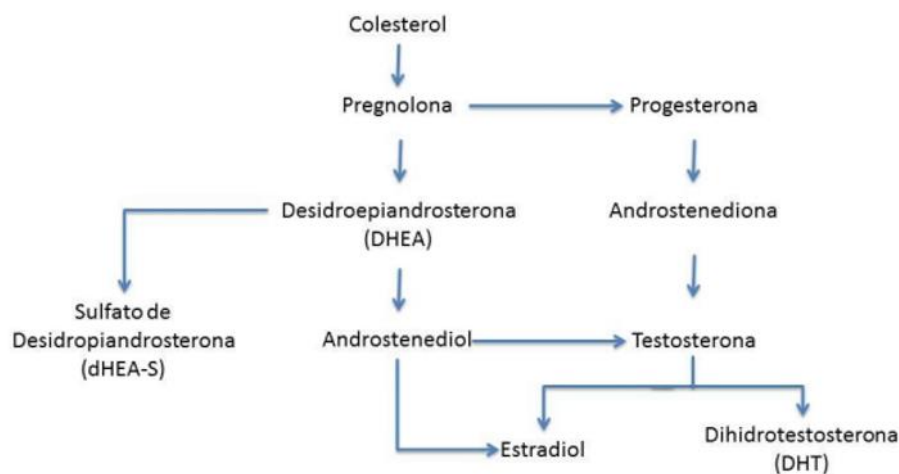


Figura 3. Síntese de hormônios sexuais a partir do colesterol (ROCHA; AGUIAR; RAMOS, 2014).

Sabe-se que além do *gene SRY*, alguns genes presentes em autossomos também participam da cascata de eventos que resultam na determinação e diferenciação sexual humana, dentre eles, estão os genes *SF-1*, *SOX9* e o *WNT-4* (DOMENICE et al., 2002).

O *gene SF-1* (Gene do Fator Estereoidogênico 1) está localizado no braço longo do cromossomo 9 e atua como um importante ativador de genes relacionados ao desenvolvimento testicular, uma vez que modula tanto a cascata estereoidogênica das células de Leydig embrionárias, quanto a expressão do gene envolvido com a biossíntese do hormônio anti-mülleriano (HAM) (LUO et al., 1994). O HAM é uma glicoproteína sintetizado pelas células de Sertoli que promove a degeneração do ducto de Müller. A testosterona (Figura 4) assim como androstenediona são hormônios esteroides anabólicos sintetizados pelas células de Leydig a partir da molécula de colesterol (MARCHETTI; BARTH, 2013) por volta da oitava semana embrionária (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016). Esses hormônios (testosterona e androstenediona) promovem a estabilização e diferenciação do ducto de Wolff culminando com o desenvolvimento do epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016). Ademais, a expressão do *SF-1* também atua como modulador endócrino no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante a diferenciação sexual (LUO et al., 1994).

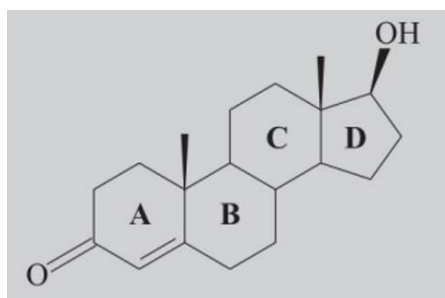


Figura 4. Fórmula estrutural da molécula de testosterona (CUNHA et al., 2004).

O *gene SOX9* (SRY-related HMG-box gene 9) é um gene determinante testicular localizado no braço longo do cromossomo 17 expresso nas células testiculares desde o início de seu desenvolvimento, cuja expressão é regulada pelo *SRY*. Sua expressão pode ser observada nos primórdios gonadais de ambos os sexos, entretanto, embora sua expressão persista nas células de Sertoli, desaparece nos ovários durante seu desenvolvimento (MANSOUR et al., 1995).

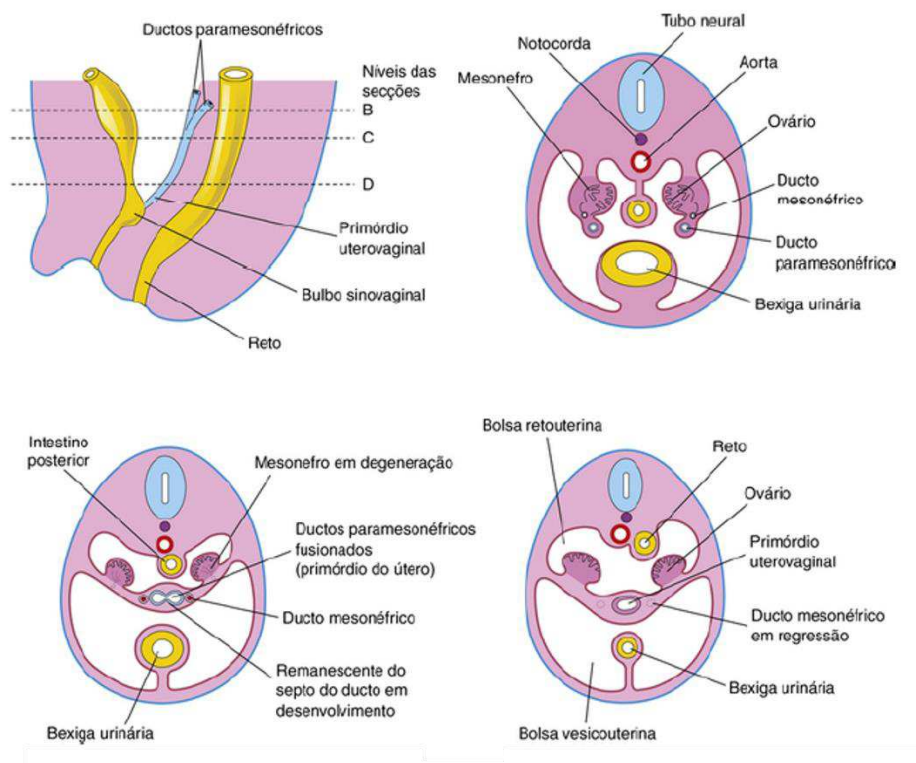


Figura 5. Desenvolvimento inicial dos ovários e útero (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

O gene *WNT4* (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member 4) localizado no braço curto do cromossomo 1, codifica glicoproteínas extracelulares sinalizadoras envolvidas no desenvolvimento dos ovários e do ducto de Müller (VAINIO et al., 1999).

Após a décima semana, em indivíduos XX, na ausência do *SRY*, o epitélio superficial do córtex da gônada indiferenciada origina cordões corticais que se direcionam ao mesênquima subjacente e incorporam as células germinativas primordiais formando os ovários (Figura 5). Cada célula germinativa primordial origina uma oogônia envolta por um aglomerado de células derivadas do rompimento dos cordões corticais (MOORE; PERSAUD, 2008). Em fetos XX, a ausência do HAM permite que o ducto de Müller se diferencie formando as tubas uterinas, útero e parte superior da vagina. Além disso, na ausência de testosterona o ducto de Wolff se degenera (MACIEL-GUERRA; GUERRA JÚNIOR, 2002). O restante da vagina (cerca de 2/3) se formam durante a diferenciação da genitália externa (SILVERTHORN, 2010).

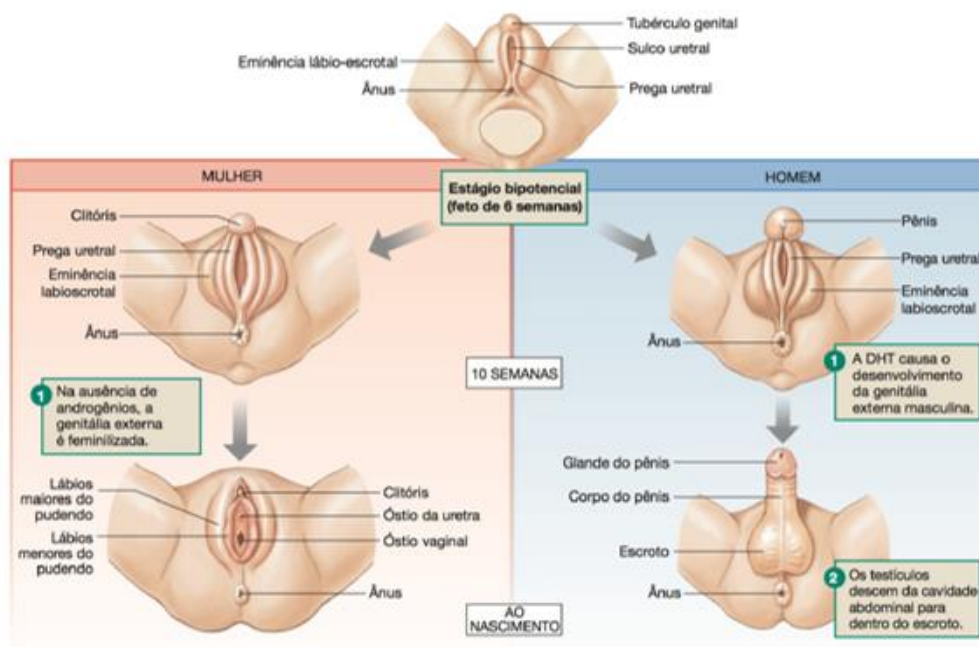


Figura 6. Desenvolvimento da genitália externa humana (SILVERTHORN, 2010).

A genitália externa indiferenciada (Figura 6) é constituída por: tubérculo genital, sulco e pregas uretrais e eminência labioscrotal (SILVERTHORN, 2010). A partir da décima semana, a testosterona é convertida a di-hidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5α -redutase. Este hormônio (DHT) possui a maior potência dentre os andrógenos. Apesar de atuarem sobre o mesmo receptor androgênico, a testosterona e a DHT promovem ações teciduais específicas (MARCHETTI; BARTH, 2013). Durante o desenvolvimento fetal, a DHT controla o desenvolvimento da próstata e promove a masculinização das estruturas da genitália externa. Na ausência de androgênios, a genitália externa é feminilizada (SILVERTHORN, 2010).

Em ratas, o período gestacional dura de 22 a 23 dias. No que se refere ao desenvolvimento do sistema reprodutor, no dia gestacional (DG) 12 destaca-se a determinação sexual gonadal (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018), o início da secreção neuronal do LHRH (AUBERT et al., 1985; SCHWANZEL - FUKUDA; MORRELL; PFAFF, 1985), e a detecção de receptores para o LHRH na hipófise anterior fetal (NEMESKERI; HALASZ; KURAZ, 1983). Entretanto, estudos mostram que apenas entre os DPN 12-14 a hipófise apresenta-se vascularmente conectada ao hipotálamo (FINK; SMITH, 1971; SZABÓ; CSÁNYI, 1982).

Em ratos, no DG 13,5 inicia-se a formação morfológica testicular (JOBILING et al., 2011). Entre os DG 14,5-15,5 o testículo primordial apresenta receptores para o LH (OJEDA; SKINNER, 2006; WARREN; HALTMEYER; EIK-NES, 1975) e passa a secretar testosterona pelas células de Leydig (HABERT; PICON, 1984; SCOTT; MASON; SHARPE, 2009). Pouco tempo depois, entre os DG 16,5-17,5, as células de Sertoli passam a apresentar receptores para o FSH (HODGSON; ROBERTSON; DE KRETZER, 1983; RANNIKKI; ZHANG; HUHTANIEMI, 1995; WARREN; HALTMEYER; EIK-NES, 1975), e os gonócitos se proliferam no período de DG 14,5 e 18 (PICUT et al., 2015). Do DPN 0 até o DPN 9 os gonócitos se diferenciam em espermatogônias (PICUT et al., 2015). O pico de proliferação das espermatogônias e células de Sertoli passam a ser observados a partir do DPN 5 se mantém até o DPN 15 (PRYOR et al., 2000) e encerra-se no DPN 18, dia em que observa-se a formação da barreira hemato-testicular (ORTH, 1982; PICUT et al., 2015).

Nas ratas, após a determinação sexual gonadal (DG 12-14), as células germinativas proliferam e formam “ninhos” cercados por camadas de células epiteliais escamosas que passam originar os folículos primordiais apenas após o nascimento (OJEDA; SKINNER, 2006). Sabe-se que as fêmeas iniciam a diferenciação de células reprodutivas durante o desenvolvimento neonatal e possuem um pool finito desse tipo celular (LEVINE, 2015). Isso acontece porque durante a gestação, os oócitos são protegidos pelas altas concentrações de progesterona materna. No entanto, logo após o nascimento essas células ficam expostas ao fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e grande parte delas morrem (MORRISON; MARCINKIEWICZ, 2002; NILSSON; KEZELE; SKINNER, 2002), o que reduz drasticamente a população de células germinativas ovarianas que originarão os folículos primordiais (KEZELE; SKINNER, 2003; NILSSON; KEZELE; SKINNER, 2002).

Sabe-se que em ratos, o desenvolvimento sexual pode ser dividido em 4 fases: neonatal, infância, juvenil e peripuberal (OJEDA; ADVIS; ANDREWS, 1980; PICUT et al., 2015; PICUT; REMICK, 2017). O período neonatal corresponde a primeira semana após o nascimento tanto para machos quanto para fêmeas. A infância tem início no dia pós-natal (DPN) 8 para ambos e se estende até o DPN 20 para os machos e DPN 21 para as fêmeas. Entretanto, para os machos, o período juvenil está compreendido entre os DPN 21 e DPN 35 e o peripuberal entre os DPN 36 e 55-60, quando a presença de espermatozoides maduros no ducto deferente passa a ser detectada (CLEGG, 1960; OJEDA; ADVIS; ANDREWS, 1980). Enquanto para as fêmeas, o período juvenil se inicia no DPN 22 e termina entre os DPN 30-32 quando inicia o peripuberal que termina entre os DPN 38-40 quando ocorre a primeira ovulação (OJEDA; ADVIS; ANDREWS, 1980). Assim, em ratos, durante os períodos

gestacional (que abrange os estágios: embrionário e fetal) e lactacional (que abrange os períodos neonatal e infância) ocorrem importantes janelas críticas de desenvolvimento (STOKER et al., 2000).

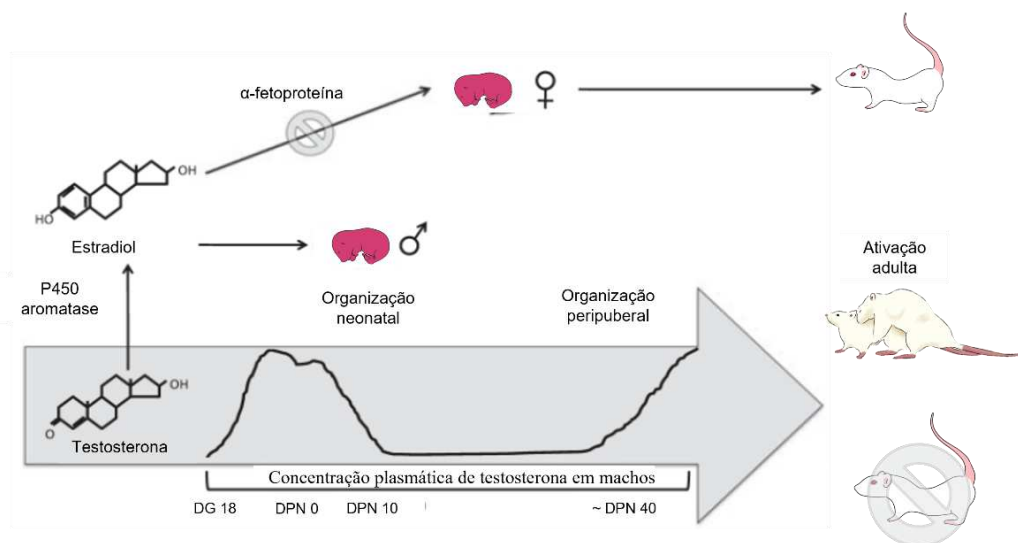


Figura 7. Período sensível para a diferenciação sexual hipotalâmica em ratos. Adaptado de (LENZ; MCCARTHY, 2010).

Além da formação, crescimento e diferenciação do sistema reprodutor, durante o período perinatal também ocorre a diferenciação sexual hipotalâmica (DSH) (LENZ; MCCARTHY, 2010). Em ratos, a DSH (Figura 7) está compreendida entre o DG 17/18 (WEISZ; WARD, 1980) e o DPN 10 (JACOBSON; GORSKI, 1981) e se inicia a partir do primeiro pico de testosterona de origem testicular fetal que é complementado por um segundo pico androgênico que ocorre no DPN 1. Esses primeiros picos androgênicos são denominados de período organizacional. Ao atingir o hipotálamo masculino, a testosterona é convertida pela enzima aromatase (P450) em estradiol (PHOENIX, 2009) que por sua vez, atua de forma específica promovendo alterações neuronais necessárias na área pré-óptica (POA) causando a masculinização. Este mesmo hormônio (estradiol), ao atuar no hipotálamo médio basal resulta no processo conhecido como defeminização (WRIGHT et al., 2010). Durante a puberdade, sob a ação de um terceiro pico androgênico, o hipotálamo masculino passa por um período denominado de ativacional, que atua como um indutor do comportamento sexual masculino (AMATEAU; MCCARTHY, 2004). Enquanto em ratas, a ausência de estimulação estrogênica no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) durante a DSH, as tornam aptas a apresentar o comportamento de lordose na idade adulta (WRIGHT et al., 2010). Assim, a atividade hormonal causada pelos picos plasmáticos de testosterona de origem testicular

durante o período perinatal (BEACH, 1976) modificam a morfologia e a fisiologia neuronal permitindo que o cérebro, em desenvolvimento, torne-se responsivo aos perfis hormonais adultos, sendo, portanto, responsável pela fisiologia reprodutiva e do comportamento (LENZ; MCCARTHY, 2010).

O sistema reprodutor humano é suscetível à uma grande variedade de fatores exógenos como os poluentes ambientais, cosméticos, patógenos e drogas (FOSTER; GRAY, 2008) de tal modo que os efeitos adversos resultante da exposição ambiental a todos esses agentes sobre o sistema reprodutor está diretamente relacionado com o aumento da infertilidade humana em vários países (WANGIKAR; AHMED; VANGALA, 2011). Sabe-se que a exposição materna a fármacos pode acarretar sérias consequências para o embrião e resultar tanto em anomalias congênitas quanto induzir alterações importantes em diversos sistemas fisiológicos em especial o sistema reprodutor incluindo a maturação sexual (WANGIKAR; AHMED; VANGALA, 2011).

De fato, vários trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que em ratos, a exposição materna à xenobióticos é capaz de causar importantes alterações reprodutivas e comportamentais ao longo do desenvolvimento tanto na prole masculina (FORCATO et al., 2017; PEREIRA et al., 2020; VIEIRA et al., 2013) quanto na feminina (ALEIXO et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016; MONTAGNINI et al., 2018). Sabe-se que condições intrauterinas adversas, são capazes de induzir efeitos deletérios transgeracionais (FINDLAY et al., 2015), uma vez que alterações em fatores ambientais durante a gestação estão associadas a reprogramação de genes responsáveis por modificar permanentemente a estrutura e o funcionamento de diferentes órgãos (CIANFARANI et al., 2012; PAMPANINI et al., 2019). Assim, a vida fetal é a primeira janela fundamental de suscetibilidade para o indivíduo.

Devido à complexidade ética que envolve a realização de pesquisas científicas com humanos, ao longo das últimas décadas, o uso de modelos animais, como roedores vem sendo frequentemente usados para avaliar o risco potencial para a reprodução humana, em especial, no que se refere à identificação e caracterização das consequências na função reprodutiva de adultos expostos a fatores ambientais como os xenobióticos, durante a infância (OJEDA; SKINNER, 2006; PRYOR et al., 2000). Além disso, sabe-se que os ratos constituem um modelo animal especialmente adequado para determinar parâmetros farmacocinéticos após administração oral de formulações líquidas (KARARLI, 1995).

A partir do pressuposto de que a maioria dos mecanismos fisiológicos básicos (incluindo os que se referem a maturação sexual) estão conservados dentre os mamíferos, é possível extrapolar muitos dos resultados obtidos no rato para outras espécies, incluindo

humanos. Dentre esses mecanismos, podemos citar, o controle do hormônio liberador das gonadotrofinas (LHRH ou GnRH) por neurotransmissores, o início da secreção hipofisária de gonadotrofinas (LH e o hormônio folículo estimulante (FSH)), assim como o controle exercido por elas sobre o desenvolvimento ovariano e testicular (OJEDA; SKINNER, 2006).

Em mamíferos, em ambos os sexos, o LH estimula a produção de hormônios esteroides sexuais (androgênios, progesterona, dentre outros), enquanto o FSH juntamente com os hormônios esteroides sexuais regulam a gametogênese que se inicia durante a vida intrauterina. Durante o nascimento, as gônadas tornam-se quiescentes (relativamente inativas) e assim permanecem até a puberdade quando amadurecem. A partir da puberdade e sob a ação do LHRH, as gônadas retomam a gametogênese e o indivíduo torna-se apto a manifestar o comportamento sexual (SILVERTHORN, 2010).

Sabe-se que o tratamento com a Sulfassalazina (SAS) (Figura 8) altera as concentrações de hormônios esteroides como a testosterona e aumenta as concentrações de outros hormônios sexuais que atuam no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal como as gonadotrofinas tanto em ratos quanto em homens (OSAWA; FAROMBI, 2018; RAGNI et al., 1984), respectivamente. Em ratos adultos, o tratamento com 600 mg/kg/dia de SAS por gavagem, durante 14 dias aumentou tanto LH quanto FSH (OSAWA; FAROMBI, 2018) e na dose de 3g/dia a SAS reduziu LH em homens (RAGNI et al., 1984).

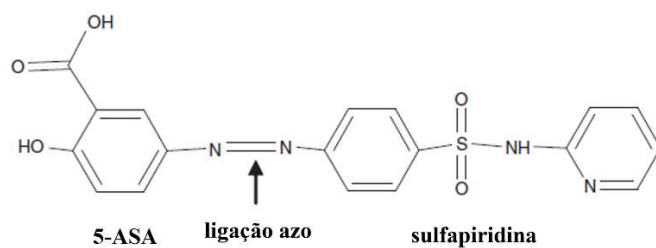


Figura 8. Fórmula estrutural da Sulfassalazina (LINARES; ALONSO; DOMINGO, 2011).

A SAS é um medicamento prescrito como primeira linha para o tratamento de doenças crônicas inflamatórias intestinais como colite ulcerativa e doença de Crohn e reumáticas como artrite reumatoide e espondilite anquilosante (LODOWSKA et al., 2015). Os efeitos adversos mais comuns são: cefaleia, erupções cutâneas, náusea, vômito, dispepsia, anorexia e oligospermia reversível. SAS é composta por 5-aminossalicilato (5-ASA) ligado à sulfapiridina através de uma ligação azo (GOODMAN; GILMAN, 2011). Em humanos, cerca

de 10 a 30% da SAS ingerida por via oral atinge a circulação sistêmica de forma inalterada após ser absorvida no intestino delgado (PLOSKER; CROOM, 2006). O restante, aproximadamente 75% atingem o intestino grosso (PLOSKER; CROOM, 2006) onde é clivada por bactérias azoredutases presentes no trato gastrointestinal distal de humanos e ratos (PEPPERCORN; GOLDMAN, 1973; RAINS; NOBLE; FAULDS, 1995; TETT, 1993). Os efeitos adversos da SAS são atribuídos a sulfapiridina que é quase totalmente absorvida (> 90%) em comparação com cerca de 20-30% do 5-ASA também conhecido como mesalazina (RAINS; NOBLE; FAULDS, 1995; TETT, 1993) ao qual atribui-se o efeito terapêutico da SAS (OSAWA; FAROMBI, 2018).

De acordo com estudos *in vitro* (LAPPAS et al., 2002; LODOWSKA et al., 2015; PELTIER et al., 2009; WAHL et al., 1998) e *in vivo* (GAN; CHEN; OUYANG, 2005), o mecanismo de ação da SAS inclui a inibição de um importante fator de transcrição de citocinas pró-inflamatórias – o Fator nuclear kappa B (NF-kappaB).

Devido à sua eficácia e baixa incidência de efeitos adversos em comparação com outros medicamentos anti-inflamatórios e antirreumáticos, a prescrição deste fármaco para gestantes e lactantes tem se tornado cada vez mais comum (BIRRU TALABI; CLOWSE, 2020) e vem sendo considerado seguro inclusive durante o primeiro trimestre gestacional por não induzir teratogênese (NORGARD et al., 2007; VIKTIL; ENGELAND; FURU, 2012).

Entretanto, tanto a SAS quanto seus metabólitos atravessam a placenta (ESBJORNER; JARNEROT; WRANNE, 1987; GOODMAN; GILMAN, 2011; JÄRNEROT; INTO-MALMBERG; ESBJÖRNER, 1981) e atingem concentrações sanguíneas fetais próximas às concentrações maternas (JÄRNEROT; INTO-MALMBERG; ESBJÖRNER, 1981). Sabe-se que durante a vida intrauterina, a exposição a xenobióticos, dentre eles os fármacos, pode mudar permanentemente a estrutura, função e o metabolismo celular aumentando a suscetibilidade do organismo ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis durante a vida adulta (HO et al., 2017). Além disso, a exposição do neonato aos metabólitos da SAS como à sulfapiridina, também ocorre através do leite materno (BERLIN; YAFFE, 1980; ESBJORNER; JARNEROT; WRANNE, 1987; KHAN; TRUELOVE, 1979). Assim, a exposição materna à SAS durante os estágios iniciais de desenvolvimento poderia afetar diretamente o organismo fetal e prejudicar o desenvolvimento reprodutivo dos filhotes.

Vários estudos na literatura mostram que em indivíduos adultos, o tratamento com SAS induz consequências graves na função reprodutiva, resultando em infertilidade transitória caracterizada pela redução da contagem e da motilidade espermática e pela morfologia

anormal das células espermáticas tanto em humanos (BIRNIE; MCLEOD; WATKINSON, 1981; HORIMOTO et al., 2000; LEVI et al., 1979) quanto em ratos (ALONSO et al., 2009; FUKUSHIMA et al., 2005, 2007; HOYT; FISHER; SWISHER, 1995; OMMATI et al., 2018; OSAWE; FAROMBI, 2018; SHARMA; KHAJJA; PAREEK, 2007). Além disso, alguns estudos, mostram uma relação entre danos espermáticos com um estado de estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) (ALONSO et al., 2009; OMMATI et al., 2018; OSAWE; FAROMBI, 2018; SUN et al., 2017; YU et al., 2017).

As ERO, também chamadas de radicais livres, são produzidas durante o processo de metabolismo do oxigênio e têm pelo menos um elétron desemparelhado que as tornam altamente reativas. Quando não estão em equilíbrio com os antioxidantes, os radicais livres podem atacar moléculas próximas, iniciando uma reação em cadeia que pode levar à oxidação rápida de biomoléculas, exercendo efeitos positivos ou negativos nas funções celulares normais (WARREN; JOHNSON; WARD, 1987). Esse equilíbrio normalmente é mantido pelo metabolismo aeróbico mitocondrial e a produção de antioxidantes celular.

Quando em equilíbrio com os sistemas de defesa antioxidantes (SDA), as ERO atuam durante gestação (MYATT; CUI, 2004), início do trabalho de parto prematuro (PRESSMAN et al., 2003; WALL; PRESSMAN; WOODS, 2002) e a termo (FAINARU et al., 2002; MOCATTA et al., 2004). Além disso, em mulheres, ERO também estão envolvidas com importantes processos relacionados ao ciclo menstrual como a apoptose das células do corpo lúteo (SUGINO et al., 1993), maturação dos oócitos (HU et al., 2001), sinalização hormonal, foliculogênese e estereoidogênese (JOZWIK et al., 1999; RILEY; BEHRMAN, 1991; SABATINI et al., 1999; SUGINO et al., 1996; TAMATE; SENGOKU; ISHIKAWA, 1995).

Em homens, as ERO também são importantes para a saúde reprodutiva uma vez que estão envolvidos com processos que culminam com a capacitação espermática (COCUZZA et al., 2007; DEEPINDER; COCUZZA; AGARWAL, 2008), hiperativação e na reação acrossômica que culmina com a fusão do espermatozoide com o ovócito (LEWIS et al., 1995; SIES, 1993) promovendo a fertilização.

Entretanto, em situações em que as células tornam-se incapazes de neutralizar os radicais livres produzidos pelo metabolismo celular, seja pelo aumento excessivo na formação de ERO e/ou; devido à redução na produção endógena de antioxidantes (SHARMA et al., 1999), às células entram em estado de estresse oxidativo que resultam em apoptose celular e induzem efeitos patológicos que promovem danos aos diferentes tecidos e órgãos (AITKEN; BAKER, 1995).

No que se refere ao sistema reprodutor, o desbalanço na relação entre ROS/antioxidantes promovem alterações em vias celulares e estas resultam em danos às células germinativas, prejudicam a fertilização e induzem o aumento de abortos espontâneos e no desenvolvimento de doenças transgeracionais (AITKEN; CURRY, 2011; OPUWARI; HENKEL, 2016).

No sistema reprodutor feminino, o estresse oxidativo está correlacionado a processos fisiopatológicos como endometriose, hidrossalpinge (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003; BEDAIWY et al., 2002a, 2002b; MURPHY et al., 1998; MURPHY; SANTANAM; PARTHASARATHY, 1998) e síndrome do ovário policístico (GONZÁLEZ et al., 2006).

Em homens, o estresse oxidativo está envolvido com diversas alterações espermáticas que incluem: mudanças na morfologia, redução na contagem, na motilidade e na viabilidade dos espermatozoides (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997), fragmentação de DNA e apoptose em células gonadais (DOROSTGHOAL et al., 2017), sendo portanto uma das principais causas de infertilidade masculina (AGARWAL et al., 2018; BARATI; NIKZAD; KARIMIAN, 2020; LAVRANOS et al., 2012).

Assim, o estresse oxidativo pode ser definido pelo desequilíbrio entre as concentrações de ROS que são geradas pelo metabolismo celular e a capacidade da célula de neutralizar e reparar os danos causados pelo estado de estresse oxidativo por meio do SDA (AGARWAL; ALLAMANENI, 2004; PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014). Os SDA endógenos das células incluem enzimas antioxidantes como glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e compostos não enzimáticos como a glutatona reduzida (GSH) e algumas proteínas com baixo peso molecular (POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). A GSH é o principal antioxidante endógeno que não só atua na desintoxicação celular e no sistema imunológico (KHAN et al., 2018), mas também tem um papel importante na manutenção de todos os outros antioxidantes (ADEOYE et al., 2018).

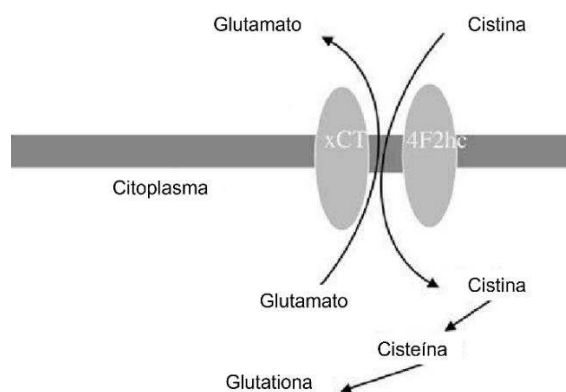


Figura 9. Figura representativa do Sistema Xc⁻ em neurônios. Adaptado de (LEWERENZ; MAHER, 2011).

Sabe-se que o sistema X_c^- (SX_c^-) (Figura 9) fornece a entrada de cistina necessária para a biossíntese de GSH. Portanto, o SX_c^- é considerado o mecanismo chave para reagir ao estresse oxidativo celular (CONRAD; SATO, 2012) uma vez que a inibição do SX_c^- leva ao acúmulo tóxico de ROS (LEWERENZ; KLEIN; METHNER, 2006) e este pode ter implicações relevantes para o desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis (AUNAN et al., 2016).

O SX_c^- é um transportador transmembrana constituído de duas subunidades de proteínas: a xCT que é uma cadeia leve específica para o SX_c^- e a 4F2hc que é uma cadeia pesada que pode ser encontrada incorporada a vários sistemas de transportadores de aminoácidos (BRIDGES et al., 2001; SATO et al., 1999). O SX_c^- é encontrado na barreira hematoencefálica assim como em todo parênquima cerebral e (BAKER et al., 2002; BURDO; DARGUSCH; SCHUBERT, 2006) e atua como trocador antiporte de cistina/glutamato da membrana plasmática (LEWERENZ; MAHER, 2011), na proporção de 1:1 (MASSIE et al., 2011), que promove a liberação de um glutamato para cada entrada de molécula de cistina (BENTEA et al., 2020). Assim, além da relação com a biossíntese de GSH, o SX_c^- também é importante para a fisiologia do comportamento, uma vez que o SX_c^- é o principal responsável pela liberação de glutamato não vesicular, que ocorre continuamente no sistema nervoso central (SNC) (BENTEA et al., 2020) contribuindo com cerca de 60-70% das concentrações extracelular de glutamato em algumas regiões do cérebro, como hipocampo (BUNDEL et al., 2011) e corpo estriado (MASSIE et al., 2011). Sabe-se que o desequilíbrio na liberação de glutamato vem sendo relacionado com processos patogênicos relacionados com a manifestação de estresse (POPOLI et al., 2013) e transtornos do humor, como ansiedade e comportamento do tipo depressivo (BENTEA et al., 2015; POPOLI et al., 2013).

A SAS é um potente inibidor do SX_c^- (GOUT et al., 2001) aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (BERKENBOSCH et al., 1990). Lutgen e colaboradores (2014) demonstraram que ratos adultos tratados com SAS na dose 0-16 mg/kg por via intraperitoneal tiveram o SX_c^- inibido e apresentaram alterações nos parâmetros comportamentais de motivação (LUTGEN et al., 2014). Além disso, em camundongos adultos, a ausência de SX_c^- corticoestriatal causa uma redução nas concentrações de glutamato pré e pós-sináptico resultando em déficit no comportamento de sociabilidade desses animais (BENTEA et al., 2020). A conectividade corticoestriatal está amplamente envolvida em mecanismos de comportamentos motivacionais (SHEPHERD, 2013). Em mamíferos, assim como roedores e humanos, o comportamento materno é um comportamento social complexo e bem-organizado

que envolve mecanismos altamente motivacionais (FLEMING; CORTER, 1988; NUMAN, 2007; OLAZÁBAL et al., 2013; ROSENBLATT, 1989; SMILEY et al., 2019) e sabe-se que o sucesso reprodutivo de um indivíduo, depende da integridade morfológica e funcional do sistema reprodutor, bem como dos sistemas motivacionais centrais que estão envolvidos com os comportamentos reprodutivos (sexual e materno). Portanto, o tratamento materno com SAS poderia induzir alterações motivacionais, levando a prejuízos também no comportamento reprodutivo.

Assim, considerando 1) a utilização da SAS no tratamento de artrite reumatóide e de doenças crônicas inflamatórias intestinais durante a gestação e lactação; 2) a exposição da prole em decorrência da passagem deste fármaco pela placenta e pelo leite; 3) a falta de informações específicas sobre as consequências para o desenvolvimento reprodutivo da prole exposta à SAS durante as janelas críticas do desenvolvimento e da relevância clínica do assunto; o presente estudo justificou-se pela investigação de possíveis alterações na função reprodutiva da prole desencadeadas pela exposição materna à SAS durante as fases iniciais do desenvolvimento de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se a exposição materna à SAS, durante a gestação e lactação, pode resultar em alterações sobre a morfologia e função reprodutiva da prole de ratas.

2.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos da SAS em ratas Wistar da geração parental (F0), assim como suas consequências para o desenvolvimento reprodutivo da geração F1 incluindo os períodos neonatal, infância, puberdade e vida adulta, avaliando:

Nas ratas da geração F0: investigar quanto a toxicidade reprodutiva e a motivação para o cuidado materno.

Nas ratas da geração F1: investigar o desenvolvimento reprodutivo pós-natal incluindo o comportamento reprodutivo, parâmetros de estresse oxidativo das gônadas e fertilidade.

Nos ratos da geração F1: investigar o desenvolvimento reprodutivo pós-natal, incluindo parâmetros de estresse oxidativo das gônadas.

da manhã) e com água e ração (NuvilabTM, Quimtia) à vontade. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UEL (CEUA: 10495.2018.13).

Para o acasalamento, depois de um período de adaptação de 15 dias, ao final da tarde foi colocado um macho em cada gaiola contendo duas fêmeas. Na manhã do dia seguinte, foi realizado esfregaço vaginal e a fêmea foi considerada prenhe se no esfregaço fosse observado espermatozoides. Este dia, foi denominado dia gestacional (DG) 0, as fêmeas (n=10/grupo) foram alocadas em gaiolas individuais e divididas para compor os seguintes grupos experimentais e obtenção dos filhotes:

- Grupo controle (CTR), em que ratas foram tratadas diariamente com 0.50ml de carboximetilcelulose (CMC), por gavagem.
- Grupo Sulfassalazina (SASG), em que as ratas foram tratadas com SAS dissolvida em CMC na dose de 300 mg/kg/dia, diariamente, por gavagem (ALONSO et al., 2009).

Ambos os grupos foram tratados do DG 0 até o dia do desmame da prole, ou seja, dia lactacional (DL) 21. Devido a SAS inibir a absorção gastrointestinal de folato, durante o período gestacional, as ratas do grupo SASG também receberam ácido fólico (AF) na dose de 3 mg/kg/dia, através de gavagem (HERNÁNDEZ-DÍAZ et al., 2000; JANSEN et al., 2004; VERMEIRE et al., 2012). O tratamento com AF aconteceu 2 horas antes do tratamento com SAS. O AF também foi dissolvido em CMC. O primeiro tratamento foi realizado diariamente entre as 10:00 e 11:00 horas da manhã. O grupo CTR recebeu apenas CMC durante os dois tratamentos. A cada 3 dias foi realizado o acompanhamento do ganho de peso corporal das fêmeas para correção do volume de administração.

A dose de 300 mg/kg/dia de SAS representa um ajuste dosimétrico da dose recomendada para gestantes que é de 500 mg/dia. Realizando ajuste dosimétrico utilizando a escala BW^{3/4} (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA, (2011)(U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA); OFFICE OF THE SCIENCE ADVISOR RISK ASSESSMENT FORUM, 2011), e considerando o peso de um humano adulto de 70 kg e o de um roedor com 250 g, obtemos o valor de 29,75 mg/kg/dia (variação interespecie). No entanto, considerando que em ratos, o metabolismo é dez vezes mais rápido que o humano, adotou-se o fator 10 (variação intraespecie), resultando na dose de 298 mg/kg/dia, o qual foi arredondada para 300 mg/kg/dia, considerando-se a proximidade com

estudos na literatura (ALONSO et al., 2009; DIK et al., 2018; HORIMOTO et al., 2000; OMMATI et al., 2018). Com relação ao AF, a dose recomendada para gestantes com risco de problemas de desenvolvimento fetal relacionado ao tubo neural, assim como de anomalias cardiovasculares é de 5 mg/dia (FLINT et al., 2016; HIGASHI et al., 2016) que corresponde a 0,071 mg/kg/dia com a mesma racionalidade em que foi obtida a dose de SAS e aplicando o método de dosimetria, essa dose corresponderia a 0,3 mg/kg/dia em ratos, portanto foi adotada a dose de 3 mg/kg/dia considerando o fator 10 de variação intraespécie.

A suplementação com AF foi fornecida apenas durante o período gestacional porque: (1) nossa principal preocupação era evitar a teratogênese relacionada à deficiência de AF durante o tratamento materno com SAS (NORGARD et al., 2007; VIKTIL; ENGELAND; FURU, 2012); (2) embora o desenvolvimento pós-natal também seja sensível à deficiência de AF, a exposição a baixa concentração de AF é mais crítica durante a gravidez do que durante a lactação (ANGELO, 2016; BRASIL; OLIVEIRA, 2017). Além disso, por volta do DPN 10, os filhotes começam a comer a dieta de roedores que é ofertada à mãe que normalmente contém concentrações de micronutrientes como AF; e (3) AF tem propriedades antioxidantes e a suplementação durante o período lactacional poderia alterar o perfil de estresse oxidativo dos animais da geração F1.

No DG 22, os filhotes nasceram naturalmente e este dia foi denominado como dia pós-natal (DPN) 0. No DPN 1, os filhotes foram contados, pesados e tiveram o sexo determinado. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas para 8 animais (4 machos e 4 fêmeas, sempre que possível) para se evitar que filhotes pertencentes a ninhadas maiores recebessem menor quantidade de SAS que os filhotes de ninhadas menores. Para cada avaliação prevista, foi utilizado somente um filhote macho e/ou um filhote fêmea para evitar o efeito ninhada (homogeneidade genética ou variabilidade materna), tendo 10 animais/grupo em cada parâmetro analisado. Portanto, a ninhada foi a unidade experimental. Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. As ninhadas com menos de 8 filhotes foram excluídas dos experimentos. No DPN 21 foi realizado o desmame e os filhotes foram alocados em gaiolas coletivas com animais de mesmo sexo (4-5 animais por caixa).

3.3 Avaliação de toxicidade materna

Os animais foram monitorados diariamente quanto à mortalidade, perda acentuada de peso e outros sinais visíveis de toxicidade como alterações neurológicas (rigidez muscular, tremor e convulsão), sinais autonômicos (lacrimejamento, piloereção, alteração pupilar e padrão respiratório alterado) e, mudanças comportamentais (agitação ou letargia). A partir do DG 0 foram registrados o peso e o consumo de ração das mães semanalmente até o DL 21. Além disso, o ganho real de peso corporal durante a gestação foi estimado subtraindo o peso no DL 1 (primeiro dia após o parto) do peso do DG 0 (dia do diagnóstico de prenhez), Assim como o ganho de peso durante a lactação foi estimado subtraindo o peso no DL 21 (último dia lactacional) do peso do DL 1. Excluindo, portanto, a influência do tamanho da ninhada do ganho de peso das mães.

3.3.1 Avaliação da motivação materna

O protocolo para a avaliação da motivação para o cuidado materno foi conduzido no DL 5 de acordo com a metodologia descrita por Kiss e colaboradores (KISS et al., 2012). Esse teste comportamental foi empregado para investigar os efeitos da exposição materna à SAS sobre a motivação materna e interação mãe-filhote. O DL 5 foi escolhido devido ao pico de cuidado materno que ocorre nesse dia. Todas as análises comportamentais foram realizadas entre as 09:00 e 12:00h.

No dia do teste, a mãe foi removida de sua caixa e mantida separada dos filhotes por 30 min. Após os 30 min de separação, os filhotes foram alocados de forma aleatória na caixa de modo a desmanchar o ninho e a mãe foi devolvida à caixa. Após esses procedimentos, a interação mãe-filhote foi filmada durante 30 min. A gravação foi posteriormente analisada e avaliada quanto a: latência em segundos em que a mãe recuperou o primeiro filhote; recuperação dos filhotes (número total de vezes em que a mãe recuperou os filhotes e os levou em direção ao ninho); contato com os filhotes (número total de vezes em que a mãe teve contato e/ou transportou algum filhote e o soltou em algum lugar aleatório da caixa). Esse

teste também avaliou o tempo gasto pela mãe: construindo o ninho (com ou sem contato com os filhotes); limpeza do filhote (limpando/lambendo qualquer parte da superfície corporal do filhote incluindo a região anogenital); amamentando (em qualquer posição materna); e em autolimpeza (limpando/lambendo o próprio corpo).

O tempo que a mãe não apresentou nenhum dos comportamentos acima foi considerado como tempo "fora do ninho". Os dados foram apresentados em porcentagem de tempo. Os vídeos foram analisados usando o aplicativo *Countee* (Krushka Design) para a plataforma *Android*.

3.4 Avaliação da toxicidade reprodutiva na prole feminina

O diagrama abaixo (Figura 11) resume o delineamento experimental empregado nas ratas F1.

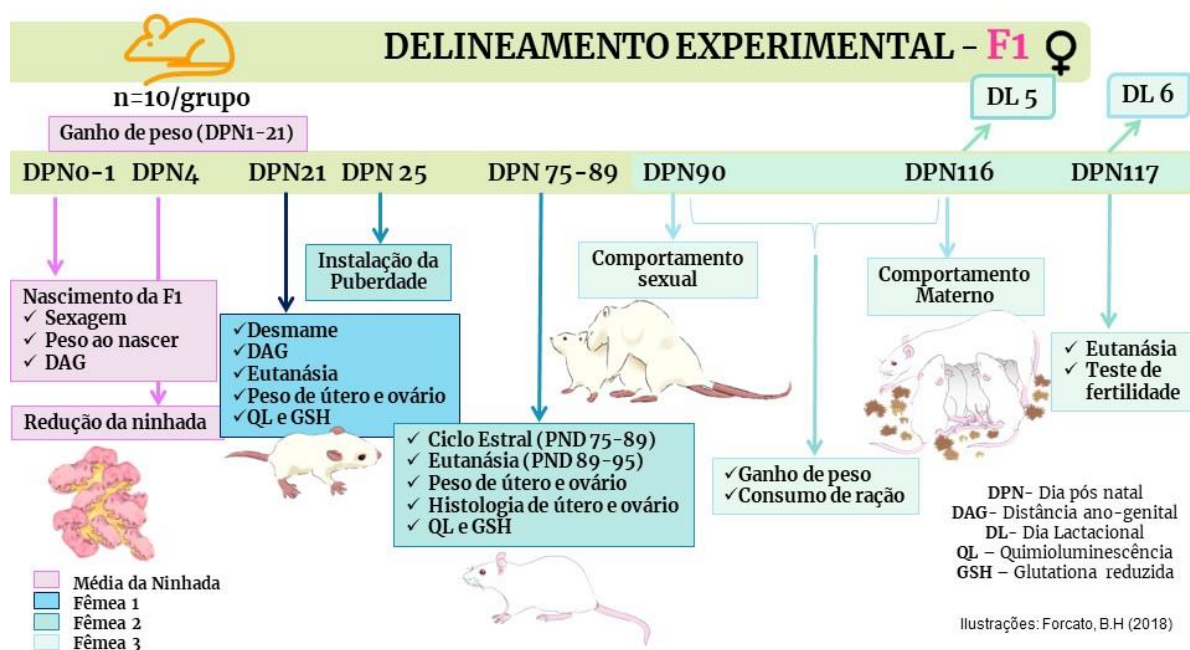


Figura 11. Fluxograma do protocolo experimental empregado nas ratas F1.

Como o tratamento materno com SAS pode atingir a prole através da placenta e/ou leite materno, e tanto o sistema reprodutor quanto os circuitos neurais associados estão em desenvolvimento nesta fase, as repercussões reprodutivas na prole feminina foram avaliadas. No DPN 21 (dia do desmame), três filhotes fêmeas de cada ninhada foram selecionados para avaliação reprodutiva em diferentes momentos: uma na infância e duas na vida adulta (n= 9-10 por grupo/idade) (GOLUB; SOBIN, 2020). Uma fêmea foi submetida à eutanásia durante a infância (DPN 21) para determinação do peso dos órgãos reprodutivos (útero e ovário direito) e análise de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no ovário, uma vez que o comprometimento do sistema antioxidante é uma via de ação sugerida da SAS no sistema reprodutor. Uma segunda fêmea foi usada para avaliar parâmetros reprodutivos não comportamentais, como instalação da puberdade (abertura vaginal e primeiro estro), ciclicidade estral, peso dos órgãos reprodutivos, análise histológica dos folículos ovarianos e útero e análise de parâmetros de estresse oxidativo durante a vida adulta (DPN 90-95). Finalmente, uma terceira fêmea foi usada para estudos sobre os efeitos do tratamento materno com SAS em parâmetros de comportamento reprodutivo (sexual e motivação para o cuidado materno) e, avaliação da fertilidade.

3.4.1 Desenvolvimento físico e sexual

O peso corporal das fêmeas (n=10/grupo) foi obtido um dia após o nascimento (DPN 1) e nos DPN 4, 7, 14 e 21. Durante o período de lactação, os filhotes também foram observados diariamente quanto ao seu estado geral de saúde no que se refere aos sinais gerais de toxicidade descritos anteriormente (item 3.3). A distância anogenital (DAG, distância do ânus ao tubérculo genital) foi obtida através de um paquímetro nos DPN 1, DPN 21, no dia em que foi constatado a abertura vaginal e no dia em que os animais foram submetidos à eutanásia. A DAG relativa foi normalizada por meio da sua divisão pela raiz cúbica do peso corporal (GALLAVAN et al., 1999). O peso corporal no DPN 1 (g); DAG no dia DPN 1 e DPN 21 e o ganho de peso corporal durante o período de lactação (g) (do DPN 1 até o DPN 21) estão expressos como média da ninhada.

Durante a infância (no DPN 21) e durante a vida adulta (a partir do DPN 89, no primeiro estro após o término da avaliação da ciclicidade estral), uma fêmea de cada ninhada (n=9-10/grupo), foi pesada e submetida à eutanásia por decapitação no período da manhã,

sempre no mesmo horário, entre as 10:00 e 11:00. Após esse procedimento, as fêmeas foram colocadas em decúbito dorsal e em seguida, submetidas à laparotomia. Imediatamente após à eutanásia, o ovário esquerdo foi removido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado no freezer a -80°C para posterior análise de parâmetros de estresse oxidativo. O ovário direito e o útero das ratas adultas foram fixados em Methacarn (solução composta por 60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético). Ao término da etapa de fixação, as peças ficaram armazenadas em álcool 70° para posterior análise histológica.

Os órgãos preservados (útero e ovário direito) foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídas em parafina purificada com polímeros plásticos (Paraplast[®] - McCormick Scientific). Seis cortes histológicos com 5 μm de espessura e separados por 50 μm de distância, foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE). Para análise histológica, o número de folículos foi contado e avaliado por microscopia de luz em uma ampliação de $400\times$. O número médio de folículos ovarianos foi calculado e os folículos foram classificados de acordo com os critérios de Pedersen e Peters (PEDERSEN; PETERS, 1968), com algumas modificações: (1) primordial (tipos 1–3b), quando os ovócitos estavam circundados por uma única camada de células epiteliais escamosas ou cúbicas. Os folículos primordial e primário foram avaliados juntos; (2) folículos em crescimento (tipos 4-5b), quando o folículo continha de duas a quatro camadas de células da granulosa e sem apresentar espaço antral; e (3) folículos antrais (tipos 6–8), quando os folículos continham um espaço antral claramente definido. Apenas os folículos primordiais e em crescimento que apresentaram núcleo visível foram contados. As lâminas foram analisadas em teste cego (sem identificação do grupo de tratamento). Em cada corno uterino foram obtidas as medidas da altura do epitélio luminal e espessura do estroma endometrial, miométrio e perimétrio na porção média do órgão, em relação ao ovário. A espessura de cada camada do útero foi medida, em três seções por animal. As imagens foram obtidas utilizando o software Images Plus 2.0 (Motic), por meio de uma câmera fotográfica (Moticam 5, Motic) acoplado a um microscópio de luz com ampliação final de $100\times$. Em cada seção, foram analisadas cinco regiões diferentes, resultando em um total de 15 medidas por animal.

3.4.2 Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo

Preparação de tecidos: O ovário esquerdo (n=5/grupo/idade) das ratas F1 durante a infância (no DPN 21) e vida adulta (DPN 89-95) foi preparado de acordo com o método descrito por Guarnier e colaboradores (GUARNIER et al., 2010) em músculo e adaptado para o ovário. Resumidamente, o tecido foi homogeneizado por 30s em um homogeneizador Ultra-Turrax (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) que continha 10 mg/mL⁻¹ de ovário em tampão 30 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ e 120 mM de KCl em pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 11.000g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi usado para as avaliações descritas abaixo:

Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por quimioluminescência (QL) iniciada por tert-butil: As misturas reacionais foram colocadas em tubos de luminescência, contendo homogenatos de ovário (10 mg/mL⁻¹), em tampão 30 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (com 120 mM de KCl em pH 7,4) e 6 mM com volume final de 1 ml. A reação de QL induzida por tert-butil hidroperóxido foi avaliada usando um luminômetro (Promega™, Madison, EUA) com uma faixa de resposta de 300–650nm (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991; OLIVEIRA; CECCHINI, 2000). Os tubos foram mantidos no escuro até o momento da análise, que foi realizada em uma sala com temperatura de 33°C. Para cada animal, foi obtida uma curva de 40 min por interpolação (cada ponto representa a suavização diferencial de 600 leituras). Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g de tecido). A curva inteira foi utilizada para estimar a concentração de hidroperóxidos lipídicos presentes na amostra.

A determinação da QL iniciada por ter-butil hidroperóxido é um ensaio sensível que tem sido aplicado para detectar a existência de estresse oxidativo associado a situações patológicas experimentais. De modo que, este ensaio é comumente utilizado para avaliar a integridade das defesas antioxidantes não enzimáticas e a consequente peroxidação lipídica de um tecido. As substâncias que constituem as defesas não enzimáticas (tocoferol, retinol etc.) diminuem sua concentração durante o estresse oxidativo devido a uma reação em tempo real e eliminação através do t-butil hidroperóxido. A lógica desse ensaio é que duas amostras de tecidos com quantidades semelhantes de proteínas e de ácidos graxos insaturados (que fornecerão as etapas da curva de propagação) produzirão maior ou menor quimioluminescência dependendo da concentração de antioxidantes endógenos (tocoferóis, carotenóides) (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). Como a quantidade de antioxidantes, mesmo hidrossolúveis, pode interferir nos danos às membranas biológicas decorrentes da

peroxidação lipídica, também quantificamos o GSH para isolar o fenômeno de alteração na qualidade das membranas.

Quantificação de glutathiona reduzida (GSH): a determinação da concentração de GSH foi realizada de acordo com o método proposto por (TIETZE, 1969). A adição de NADPH inicia uma reação enzimática da GSH presente na amostra de sobrenadante do homogenato do ovário (10 mg/mL^{-1}) com o 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), levando, por redução do DTNB, à produção de uma substância cromófora de cor amarela, o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (NTB). Na reação, para cada mol de GSH, são produzidos 2 moles de NTB, o que aumenta consideravelmente a densidade óptica observada em 412nm e, conseqüentemente, a sensibilidade do método. A cinética da reação foi acompanhada em espectrofotômetro durante 5 minutos e as concentrações GSH das amostras foram calculadas.

3.4.3 Análise da instalação da puberdade

A abertura vaginal (considerada como indicador do início da instalação da puberdade) foi observada diariamente a partir do DPN 25 ($n=10/\text{grupo}$) e utilizado como marcador de instalação da puberdade. Imediatamente após a constatação da abertura vaginal o animal foi pesado e iniciou-se a realização diária da coleta das células da mucosa vaginal para verificar o dia do primeiro estro. O material foi coletado por meio de uma haste flexível com ponta de algodão, previamente embebido em solução fisiológica, cuidadosamente inserida na vagina e rotacionada em sentido anti-horário sempre no mesmo horário. As células da mucosa aderidas na haste foram espalhadas em uma lâmina de vidro, umedecida com uma gota de soro fisiológico e observadas ao microscópio de luz.

3.4.4 Avaliação da ciclicidade estral

A partir do DPN 75, as ratas F1 foram avaliadas quanto a ciclicidade estral. Para tal, foram realizados esfregaços vaginais diariamente, durante o período da manhã, sempre no mesmo horário, por um período de 15 dias (do DPN 75 ao DPN 89). O material foi coletado

conforme descrito no item 3.4.3. As fases do ciclo estral foram identificadas em microscopia de luz classificadas como proestro, estro, metaestro e diestro de acordo com as características citológicas (MARCONDES; BIACHI; TANNO, 2002). A fase de proestro foi definida por esfregaços sem leucócitos e com predominância de células epiteliais nucleadas. A fase de estro foi definida pela ausência de leucócitos, algumas células nucleadas e muitas células epiteliais cornificadas. Os esfregaços de metaestro e diestro foram definidos pela presença de leucócitos. Os coeficientes de proestro (C_p), estro (C_e) e metaestro-diestro (C_{md}) foram determinados pela seguinte fórmula de acordo com (CHISTYAKOV et al., 2012): $C = [a/b] \cdot 100\%$, onde, C = coeficiente do ciclo correspondente, a = duração em dias do ciclo correspondente dentro do período de observação, e b = duração média do ciclo estral (em dias). A duração do ciclo estral foi calculada como o número de dias entre uma das fases do ciclo estral e a fase seguinte.

3.4.5 Avaliações comportamentais (sexual e motivação materna)

3.4.5.1 Avaliação do comportamento sexual

Ratas F1 adultas (DPN 75), foram transferidas para o biotério com ciclo claro/escuro de 12×12 horas invertido, com controle de luminosidade, ruído e temperatura para adaptação das funções fisiológicas. Após quinze dias de aclimatação (a partir do DPN 90), as avaliações do comportamento sexual feminino foi realizado sob luz vermelha e registrado por uma câmera de vídeo, ligada a um monitor em uma sala adjacente (DE AZEVEDO CAMIN et al., 2015). Inicialmente, um rato macho experiente foi colocado na gaiola de observação (caixa de acrílico), onde permaneceu por 10 min para adaptação. Em seguida, foi introduzida na mesma caixa a fêmea (virgem) a ser analisada (em fase de estro previamente identificada). Durante o comportamento, foi observado um total de 10 montas (RAMIREZ; CARRER; NASELLO, 1979). Os resultados estão expressos como coeficiente de lordose e foi calculado como (número de lordoses/total de montas) × 100 (BEACH, 1976). Além disso, o grau de lordose foi pontuado numa escala de 0 a 3 da seguinte forma: 0- ausência de lordose; 1- a fêmea apresentava pouca flexão da coluna, com cabeça e quadril levemente elevados com

relação ao solo; 2- a fêmea apresentava flexão da coluna com a cabeça elevada em ângulo próximo a 30° do solo; e 3- lordose máxima, com acentuada flexão da coluna e cabeça inclinada em ângulo $\geq 45^\circ$ em relação ao solo (Figura 12) como descrito em (FITZROY HARDY; DEBOLD, 1971). A frequência de cada tipo de lordose foi anotada. Para a obtenção do escore de lordose, foi atribuída uma pontuação média de lordose e esta foi calculada da seguinte forma: (escore de lordose = número total de pontos de lordose/número total de respostas de lordose) e atribuída para cada teste (FITZROY HARDY; DEBOLD, 1971). Todas as fêmeas foram usadas apenas uma vez.

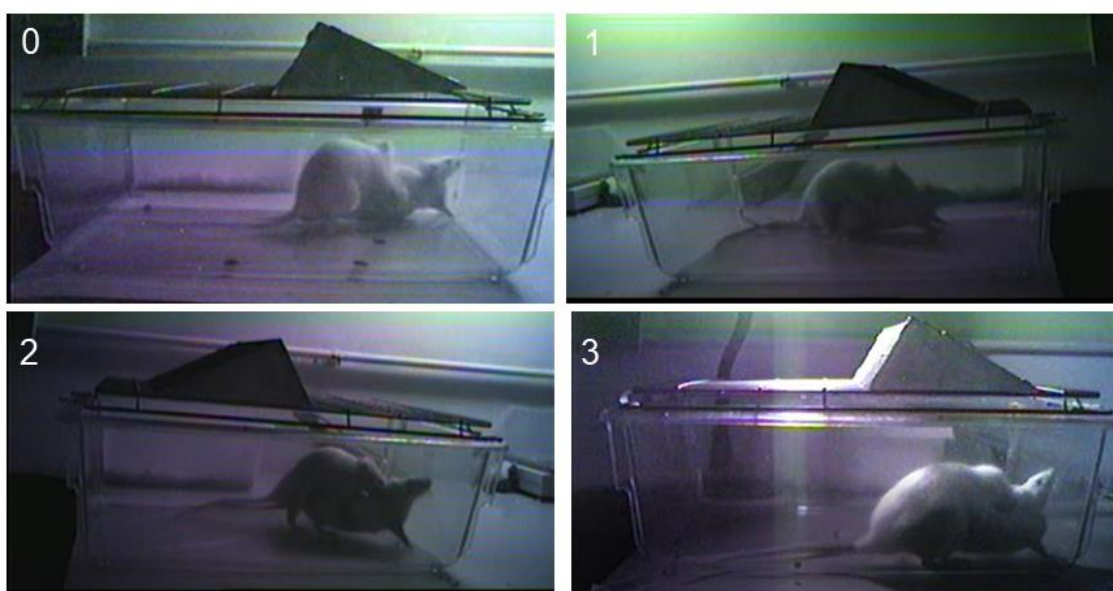


Figura 12. Imagens representando os diferentes graus de lordose e pontuação empregada para avaliação do escore de lordose em ratas (FORCATO et al., 2022).

Após a avaliação do comportamento sexual, a rata permaneceu na gaiola com o macho para o acasalamento. Na manhã seguinte, o macho foi removido da gaiola e a prenhez foi confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. Uma vez prenha, as ratas foram identificadas e alocadas em gaiolas individuais e assim permaneceram durante toda a gestação. Essas ratas foram utilizadas para analisar o ganho de peso corporal, e consumo de ração durante a gestação e durante a primeira semana do período lactacional. O ganho de peso corporal e o consumo de ração foi estimado conforme descrito no item 3.3.

3.4.5.2 A avaliação da motivação materna

A avaliação da motivação materna das ratas F1 também foi realizada no DL 5. Este protocolo foi realizado para investigar os efeitos da exposição materna à SAS durante períodos críticos do desenvolvimento reprodutivo (vida intrauterina e lactação), uma vez que o período de exposição abrange tanto a janela crítica para o desenvolvimento do sistema reprodutivo (DG 13-17) (WELSH et al., 2008) quanto a janela crítica para a diferenciação sexual hipotalâmica (DG 17/18 – DPN 10) de ratos (MACLUSKY; NAFTOLIN, 1981; SCHWARZ; MCCARTHY, 2008). A avaliação de comportamento materno foi realizado seguindo o mesmo protocolo descrito para as mães (item 3.3.1).

3.4.6 *Teste de fertilidade*

Na manhã do DPN 117 (um dia após a avaliação da motivação materna) que corresponde ao DL 6, as ratas foram submetidas à eutanásia por decapitação, colocadas em decúbito dorsal e em seguida, foram submetidas à laparotomia. O útero e ovários foram removidos e pesados. O número de corpos lúteos foi contado. A partir da visualização dos cornos uterinos, foi registrado o número de pontos de implantação. A partir da contagem das implantações e dos corpos lúteos foram determinados os seguintes parâmetros: Taxa de implantação = $[(n^\circ \text{ de implantações} / n^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100]$; Taxa de perda pré-implantação = $[(n^\circ \text{ de corpos lúteos} - n^\circ \text{ de implantações} / n^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100]$; Taxa de perda pós-implantação = $[(n^\circ \text{ de corpos lúteos} - n^\circ \text{ de fetos vivos}) / n^\circ \text{ de implantações}] \times 100$; Taxa de Viabilidade Fetal = $[(n^\circ \text{ de filhotes vivos} / n^\circ \text{ de pontos de implantação}) \times 100]$ (GUERRA; DE TOLEDO; KEMPINAS, 2011).

3.5 Avaliação da toxicidade reprodutiva na prole masculina

O diagrama abaixo (Figura 13) resume o delineamento experimental empregado nos ratos F1.

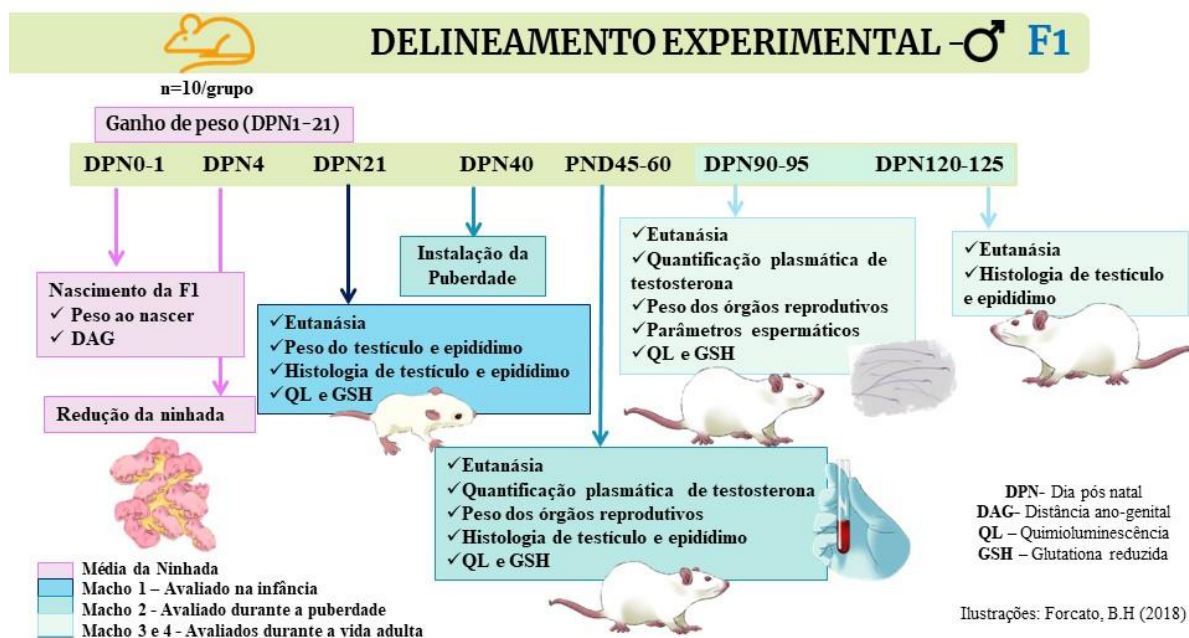


Figura 13. Fluxograma do protocolo experimental empregado nos ratos F1.

3.5.1 Desenvolvimento físico e sexual

O peso corporal dos machos (n=10/grupo) foi obtido um dia após o nascimento (DPN 1) e nos DPN 4, 7, 14 e 21. Durante o período de lactação, assim como as fêmeas, os filhotes machos também foram observados diariamente quanto aos sinais visíveis de toxicidade conforme descrito no item 3.3. Os ratos F1 tiveram a DAG obtida no DPN 1, DPN 21, no dia em que ocorreu o descolamento do prepúcio e no dia em que foram submetidos à eutanásia conforme metodologia descrita no item 3.4.1 (GALLAVAN et al., 1999). O peso corporal (g) ao nascer; a DAG no dia DPN 1 e DPN 21 e o ganho de peso corporal durante o período de lactação (g) (do DPN 1 até o DPN 21) estão expressos como média da ninhada. No DPN 21,

um macho de cada ninhada (n=9-10/grupo) foi submetido à eutanásia por decapitação e usado para a análise dos parâmetros reprodutivos durante a infância.

A partir do DPN 40, os ratos foram examinados diariamente até se verificar a completa separação prepucial (considerada como indicador de instalação da puberdade), ocasião em que os animais foram novamente pesados. Um dia após o descolamento do prepúcio (DPN 45-60), um macho de cada ninhada (n=10/grupo) foi submetido à eutanásia por decapitação e foi usado para a análise dos parâmetros reprodutivos durante a puberdade.

3.5.2 Quantificação da concentração plasmática de testosterona

Imediatamente após a decapitação, amostras de sangue dos animais durante a puberdade (DPN 45-60) e vida adulta (DPN 90-95) foram coletadas em tubos de ensaio heparinizados, durante o período da manhã sempre no mesmo horário. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 4°C) e o plasma congelado para posterior análise. A concentração plasmática de testosterona foi obtida por imunoensaio de micropartículas por quimiluminescência usando ImmuChem™ Double Antibody I RIA Kit (MP Biomedicals, Orangeburg, NY), e analisadas de acordo com as instruções do fabricante, o qual o coeficiente de variação intra-ensaio e sensibilidade foram 4,6% e 0,15nmol/L, respectivamente.

3.5.3 Análise histológica dos testículos

Imediatamente após a coleta de sangue, os animais foram colocados em decúbito dorsal e em seguida, foram submetidos à laparotomia. O testículo direito dos ratos F1 durante a infância (DPN 21), puberdade (DPN 45-60) e adultos (DPN 120-125) (n=6-8/grupo/idade) foram removidos, dissecados, pesados e imersos em Methacarn. Após uma prefixação de 2 horas os testículos foram removidos do fixador e cortados, retornando em seguida ao fixador até completar 5 horas. Ao término da etapa de fixação, as peças ficaram armazenadas em álcool 70° até o momento em que foram cortadas em fragmentos, desidratadas em

concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídas em Paraplast® (McCormick Scientific). Seis cortes histológicos com 5 µm de espessura e separados por 50 µm de distância, foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE). Para a análise da morfometria testicular foram usadas imagens obtidas com uma câmera (Moticam 5, Motic) acoplada a um microscópio óptico, utilizando o software Images Plus 2.0 (Motic), com aumento final de 100x. A partir dessas imagens o diâmetro tubular médio por animal foi obtido pela mensuração ao acaso (escolhidos de forma aleatória) de 15 secções transversais de túbulo seminífero com perfis redondos ou arredondados. A composição dos dados volumétricos do parênquima testicular foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Weibel (WEIBEL, 2013) e foram obtidos usando uma grade de 100 interseções acoplada a uma ocular de um microscópio óptico ocular com ampliação final de 400x. Um total de 10 campos escolhidos aleatoriamente (1000 pontos) foram pontuados para cada animal. O volume de cada componente do parênquima testicular, expresso em microlitro (µl), foi estimado a partir do conhecimento do porcentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. Para obter uma medição mais precisa do volume do parênquima testicular, subtraiu-se do peso bruto do testículo pelo peso da túnica albugínea (~6,5%). O peso do testículo foi considerado igual ao seu volume, uma vez que, a densidade do testículo é quase 1,0 (~1,03–,04)(FRANÇA; GODINHO, 2003; SCHERLE, 1970). O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS), expresso em metros (10⁶) por testículo foi calculada a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos e da medição do diâmetro tubular obtido para cada animal, de acordo com a seguinte fórmula: $CTTS = VTS / \pi R^2$, em que VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL et al., 1963; DORST; SAJONSKI, 1974).

3.5.4 *Análise morfométrica e histopatológica do epidídimo*

O epidídimo direito dos ratos F1 durante a infância (DPN 21), puberdade (DPN 45-60) e adultos (DPN 120-125) (n=5/grupo/idade), após uma prefixação de 3 horas em Metacarn, foi subdividido nas porções de cabeça, corpo e cauda os quais foram cortados longitudinalmente e deixados fixar por mais 3 horas. As porções epididimárias foram incluídas em Paraplast® (McCormick Scientific) e seccionadas em 5 µm de espessura e

separados por 50 μm de distância, foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram utilizadas para análise morfológica e histopatológica do epidídimo, como previamente descrito por Favareto e colaboradores (FAVARETO et al., 2011). A inspeção histopatológica foi realizada por meio de cortes transversais da cabeça e cauda do epidídimo, os quais foram avaliados qualitativamente por meio de uma câmera fotográfica (Moticam 5, Motic) acoplada a um microscópio óptico (aumento de 100 \times e 400 \times), utilizando o software Images Plus 2.0 (Motic). A análise estereológica do epidídimo foi realizada segundo método de Weibel (WEIBEL, 1963), na qual se utiliza um sistema teste de pontos em um graticulado com 168 pontos para assim, obter-se a proporção do corte ocupada pelo lúmen, epitélio e interstício. Foram realizadas utilizando 10 imagens histológicas da cabeça (Região 2A) e cauda (Região 5A/B) (MILLER; KILLIAN, 1987), capturadas com uma câmera (Moticam5, Motic) acoplado a um microscópio óptico em aumento final de 400x.

3.5.5 Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo nos testículos

Preparação de tecidos: O testículo esquerdo dos ratos F1 durante a infância (DPN 21), puberdade (DPN 45-60) e adultos (DPN 120-125) (n=5/grupo/idade), foi preparado de acordo com o método descrito por Guarnier e colaboradores (GUARNIER et al., 2010) em músculo e adaptado para o testículo (SIERVO et al., 2019). O tecido foi homogeneizado por 30s em um homogeneizador Ultra-Turrax (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) que continha 25mg/mL⁻¹ de testículo em tampão 30 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ e 120 mM de KCl em pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 11.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi processado da mesma forma que o ovário das ratas F1 e utilizado para analisar a peroxidação lipídica e a quantificação de GSH conforme descrito no item 3.4.2.

3.5.6 *Parâmetros espermáticos*

Para a análise dos parâmetros espermáticos um rato adulto (DPN 90-95) de cada ninhada (n=10/grupo) foi submetido à eutanásia por decapitação, colocados em decúbito dorsal e submetidos à laparotomia. Imediatamente após esse procedimento, o ducto deferente direito foi removido e usado para a análise da motilidade e contagem espermática no ducto. Em seguida, o outro ducto deferente (esquerdo) foi removido e o seu conteúdo utilizado para a análise da morfologia espermática. O testículo e o epidídimo direito foram removidos, dissecados, pesados e na sequência foram congelados a -20 °C para posterior contagem espermática.

3.5.6.1 Motilidade espermática

Para a análise da motilidade espermática os espermatozoides foram obtidos do ducto deferente direito e diluídos em 1ml de meio GV HEPES (Ingamed, Brasil) pré-aquecido a 34 °C. Uma alíquota de 10 µl foi colocada em câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) e analisados em fase de contraste do microscópio óptico (OSM-223287, Olympus) com aumento final de 100x. Foram avaliados 100 espermatozoides por animal e classificados em móveis e imóveis (FAVARETO; DE TOLEDO; KEMPINAS, 2011; PEROBELLI et al., 2010).

3.5.6.2 Contagem espermática no ducto deferente

Após a análise do padrão de motilidade, foi realizada a contagem espermática no ducto deferente estimada em milhões por mililitro. Para isso foi utilizada uma câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) em microscopia de luz, com um aumento de 100x, com o auxílio de contador de células. A câmara de Makler possui uma profundidade de 0,01 mm e uma marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1 mm²) cada um com 0,1 mm x 0,1 mm.

O volume compreendido na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula é de 0,001 mm³. Foram contados os espermatozoides presentes em 10 quadrados (marcação da própria câmara) escolhidos aleatoriamente, em quatro campos diferentes, e foi realizada a média (PIFFER et al., 2009).

3.5.6.3 Contagem espermática e produção diária espermática testicular e trânsito espermático no epidídimo

Para a contagem espermática, as espermátides maduras testiculares e os espermatozoides das porções epididimárias (cabeça/corpo e cauda) resistentes à homogeneização (n=10/grupo) foram processados conforme método descrito por Robb e colegas (ROBB; AMANN; KILLIAN, 1978) com adaptações de Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2007). O testículo direito, decapsulado, foi pesado e homogeneizado em 5mL de solução contendo NaCl (0,9%) e TritonX (0,5%). Após diluição na proporção 1:10, a amostra foi transferida para câmara de Neubauer (Optik Labor, 0,100mm Tiefe Depth Profondeur) para contagem das espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese), foram contados 5 campos (4 extremidades e o centro) de cada lado da câmara de duas câmaras. Ao final das contagens, foi obtida a média das 4 contagens/animal (2 de cada câmara). As porções epididimárias (cabeça/corpo e cauda) também foram homogeneizadas em solução de NaCl e TritonX. Entretanto, em proporções diferentes. Para a cabeça/corpo do epidídimo a proporção utilizada foi de 1ml para cada 200mg de tecido e para a cauda, 1ml para cada 100mg de tecido. Após a homogeneização ambas as porções epididimárias foram diluídas na proporção de 1:20. As contagens de espermatozoides foram realizadas da mesma forma como descrito para o testículo.

Cálculo da produção diária de espermatozoides: o n° de espermatozoides produzidos pelo testículo por dia foi estimado pela razão entre o n° total de espermátides por testículo dividido por 6,1, que é o n° de dias que essas espermátides maduras estão presentes no epitélio germinativo (FERNANDES et al., 2007).

Trânsito de espermatozoides no epidídimo: o tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo foi calculado dividindo-se o n° de espermatozoides na cabeça/corpo ou cauda epididimária, pelo valor obtido na produção diária de espermatozoides de cada animal (FERNANDES et al., 2007).

3.5.6.4 Morfologia espermática

A avaliação da morfologia dos espermatozoides foi realizada de acordo com (FERNANDES et al., 2007). O ducto deferente esquerdo (n=10/grupo) foi seccionado nas extremidades anterior e posterior, e lavado internamente com o auxílio de agulha e seringa, com 1,0 mL de solução de formol salina 10%. Foi preparado esfregaço em lâmina histológica onde foram analisados 200 espermatozoides por animal em fase de contraste em microscópio óptico (400x) (SEED et al., 1996). Anormalidades morfológicas foram classificadas em duas categorias gerais: morfologia de cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete, sem curvatura ou isolada) ou morfologia de cauda (enrolada, quebrada e isolada) (FILLER, 1993). Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de espermatozoides morfológicamente normais e de espermatozoides com anormalidades de cabeça e cauda.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) para cada variável. Para os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram analisados por Test-*t* de Student (teste paramétrico) e apresentados como média \pm desvio padrão (SIMUNDIC, 2012). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram analisadas por *Mann-Whitney* (teste não paramétrico) e apresentados como mediana (1º e 3º quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Outros testes estatísticos empregados neste estudo:

- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA): ingestão alimentar das ratas F0 e F1 e, do ganho de peso corporal das ratas e ratos F1 do DPN 1 ao DPN 21. Para os dados que não passaram pelo critério de esfericidade na RMANOVA, foram usados os valores estatísticos (d.f. e F) seguindo a correção de Greenhouse-Geisser.
- A análise de covariância (ANCOVA): avaliação do peso dos órgãos reprodutivos de F0 e F1 usando o peso corporal final como covariável. No entanto, como o ANCOVA e o teste *t* de Student forneceram resultados semelhantes, foram apresentados os resultados do teste *t* de Student.
- ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni: Medição de hidroperóxidos lipídicos por quimioluminescência (QL) iniciada por tert-butil no ovário e testículo dos animais F1
- Teste exato de Fisher: Recuperação dos filhotes (ratas F0), comportamento sexual (Graus de lordose) das ratas F1 e parâmetros espermáticos (morfologia e motilidade) dos ratos F1.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados usando SPSS versão 19 para Windows (SPSS Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros avaliados nas mães (geração F0)

Durante o tratamento, as fêmeas da geração F0 não apresentaram sinais visíveis de toxicidade (padrão respiratório anormal, lacrimejamento, piloereção e tremores e etc.). O tratamento com SAS também não afetou o ganho de peso corporal (g) durante a gestação (DL1-DG0) e lactação (DL21-DL1) (Tabela 1) ou ingestão alimentar (Figura 14). O número de filhotes e razão sexual (Machos/Fêmeas) também não foram afetados pelo tratamento com SAS $p > 0,05$ (Tabela 1).

Tabela 1. Ganho de peso corporal durante a gestação (DL1-DG0), lactação (DL21-DL1), número de filhotes por ninhada e razão sexual das ratas da geração F0

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Ganho de peso corporal (g) durante a gestação	27,66 ± 10,13	21,63 ± 8,41
Ganho de peso corporal (g) durante a lactação	19,72 ± 12,20	19,33 ± 10,30
Nº de filhotes por ninhada	12,10 ± 1,52	10,60 ± 2,50
Razão sexual dos filhotes (M:F)	1,15 ± 0,48	0,99 ± 0,42

Os dados estão representados como média ± desvio padrão. A significância entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student. Não houve diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Ratas do grupo Sulfassalazina (SASG) foram tratadas com Sulfassalazina na dose de 300 mg/kg/dia durante os períodos gestacional e lactacional. O grupo controle (CTR) foi tratado com o veículo carboximetilcelulose (CMC).

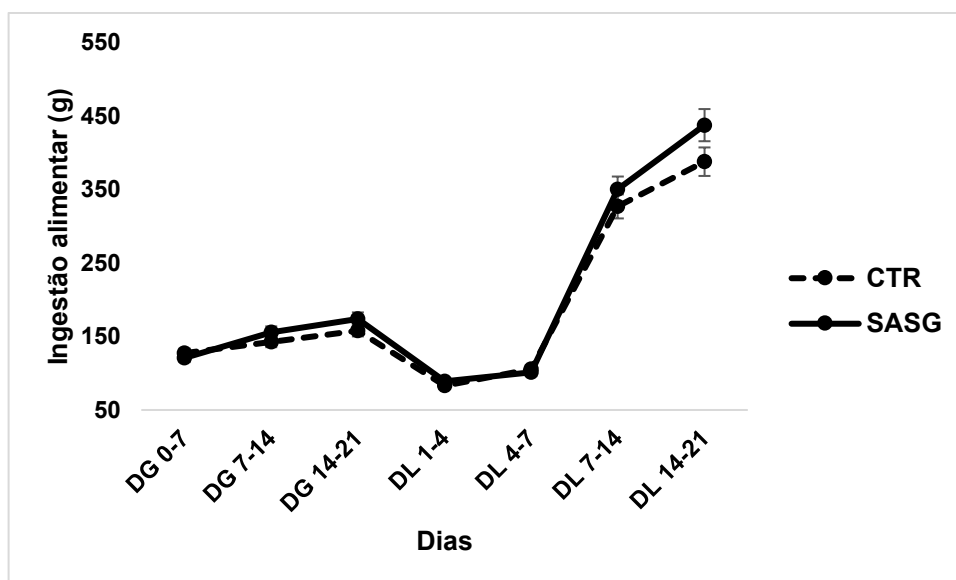


Figura 14. Ingestão alimentar das ratas da geração F0 tratadas com Sulfassalazina (SAS) durante os períodos de gestação e lactação. Os dados ($n=10$ por grupo) foram avaliados por ANOVA de medidas repetidas e estão apresentados como média \pm desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre o grupo tratado com SAS e seu grupo controle (CTR) tratado com carboximetilcelulose (CMC), ($p>0,05$).

5.1.1 Avaliação da motivação materna da geração F0

O tratamento com SAS reduziu a motivação para o cuidado materno das ratas F0. Metade das ratas do grupo SAS não recuperou toda a ninhada durante os 30 min. de teste (teste exato de Fisher, $p = 0,03$), no entanto, os demais parâmetros do comportamento materno não foram alterados pelo tratamento com SAS (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação do comportamento materno das ratas da geração F0

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Ratas que recuperaram todos os filhotes	100% (10/10)	50% (5/10)*
Latência para recuperar o 1º filhote (s)	60,50 [41,25-110,75]	47,50 [43,25-100,5]
Recuperação de filhotes (nº)	6,00 [5,00-7,25]	3,50 [1,75-7,00]
Contato com o filhote (nº)	8,00 [5,50-17,00]	3,00 [2,00-8,75]
Construção de ninho (s)	147,50 [125,75-251,00]	96,50 [48,50-184,50]
Limpeza do filhote (s)	147,60 ± 132,60	179,00 ± 130,34
Amamentação (s)	473,50 [46,25-781,00]	174,00 [0,00-707,75]
Autolimpeza (s)	19,10 ± 11,23	21,20 ± 19,23
Fora do ninho (s)	956,90 ± 470,15	1186,10 ± 386,50

A porcentagem de animais que recuperaram todos os filhotes foi analisada pelo teste de Fisher, * $p < 0,05$. Os demais dados estão apresentados como média ± desvio padrão ou como mediana [1º Quartil – 3º Quartil] com a significância das diferenças analisadas pelo teste t de Student ou teste de *Mann-Whitney* quando apropriado, $p > 0,05$. Os números entre parênteses mostram o número de animais por grupo. Os parâmetros com (s) significa o tempo em segundos em que as ratas exibiram esse comportamento específico durante o período de observação. Ratas do grupo Sulfassalazina (SASG) foram tratadas com Sulfassalazina na dose de 300 mg/kg/dia durante os períodos gestacional e lactacional. O grupo controle (CTR) foi tratado com o veículo carboximetilcelulose (CMC).

O peso corporal (g) no dia da eutanásia (DL 21) assim como no peso dos órgãos reprodutivos (útero e ovário) estão apresentados na Tabela 3. Esses parâmetros não foram afetados pelo tratamento com SAS.

Tabela 3. Peso corporal e peso de órgãos reprodutivos no dia lactacional (DL) 21 das ratas da geração F0

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Peso corporal (g)	279,56 ± 36,00	275,34 ± 27,08
Útero (g)	0,23 ± 0,10	0,31 ± 0,14
Ovário (mg)	65,85 ± 14,30	71,04 ± 9,61

Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Os dados estão representados como média ± desvio padrão. A significância entre os grupos para o peso corporal foi avaliada pelo teste t de Student, enquanto o peso dos órgãos reprodutivos foi avaliado por ANCOVA com o peso corporal final como covariante. Não houve diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$. Ratas do grupo Sulfassalazina (SASG) foram tratadas com Sulfassalazina na dose de 300 mg/kg/dia durante os períodos gestacional e lactacional. O grupo controle (CTR) foi tratado com o veículo carboximetilcelulose (CMC).

5.2 Parâmetros analisados na prole feminina (geração F1)

5.2.1 Parâmetros de desenvolvimento físico e sexual

O peso ao nascer das fêmeas F1, bem como o DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) no DPN 1 e no DPN 21 (Tabela 4), não foram afetados pela exposição intrauterina e lactacional à SAS. Esses dados estão expressos como média da ninhada.

Tabela 4. Peso corporal ao nascer e DAG no DPN 1 e DPN 21 das ratas da geração F1

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Peso corporal ao nascer (g)	6,15 [5,79-6,78]	5,84 [5,73-6,31]
DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) no DPN 1	0,92 [0,83-0,95]	0,90 [0,81-1,05]
DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) no DPN 21	2,25 [1,98-2,38]	2,27 [1,95-2,39]

Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Os dados estão representados como ou mediana [1º Quartil – 3º Quartil]. A significância entre os grupos foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, $p > 0,05$. Animais expostos a Sulfassalazina durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DAG: distância anogenital; DPN: dia pós-natal. Dados expressos como média da ninhada.

O ganho de peso corporal das ratas da geração F1 do nascimento até o desmame (DPN 21) estão apresentados na Figura 15. Esse parâmetro também não foi influenciado pela exposição materna à SAS.

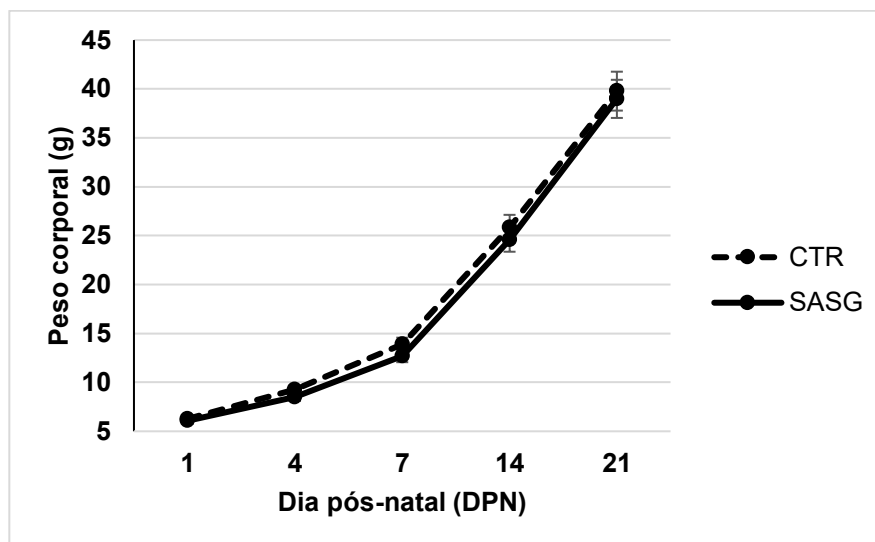


Figura 15. Ganho de peso corporal (g) do dia pós-natal (DPN) 1 ao DPN 21 das ratas da geração F1 expostas maternalmente à Sulfassalazina. As mães da geração F0 foram tratadas com 300 mg/kg/dia de Sulfassalazina (SAS) durante os períodos de gestação e lactação (do dia gestacional (DG) 0 ao dia lactacional (DL) 21). Os dados (n=10 por grupo) foram avaliados por ANOVA de medidas repetidas e estão apresentados como média \pm desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

Os dados da DAG, do peso corporal e do peso dos órgãos reprodutivos (útero e ovário direito) das ratas da geração F1 durante a infância (DPN 21) e durante a vida adulta (DPN 89-95) estão apresentados na Tabela 5 e 6, respectivamente. Esses parâmetros não foram afetados pela exposição materna à SAS, $p>0,05$.

Tabela 5. Distância anogenital (DAG), peso corporal e peso de órgãos reprodutivos das ratas da geração F1 no dia pós-natal 21

Parâmetros	CTR (10)	SASG (9)
Peso corporal (g)	42,11 [35,06-44,25]	38,21 [37,47-40,23]
DAG (mm/g ^{1/3})	2,29 [1,91-2,46]	2,17 [1,93-2,35]
Útero (mg)	19,65 ± 4,26	21,03 ± 2,00
Ovário (mg)	8,48 ± 2,09	6,86 ± 1,87

Os dados estão representados como média ± desvio padrão ou mediana [1º Quartil – 3º Quartil]. A significância entre os grupos para o peso corporal e para DAG relativa foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, enquanto o peso dos órgãos reprodutivos foi avaliado por ANCOVA com o peso corporal final como covariante. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo, p>0,05. Animais expostos a Sulfassalazina durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

Tabela 6. Distância anogenital (DAG), peso corporal e peso de órgãos reprodutivos das ratas F1 adultas (DPN 89-95)

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Peso corporal (g)	243,12 ± 22,41	236,65 ± 20,96
DAG (mm/g ^{1/3})	2,40 ± 0,17	2,26 ± 0,19
Útero (mg)	467,05 [419,00-635,33]	459,65 [437,00-659,68]
Ovário (mg)	36,15 ± 2,84	37,90 ± 7,85

Os dados estão representados como média ± desvio padrão ou mediana [1º Quartil – 3º Quartil]. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo, p>0,05. A significância entre os grupos para o peso corporal e para DAG relativa foi avaliada pelo teste t de Student, enquanto o peso dos órgãos reprodutivos foi avaliado por ANCOVA com o peso corporal final como covariante. Animais expostos a Sulfassalazina durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina. DPN: dia pós-natal.

A análise histomorfométrica do útero, número de corpos lúteos e folículos ovarianos das ratas adultas estão apresentados na Tabela 7. Esses dados também não foram influenciados pela SAS.

Tabela 7. Análise histomorfométrica do útero, número de corpos lúteos e folículos ovarianos das ratas F1 adultas (DPN 89-95)

	CTR (10)	SASG (10)
Parâmetros Ovarianos		
Nº de corpos lúteos	8,20 [6,35-8,40]	7,30 [7,30-6,60]
Nº de folículos primordiais e primários	28,78 ± 9,40	26,04 ± 5,67
Nº de folículos em crescimento	19,94 ± 7,64	18,04 ± 6,42
Nº folículos antrais	4,82 ± 1,31	5,92 ± 1,36
Parâmetros Uterinos		
Estroma endometrial (µm)	347,61 ± 97,25	325,27 ± 101,53
Míométrio (µm)	280,17 ± 37,42	304,15 ± 45,77
Epitélio luminal (µm)	25,86 ± 3,30	24,04 ± 4,45
Perimétrio (µm)	11,35 ± 2,00	10,77 ± 1,30

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão ou mediana [1º Quartil – 3º Quartil]. A significância entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student, exceto para o número de corpos lúteos, que foi analisado pelo teste de *Mann-Whitney*. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo $p > 0,05$. Ratas da geração F1 expostas à SAS durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

5.2.2 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo nos ovários

Quimioluminescência (QL) iniciada por hidroperóxido de terc-butila.

A exposição intrauterina e lactacional à SAS induziu um aumento significativo nas concentrações de peroxidação lipídica, como demonstrado pelo aumento significativo da curva QL no ovário das fêmeas da geração F1 tanto durante a infância ($p = 0,012$) quanto durante a vida adulta ($p < 0,0001$) (Figura 16). As concentrações de GSH não foram afetados pela exposição materna à SAS (teste t de Student, $p > 0,05$), conforme mostrado na Figura 5.

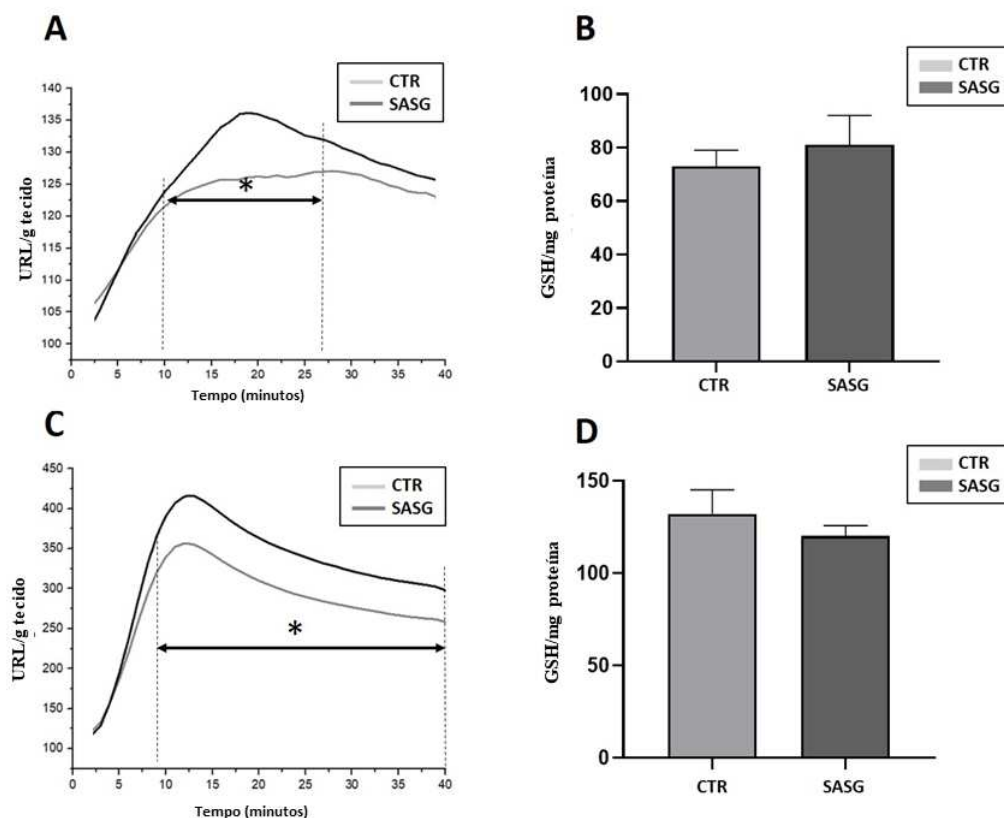


Figura 16. Efeito da exposição materna à Sulfassalazina (SAS) sobre a concentração de hidroperóxido lipídico e concentração de glutathione reduzida (GSH) no ovário das ratas da geração F1. A quimioluminescência iniciada com hidroperóxido de terc-butila foi monitorada continuamente por 40 minutos em homogeneizados de ovários. Cada curva representa um ajuste gaussiano da média de 600 leituras de luz emitida. As curvas inteiras foram empregadas para realizar a comparação estatística por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni. As curvas representam as médias de 5 animais. Ambas as análises foram realizadas com o mesmo nível de significância ($*p < 0,05$) ao qual o grupo SASG foi comparado com o controle. Os limites indicam os pontos onde foram detectadas diferenças quantitativas (A e C). Os gráficos B e D mostram os dados da análise da concentração de GSH no ovário das fêmeas da geração F1. O teste t de Student não identificou diferença estatística entre os grupos nesse parâmetro. (A e B) mostram dados das ratas durante a infância no dia pós-natal (DPN) 21 e (C e D) das ratas adultas. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; URL: unidades relativas de luz.

5.2.3 Análise da instalação da puberdade e da ciclicidade estral

Dados da instalação da puberdade das ratas da geração F1, assim como o peso corporal e a DAG relativa no dia em que os animais apresentaram abertura vaginal estão apresentados na Tabela 8. Esses parâmetros não foram influenciados pela exposição maternal à SAS (teste t de Student, $p > 0,05$).

Tabela 8. Distância anogenital (DAG) relativa, peso corporal, dia em que as ratas F1 apresentaram abertura vaginal e dia de ocorrência do primeiro estro

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Peso corporal (g)	104,60 ± 10,70	96,01 ± 11,92
DAG (mm/g ^{1/3})	2,25 ± 0,26	2,06 ± 0,24
DPN em que ocorreu a abertura vaginal	34,90 ± 2,23	35,00 ± 2,00
DPN em que ocorreu o primeiro estro	35,00 ± 2,40	35,80 ± 2,20

Números entre parênteses representam o número de animais/grupo. Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média e foram avaliados com o teste t de Student. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, $p > 0,05$. Ratas expostas à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

O coeficiente dos diferentes estágios do ciclo estral e a duração média do ciclo também foi similar entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9. Coeficientes dos diferentes estágios do ciclo estral e duração do ciclo estral das ratas F1 adultas (DPN 75-89)

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Coefficientes (%)		
Estro	26,67 [25,00-33,33]	26,67 [25,00-28,33]
Metaestro/diestro	53,33 [51,67-60,00]	53,33 [46,67-58,33]
Proestro	16,67 [6,67-21,67]	20,00 [11,67-26,67]
Duração média do ciclo (dias)	6,25 [4,69-15,00]	5,00 [3,75-9,37]

Os dados estão apresentados como mediana [1º Quartil – 3º Quartil]. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney). Os coeficientes foram calculados usando a fórmula $C = a/b \times 100$, onde C é o coeficiente do período do ciclo, a é o número de dias do período do ciclo correspondente durante a observação e b é a duração total dos ciclos completos (em dias). Ratas da geração F1 expostas à Sulfassalazina durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

5.2.4 Avaliação dos comportamentos reprodutivos (sexual e motivação materna)

5.2.4.1 Avaliação do comportamento sexual

A exposição materna à SAS induziu um aumento significativo no escore de lordose $t(18)=2,04$; $p=0,05$ (teste t de Student) e na frequência com que as ratas apresentaram lordose de grau 3 $U= 22,50$; $p=0,03$ (*Mann-Whitney*), como mostra a Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros avaliados durante o comportamento sexual das ratas da geração F1

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Coeficiente de Lordose (%)	80 [72,50 – 90]	90 [82,50 – 100]
Escore de Lordose	2,02 ± 0,25	2,30 ± 0,36*
Lordoses (%)		
Lordose de Grau 0	{21/100}	{13/100}
Lordose de Grau 1	{16/100}	{11/100}
Lordose de Grau 2	{44/100}	{42/100}
Lordose de Grau 3	{19/100}	{34/100}*

Números entre parênteses indicam o número de animais/grupo. Dados do coeficiente de lordose (calculado como número total de lordoses/total de montas) estão expressos em mediana [1º Quartil – 3º Quartil], *Mann-Whitney*, $p > 0,05$. Dados do escore de Lordose (número total de pontos de lordose/número total de respostas de lordose) estão apresentados como média ± desvio padrão da média, $*p < 0,05$ (test-*t* de Student). Número entre chaves representa a porcentagem relativa aos pontos (classificados em uma escala de 0 a 3, o qual 0 representa a ausência de lordose e 3 a lordose máxima) que foram atribuídos para cada grau de lordose /total de pontos possíveis com as observações. Os graus de magnitude de lordose foram comparados pelo teste exato de Fisher, $*p < 0,05$. Animais expostos à Sulfassalazina durante os estágios iniciais de desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

Entretanto, a exposição materna à SAS durante os estágios iniciais de desenvolvimento (intrauterino e lactacional) não influenciou o ganho de peso corporal durante a gestação (g) (DL1- DG0) ou durante a lactação (DL 6 – DL1) das ratas da geração F1 (Tabela 11). A exposição materna à SAS também não alterou a ingestão alimentar das ratas durante a gestação ou durante a primeira semana do período lactacional, como mostra a Figura 17. Além disso, o número de filhotes por ninhada e a razão sexual (Machos/Fêmeas) também foram similares entre os grupos (*Mann-Whitney*, $p > 0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11. Ganho de peso corporal durante a gestação (DL1-DG0), lactação (DL6-DL1), número de filhotes por ninhada e razão sexual das ratas da geração F1

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Ganho de peso corporal (g) durante a gestação	36,38 ± 10,56	27,23 ± 13,70
Ganho de peso corporal (g) durante a lactação	3,74 [1,79-14,90]	1,80 [2,94-10,48]

Números entre parênteses representam o número de animais/grupo. Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média ou como mediana [1º Quartil – 3º Quartil], e foram avaliados com o teste t de Student ou teste de *Mann-Whitney* quando apropriado. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, $p > 0,05$. Ratas expostas à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

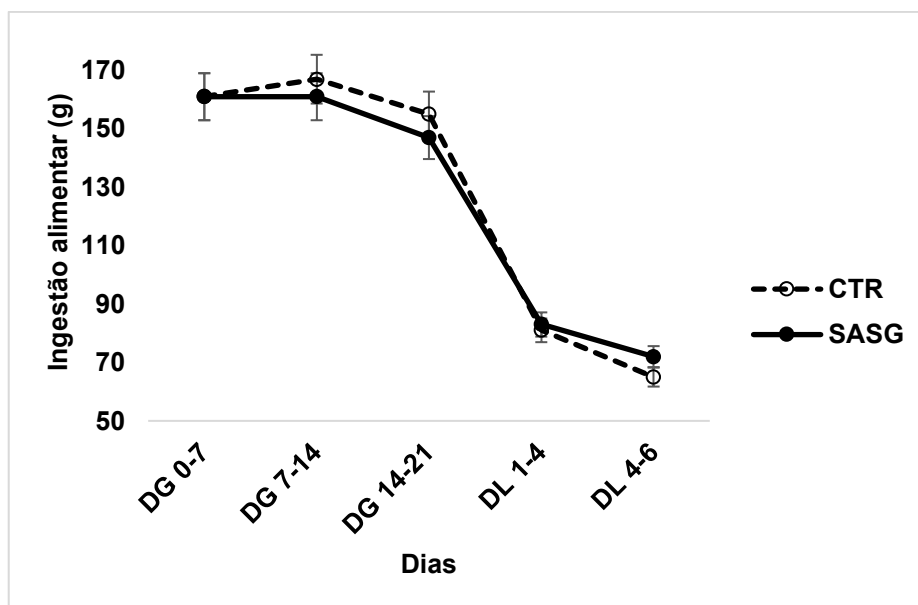


Figura 17. Ingestão alimentar das ratas expostas à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação. Os dados ($n=10$ por grupo) foram avaliados por ANOVA de medidas repetidas e estão apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos, ($p > 0,05$). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DG: dia gestacional; DL: dia lactacional.

5.2.4.2 Avaliação da motivação materna

A avaliação da motivação materna das fêmeas da geração F1 está na Tabela 12. A exposição materna à SAS não causou alteração nesses parâmetros. Uma rata do grupo SASG e duas do grupo CTR tiveram menos do que 8 filhotes e foram excluídas da análise.

Tabela 12. Análise da motivação materna das ratas da geração F1

Parâmetros	CTR (08)	SAS (09)
Latência para recuperar o 1º filhote	33,00 [27,25-63,75]	51,00 [35,50-94,50]
Recuperação de filhotes (nº)	8,00 [6,25-9,75]	8,00 [5,50-12,00]
Contato com o filhote (nº)	2,00 ± 1,85	2,22 ± 1,30
Construção de ninho (s)	180,50 [51,75-264,50]	85,00 [63,00-245,50]
Limpeza do filhote (s)	258,75 ± 73,65	189,00 ± 77,09
Amamentando (s)	247,50 [0,00-326,50]	128,00 [0,00-217,50]
Autolimpeza (s)	18,50 [12,25-33,00]	23,00 [13,50-31,00]
Fora do ninho (s)	1130,00 ± 183,08	1287,56 ± 191,18

Números entre parênteses representam o número de animais/grupo. Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média ou como mediana [1º Quartil – 3º Quartil], e foram avaliados com o teste t de Student ou teste de *Mann-Whitney* quando apropriado. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, $p > 0,05$. Os parâmetros com (s) significa o tempo em segundos em que as ratas exibiram esse comportamento específico durante o período de observação. Ratas expostas à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

5.2.5 Avaliação da fertilidade

Os dados da avaliação da fertilidade das ratas da geração F1 estão apresentados na Tabela 13. Os parâmetros avaliados não foram afetados pela exposição intrauterina e lactacional à SAS. Além disso, o número de filhotes por ninhada (CTR: 12,05 [9,75-13,00], n=10 e SASG: 11,05 [10,75-12,50], n=10) e a razão sexual (Machos/Fêmeas) (CTR: 0,86

[0,69-1,00], n=10 e SASG: 0,85 [0,63-1,19], n=10) também foram similares entre os grupos (*Mann-Whitney*, $p>0,05$).

Tabela 13. Parâmetros de fertilidade das ratas adultas da geração F1

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Taxa de implantação (%)	82,02 ± 10,94	82,91 ± 5,53
Perda pré implantação (%)	17,98 ± 10,94	17,09 ± 5,53
Perda pós implantação (%)	7,14 [0,00-17,53]	8,01[5,00-21,84]
Viabilidade fetal (%)	92,86 [82,47-100,00]	91,99 [78,16-95,00]

Números entre parênteses representam o número de animais/grupo. Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média ou como mediana [1º Quartil – 3º Quartil], e foram avaliados com o teste t de Student ou teste de *Mann-Whitney* quando apropriado. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, $p>0,05$. Ratas expostas à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

5.3 Parâmetros analisados na prole masculina (geração F1)

5.3.1 Desenvolvimento físico e sexual

O peso ao nascer da prole masculina bem como a DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) no DPN 1 e DPN 21 estão apresentados na Tabela 14. Esses parâmetros não foram afetados pela exposição materna à SAS. Esses dados estão expressos como média da ninhada.

O ganho de peso corporal dos machos da geração F1 desde o nascimento até o desmame (DPN 1-21) estão apresentados na Figura 18, este dado também não foi influenciado pela SAS.

Tabela 14. Peso corporal ao nascer e DAG no DPN 1 e DPN 21 dos ratos da geração F1

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Peso corporal ao nascer (g)	6,53 [6,14-6,82]	6,14 [5,95-6,61]
DAG relativa (mm/g ^{1/3}) no DPN 1	1,40 ± 0,08	1,47 ± 0,10
DAG relativa (mm/g ^{1/3}) no DPN 21	3,19 ± 0,28	3,33 ± 0,26

Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Os dados do peso corporal ao nascer estão representados como ou mediana [1º Quartil – 3º Quartil] (teste de *Mann-Whitney*), os outros parâmetros foram avaliados com o teste t de Student, $p > 0,05$. Animais expostos a Sulfassalazina durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). Dados estão expressos como média da ninhada. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DAG: distância anogenital; DPN: dia pós-natal.

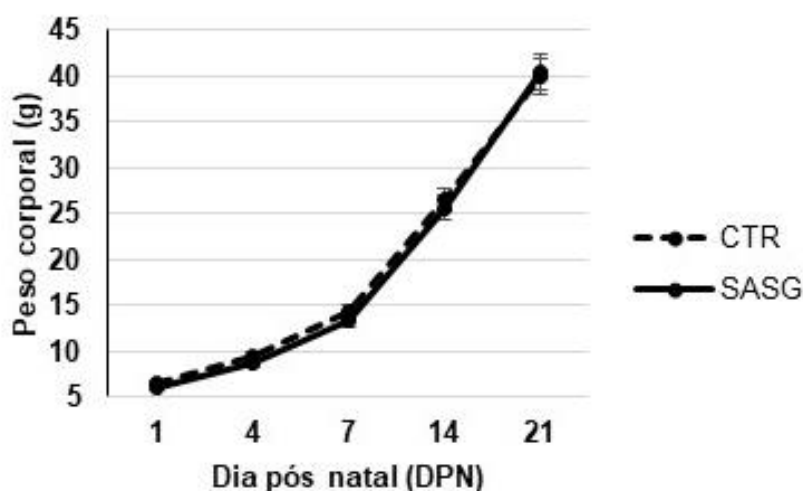


Figura 18. Ganho de peso corporal (g) do dia pós-natal (DPN) 1 ao DPN 21 dos ratos da geração F1 expostos à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactação. As ratas da geração F0 foram tratadas com 300 mg/kg/dia de Sulfassalazina (SAS) durante os períodos de gestação e lactação (do dia gestacional (DG) 0 ao dia lactacional (DL) 21). Os dados (n=10 por grupo) foram avaliados por ANOVA de medidas repetidas e estão apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

5.3.2 Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona

O peso corporal, peso do testículo e epidídimo direito dos ratos da geração F1 no DPN 21 estão apresentados na Tabela 15. A exposição materna à SAS não induziu alterações nesses parâmetros.

Tabela 15. Peso corporal e peso de órgãos reprodutivos dos ratos da geração F1 no DPN 21

Parâmetros	CTR (10)	SASG (9)
Peso corporal (g)	40,76 [38,35-44,81]	40,27 [38,53-43,32]
Testículo direito (mg)	82,79 ± 20,43	80,22 ± 15,83
Epidídimo direito (mg)	14,57 ± 3,38	14,53 ± 2,37

Os dados estão representados como média ± desvio padrão ou mediana [1º Quartil – 3º Quartil]. A significância entre os grupos para o peso corporal foi avaliada pelo teste de *Mann-Whitney*, enquanto o peso dos órgãos reprodutivos foi avaliado por ANCOVA com o peso corporal final como covariante ($p > 0,05$). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Animais expostos à Sulfassalazina durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

A concentração plasmática de testosterona, peso corporal e o peso de órgãos reprodutivos dos ratos durante a puberdade (DPN 45-60) da geração F1 estão apresentados na Tabela 16. A exposição materna à SAS não causou alterações significativas nesses parâmetros.

Tabela 16. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona dos ratos da geração F1 durante a puberdade (DPN 45-60).

Parâmetros	CTR (09)	SASG (10)
Peso corporal (g)	221,04 ± 13,67	204,69 ± 19,20
Testículo direito (g)	1,10 ± 0,12	1,10 ± 0,11
Epidídimo direito (g)	0,31 ± 0,05	0,29 ± 0,04
Vesícula seminal (g)	0,20 ± 0,11	0,20 ± 0,09
Próstata (g)	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,03
Testosterona (ng/dl)	346,80 ± 374,75 (8)	310,10 ± 318,56 (10)

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média e foram avaliados com o teste t de Student, $p > 0,05$. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Ratos expostos à Sulfassalazina durante os estágios iniciais de desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal

A concentração plasmática de testosterona, peso corporal e o peso de órgãos reprodutivos dos ratos adultos (DPN 90-95) da geração F1 estão apresentados na Tabela 17. Esses parâmetros não foram afetados pela exposição materna à SAS.

Tabela 17. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona dos ratos F1 adultos (DPN 90-95).

Parâmetros	CTR (10)	SASG (10)
Peso corporal (g)	352,78 ± 18,20	353,51 ± 17,50
Testículo direito (g)	1,64 [1,53-1,71]	1,68 [1,63-1,89]
Epidídimo direito (g)	1,10 [1,00-1,17]	1,12 [1,10-1,23]
Vesícula seminal (g)	1,20 ± 0,07	1,18 ± 0,07
Próstata (g)	0,31 [0,30-0,40]	0,37 [0,29-0,39]
Testosterona (ng/dl)	226,26 [181,97-410,72] (8)	274,31 [54,27-779,36] (9)

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média ou como mediana [1° Quartil – 3° Quartil] e foram avaliados com o teste t de Student ou teste de *Mann-Whitney* quando apropriado, $p > 0,05$. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Ratos expostos à Sulfassalazina durante os estágios iniciais de desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

5.3.3 Instalação da puberdade

Dados sobre o início da puberdade, como DAG relativa e o dia da separação prepucial também não foram influenciados pela exposição materna à SAS (Tabela 18).

Tabela 18. Distância anogenital (DAG) relativa, peso corporal e dia em que os animais apresentaram descolamento do prepúcio

Parâmetros	CTR (9)	SASG (10)
DAG (mm/g ^{1/3})	4,30 ± 0,29	4,23 ± 0,22
Peso corporal (g)	214,93 ± 11,75	198,43 ± 17,57
Dia da separação prepucial	52,11 ± 7,39	47,90 ± 2,51

Os dados estão representados como média ± desvio padrão e foram avaliados pelo teste t de Student, $p > 0,05$. O número entre parênteses representa o número de animais por grupo. Ratos da geração F1 expostos à Sulfassalazina durante o desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina.

5.3.4 Análise histomorfométrica do testículo

Os resultados da análise histomorfométrica do testículo de ratos da geração F1 no DPN 21 estão apresentados na Tabela 19. A exposição materna à SAS não induziu alterações histológicas nesses parâmetros.

Tabela 19. Parâmetros histomorfométricos do testículo dos ratos da geração F1 durante a infância (DPN 21)

Parâmetros	CTR (7)	SASG (7)
Volume testicular (μ l)	77,73 ± 22,19	73,16 ± 16,15
Volume do interstício (μ l)	39,30 ± 12,08	33,04 ± 7,99
Volume dos túbulos seminíferos (μ l)	38,42 ± 11,63	40,12 ± 9,28
Diâmetro dos túbulos seminíferos (μ m)	89,52 ± 5,58	88,55 ± 5,25
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	6,13 ± 1,90	6,47 ± 1,25

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média e foram avaliados com o teste t de Student, $p > 0,05$. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Ratos expostos à Sulfassalazina durante os estágios iniciais de desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

Os resultados da análise histomorfométrica do testículo dos ratos durante a puberdade (DPN 45-60) da geração F1 estão apresentados na Tabela 20. Houve um aumento no comprimento total dos túbulos seminíferos dos ratos do grupo SAS [$t(12)=2,36$; $p=0,036$] quando comparado ao grupo CTR.

Tabela 20. Parâmetros histomorfométricos do testículo dos ratos da geração F1 durante a puberdade (DPN 45-60).

Parâmetros	CTR (6)	SASG (8)
Volume testicular (μ l)	1003,05 \pm 125,23	1020,21 \pm 115,77
Volume do interstício (μ l)	381,85 \pm 73,97	349,06 \pm 89,44
Volume dos túbulos seminíferos (μ l)	621,20 \pm 116,34	671,93 \pm 73,16
Diâmetro dos túbulos seminíferos (μ m)	297,13 \pm 15,22	182,48 \pm 11,88
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	20,52 \pm 3,94	26,01 \pm 4,55*

Dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média e foram avaliados com o teste t de Student, $*p<0,05$. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Ratos expostos à Sulfassalazina durante os estágios iniciais de desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina

Os resultados da análise histomorfométrica do testículo de ratos adultos (DPN 120-125) da geração F1 estão apresentados na Tabela 21. Os parâmetros histológicos avaliados durante a vida adulta não foram afetados pela exposição materna à SAS.

Tabela 21. Parâmetros histomorfométricos do testículo dos ratos da geração F1 durante a vida adulta (DPN 120-125).

Parâmetros	CTR (7)	SASG (6)
Volume testicular (μl)	1623,32 \pm 120,81	1773,77 \pm 152,90
Volume do interstício (μl)	493,67 [486,46-630,38]	634,19 [557,34-729,52]
Volume dos túbulos seminíferos (μl)	1078,59 \pm 80,79	1138,15 \pm 162,05
Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm)	226,73 \pm 10,22	229,73 \pm 12,82
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	26,95 \pm 4,05	27,69 \pm 5,05

Dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ou como mediana [1º Quartil – 3º Quartil] e foram avaliados com o teste *t* de Student ou teste de *Mann-Whitney* quando apropriado, $p > 0,05$. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Ratos expostos à Sulfassalazina durante os estágios iniciais de desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina

A análise estereológica do epidídimo durante a puberdade está apresentada na Tabela 22. Conforme indicado pelo teste *t* de Student, a exposição materna à SAS não alterou os compartimentos da cabeça ou cauda do epidídimo.

Tabela 22. Análise estereológica do epidídimo dos ratos da geração F1 durante a puberdade (DPN 45-60)

Parâmetros	CTR (7)	SASG (7)
Cabeça do epidídimo (região 2A) %		
Epitélio	33,72 ± 5,57	37,33 ± 5,94
Lúmen	38,79 ± 12,40	38,56 ± 5,75
Estroma	27,48 ± 7,46	26,11 ± 9,39
Cauda do epidídimo (região 5A/B) %		
Epitélio	29,67 ± 2,41	34,37 ± 4,05
Lúmen	50,29 ± 4,04	46,79 ± 8,67
Estroma	20,01 ± 4,61	18,82 ± 7,52

Dados referem-se a porcentagem de pontos que incidem sobre cada compartimento de cada região do epidídimo e estão apresentados como média ± desvio padrão da média (teste t de Student). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Ratos expostos à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactacional. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

Os dados da análise estereológica do epidídimo dos animais adultos (DPN 120-125) estão apresentados na Tabela 23. A exposição materna à SAS não alterou os compartimentos da cabeça ou cauda do epidídimo, durante a vida adulta.

Tabela 23. Análise estereológica do epidídimo dos ratos da geração F1 durante a vida adulta (DPN 120-125)

Parâmetros	CTR (7)	SASG (7)
Cabeça do epidídimo (2A região) %		
Epitélio	25,90 ± 4,46	24,83 ± 2,32
Lúmen	51,01 ± 7,22	50,21 ± 6,86
Estroma	23,07 ± 6,99	25,41 ± 6,40
Cauda do epidídimo (5A/B região) %		
Epitélio	25,41 ± 2,92	24,65 ± 1,93
Lúmen	49,43 ± 6,77	49,18 ± 5,84
Estroma	25,16 ± 8,82	26,24 ± 5,41

Dados referem-se a porcentagem de pontos que incidem sobre cada compartimento de cada região do epidídimo e estão apresentados como média ± desvio padrão da média (teste t de Student). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Ratos expostos à Sulfassalazina durante a vida intrauterina e lactacional. CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

5.3.5 Análise histopatológica do epidídimo

A análise histopatológica do epidídimo dos ratos da geração F1 estão apresentados na Figura 19. A exposição materna à SAS não induziu alterações nos animais avaliados durante a infância (DPN 21) ou durante a vida adulta (DPN 120-125). Entretanto, os animais do grupo SASG avaliados durante a puberdade, apresentaram células arredondadas no lúmen tanto na cabeça quanto na cauda do epidídimo.

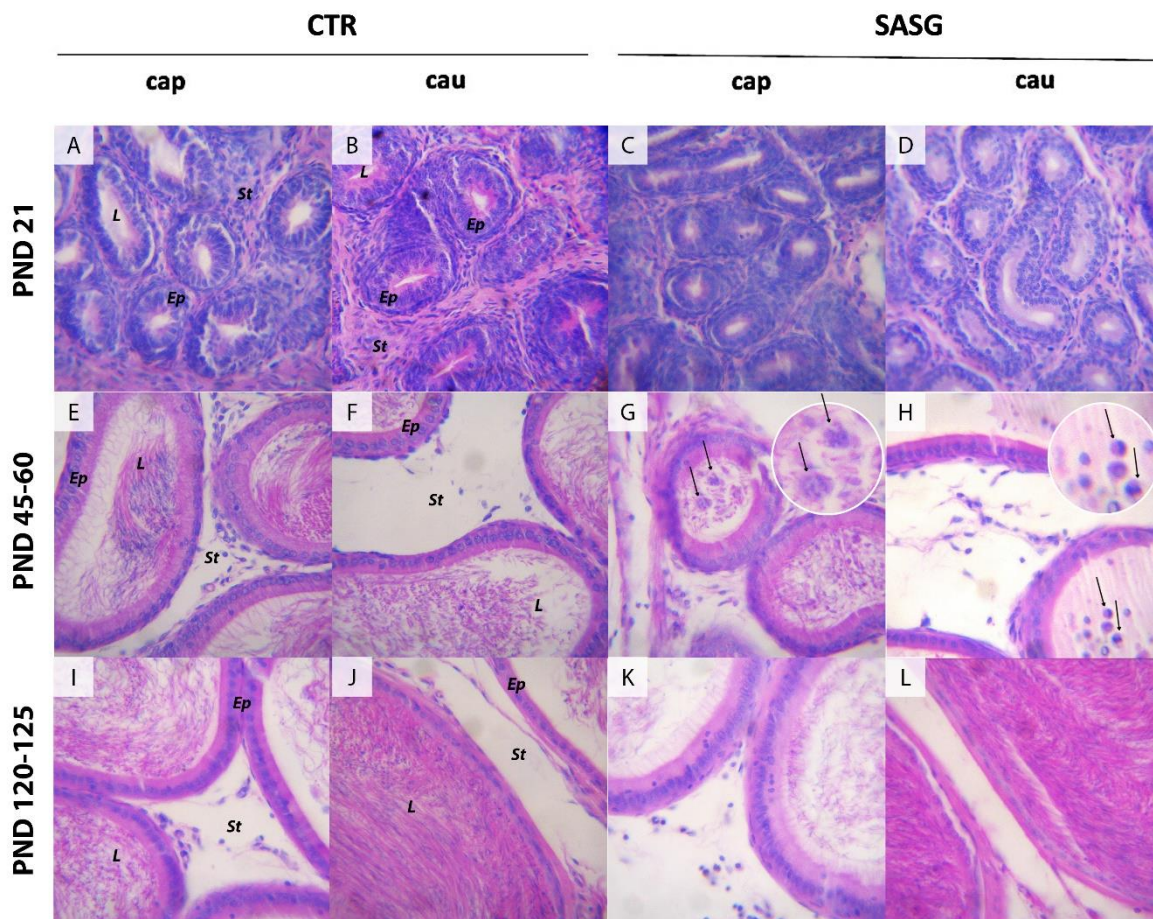


Figura 19. Análise histopatológica da cabeça e cauda do epidídimo dos ratos da geração F1. Fotomicrografia de (A, C, E, G, I e K) cabeça e (B, D, F, H, J e L) seções da cauda do epidídimo de ratos no dia pós-natal (DPN) 21 CTR (A e B), SASG (C e D); puberdade (DPN 45-60) CTR (E e F) e SASG (G e H); e adultos (DPN 120-125) CTR (I e J) e SASG (K e L). (A, B, C, D, E, F, I, J, K e L) Epitélio, lúmen e estroma com aspectos normais. Presença de células redondas (seta e imagem ampliada) no lúmen (G e H). Coloração de hematoxilina e eosina, analisadas em microscópio de contraste de fase (ampliação de 400x). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina. L: lúmen; Ep: epitélio; St: estroma.

5.3.6 Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo nos testículos

Com relação as análises relacionadas ao estresse oxidativo, a exposição intrauterina e lactacional à SAS induziu um aumento significativo na curva QL dos ratos da geração F1 durante a puberdade (DPN 45-60) como mostrado na Figura 20, ($p < 0,0001$). A concentração

de GSH no testículo dos animais avaliados no DPN 21 também foi afetada pela exposição materna à SAS (teste *t* de Student, $p = 0,0379$), conforme mostrado na Figura 20.

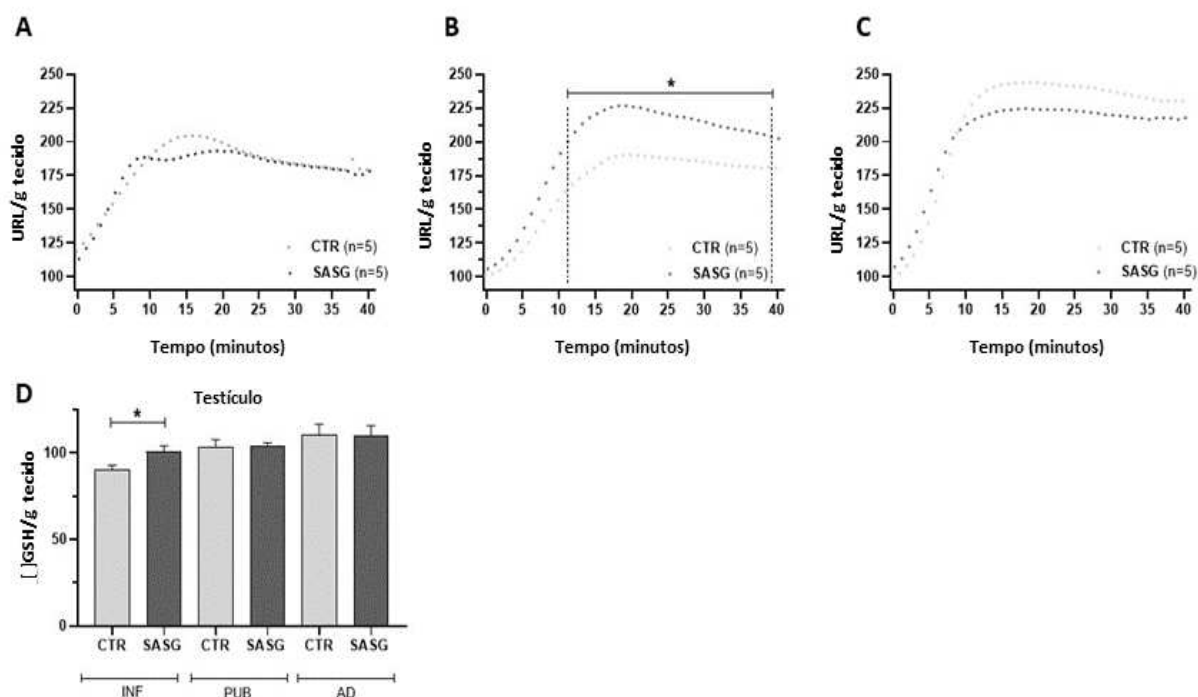


Figura 20. Efeito da exposição materna à Sulfassalazina (SAS) sobre a concentração de hidroperóxido lipídico e de glutatona reduzida (GSH) no testículo de ratos da geração F1. (A) representa dados dos animais durante a infância (DPN 21), (B) durante a puberdade (DPN 45-60) e (C) durante a vida adulta (DPN 90-95). A quimioluminescência iniciada com hidroperóxido de terc-butila foi monitorada continuamente por 40 minutos em homogenatos de testículo. Cada curva representa um ajuste gaussiano da média de 600 leituras de luz emitida. As curvas inteiras foram empregadas para realizar a comparação estatística por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. As curvas representam as médias de 5 animais. Ambas as análises foram realizadas com o mesmo nível de significância ao qual o grupo SASG foi comparado com o grupo controle (CTR). (D) mostram dados de análise de GSH dos testículos dos ratos da geração F1 (teste *t* de Student, $*p < 0,05$). Os limites indicam os pontos onde foram detectadas diferenças quantitativas (B e D). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; INF: infância; PU: puberdade; AD: adulto; URL: unidades relativas de luz.

5.3.7 Parâmetros espermáticos

Em relação aos parâmetros espermáticos, os ratos adultos (DPN 90-95) não apresentaram alteração significativa na motilidade (CTR: 81,9%; SASG: 80,2 %, $n=$

10/grupo) ou na morfologia espermática normal (CTR: 86,1%; SASG: 87,7%, n= 10/grupo) (teste exato de Fisher, $p>0,05$).

Os dados referentes a contagem espermática realizada no testículo, epidídimo e ducto deferente dos ratos adultos da geração F1 estão apresentados na Tabela 24. Esses parâmetros não foram afetados pela exposição materna à SAS.

Tabela 24. Número de espermátides e produção diária de espermatozoides testicular, número de espermatozoides e tempo de trânsito espermático no epidídimo e, contagem de espermatozoides no ducto deferente de ratos F1 adultos (DPN 90-95).

Parâmetros	CTR (7)	SASG (8)
Nº de espermátides (10^6 /testículo)	143,20 ± 42,96	150,68 ± 24,75
Nº de espermátides (10^6 /g/testículo)	105,86 ± 26,90	109,90 ± 14,14
Produção diária espermática (milhões)	23,48 ± 7,04	24,70 ± 4,06
Nº espermatozoides x 10^6 /cabeça + corpo do epidídimo	119,94 ± 20,70	119,19 ± 22,42
Nº espermatozoides x 10^6 /g/cabeça + corpo do epidídimo	444,95 ± 50,67	389,74 ± 77,35
Nº espermatozoides x 10^6 /cauda do epidídimo	179,01 [171,52-188,02]	169,16 [128,06-229,75]
Nº espermatozoides x 10^6 /g/cauda do epidídimo	937,61 ± 207,59	792,10 ± 231,11
Tempo de trânsito espermático (dias) através da cabeça/corpo do epidídimo	4,58 [4,40-5,99]	4,54 [4,39-5,61]
Tempo de trânsito espermático (dias) através da cauda do epidídimo	7,53 [6,27-11,59]	6,70 [5,02-8,75]
Contagem espermática no ducto deferente (10^6 /ml)	26,90 ± 6,56 (10)	26,05 ± 6,41 (10)

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média ou como mediana [1º Quartil – 3º Quartil] e foram avaliados com o teste *t* de Student ou teste de *Mann-Whitney* quando apropriado, $p>0,05$. Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Ratos expostos à Sulfassalazina durante os estágios iniciais de desenvolvimento (período intrauterino e lactação). CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; DPN: dia pós-natal.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos do tratamento com Sulfassalazina na motivação para o cuidado materno de ratas Wistar da geração parental (F0), assim como suas consequências para o desenvolvimento reprodutivo da prole masculina e feminina (geração F1) desde o nascimento até a vida adulta. O tratamento com SAS durante a gestação e lactação diminuiu a motivação para o cuidado materno das ratas da geração F0. Em relação à prole feminina, foram observadas alterações em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no ovário das ratas (durante a infância e vida adulta). Além disso, as ratas F1 adultas também apresentaram mudanças no comportamento sexual. Entretanto, apesar das alterações relacionadas ao estresse oxidativo nas gônadas das ratas da geração F1, não houve comprometimento da fertilidade das fêmeas. Dados estes publicados na edição 293 da revista Life Science no artigo intitulado como “Sulfasalazine exposure during pregnancy and lactation induces alterations in reproductive behavior in adult female rat Offspring” (FORCATO et al., 2022).

6.1 Ratas da geração F0 e Ratas F1

Com relação a avaliação da toxicidade materna, sugere-se que o tratamento com SAS na dose utilizada nesse estudo, não induziu toxicidade nas ratas F0 uma vez que parâmetros utilizados como indicadores de toxicidade como ganho de peso corporal ou a ingestão alimentar durante o período de tratamento (gestacional e lactacional) não foram afetados. Além disso, as ratas F0 não apresentaram nenhum sinal de toxicidade. Entretanto, esse estudo demonstrou que metade das ratas tratadas com SAS durante a gestação e lactação não recuperou toda a ninhada, enquanto todas as mães do grupo CTR refez o ninho durante o teste.

A análise de comportamento materno empregado nesse estudo teve como objetivo avaliar a motivação materna das mães. Para tal, escolhemos aplicar o protocolo que consiste na avaliação do comportamento de cuidado materno da rata durante 30 minutos. Para esta análise a mãe é separada de sua ninhada e elas são reunidas após 30 minutos. Essa separação não visa estressar, mas motivar a mãe a cuidar de sua prole. Após a separação, espera-se que

a mãe recupere todos os filhotes refazendo ninho, se dedique ao cuidado dos filhotes e se coloque em uma posição de lactação em cifose (a posição ideal de amamentação). Esta análise foca em quão rápido e quão bem a mãe passa por todas essas etapas e, desta forma, mostra-se como uma excelente escolha para estudar a motivação materna. Nas fêmeas, os efeitos da separação materna na função reprodutiva são menos explorados, e os resultados de alguns trabalhos mostram que a separação materna tem pouco ou nenhum efeito sobre importantes aspectos do desenvolvimento reprodutivo de fêmeas como a instalação da puberdade (LAU; KLINEFELTER; CAMERON, 1996; RHEES; LEPHART; ELIASON, 2001) ou na regularidade do ciclo estral (RHEES; LEPHART; ELIASON, 2001).

Sugere-se que o tratamento com SAS possa ter sido inibido o Sx_c^- desses animais uma vez que a SAS é um potente inibidor do Sx_c^- (GOUT et al., 2001). Dados da literatura mostram que tanto em ratos adultos tratados com SAS na dose de 16 mg/kg por via intraperitoneal (LUTGEN et al., 2014) quanto em camundongos fêmeas que receberam tratamento oral com SAS na dose de 8 mg/kg/dia (NASHED et al., 2017) tiveram o Sx_c^- inibido e apresentaram alterações em parâmetros comportamentais de motivação.

Em mamíferos, o comportamento materno envolve mecanismos altamente motivacionais (NUMAN, 2007; OLAZÁBAL et al., 2013; SMILEY et al., 2019) e, de acordo com Bridges (BRIDGES, 2015), o cuidado materno leva à expressão de vários tipos de comportamento apresentados pelas mães, e estes dão o suporte necessário para o desenvolvimento de seus filhotes. Parâmetros comportamentais como a latência e a presença do comportamento de recuperação dos filhotes para a formação do ninho podem ser utilizadas para avaliar a capacidade neurobiológica das fêmeas em apresentar comportamento materno (BRIDGES, 2015). Assim, nossa hipótese é de que o tratamento com SAS possa ter inibido o Sx_c^- das fêmeas da geração F0, interrompendo ou reduzindo a liberação de glutamato no SNC, culminando com a redução da motivação para o cuidado materno das ratas.

Os resultados observados nas fêmeas F1, mostram que a exposição intrauterina e lactacional à SAS não causou toxicidade nesses animais uma vez que não comprometeu o peso corporal ao nascer ou o ganho de peso corporal da prole durante o período lactacional assim como também não apresentaram nenhum dos sinais clínicos indicadores de toxicidade. Além disso, a exposição materna à SAS também não influenciou a DAG no DPN 1 e DPN 21, assim como não afetou a instalação da puberdade, observada pela abertura vaginal e pelo dia do primeiro estro, bem como a regularidade do ciclo estral, ou os parâmetros histomorfométricos dos órgãos reprodutivos (útero e ovário) na idade adulta. Assim, sugere-

se que a exposição intrauterina e lactacional à SAS não alterou as concentrações de estradiol durante o desenvolvimento, uma vez que todos esses parâmetros são hormônios dependentes.

Os dados da quimioluminescência iniciada pelo hidroperóxido de terc-butila foram usados para analisar a integridade das defesas antioxidantes não enzimáticas e as concentrações de hidroperóxidos lipídicos nos ovários das ratas da geração F1. O resultado do ensaio de quimioluminescência (QL) mostra que o estado de estresse oxidativo ao qual o ovário foi submetido induziu o consumo de antioxidantes e aumentou a formação de hidroperóxidos lipídicos, resultando em aumento da emissão de fótons (BARBOSA et al., 2003; GUARNIER et al., 2010; ZIMIANI et al., 2005). A peroxidação lipídica promove alterações na estrutura das membranas capazes de interromper a homeostase celular e/ou resultar na perda da capacidade de seletividade da membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A relação entre SAS e ERO no sistema reprodutivo das fêmeas ainda não foi elucidada. Infelizmente, a escassez de material devido ao tamanho reduzido dos ovários, principalmente nas ratas no DPN 21, não permitiu a quantificação ovariana de glutamato nesses animais. Juntos, o resultado da QL e a investigação na concentração ovariana de GSH refletem a extensão do dano oxidativo causado pela SAS, apontando para uma alteração no estado oxidativo das membranas celulares dos ovários das fêmeas da geração F1 tanto na infância quanto na vida adulta, ao invés de uma modificação direta da capacidade antioxidante do ovário. Entretanto, embora a exposição materna à SAS tenha alterado parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, essa alteração não foi suficiente para trazer repercussões reprodutivas tardias.

Com relação ao comportamento sexual das fêmeas da geração F1, observou-se o aumento tanto no escore quanto na frequência de lordose de magnitude 3. Esses resultados sugerem que as alterações no comportamento sexual das fêmeas do grupo SASG pode ter ocorrido devido ao efeito direto do fármaco no SNC. SAS pode ter induzido uma quantidade insuficiente de glutamato durante o período de diferenciação sexual hipotalâmica. Em roedores, durante essa janela sensível de plasticidade neuronal, dois processos distintos ocorrem no cérebro masculino: (1) a masculinização, que permite a expressão do comportamento sexual dos machos e a (2) defeminização, caracterizada pela perda de responsividade ao estradiol e à progesterona, que resulta no comportamento de lordose na vida adulta (BAUM, 1979; SCHWARZ; MCCARTHY, 2008). No cérebro feminino, o processo de feminização ocorre na ausência de estradiol durante este período crítico de desenvolvimento (BAUM, 1979; NORDEEN; YAHR, 1983). Além disso, o ácido γ -aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor sintetizado pela enzima ácido glutâmico

descarboxilase a partir do glutamato (ERLANDER et al., 1991). Embora em adultos o GABA promova um efeito inibitório (FERNÁNDEZ-GUASTI; LARSSON; BEYER, 1986; MCCARTHY; MALIK; FEDER, 1990), no cérebro neonatal, o GABA apresenta um efeito excitatório (CHERUBINI et al., 1990). A sinalização gabaérgica está relacionado com o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante todas as fases do desenvolvimento de forma complexa, a partir da migração celular de neurônios secretores de LHRH ao pico pré-ovulatório de LH (MAFFUCCI; GORE, 2009). Diferentemente dos machos, as fêmeas apresentam maior número de neurônios no AVPV (SEMAAN; KAUFFMAN, 2010). Essa diferença de tamanho é muito importante para apoiar o padrão cíclico de liberação de LH e garantir a ovulação em mulheres adultas (PETERSEN et al., 2012). Além disso, as fêmeas também apresentam uma quantidade maior de neurônios dopaminérgicos, GABA/glutamatérgicos e expressam mais Kiss-1 do que os machos (KAUFFMAN et al., 2007; OTTEM et al., 2004; SIMERLY, 1998). Durante o desenvolvimento cerebral do neonato, a liberação de glutamato no núcleo ventrolateral-ventromedial (VMHvl) modula a diferenciação sexual hipotalâmica e apresenta um fenótipo sexualmente dimórfico (LIANG, 2018). Nas fêmeas, a sinalização glutamatérgica no VMHvl depende do glutamato dos astrócitos e pode estar relacionada ao processo de comportamento de feminização (LIANG, 2018). Além disso, Yang e colegas (YANG et al., 2013) mostram que em fêmeas, a ablação em neurônios com expressão de receptor de progesterona (RP) no VMHvl diminui a receptividade sexual, sem induzir alterações na ciclicidade estral ou no comportamento materno dessas fêmeas. Assim, as alterações na expressão do comportamento sexual das fêmeas da geração F1 observadas neste estudo podem ter sido causadas por um desequilíbrio nas concentrações neuronais de glutamato desses animais durante o desenvolvimento inicial.

Em fêmeas, os eventos fisiológicos e comportamentais que permeiam a expressão do cuidado materno começam na vida perinatal e se estendem até a idade adulta (BRIDGES, 2015). Assim, a exposição materna às substâncias exógenas, como drogas, pode prejudicar a expressão do comportamento materno da prole feminina. Entretanto, nesse estudo, a exposição materna à SAS durante os estágios iniciais de desenvolvimento não induziu alterações nos parâmetros de comportamento materno das ratas F1.

6.2 Ratos F1

No que se refere aos ratos da geração F1, apesar da SAS ter induzido um aumento na concentração de GSH no testículo dos ratos no DPN 21, os dados obtidos mostraram que a exposição materna à SAS não influenciou o desenvolvimento reprodutivo desses animais durante o período neonatal e infância.

Além disso, dados como a DAG no DPN 1 e DPN 21, bem como no dia da separação prepucial (utilizado como indicador de maturidade sexual) sugerem que a concentração de testosterona, durante a janela de programação para a masculinização que ocorre do DG 14,5 ao DG 17,5 (WELSH et al., 2008, 2010), pode não ter sido afetada pela SAS, uma vez que tanto a DAG quanto a instalação da puberdade são considerados marcadores da ação androgênica e ambas não foram afetadas pela exposição materna à SAS. Dados na literatura mostram que ratos SD adultos tratados com SAS durante 60 dias apresentaram redução na concentração de testosterona e na expressão e atividade de enzimas relacionadas a via estereoidogênica como da proteína estereoidogênica reguladora aguda (STAR) tanto na dose de 300 quanto na de 600 mg/kg/dia e; da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) e da 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) na dose de 600 mg/kg/dia (OMMATI et al., 2018; OSAWE; FAROMBI, 2018), assim como na concentração de colesterol testicular após 14 dias de tratamento com 600 mg/kg/dia de SAS (OSAWÉ; FAROMBI, 2018).

Os resultados da análise histomorfométrica testicular durante a puberdade mostra que a exposição materna à SAS durante as fases iniciais de desenvolvimento sexual de ratos (embrionário, fetal, neonatal e infância) aumentou o comprimento total dos túbulos seminíferos. Esses dados sugerem que a SAS pode ter induzido um aumento nas concentrações de FSH desses animais, pois dados da literatura mostram que o tratamento de ratos adultos com 600 mg/kg/dia de SAS durante 14 dias, aumenta as concentrações plasmáticas de FSH (OSAWÉ; FAROMBI, 2018). Sabe-se que o FSH tem efeito específico sobre o crescimento longitudinal dos túbulos seminíferos, uma vez que ratos tratados com 100 μ g e 200 μ g de FSH, por injeção subcutânea, do DPN 1 ao 16 apresentaram aumento no comprimento longitudinal dos túbulos seminíferos, sem apresentar alterações nas concentrações de andrógenos, no número de células de Sertoli, no diâmetro gonadal ou quaisquer outras alterações histológicas testiculares (LEIDL; BENTLEY; GASS, 1976).

Além disso, alguns trabalhos na literatura mostram que o tratamento com 300 e 600 mg/kg/dia de SAS por 14 dias causa alterações histológicas no testículo de ratos adultos

(ALONSO et al., 2009; OMMATI et al., 2018). No estudo desenvolvido por Alonso e colaboradores (ALONSO et al., 2009) em ambas as doses avaliadas (300 e 600 mg/kg/dia) a SAS causou destruição no epitélio espermatogênico, descamação intratubular e progressiva perda de células de Sertoli ou células germinativas (ALONSO et al., 2009). No trabalho de Ommati e colaboradores (OMMATI et al., 2018) a SAS causou alterações histopatológicas no testículo descritas como injúria severa e descamação tubular, além de redução na espessura, diâmetro e no índice espermatogênico. Na menor dose avaliada (150 mg/kg/dia), houve alteração na estrutura dos túbulos seminíferos e redução discreta no número de feixes espermáticos (OMMATI et al., 2018). Demonstrando que mesmo em dose mais baixas, o tratamento com SAS é capaz de induzir alterações histopatológicas no testículo de ratos adultos.

No estudo de Hoyt e colaboradores (HOYT; FISHER; SWISHER, 1995), ratos adultos foram tratados com 600 mg/kg/dia de SAS durante 14 dias e avaliados no primeiro e no décimo quinto dia após o término do tratamento. A histopatologia testicular foi considerada o ponto mais sensível para a toxicologia reprodutiva desses animais. Entretanto, embora o tratamento com a SAS tenha reduzido a fertilidade dos ratos que foram avaliados logo após o término do tratamento, não houve alteração na concentração ou na motilidade espermática, sugerindo que esses parâmetros não foram a causa primária da infertilidade mediada pela SAS nesses animais. Além disso, os ratos avaliados 1 dia após o término do tratamento apresentaram um número significativamente menor de espermátides retidas no lúmen nas seções de túbulos na fase IX em comparação ao grupo controle, enquanto os ratos avaliados 15 dias após o término do tratamento apresentaram um número significativamente maior de seções de túbulos nas fases IX e X que continham espermátides retidas no lúmen e um número significativamente maior de seções de túbulos na fase XI que continham fragmentos de espermátides na camada basal. Estudos mais recentes sugerem que as alterações reprodutivas responsáveis pela infertilidade mediada pela SAS em roedores adultos podem estar relacionadas ao epidídimo (FUKUSHIMA et al., 2005, 2007; SHARMA; KHAJJA; PAREEK, 2007).

Em relação à análise histológica do epidídimo, no presente estudo, durante a puberdade, foram observadas células redondas tanto na cabeça quanto na cauda do epidídimo. Ratos Wistar adultos tratados oralmente com SAS na dose de 500 mg/kg/dia apresentaram diminuição da altura celular, redução na atividade secretora epitelial e alterações degenerativas nas células epiteliais do epidídimo. Entretanto, neste estudo, sugere-se a descamação do epitélio ou a presença de células germinativas no início da espermatogênese

uma vez que a ausência de marcadores específicos não nos permite afirmar que se trata-se de células do sistema imunológico.

No estudo de Sharma e colaboradores (SHARMA; KHAJJA; PAREEK, 2007), além das alterações histopatológicas epididimárias descritas acima, os animais também apresentaram diminuição na expressão do gene *relacionado ao acrossoma (CD59)*, da *proteína do cofator de membrana (MCP)* e do *fator acelerador de decaimento (DAF)* no epidídimo.

Sabe-se que as proteínas MCP e DAF são encontradas na superfície de uma ampla variedade de células, tais como eritrócitos, todos os tipos de leucócitos, plaquetas, tecido conjuntivo e células epiteliais e são conhecidas por atuarem como reguladoras do complemento (CAMPBELL et al., 1988). CD59 e DAF também são sintetizadas no epitélio do sistema genital interno masculino, transportadas para o fluido seminal e incorporadas na membrana acrossomal interna e parece proteger o espermatozoide de danos mediados pelo complemento no trato reprodutivo feminino (SIMPSON; HOLMES, 1994). Além disso, acredita-se que tanto a CD59 quanto a DAF estejam relacionados com a maturação do espermatozoide (FUKUSHIMA et al., 2005). Assim, no estudo realizado por Sharma e colaboradores (SHARMA; KHAJJA; PAREEK, 2007) a hipótese é de que a SAS, ao induzir a supressão da atividade secretora em células epiteliais do epidídimo, assim como a diminuição da síntese das proteínas CD9, MCP e DAF na membrana do espermatozoide, tenha reduzido a reação acrossômica, que é o processo pelo qual o espermatozoide é capaz de fertilizar o ovócito II resultando na infertilidade masculina dos ratos avaliados.

No estudo desenvolvido por Fukushima e colaboradores (FUKUSHIMA et al., 2005), ratos adultos tratados com 600 mg/kg/dia de SAS por gavagem durante 28 dias apresentaram supressão da maturação espermática e redução na expressão do mRNA das proteínas CD59, DAF e MCP, tanto na cabeça quanto na cauda do epidídimo. A hipótese levantada por esses pesquisadores é de que a SAS, ao suprimir a síntese das proteínas reguladoras do complemento, induziu alterações na concentração intracelular de Ca^{2+} resultando na redução da motilidade e da reação acrossômica do espermatozoide (FUKUSHIMA et al., 2005).

Um outro estudo realizado por esse mesmo grupo de pesquisa, no qual os ratos adultos também receberam 600 mg/kg/dia de SAS por gavagem durante 28 dias. Observou-se que, no testículo, o tratamento não afetou a expressão dos genes que codificam as proteínas CD59, DAF e MCP. Entretanto, no epidídimo a expressão dos genes CD59 e DAF foi reduzida pela metade desde o primeiro dia de tratamento em comparação com o grupo controle. Além disso, no sétimo dia de tratamento, a SAS causou redução na motilidade e na reação acrossômica

dos espermatozoides. O referido estudo sugere que a redução da expressão de CD59 e DAF prejudicou a maturação dos espermatozoides, resultando na inibição da motilidade e da reação acrossômica. Além disso, o aumento das alterações com o tempo de exposição à SAS pode indicar um aumento no número de espermatozoides afetados (FUKUSHIMA et al., 2007).

A avaliação de parâmetros relacionadas ao estresse oxidativo mostrou que a exposição materna à SAS foi capaz de afetar o testículo da geração F1 de ratos durante o desenvolvimento (infância e puberdade). Ratos SD adultos tratados com 600 mg/kg/dia de SAS por gavagem, por 14 (ALONSO et al., 2009) ou nas doses de 150, 300 e 600 mg/kg/dia durante 28 dias (OMMATI et al., 2018), assim como ratos Wistar adultos tratados com 600 mg/kg/dia de SAS por gavagem, durante 14 dias (OSAWA; FAROMBI, 2018) apresentaram alterações nos marcadores de estresse oxidativo testicular. Alonso e colegas (ALONSO et al., 2009) observaram que ratos tratados com SAS na dose de 600/mg/kg/dia apresentaram uma diminuição na atividade da glutatona redutase (GR) e da glutatona-S-transferase (GST) além de um aumento nas concentrações de GSH. Dentre esses parâmetros, apenas o GR permaneceu modificado após 14 dias de recuperação. Contraditoriamente, em Ommati e colaboradores (OMMATI et al., 2018) a SAS induziu uma diminuição na concentração GSH testicular e provocou um aumento nas ERO e na peroxidação lipídica nas membranas celulares do testículo nas três doses avaliadas (150, 300 e 600 mg/kg/dia). Osawe e Farombi (OSAWA; FAROMBI, 2018) também observaram um aumento na peroxidação lipídica e redução nas concentrações de SOD, GSH, GR e GST em testículo e epidídimo de animais tratados com SAS na dose de 600 mg/kg/dia.

A GSH é a principal defesa antioxidante celular não enzimática que ajuda a neutralizar as ERO e outros radicais livres que podem danificar as células e levar a doenças (LUBERDA, 2005). A ampla distribuição da glutatona e seu aparente envolvimento em uma multiplicidade de funções biológicas têm gerado um interesse contínuo nos métodos de análise desse componente celular desde sua descoberta e isolamento (TIETZE, 1969). A glutatona é conhecida como um antioxidante solúvel em água e amplamente distribuída em tecidos animais e vegetais e em microrganismos e mantido predominantemente no estado reduzido (GSH), que compreende na maioria dos casos a maior parte dos grupos sulfidril não proteicos celulares (TIETZE, 1969). A medição de tiol solúvel em ácido tem sido empregada para a estimativa das concentrações de GSH de extratos de tecido há muito tempo (WOODWARD, 1935). Os procedimentos para sua estimativa dependem geralmente da medição da mudança de absorvância seguida por DPNH ou TPNH (ELLMAN, 1959; SRIVASTAVA; BEUTLER, 1967).

A GR é uma enzima importante na manutenção das concentrações de GSH nas células espermatogênicas, uma vez que atua no sistema redox da glutathiona oxidada (GSSG) promovendo o seu retorno à forma reduzida, o que resulta na reciclagem da GSH (KANEKO et al., 2002; LINARES et al., 2007). A GST é uma enzima responsável pela adição de GSH a diversas substâncias endógenas e xenobióticos e sabe-se que a GSH é um co-substrato para GST (ROMEU et al., 2002). Portanto, assim como a GSH, tanto a GR quanto a GST também são fundamentais para a proteção dessas células contra o estresse oxidativo.

Neste estudo, os machos F1 apresentaram alteração nas concentrações testiculares de GSH apenas durante a infância (DPN 21) período em que ainda estavam sendo expostos à SAS através da lactação. Quando há um aumento de ERO, as células podem aumentar a produção de GSH para combater o estresse oxidativo. Assim, o aumento de GSH no testículo desses animais pode ter contrabalanceado o aumento de ERO induzido pela SAS. Esse processo pode ter prevenido o estresse oxidativo celular, que poderia levar à peroxidação lipídica das membranas testiculares. Em outras palavras, o GSH pode ter protegido as células do testículo da peroxidação lipídica e outros danos oxidativos causados pelo excesso de ERO gerados pela SAS.

Nos ratos F1, o ensaio de QL foi usado para analisar a integridade das defesas antioxidantes não enzimáticas, assim como as concentrações de hidroperóxidos lipídicos presentes em amostras de homogenatos do testículo dos animais durante a infância (DPN 21), puberdade (DPN 45-60) e vida adulta (DPN 90-95). O aumento observado na curva QL dos animais avaliados durante a puberdade, indica que houve um aumento na peroxidação lipídica das membranas das células testiculares, uma vez que a lógica desse ensaio consiste na indução do consumo de antioxidantes pelo hidroperóxido de tert-butil, que por sua vez aumenta a formação de hidroperóxidos lipídicos, resultando em aumento da emissão de fótons de forma dependente do tempo e esta pode ser visualizada através de uma curva, em unidades relativas de luz (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991; OLIVEIRA; CECCHINI, 2000). Dessa forma, um aumento na curva QL está intimamente relacionado ao estresse oxidativo ao qual o órgão foi previamente exposto.

No entanto, é importante destacar que nenhum desses parâmetros foi alterado durante a vida adulta, sugerindo a recuperação desses marcadores de estresse oxidativo durante o desenvolvimento reprodutivo. Além disso, a fertilidade masculina não foi afetada uma vez que a concentração plasmática de testosterona e os parâmetros espermáticos foram preservados.

Embora a SAS altere a morfologia do testículo e do epidídimo durante a puberdade, no DPN 120, os animais não apresentaram alterações histológicas nesses órgãos reprodutivos, sugerindo que a exposição materna à SAS na dose proposta não causou alterações permanentes nesses órgãos uma vez que as alterações histológicas observadas durante a puberdade não prejudicaram a morfologia e/ou a função testicular na idade adulta.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos da SAS observados no presente estudo representam uma preocupação relevante para a saúde pública, uma vez que o tratamento com SAS prejudicou a motivação materna das ratas F0 e induziu alterações reprodutivas tanto nas ratas quanto nos ratos F1. Apesar das alterações induzidas pela SAS no comportamento sexual e do aumento na peroxidação lipídica nos ovários das ratas F1, a exposição materna à SAS durante os estágios iniciais de desenvolvimento não prejudicou a fertilidade desses animais.

Com relação aos ratos F1, nossos dados demonstram que: (1) a exposição materna à SAS é capaz de causar alterações histológicas nos testículos e epidídimos durante a puberdade e alterações relacionadas ao estresse oxidativo no testículo dos ratos avaliados durante a infância e puberdade, e (2) a puberdade é um período mais sensível a exposição materna à SAS.

Além disso, é importante destacar que, uma vez que não foram encontrados estudos prévios, este provavelmente é o primeiro estudo a investigar os efeitos do tratamento com SAS na geração F0 e as consequências da exposição materna à SAS no desenvolvimento reprodutivo de ratas e ratos da geração F1 do nascimento até a vida adulta, empregando uma dose relevante para mulheres grávidas. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar a segurança da exposição materna à SAS durante importantes janelas críticas do desenvolvimento reprodutivo, como os períodos gestacional e de lactação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEIXO, J. F. et al. Effect of paracetamol treatment on maternal care and reproductive outcomes in female rat offspring. **Reproduction, fertility, and development**, v. 32, n. 18, p. 1311–25, 2012.

ALONSO, V. et al. Sulfasalazine induced oxidative stress: A possible mechanism of male infertility. **Reproductive Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 35–40, 2009.

AMATEAU, S. K.; MCCARTHY, M. M. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 643–650, 2004.

ANGELO, G. **Life stages: Pregnancy and Lactation**. Disponível em: <<https://lpi.oregonstate.edu/mic/life-stages/pregnancy-lactation>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

ATTAL, J. et al. Développement Testiculaire et Établissement de la Spermatogenèse Chez le Taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 3, n. 3, p. 219–241, 1963.

AUBERT, M. L. et al. Ontogeny of Hypothalamic Luteinizing Hormone- (GnRH) and Pituitary GnRH receptors in Fetal and Neonatal Rats. **Endocrinology**, v. 116, n. 4, p. 1565–1576, 1985.

BARBOSA, D. S. et al. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids. **Nutrition**, v. 19, n. 10, p. 837–842, 2003.

BAUM, M. J. Differentiation of coital behavior in mammals: A comparative analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 3, n. 4, p. 265–284, 1979.

BEACH, F. A. Prolonged hormone deprivation and pretest cage adaptation as factors affecting the display of lordosis by female rats. **Physiology and Behavior**, v. 16, n. 6, p. 807–808, 1976.

BENTEA, E. et al. Corticostriatal dysfunction and social interaction deficits in mice lacking the cystine/glutamate antiporter. **Molecular Psychiatry**, 2020.

BERKENBOSCH, F. et al. The Alzheimer's Amyloid Precursor Protein Is Produced by Type I Astrocytes in Primary Cultures of Rat Neuroglia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 25, p. 431–440, 1990.

BERLIN, C. M.; YAFFE, S. J. Disposition of Salicylazosulfapyridine (Azulfidine) and Metabolites in Human Breast Milk. **Developmental pharmacology and therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 31–39, 1980.

BIRNIE, G. G.; MCLEOD, T. I. F.; WATKINSON, G. Incidence of sulphasalazine-induced male infertility. **Gut**, v. 22, n. 6, p. 452–455, 1981.

BIRRU TALABI, M.; CLOWSE, M. E. B. Antirheumatic medications in pregnancy and breastfeeding. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 32, n. 3, p. 238–246, 2020.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. N. **Genética humana**. 2ª ed. Porto Alegre - RS: Artmed, 2001.

BRASIL, F. B.; OLIVEIRA, M. R. DE. Maternal folic acid consumption during gestation and its long-term effects on offspring ' s liver : a systematic review. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2017.

BRIDGES, C. C. et al. Structure, function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, n. 1, p. 47–54, 2001.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine Regulation of Maternal Behavior. **Front Neuroendocrinol**, v. 36, p. 178–196, 2015.

CHERUBINI, E. et al. GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 481–490, 1990.

CHISTYAKOV, V. A. et al. Effect of plastoquinone derivative 10-(60 - plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on estrous cycle and 17 β -estradiol level in rats. **Biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 1382–86, 2012.

CIANFARANI, S. et al. Effect of intrauterine growth retardation on liver and long-term metabolic risk. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 10, p. 1270–1277, 2012.

CLEGG, E. J. The age at which male rats become fertile. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 1, p. 119–120, 1960.

DE AZEVEDO CAMIN, N. et al. Effects of maternal exposure to the galactagogue Sulpiride on reproductive parameters in female rats. **Physiology and Behavior**, v. 140, p. 247–253, 2015.

DE BUNDEL, D. et al. Loss of system xc- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 15, p. 5792–5803, 2011.

DIK, B. et al. Sulfasalazine treatment can cause a positive effect on lps-induced endotoxemic rats. **Experimental Animals**, v. 67, n. 4, p. 403–412, 2018.

DOMENICE, S. et al. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 433–443, 2002.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulus system des schweinehodenswahrend der postnatalen entwicklug. *Monaths. Veterinary Medicine.*, v. 29, p. 650–652, 1974.

DOS SANTOS, A. H. et al. In utero and lactational exposure to fluoxetine delays puberty onset in female rats offspring. *Reproductive Toxicology*, v. 62, p. 1–8, 2016.

ELLMAN, G. L. No Title. *Arch. Biochem. Biophys*, v. 82, p. 70, 1959.

ERLANDER, M. G. et al. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, v. 7, n. 1, p. 91–100, 1991.

ESBJORNER, E.; JARNEROT, G.; WRANNE, L. Sulphasalazine and sulphapyridine serum levels in children to mothers treated with sulphasalazine during pregnancy and lactation. *Acta Paediatrica Scandinavica*, v. 76, n. 1, p. 137–142, 1987.

FAVARETO, A. P. A. et al. Persistent Impairment of Testicular Histology and Sperm Motility in Adult Rats Treated with Cisplatin at Peri-Puberty. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 109, n. 2, p. 85–96, 2011.

FAVARETO, A. P. A.; DE TOLEDO, F. C.; KEMPINAS, W. D. G. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reproductive Toxicology*, v. 32, n. 4, p. 425–433, 2011.

FERNANDES, G. S. A. et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*, v. 23, n. 1, p. 106–112, 2007.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LARSSON, K.; BEYER, C. GABAergic control of masculine sexual behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 24, n. 4, p. 1065–1070, 1986.

FILLER, R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. Em: CHAPLIN, R. E.; HEINDEL, J. H. (Eds.). *Male Reproductive toxicology*. San Diego: California: Academic Press, 1993. p. 334–343.

FINDLAY, J. K. et al. How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biology of Reproduction*, v. 93, n. 5, p. 1–7, 2015.

FINK, G.; SMITH, G. C. Ultrastructural features of the developing hypothalamo-hypophysial axis in the rat - A correlative study. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v. 119, n. 2, p. 208–226, 1971.

FITZROY HARDY, D.; DEBOLD, J. F. Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. *Physiology and Behavior*, v. 7, n. 4, p. 643–645, 1971.

FLINT, J. et al. BSR and BHPR guideline on prescribing drugs in pregnancy and breastfeeding-Part I: Standard and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs and corticosteroids. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 55, n. 9, p. 1693–1697, 2016.

FORCATO, S. et al. In utero and lactational exposure to metformin induces reproductive alterations in male rat offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 74, 2017.

FORCATO, S. et al. Sulfasalazine exposure during pregnancy and lactation induces alterations in reproductive behavior in adult female rat offspring. **Life Sciences**, v. 293, n. 120303, 2022.

FOSTER, P.; GRAY, E. Toxic responses of the reproductive system. Em: **Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 761–806.

FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. weibel. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1554–1561, 2003.

FUKUSHIMA, T. et al. Effects of sulfasalazine on sperm acrosome reaction and gene expression in the male reproductive organs of rats. **Toxicological Sciences**, v. 85, n. 1, p. 675–682, 2005.

FUKUSHIMA, T. et al. Early changes in sperm motility, acrosome reaction, and gene expression of reproductive organs in rats treated with sulfasalazine. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 153–157, 2007.

GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: Potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

GAN, H. T.; CHEN, Y. Q.; OUYANG, Q. Sulfasalazine inhibits activation of nuclear factor- κ B in patients with ulcerative colitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 20, n. 7, p. 1016–1024, 2005.

GOLUB, M. S.; SOBIN, C. A. Statistical modeling with litter as a random effect in mixed models to manage “intralitter likeness”. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 77, n. March, p. 106841, 2020.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **The Pharmacological basis of therapeutics: Digital Edition**. 11 th ed. New York, NY: McGraw-Hill Companies, Inc., 2011.

GOUT, P. W. et al. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x-cystine transporter: A new action for an old drug. **Leukemia**, v. 15, n. 10, p. 1633–1640, 2001.

GUARNIER, F. A. et al. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. **Muscle nerve**, v. 42, n. 6, p. 950–958, 2010.

GUERRA, M. T.; DE TOLEDO, F. C.; KEMPINAS, W. D. G. In utero and lactational exposure to fenvalerate disrupts reproductive function in female rats. **Reproductive Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 298–303, 2011.

HABERT, R.; PICON, R. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 β levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 193–198, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5th. ed. New York: Oxford University Press, 2015. v. i

HERNÁNDEZ-DÍAZ, S. et al. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 22, p. 1608–14, 2000.

HIGASHI, C. M. et al. Does fish oil or folic acid prevent vascular changes in female progeny caused by maternal exposure to fluoxetine? **Life Sciences**, v. 152, p. 165–170, 2016.

HO, S. M. et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. **Reproductive Toxicology**, v. 68, p. 85–104, 2017.

HODGSON, Y.; ROBERTSON, D.; DE KRETZER, D. The regulation of testicular function. **Int Rev Physiol**, v. 27, p. 275–327, 1983.

HORIMOTO, M. et al. Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexandione. **Reproductive Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 55–63, 2000.

HOYT, J. A.; FISHER, L. F.; SWISHER, D. K. Short-term male reproductive toxicity study with sulfasalazine in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 315–326, 1995.

JACOBSON, C. D.; GORSKI, R. A. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 196, n. 3, p. 519–529, 1981.

JANSEN, G. et al. Sulfasalazine is a potent inhibitor of the reduced folate carrier: Implications for combination therapies with methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 7, p. 2130–2139, 2004.

JÄRNEROT, G.; INTO-MALMBERG, M. B.; ESBJÖRNER, E. Placental transfer of sulphasalazine and sulphapyridine and some of its metabolites. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 5, p. 693–697, 1981.

JOBLING, M. S. et al. Effects of di(n-butyl) phthalate exposure on foetal rat germ-cell number and differentiation: Identification of age-specific windows of vulnerability. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 5 PART 2, 2011.

KANEKO, T. et al. The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 5, p. 1570–1578, 2002.

KARARLI, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 16, n. 5, p. 351–380, 1995.

KAUFFMAN, A. S. et al. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1774–1783, 2007.

KEZELE, P.; SKINNER, M. K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: Endocrine model of follicle assembly. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3329–3337, 2003.

KHAN, A. K. A.; TRUELOVE, S. C. Placental and mammary transfer of sulphasalazine. **British Medical Journal**, v. 2, n. 6204, p. 1553, 1979.

KINTER, K. J.; ANEKAR, A. A. **Biochemistry, Dihydrotestosterone**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2022.

KISS, A. C. I. et al. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 3, p. 292–300, 2012.

LAPPAS, M. et al. Nuclear factor Kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 668–673, 2002.

LECLUZE, E. et al. Dynamics of the transcriptional landscape during human fetal testis and ovary development. **Human Reproduction**, v. 35, n. 5, p. 1099–1119, 2020.

LEIDL, W.; BENTLEY, M. I.; GASS, G. H. Longitudinal Growth of the Seminiferous Tubules in LH and FSH Treated Rats. **Andrologia**, v. 8, n. 2, p. 131–136, 1976.

LENZ, K. M.; MCCARTHY, M. M. Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 2096–2104, 2010.

LEVI, A. J. et al. Male infertility due to sulphasalazine. **The Lancet**, v. 11, n. 2, p. 276–278, 1979.

LEVINE, J. E. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Fourth ed. Amsterdam: Elsevier Inc, 2015. v. 2

LIANG, S. L. The glutamine-glutamate cycle regulates synaptic glutamate release in the ventrolateral ventromedial nucleus of the hypothalamus of perinatal female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, n. 11, p. 0–3, 2018.

LINARES, V. et al. Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. **Toxicology**, v. 236, n. 1–2, p. 82–91, 1 jul. 2007.

LODOWSKA, J. et al. The effect of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid on the secretion of interleukin 8 by human colon myofibroblasts. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 72, n. 5, p. 917–921, 2015.

LUBERDA, Z. **The role of glutathione in mammalian gametes**. [s.l.: s.n.].

LUTGEN, V. et al. Behavioral assessment of acute inhibition of system xc- In rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 24, p. 4637–4647, 2014.

MACIEL-GUERRA, A. T.; GUERRA JÚNIOR, G. **Menino ou menina? - Os distúrbios da diferenciação sexual**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2002.

MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual Differentiation of the Central Nervous System. **Science**, v. 211, n. 4488, p. 1294–1303, 1981.

MAFFUCCI, J. A.; GORE, A. C. Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 274, p. 69–127, 2009.

MARCHETTI, P. M.; BARTH, J. H. Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 95–107, 2013.

MARCONDES, F. K.; BIACHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, p. 609–614, 2002.

MASSIE, A. et al. Dopaminergic neurons of system x c – -deficient mice are highly protected against 6-hydroxydopamine-induced toxicity . **The FASEB Journal**, v. 25, n. 4, p. 1359–1369, 2011.

MCCARTHY, M. M.; MALIK, K. F.; FEDER, H. H. Increased GABAergic transmission in medial hypothalamus facilitates lordosis but has the opposite effect in preoptic area. **Brain Research**, v. 507, n. 1, p. 40–44, 1990.

MILLER, R. J.; KILLIAN, G. J. **Morphometric Analyses of the Epididymis from Normal and Vasectomized Rats**. **Journal of Andrology**, 1987.

MONTAGNINI, B. G. et al. Investigation of the potential effects of triclosan as an endocrine disruptor in female rats : Uterotrophic assay and two-generation study. **Toxicology**, v. 410, n. May, p. 152–165, 2018.

MOORE, K.; PERSAUD, T. **Embiologia clínica**. 8^a ed. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2008.

MORRISON, L. J.; MARCINKIEWICZ, J. L. Tumor necrosis factor α enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 450–457, 2002.

NASHED, M. G. et al. Behavioural effects of using sulfasalazine to inhibit glutamate released by cancer cells: A novel target for cancer-induced depression. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 1–11, 2017.

NEMESKERI, A.; HALASZ, B.; KURAZ, M. Ontogenesis of the rat hypothalamo-adenohypophyseal system and inherent capacity of the fetal pituitary to differentiate into hormone-synthesizing and releasing cells. Em: BATHNAGAR, A. A. (Ed.). **The Anterior Pituitary Gland**. Raven Pres ed. New York: [s.n.]. p. 341–354.

NILSSON, E. E.; KEZELE, P.; SKINNER, M. K. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, n. 1–2, p. 65–73, 2002.

NORDEEN, E. J.; YAHR, P. A regional analysis of estrogen binding to hypothalamic cell nuclei in relation to masculinization and defeminization. **Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 933–941, 1983.

NORGARD, B. et al. Therapeutic drug use in women with crohn's disease and birth outcomes: A danish nationwide cohort study. **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, n. 7, p. 1406–1413, 2007.

NUMAN, M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 49, n. 1, p. 12–21, 2007.

OJEDA, S. R.; ADVIS, J. P.; ANDREWS, W. W. Neuroendocrine control of the onset of puberty. **Federation proceedings**, v. 39 (7), n. May 15, p. 2365–2371, 1980.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the rat. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, p. 2061–2126, 2006.

OLAZÁBAL, D. E. et al. Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1875–1892, 2013.

OLIVEIRA, F. J. DE A.; CECCHINI, R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania* (L.) Chagasi. **J Parasitol**, v. 86, n. 5, p. 1067–1072, 2000.

OMMATI, M. M. et al. Dual effects of sulfasalazine on rat sperm characteristics, spermatogenesis, and steroidogenesis in two experimental models. **Toxicology Letters**, n. December 2017, 2018.

ORTH, J. M. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. **The Anatomical Record**, v. 203, n. 4, p. 485–492, 1982.

OSAWA, S.; FAROMBI, E. Quercetin and rutin ameliorates sulphasalazine-induced spermotoxicity, alterations in reproductive hormones and steroidogenic enzyme imbalance in rats. **Andrologia**, v. 50, n. 5, p. 1–11, 2018.

OTTEM, E. N. et al. Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: Sexual dimorphism and function. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 37, p. 8097–8105, 2004.

PAMPANINI, V. et al. Impact of uteroplacental insufficiency on ovarian follicular pool in the rat. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2019.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a Classification of Oocytes and Follicles in the Mouse Ovary. **Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 555–557, 1968.

PELTIER, M. R. et al. Effect of Sulfasalazine on Basal and Bacteria-Stimulated Interleukin-8 Production by Endocervical Epithelial Cells. v. 61, p. 190–195, 2009.

PEPPERCORN, M. A.; GOLDMAN, P. Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. **Gastroenterology**, v. 64, n. 2, p. 240–245, 1973.

PEREIRA, M. R. F. et al. Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring? **Reproductive Toxicology**, v. 93, n. July 2019, p. 68–74, 2020.

PEROBELLI, J. E. et al. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 73, n. 13–14, p. 991–1002, 2010.

PETERSEN, S. L. et al. Sexual differentiation of the gonadotropin surge release mechanism: A new role for the canonical NfκB signaling pathway. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 36–44, 2012.

PHOENIX, C. H. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the Tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 5, p. 566, 2009.

PICUT, C. A. et al. Postnatal Development of the Testis in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 326–342, 2015.

PICUT, C. A.; ZIEJEWSKI, M. K.; STANISLAUS, D. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 190–227, 2018.

PIFFER, R. C. et al. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reproduction, fertility, and development**, v. 21, n. 5, p. 634–9, 2009.

PLOSKER, G. L.; CROOM, K. F. Rheumatoid Arthritis. **Drugs**, v. 65, n. 13, p. 1825–1849, 2006.

PRYOR, J. L. et al. Critical windows of exposure for children's health: The reproductive system in animals and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 491–503, 2000.

RAGNI, G. et al. Abnormal Semen Quality and Low Serum Testosterone in Men with Inflammatory Bowel Disease Treated for a Long Time with Sulfasalazine". **Andrologia**, v. 16, n. 2, p. 162–167, 1984.

RAINS, C. P.; NOBLE, S.; FAULDS, D. Sulfasalazine: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Drugs**, v. 50, n. 1, p. 137–156, 1995.

RAMIREZ, O. A.; CARRER, H. F.; NASELLO, A. G. Prenatal amphetamine exposure: Ovulation, sexual behavior and hypothalamic monoamine content in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 11, n. 6, p. 605–609, 1979.

RANNIKKI, A. S.; ZHANG, F. P.; HUHTANIEMI, I. T. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 107, n. 2, p. 199–208, 1995.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.

ROMEU, M. et al. Parameters related to oxygen free radicals in erythrocytes, plasma and epidermis of the hairless rat. **Life Sciences**, v. 71, n. 15, p. 1739–1749, 2002.

SATO, H. et al. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 17, p. 11455–11458, 1999.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, n. 1, p. 57–60, jun. 1970.

SCHWANZEL-FUKUDA, M.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 238, n. 3, p. 348–364, 1985.

SCHWARZ, J. M.; MCCARTHY, M. M. The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat. **Horm Behav.**, v. 54, n. 5, p. 662–668, 2008.

SCOTT, H. M.; MASON, J. I.; SHARPE, R. M. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 7, p. 883–925, 2009.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. **Reprod Toxicol**, v. 10, n. 3, p. 237–44., 1996.

SEMAAN, S. J.; KAUFFMAN, A. S. Sexual Differentiation and Development of Forebrain Reproductive Circuits. **Curr Opin Neurobiol**, v. 20, n. 4, p. 424–431, 2010.

SHARMA, J. G. C. S.; S.KHAJJA, K. J. B.; PAREEK, H. Histological determination of site of antifertility action of sulfasalazine in male albino rats. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 95–101, 2007.

SIERVO, G. E. M. L. et al. Sleep restriction during peripuberty unbalances sexual hormones and testicular cytokines in rats. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 1, p. 112–122, 2019.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. 5ª edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SIMERLY, R. B. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. **Behavioural Brain Research**, v. 92, n. 2, p. 195–203, 1998.

SIMUNDIC, A. M. Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in Biochemia Medica journal. **Biochemia Medica**, v. 22, n. 1, p. 15–23, 2012.

SMILEY, K. O. et al. Neuroendocrinology and Adaptive Physiology of Maternal Care. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 43, p. 161–210, 2019.

SRIVASTAVA, S. K.; BEUTLER, E. No Title. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 28, p. 659, 1967.

STOKER, T. E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197–252, 2000.

SUN, Z. et al. Alterations in epididymal proteomics and antioxidant activity of mice exposed to fluoride. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 169–180, 2017.

SZABÓ, K.; CSÁNYI, K. The vascular architecture of the developing pituitary-median eminence complex in the rat. **Cell and Tissue Research**, v. 224, n. 3, p. 563–577, 1982.

TETT, S. E. Clinical Pharmacokinetics of Slow-Acting Antirheumatic Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 25, n. 5, p. 392–407, 1993.

TIETZE, F. Enzymic Method for Quantitative Nanogram Amounts of Total Glutathione : Determination and Oxidized. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA); OFFICE OF THE SCIENCE ADVISOR RISK ASSESSMENT FORUM. Recommended Use of Body Weight 3/4 as the Default Method in Derivation of the Oral Reference Dose. **Epa/100/R11/0001**, p. 1–39, 2011.

VERMEIRE, S. et al. Management of inflammatory bowel disease in pregnancy. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 6, n. 8, p. 811–823, 2012.

VIEIRA, A. C. F. et al. Diclofenac- β -cyclodextrin for colonic drug targeting : in vivo performance in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 500, n. 1–2, p. 366–370, 2016.

VIEIRA, M. L. et al. Could maternal exposure to the antidepressants fluoxetine and St. John's Wort induce long-term reproductive effects on male rats? **Reproductive Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 102–107, 2013.

VIKTIL, K. K.; ENGELAND, A.; FURU, K. Outcomes after anti-rheumatic drug use before and during pregnancy: A cohort study among 150 000 pregnant women and expectant fathers. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 41, n. 3, p. 196–201, 2012.

WOODWARD, G. E. No Title. **J BIOL CHEM**, v. 109, n. 1, 1935.

WAHL, C. et al. Sulfasalazine: A potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 5, p. 1163–1174, 1998.

WANGIKAR, P.; AHMED, T.; VANGALA, S. **Toxicologic Pathology of the Reproductive System**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.

WARREN, D. W.; HALTMEYER, G. C.; EIK-NES, K. B. The effect of gonadotrophins on the fetal and neonatal rat testis. **Endocrinology**, v. 96, n. 5, p. 1226–1229, 1975.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 12, p. 131–55, fev. 1963.

WEIBEL, E. R. A retrospective of lung morphometry: From 1963 to present. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 6, p. 405–408, 2013.

WEISZ, J.; WARD, I. L. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. **Endocrinology**, v. 106, n. 1, p. 306–316, 1980.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479–1490, 2008.

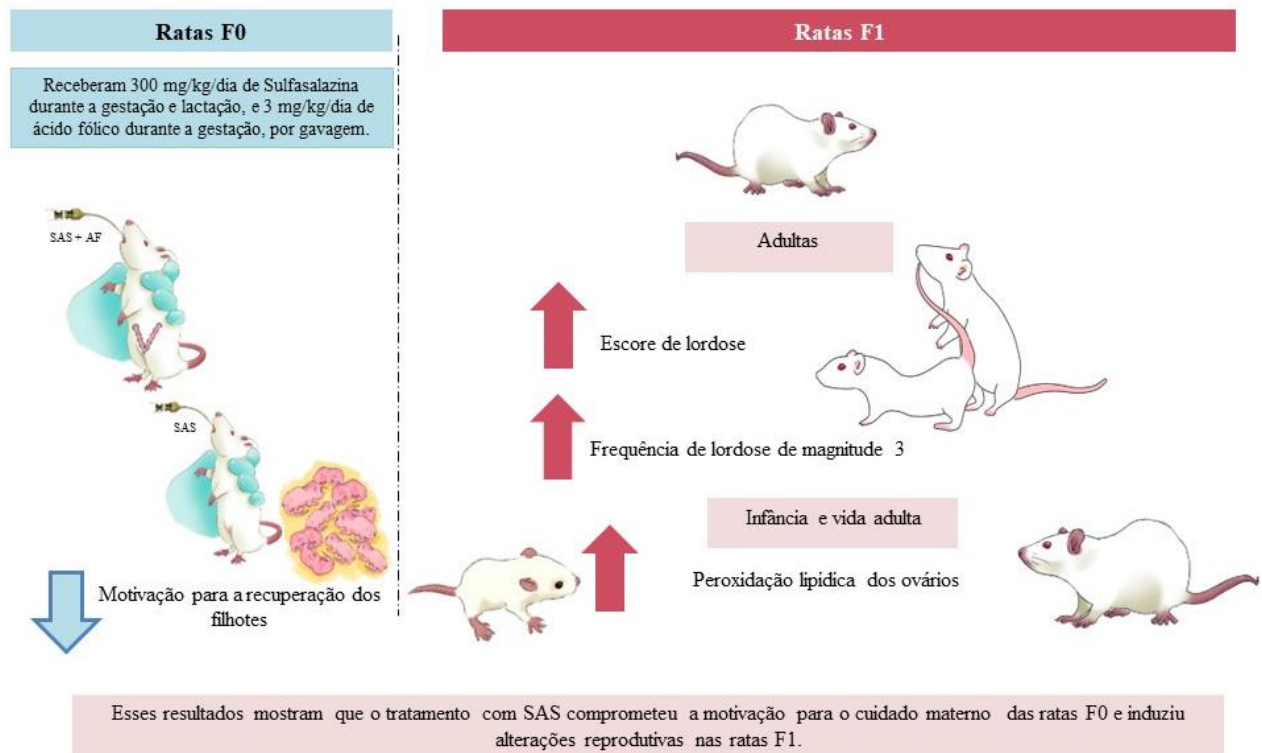
WRIGHT, C. L. et al. Cellular Mechanisms of Estradiol-Mediated Sexual Differentiation of the Brain. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 9, p. 553–561, 2010.

YANG, C. F. et al. Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 896–909, 2013.

YU, Y. et al. Ameliorative Effect of VE, IGF-I, and hCG on the Fluoride-Induced Testosterone Release Suppression in Mice Leydig Cells. **Biological Trace Element Research**, v. 181, n. 1, p. 95–103, 2017.

ZIMIANI, K. et al. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia / reperfusion as evaluated by chemiluminescence. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 2, p. 196–203, 2005.

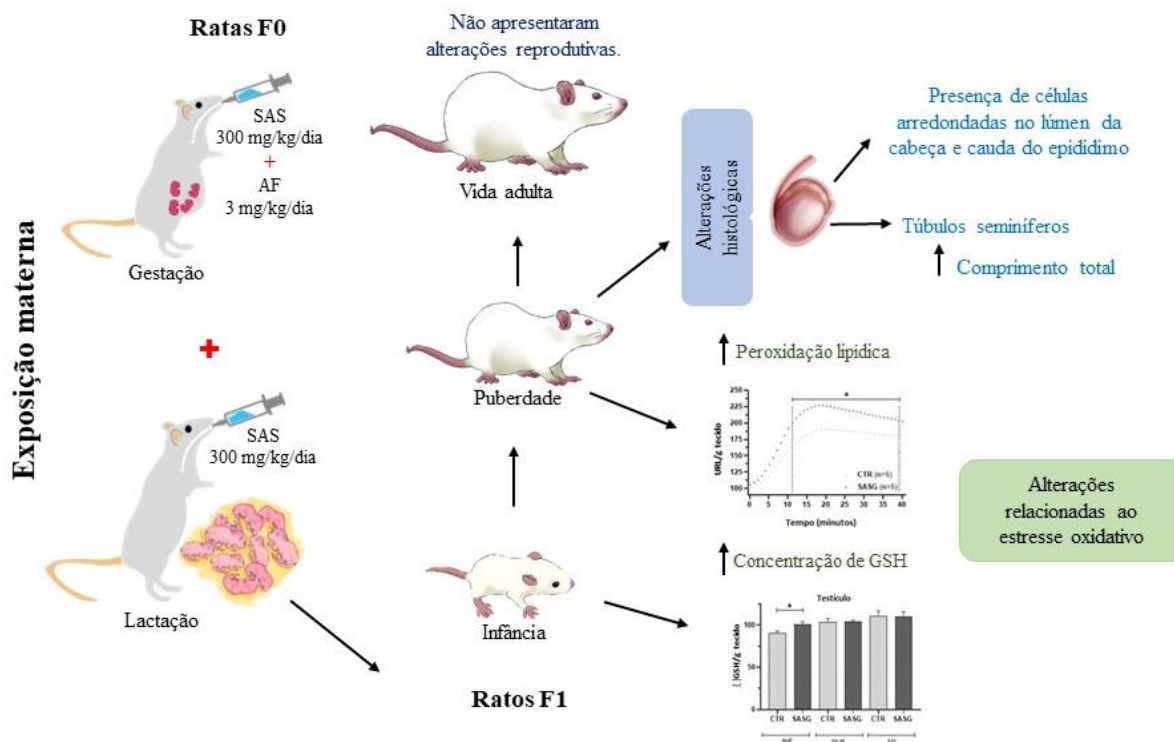
APÊNDICE A- Resumo gráfico das alterações reprodutivas induzidas pela SAS nas ratas F0 e F1.



Ilustrações: Forcato, B. H. (2008).

Esquema gráfico que resume as consequências da exposição materna à Sulfassalazina nos parâmetros reprodutivos das ratas F0 e F1. SAS: Sulfassalazina; AF: ácido fólico.

APÊNDICE B- Resumo gráfico das alterações reprodutivas induzidas pela exposição materna à SAS em ratos F1.



Ilustrações: Forcato, B. H. (2008).

Esquema gráfico que resume as consequências da exposição materna à Sulfassalazina nos parâmetros reprodutivos dos ratos F1. SAS: Sulfassalazina; AF: ácido fólico; GSH: glutathiona reduzida; INF: infância; PUB: puberdade; AD: adultos; CTR: grupo controle; SASG: grupo Sulfassalazina; URL: unidades relativas de luz.

ANEXO A- Aprovação da Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 125/2018

Londrina, 26 de julho de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação dos efeitos da exposição materna a Sulfasalazina em aspectos reprodutivos da prole de ratas " protocolo CEUA nº 10495.2018.13 sob a responsabilidade de Daniela Cristina Ceccatto Gerardin Cantamessa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **26/07/2018**.

Este projeto tem por objetivo investigar se a exposição materna a sulfasalazina durante a gestação e lactação pode alterar os parâmetros reprodutivos e de estresse oxidativo da prole. Grau de invasividade: GI3

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	26/07/2018 a 09/03/2021
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	253 Sendo 21 machos e 32 fêmeas (75 dias) oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Prole oriunda desses animais: estimativa de 100 machos e 100 fêmeas.
Peso/ Idade	75 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, Testículo, Epidídimo, Próstata, Vesícula Seminal, Ducto Deferente, Rins, Fígado, Adrenais, Útero e Ovário.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Prof.ª. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

CIF

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a). Daniela Cristina Ceccatto Gerardin Cantamessa
Responsável pelo projeto
Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para o Biotério Central/CCB
C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas/CCB
C/C para a Direção de Centro do CCB

ANEXO B – Artigo referente aos dados das ratas da geração F0 e F1 intitulado “Sulfasalazine exposure during pregnancy and lactation induces alterations in reproductive behavior in adult female rat Offspring” publicado na edição 293 da revista *Life Sciences* (Qualis A1 da CBI).



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie



Sulfasalazine exposure during pregnancy and lactation induces alterations in reproductive behavior in adult female rat offspring

Simone Forcato ^a, Ana Beatriz de Oliveira Aquino ^a, Nathaly de Moura Camparoto ^a, Hannah Hamada Mendonça Lens ^b, Flavia Alessandra Guarnier ^b, Ana Carolina Inhasz Kiss ^c, Daniela Cristina Ceccatto Gerardin ^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Londrina State University, Londrina, PR, Brazil.

^b Department of General Pathology, Londrina State University, Londrina, PR, Brazil

^c Department of Structural and Functional Biology, Botucatu Biosciences Institute, Sao Paulo State University, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Maternal exposure
System x_c⁻
Reproductive behavior
Female fertility

ABSTRACT

Aims: Sulfasalazine (SAS) is the first line drug in the treatment of chronic inflammatory bowel diseases in pregnant women. SAS and its metabolites cross the placenta and can be transferred through the milk. However, the long-term consequences to the reproductive system of offspring from dams exposed to SAS have not yet been studied. Thus, our study investigated the effects of SAS treatment during gestational and lactational periods on maternal care in F0 and reproductive outcomes in F1 females.

Main methods: Wistar female rats ($n = 10/\text{group}$) received 300 mg/kg/day of SAS dissolved in carboxymethyl cellulose (CMC), by gavage, from gestational day 0 to lactation day 21 and 3 mg/kg/day of folic acid during gestation. The control group received CMC only. On PND 21, the female pups were selected for reproductive evaluation at different time points: infancy and adulthood. The reproductive parameters evaluated were installation of puberty (vaginal opening and first estrus), estrous cyclicity, reproductive organs weight, histological analysis of the ovary follicles and uterus, analysis of oxidative stress in ovarian tissue, reproductive behavior (sexual and maternal), and fertility.

Key findings: SAS treatment decreased the retrieving behavior in F0 females. The F1 females presented an increase in the lordosis score, frequency of lordosis of magnitude 3, and lipid peroxidation of ovarian tissues in both infancy and adult life.

Significance: The SAS effects observed in the current study represent a relevant concern for public health, as they demonstrated that treatment with SAS compromised the maternal motivation of dams and induced reproductive alterations in F1 females.

1. Introduction

Sulfasalazine (SAS) is the first-line treatment for chronic inflammatory bowel diseases [1,2] and rheumatoid arthritis [3]. SAS has become increasingly commonly used for treatment during pregnancy and breastfeeding due to its effectiveness and the lower incidence of maternal side effects compared with other anti-inflammatory and antirheumatic drugs [4]. Although SAS exposure during pregnancy and lactation is not considered teratogenic [5,6], studies show that SAS crosses the placenta and reaches fetal circulation [7,8]. Furthermore, SAS also passes into breastmilk [7,9,10].

SAS is composed of 5-aminosalicylate (5-ASA) linked by an azo bond to sulfapyridine. These compounds are released for absorption after bacteria in the distal gastrointestinal tract cleaves the azo bond [11] in both humans and rats [12]. In humans,

transcription factor of pro-inflammatory cytokines - Nuclear factor kappa B (NF- κ B), observed in both in vitro [2,16–18] and in vivo [19] studies.

Some studies in the literature show that SAS treatment causes decreased testosterone levels and increased plasmatic levels of gonadotropins, in both adult humans and male rats [20,21]. Thus, exposure to SAS during early development could directly affect the fetal organism, as in the gestational period, sexual hormones are important to the reproductive development of the pups [22].

In adulthood, alterations in reproductive and behavioral parameters in the offspring were reported [23–25]. Studies showed that maternal exposure to xenobiotics causes reproductive alterations in female offspring [23,26,27]. It is known that all reproductive cells of female offspring begin differentiation during development and that rats are born with a finite pool of primordial follicles [28]. Therefore, changes in the maternal organism during this period may have transgenerational deleterious effects [29].

Abbreviations: SAS, Sulfasalazine; Sx_c⁻, System x_c⁻; CMC, carboxymethyl cellulose; SASG, sulfasalazine group; GD, gestational day; LD, lactational day; PND, postnatal day; AGD, anogenital distance.

* Corresponding author at: Department of Physiological Sciences, Londrina State University - UEL, 86051-980 Londrina, Parana, Brazil. *E-mail address:*

degerardin@uel.br (D.C.C. Gerardin). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120303>

Received 12 November 2021; Received in revised form 23 December 2021; Accepted 4 January 2022

Available online 17 January 2022

0024-3205/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

only 12% of SAS reaches the systemic circulation via oral dose [13]. It is known that rats have a similar total gastrointestinal transit time to humans [14], and this species constitutes an animal model that is especially well-suited for determining pharmacokinetic parameters after oral administration of liquid formulations [15]. The mechanism of action of SAS includes the inhibition of an important

Reproductive success depends on the morphological and functional integrity of the reproductive tract, as well as related central motivational systems involved with reproductive behaviors. In adult rodents, SAS can promote alterations in brain motivational systems [30,31], which play an important role in sexual behavior and maternal care [32,33]. Therefore, exposure to SAS

could induce motivational alterations, leading to reproductive behavior impairments.

Finally, it is important to highlight that the long-term consequences to the reproductive system of offspring from dams exposed to SAS have not yet been studied. Thus, considering the lack of studies evaluating the possible reproductive consequences of SAS exposure during critical windows of development, the present study aimed to evaluate the effects of SAS treatment on dam motivation and reproductive parameters of female offspring.

2. Material and methods

2.1. Animals and treatment

Male ($n = 11$) and female ($n = 22$) Wistar rats (75 days), from the colony of the State University of Londrina, were housed collectively in same-sex groups (4–5 animals per cage) in polypropylene cages (29 cm × 18 cm × 13 cm) and used as the parental generation. They were kept in a controlled environment at a temperature of 23 ± 2 °C, 12 h light/dark cycle, with lights on at 06:00 h. All animals had food (regular lab chow - Nuvilab™, Quimtia) and water ad libitum. All animal procedures were approved by the UEL Ethics Committee for Animal Research (CEUA: 10495.2018.13). The experimental design is shown in Fig. 1.

After a 15-day period of adaptation, two females were placed overnight in a cage with one male, and the next morning, pregnancy was confirmed by the presence of sperm and the estrus

phase in the vaginal smears; this day was designated gestational day (GD) 0.

The pregnant Wistar female rats were individually housed and allocated to one of the following experimental groups (10 dams/group):

- Control group (CTR), which received 0.50 mL of carboxymethyl cellulose (CMC), daily, through gavage.
- Sulfasalazine group (SASG), which received 300 mg/kg/day of sulfasalazine dissolved in CMC, daily, through gavage (Alonso et al., 2009).

Both groups were treated from GD 0 until lactational day 21 (LD 21). Since SAS inhibits gastrointestinal folate absorption, during the gestational period, F0 (first generation females) also received 3 mg/kg/day of folic acid (FA) through gavage [34–36]. The FA treatment occurred two hours before the SAS treatment and was also dissolved in CMC. The treatment occurred daily between 10:00 and 11:00 h. The CTR group received only CMC during both treatments.

The dose of 300 mg/kg/day of SAS represents a dosimetric adjustment of the safe dose for pregnant women of 500 mg/day [37]. Applying the body weight^{3/4} scaling (United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 2011) [38], with an added security of a factor of 10, considering intraspecific variability, the dose of 298 mg/kg/day was obtained. The dose of 300 mg/kg/day was then adopted considering the proximity with studies in the literature [39–42]. Regarding the FA, the recommended dose is 5 mg/day [43,44] to reduce the risk of the development of oral clefts [45] and neural

tube defects, as well as cardiovascular anomalies - [46].

Applying the body weight^{3/4} scaling [38], the dose of 0.3 mg/kg/day in rats (inter-species variability) was obtained, and after adding a factor of 10 (intraspecific variability), we adopted the dose of 3 mg/kg/day [43]. At GD 22, all the dams (F0) delivered naturally, and this day was considered postnatal day (PND) 0. On PND 1, pups were counted, weighed, and their sex was identified. In order to homogenize SAS exposure among litters, on PND 4 the number of pups per litter was culled to eight, maintaining, when possible, four males and four females. Litters with less than 8 pups were excluded from the experiment. Pups were weaned on PND 21 and allocated in same-sex collective cages (4–5 animals per cage). The female pups were evaluated from infancy (PND 21) to adulthood (PND 75–117). No littermates were used for the same analysis; thus, the litter was the experimental unit.

The male pups were used in other reproductive experiments from our research group.

2.2. Experimental procedures F0 generation

The effects of SAS treatment on the maternal reproductive system during the gestational and lactational periods were evaluated. To assess whether SAS treatment at the employed dose caused maternal toxicity, body weight and food intake were monitored throughout the treatment period. To investigate whether SAS altered the maternal care motivation as well as interaction with their offspring, a home cage retrieval test was performed.

2.2.1. Maternal general toxicity

Body weight was measured every 3 days during the treatment period to correct the drug volume administration. Toxicity signs such as abnormal respiratory pattern, lacrimation, piloerection, and tremors were observed daily.

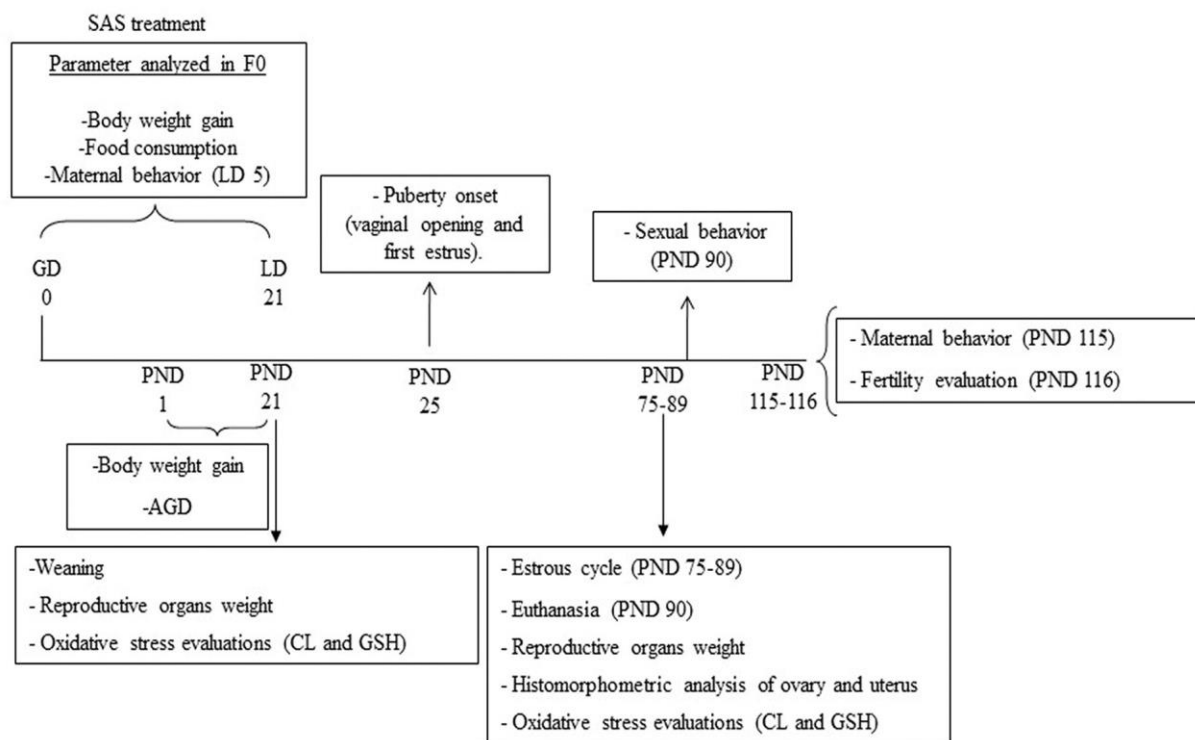


Fig. 1. Diagram of the experimental design. GD: gestational day. LD: lactational day. PND: postnatal day. AGD: anogenital distance. CL: chemiluminescence. GSH: reduced Glutathione.

During gestational and lactational periods, the maternal body weight and food intake were assessed weekly. The maternal body weight gain during pregnancy was obtained by subtracting the weight on LD 1 from the weight on GD 0 (pregnancy weight gain), and during lactation was obtained by subtracting the body weight on LD 21 from the body weight on LD 1.

The number of pups from each dam was counted on the day of birth (LD 1), and the sex ratio (number of males / number of females \times 100) was evaluated.

2.2.2. Evaluation of maternal motivation

Maternal motivation and care were evaluated on LD 5 according to the methodology proposed by Kiss and colleagues (2012) [47]. This behavioral test was employed to evaluate whether maternal treatment with SAS impaired maternal behavior [23,47,48]. LD 5 was chosen because maternal motivation is at its peak in this period [23]. All behavioral analyses were performed between 09:00 and 12:00 h.

On the day of the test, the female was removed from her cage and the nest was destroyed. After 30 min, the dam was returned to the cage and mother-pup interactions were recorded for 30 min with a video camera, for later evaluation. The following behaviors were scored: latency to retrieve the first pup; retrieving (number of times the mother retrieved any pup toward the nest); pup contact (number of times the mother took any pup and released it in a random place of the cage); time spent

on nest building (with or without contact with pups); time the mother spent licking and grooming any pup (both body and anogenital licking were included); time spent nursing; and time spent on self-grooming.

During the 30 min of the test, regardless of position of mothers in the cage, the time in which the female did not present any interaction with the pups was considered as “off pups”. The videos were analyzed using the Countee app (Krushka Design) on an Android platform.

3. Experimental procedures F1 generation (female offspring)

As maternal treatment with SAS can reach offspring through the placenta or milk, and the reproductive tract and associated neural circuits of offspring are under development at this stage, the reproductive repercussions on female offspring were evaluated. On PND 21 (day of weaning), three female pups from each litter were selected for reproductive evaluation at different time points: in infancy and in adult life ($n = 9-10$ per group/age) [49]. One female pup was submitted to euthanasia during infancy (PND 21) for determination of reproductive organ weight (uterus and right ovary) and analysis of oxidative stress in ovarian tissue, since antioxidant system impairments is a suggested pathway of action of SAS in the male reproductive system. Another pup was used to assess non-behavioral reproductive parameters, such as installation of puberty (vaginal opening and first estrus), estrous cyclicity, reproductive organ weight, histological analysis of the ovary follicles and uterus,

and analysis of oxidative stress parameters during adulthood (PND 90–95). Finally, a third female pup was used for studies about the effects of maternal SAS treatment on behavioral analysis (sexual and maternal motivation), and fertility evaluation.

3.1. Female offspring general toxicity

The pups' body weight was assessed on PND 1, 4, 7, 14, and 21. Their health status was observed daily throughout lactation for signs of toxicity and other health issues.

3.2. Analysis of the reproductive tract and oxidative stress in the short and long term (infancy and adulthood)

The anogenital distance (AGD, distance from the anus to the genital tubercle) was obtained on PND 1, PND 21, the day of vaginal opening, and the day of euthanasia. AGD was measured using a vernier caliper and normalized by the cube root of body weight [50]. The female offspring birth weight (g); AGD on PND 1 and 21, and body weight gain during the lactation period (g) (from PND 1 until PND 21) are expressed as the litter means [49].

During infancy (on PND 21) and adult life (from PND 89, in the first estrus after the end of the estrous cycle evaluation), one female pup per litter ($n = 9–10$ per group), was weighed and euthanized by decapitation at 10:00–11:00. Immediately after euthanasia, the left ovary was removed, frozen in liquid nitrogen, and stored in a freezer at -80° for further analysis of oxidative stress. The ovaries and

uterus (with fluid) were removed, and their weight determined. These reproductive organs from adult females were immersed in Methacarn solution (60% methanol, 30% chloroform, 10% acetic acid) for fixation, before being stored in ethanol 70° for histological analysis.

The preserved organs (right ovary and uterus) were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in Paraplast® (McCormick Scientific). Six $5\ \mu\text{m}$ were obtained at $50\ \mu\text{m}$ intervals of tissues collected from each animal, mounted on glass slides, and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological analysis. The number of follicles was counted and assessed by light microscopy at a magnification of $400\times$. The mean number of ovarian follicles was calculated for six sections per animal per group. The follicles were classified according to the Pedersen and Peters criteria (1968) [51], with slight modifications, as: (1) primordial (types 1–3b), considering primordial and primary follicles together when oocytes were surrounded by a single layer of either squamous or cuboidal epithelial cells; (2) growing follicles (types 4–5b), when the follicle contained two to four layers of granulosa cells with no antral space; and (3) antral follicles (types 6–8), when the oocytes contained a clearly defined antral space. Only primordial and growing follicles with a visible nucleus were counted. Sections were counted without identification of the treatment group. The uterine epithelium, endometrial stroma, myometrium, and perimetrium were evaluated in the middle portion of the uterus, relative to the position of the oviduct and

ovary. The thickness of each layer of uterus was measured, in three sections per animal, obtained using a photo camera (Moticam 5, Motic) coupled to an ocular microscope with 100× final magnification, using the software Images Plus 2.0 (Motic). In each section, five different regions were analyzed, resulting in a total of 15 measurements per animal.

3.2.1. Oxidative stress evaluation

3.2.1.1. Tissue preparation. The left ovary was prepared according to the method described by Guarnier and colleagues (2010) [52] in skeletal muscle and adapted for ovary. Briefly, the tissue was homogenized for 30 s in an Ultra-Turrax (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) homogenizer that contained 10 mg/mL⁻¹ tissue in 30 mM KH₂PO₄ and K₂HPO₄ buffer and 120 mM KCl at pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 11,000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant was used for the analysis described below.

3.2.1.2. Measurement of lipid hydroperoxides by tert-butyl-initiated chemiluminescence (CL). The reaction mixtures were placed in luminescence tubes, containing homogenate from the ovary (10 mg/mL⁻¹), in 30 mM KH₂PO₄ and K₂HPO₄ buffer (with 120 mM KCl, pH 7.4), and 6 mM tert-butyl hydroperoxide in a final volume of 1 mL. The tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) assay, was assessed using a luminometer (Promega™, Madison, USA) with a response range of 300–650 nm [53,54]. The tubes were kept in the dark until the moment of the assay, which was performed

at 33 °C. For each animal, a 40 min curve was obtained via interpolation (each point represented the differential smoothing of 600 readings). The results are expressed in relative light units per gram of tissue (RLU/g tissue). The entire curve was used to estimate the number of lipid hydroperoxides present in the sample.

3.2.1.3. Measurement of reduced glutathione.

Reduced Glutathione (GSH) was measured according to the method described by Tietze (1969) [55]. Briefly, the GSH levels were determined using DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) in the supernatant from ovarian tissue (10 mg/mL⁻¹) and evidenced by the formation of a yellow color. The GSH levels were measured at 412 nm, and the results are expressed as μmole/mg protein.

3.3. Analysis of puberty onset and estrous cyclicity

The vaginal opening is considered as an indicator of the onset of sexual maturity and was verified daily from PND 25, and the day on which vaginal open occurred was noted. From that day on, vaginal smears were performed, always in the morning, to verify the day of the first estrus (prevalence of cornified epithelial cells). The material was collected using a flexible cotton-tipped stem soaked in saline inserted in the vagina and rotated, and adherent mucous cells were spread on a glass microscope slide, moistened with a drop of saline and observed under a light microscope.

3.3.1. Estrous cycle evaluation

From PND 75, vaginal smears were obtained daily, always at the same time in the morning, over a period of 15 days. The material was collected as described in item 3.2. The estrous cycle phases were observed under light microscopy and the phase of the estrous cycle was classified as proestrus, estrus, metestrus, and diestrus according to the cytologic characteristics [56]. The proestrus phase was defined by smears with no leucocytes and possessing a prevalence of nucleated epithelial cells. The estrus phase was defined by the absence of leucocytes, some nucleated cells, and many cornified epithelial cells. The metaestrus and diestrus smears were defined by the presence of leucocytes. Coefficients of proestrus (Cp), estrus (Ce), and metaestrus-diestrus (Cmd) were determined by the formula $C = a/b \times 100$, where C is the coefficient of the period of the cycle, a is the number of days of a particular period of the cycle during the course of observations, and b is the total duration of the complete cycle (in days). The estrous cycle duration was calculated as the number of days between one estrous phase and the next [57].

3.4. Behavioral evaluations (sexual and maternal motivation)

On PND 75, before the evaluation started, a group of females was adapted during a 15-day period to a reversed light-dark cycle. Female sexual behavior (from PND 90) in the presence of a sexually experienced male was recorded using a video camera, linked to a monitor in an adjacent room,

under red light, 3–4 h after a proestrus smear was obtained [58]. The male was initially placed in the observation cage for 10 min, at which time the female was placed in the same cage. The test lasted until 10 mounts had been observed [59] and results are expressed as the lordosis quotient (LQ; calculated as (number of lordosis / total mounts) \times 100) [60]. In addition, lordosis was ranked on a scale of 0–3 as follows: 0- absence of lordosis; 1 - the female showed little flexion of the spine, with the head and hips slightly elevated from the floor; 2 - the female showed spinal flexion with the head raised close to an angle of 30° from the floor; and 3 maximum lordosis, with accented spinal flexion and the head inclined at an angle of $\geq 45^\circ$ relative to the floor (Fig. 2). The frequency of each type of lordosis was noted. A mean lordosis score (LS) was calculated (LS = total number of lordosis points/ total number of lordosis responses) and assigned for each test [61]. All females were used only once.

After the evaluation of sexual behavior, females remained overnight in the cage with the male for mating. The next morning, the male was removed, and pregnancy was confirmed by the presence of sperm in vaginal smears. These female rats were used to analyze body weight gain and food intake during gestation and the first week of the lactational period. The pregnancy body weight gain was estimated as described for the dams.

The maternal behavior evaluation of female offspring was performed to investigate the effects of maternal exposure to SAS during critical windows of reproductive development (intrauterine life and

lactation), since the exposure period covers the critical window of reproductive system development (GD 13–17) [62] and the critical window of hypothalamic sexual differentiation (from GD-18 until PND-10) of rats [63,64]. The evaluation of maternal behavior was performed following the same protocol described for the mothers.

3.5. Fertility evaluation

In the morning of PND 117, which corresponds to LD 6 (one day after the evaluation of maternal behavior), the F1 females were weighed, and euthanized by decapitation, and the reproductive organs (ovaries and uterus with fluid) were removed, dissected, and weighed. Soon after euthanasia, the number of implantation sites and corpora lutea was assessed macroscopically [65]. The reproductive performance was assessed by determining: (1) the implantation rate (number of implantations / number of corpora lutea) \times 100); (2) rate of pre-implantation loss (number of corpora lutea - number of implantations / number of corpora lutea \times 100); (3) rate of post-implantation loss (number of implantations - number of live fetuses / number of implantations) \times 100), and (4) fetal viability (number of live fetuses / number of implantations) \times 100) [65].

3.6. Statistical analysis

Initially, an exploratory analysis was conducted to evaluate the normality of distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test) for each variable. Data with normal

distribution and homogeneity of variance were analyzed by the Student's *t*-test and are reported as the mean \pm standard deviation [66]. In the absence of normal distribution and/or homogeneity of variance a Mann-Whitney H test was performed, and data are presented as the medians and interquartile range (IQR). In evaluations of food intake of F0 and F1 and of body weight gain of F1 female rats from PND 1 to PND 21, repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used. If the data did not pass the criterion of sphericity in the repeated-measures ANOVA, we used the statistical values (d.f. and *F*) following the Greenhouse-Geisser correction. Analysis of covariance (ANCOVA) was used to of each treatment on the reproductive organ weight using final body weight as the covariate. However, since the ANCOVA and Student's *t*-test provided similar results, the Student's *t*-test results are reported. To evaluate lordosis magnitude and pup retrieving, a Fisher's exact test was performed. A two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was used to detect the effect of each treatment on tert-butyl hydroperoxide-initiated CL analysis. One animal was excluded from the statistical test since its result was considered an outlier (*Z*-score). Differences were considered significant if two-tailed $p \leq 0.05$. All statistical procedures were performed using SPSS version 19 for Windows (SPSS Inc.).

4. Results

The treatment with SAS had an impact on maternal motivation of dams, without inducing toxicity. Regarding the female offspring, oxidative

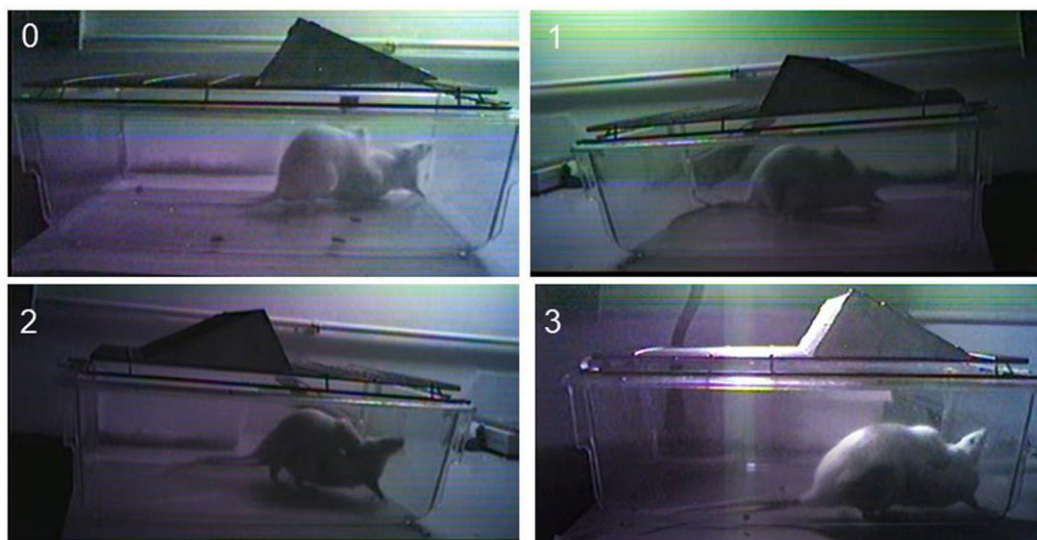


Fig. 2. Image representative of lordosis behavior of Wistar female rat. Lordosis behavior was ranked on a scale of 0–3 as follows: 0- absence of lordosis; 1- the female showed little flexion of the spine, with the head and hips slightly elevated from the floor; 2- the female showed spinal flexion with the head raised close to an angle of 30° from the floor; and 3- maximum lordosis, with accented spinal flexion and the head inclined at an angle of $\geq 45^\circ$ relative to the floor. A mean lordosis score (LS) was calculated (LS = total number of lordosis points/total number of lordosis responses) and assigned for each test.

stress-related changes in ovarian tissue were observed in both infancy and adult life. In addition, maternal exposure to SAS also induced changes in the sexual behavior of the offspring in adulthood. However, other evaluated parameters were not further compromised.

4.1. Parameters analyzed in dams (F0 generation)

During the treatment, the F0 females did not show visible signs of toxicity (abnormal respiratory pattern, lacrimation, piloerection, and tremors). The SAS treatment also did not affect body weight gain (g) of F0 during gestational (LD1-GD0) (CTR: 27.66 ± 10.13 , $n = 10$ and SASG: 21.63 ± 8.41 , $n = 10$) and lactational periods (LD21-LD1) (CTR: 19.72 ± 12.20 , $n = 10$ and SASG: 19.33 ± 10.30 , $n = 10$) or food intake during the treatment (Fig. 3). Moreover, no alterations were observed in the final body weight or in reproductive organ weights (uterus and ovaries)

at LD 21 of F0 female rats. The number of pups and sex ratio (M:F) were also not affected by treatment with SAS (Supplemental Table 1).

4.1.1. Evaluation of maternal motivation of F0

The treatment with SAS reduced the maternal care motivation in the

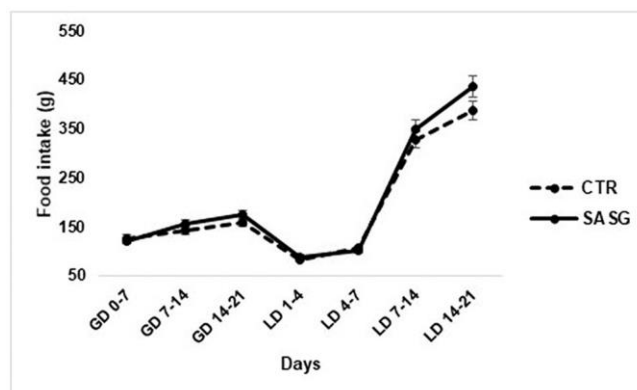


Fig. 3. Food intake of F0 female rats treated with 300 mg/kg/day sulfasalazine (SAS) during gestation and lactation periods (from Gestational day (GD) 0 to Lactational day (LD) 21). Data are presented as mean \pm standard deviation. ($n = 10$ per group). There were no significant differences between the SAS-treated group and their control group (CTR) treated with carboxymethyl cellulose (CMC), ($p > 0.05$, repeated-measures ANOVA).

rats. Half of F0 female rats did not complete the retrieval of the whole litter (Fisher's exact test, $p = 0.03$) in the SAS group. The other parameters of

maternal behavior were not altered by SAS treatment (Table 1).

4.2. Parameters analyzed in female offspring (F1 generation)

The birth weight of F1 females (g) (CTR: 6.15 [5.79–6.78], $n = 10$; SASG: 5.84 [5.73–6.31], $n = 10$) $U = 35.50$, $p > 0.05$, and the body weight gain from birth until weaning (Fig. 4), as well as the relative AGD ($\text{mm/g}^{1/3}$) at PND 1 (CTR: 0.92 [0.83–0.95], $n = 10$ and SASG: 0.90 [0.81–1.05], $n = 10$) and at PND 21 (CTR: 2.25 [1.98–2.38], $n = 10$ and SASG: 2.27 [1.95–2.39], $n = 10$), were not affected by intrauterine and lactational exposure to SAS. Data are expressed as litter means.

The body weight and reproductive organ weights (uterus and right ovary) at PND 21 and in adult female rats (Supplemental Tables 2 and 3 respectively), and histological analysis of the ovarian follicles and uterus in F1 adult female rats (Supplemental Table 4) were also not influenced by maternal exposure to SAS.

Table 1

Evaluation of the maternal behavior in F0 female rats.

Parameters	CTR (10)	SASG (10)
Dams that retrieved all pups	100% (10/10)	50% (5/10)*
Time to retrieve 1st pup (s)	60.50 [41.25–110.75]	47.50 [43.25–100.5]
No. of Retrievals	6.00 [5.00–7.25]	3.50 [1.75–7.00]
No. of Pup contacts	8.00 [5.50–17.00]	3.00 [2.00–8.75]
Nest building (s)	147.50 [125.75–251.00]	96.50 [48.50–184.50]
Grooming pup (s)	147.60 ± 132.60	179.00 ± 130.34
Nursing duration (s)	473.50 [46.25–781.00]	174.00 [0.00–707.75]
Self-grooming (s)	19.10 ± 11.23	21.20 ± 19.23
Off pup (s)	956.90 ± 470.15	1186.10 ± 386.50

The percentage of animals that retrieved all pups was analyzed by Fisher's test, * $p < 0.05$. The other data are given as mean ± standard deviation or as median [interquartile range] with the significance of differences analyzed using the Student's t-test or Mann–Whitney test as appropriate, $p > 0.05$. Numbers in parentheses show the number of animals per group. Parameter with (s) means time in seconds spent exhibiting that particular behavior during the observation period. Female rats of sulfasalazine group (SASG) were treated with sulfasalazine at dose of 300 mg/kg/day during gestational and lactational periods. Control group (CTR) was treated with vehicle carboxymethyl cellulose (CMC).

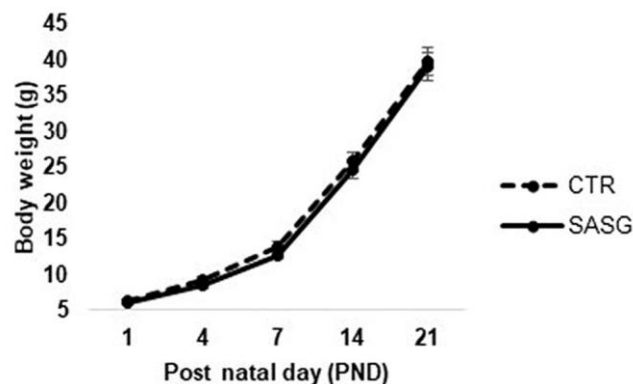


Fig. 4. Body weight gain (g) of F1 female pups from Postnatal Day 1 to 21 born to dams treated with 300 mg/kg/day sulfasalazine (SAS) during gestation and lactation periods (from Gestational day (GD) 0 to Lactation day (LD) 21). Data are presented as mean ± standard deviation. ($n = 10$ per group). There were no significant differences between the SAS-treated group and their control group (CTR) treated with carboxymethyl cellulose (CMC), ($p > 0.05$, repeated-measures ANOVA).

4.2.1. Oxidative stress evaluation

4.2.1.1. Tert-Butyl Hydroperoxide–Initiated Chemiluminescence. (CL).

The data on tert-butyl hydroperoxide–initiated chemiluminescence was used to analyze the integrity of non-enzymatic antioxidant defenses and the levels of lipid hydroperoxides in ovarian tissues. Intrauterine and lactational exposure to SAS induced a significant increase in lipid peroxidation levels, as demonstrated by the significant enhancement in the Cl curve in both infant ($p = 0.012$) and adult F1 females ($p < 0.0001$) when compared to the control group (Fig. 5). Points were significantly higher from points 10 to 27 and, from point 8 to the end of the curve when compared by two-way ANOVA analysis complemented by Bonferroni's post hoc test, respectively. The GSH levels were not affected by intrauterine and lactational exposure to SAS (Student's t-test), as shown in Fig. 5.

4.2.2. Analysis of puberty onset and estrous cyclicity

SAS exposure did not influence the onset of puberty observed by the day of vaginal opening (CTR: 34.90 ± 2.23 , $n = 10$ and SASG: 35.00 ± 2.00 , $n = 10$) and did not affect the day of the first estrus (CTR: 35.00 ± 2.40 , $n = 10$ and SASG: 35.80 ± 2.20 , $n = 10$) in F1 female rats. The coefficients of the different stages of the estrous cycle and estrous cycle length were similar between groups (Supplemental Table 5).

4.2.3. Behavioral evaluations (sexual and maternal motivation)

4.2.3.1. Evaluation of sexual behavior. Maternal exposure to SAS induced an increase in lordosis score $t(18) = 2.04$; $p = 0.05$ (Student's *t*-test) and in frequency of magnitude 3 of lordosis $U = 22.50$; $p = 0.03$ (Mann-Whitney) in F1 females, as shown in Table 2.

Exposure to SAS during early development (intrauterine and lactational) did not influence the body weight gain (g) during gestational (LD1- GD0) (CTR: 36.38 ± 10.56 , $n = 10$ and SASG: 27.23 ± 13.70 , $n = 10$) or lactational periods (LD 6 – LD1) (CTR: $3.74 [1.79-14.90]$, $n = 10$ and SASG: $1.80 [2.94-10.48]$, $n = 10$) in F1 female rats. SAS exposure also did not alter the food intake during gestation and the first week of the lactational period, as shown in Fig. 6.

4.2.3.2. Evaluation of maternal motivation. The F1 female maternal behavior is shown in Table 3. SAS

exposure did not cause significant alterations in these parameters. One female of the SAS group and two females of the control group had less than eight pups, so data from these animals were removed from the analysis.

4.2.4. Evaluation of fertility

The evaluation of fertility in F1 females is presented in Table 4. The evaluated parameters were not affected by intrauterine and lactational exposure to SAS. Moreover, the number of pups per litter (CTR: $12.05 [9.75-13.00]$, $n = 10$ and SASG: $11.05 [10.75-12.50]$, $n = 10$) and sex ratio (M:F) (CTR: $0.86 [0.69-1.00]$, $n = 10$ and SASG: $0.85 [0.63-1.19]$, $n = 10$) were also similar between groups (Mann-Whitney U).

5. Discussion

The present study investigated the effects of SAS treatment on maternal care in F0 female rats and on reproductive outcomes in sexual development including reproductive behavior (sexual and maternal) and fertility in maternally exposed F1. The FA supplementation was only provided during the gestational period as: (1) our major concern was to avoid birth defects related to FA deficiency during maternal treatment with SAS [5,6]; (2) although the postnatal development is also sensitive to FA deficiency, the exposure to low FA levels is more critical during pregnancy than during lactation [67,68] and around the middle of the lactation period, the pups start to eat chow rodent diets that typically

contain levels of micronutrients such as FA; and (3) FA has antioxidative properties and the supplementation could alter the oxidative stress profile of F1 animals.

SAS treatment decreased the retrieving behavior in F0 females. In female offspring, there was an increase in the lordosis score and the frequency of lordosis of magnitude 3. Furthermore, the F1 females presented an increase in the lipid peroxidation of ovarian tissues in both infancy and adult life. However, despite oxidative stress alterations, there were no related reproductive repercussions.

SAS treatment at the dose of 300 mg/kg/day did not alter the body weight gain or the food intake of F0 females during gestation and lactational periods. Maternal exposure to SAS had no effect on body weight at birth or body weight gain of F1 female offspring during the lactation period. Moreover, no signs of toxicity were observed in either F0 or F1 females. Thus, it is suggested that the dose used in the current study did not cause toxicity in F0 or F1 female pups.

The results of the current study demonstrated that SAS treatment decreased the maternal care

motivation of F0 females. While half of dams in the SAS group did not retrieve the whole litter, all mothers in the CTR group performed these actions. The System x_c^- (Sx_c^-) is a heteromeric antiporter (L-cystine/L-glutamate exchanger) [69] responsible for the release of non-vesicular glutamate, which occurs continuously in the CNS [70]. It is known that Sx_c^- contributes approximately 60–70% of the levels of extracellular glutamate in some brain regions such as the hippocampus [71] and striatum [72]. SAS is a potent inhibitor of the Sx_c^- [69] approved by the U.S. Food and Drug Administration [73]. Lutgen and collaborators (2014) [31] demonstrated that in adult rats, treatment with SAS at a dose of 0–16 mg/kg intraperitoneally inhibited Sx_c^- and caused alterations in behavior parameters of motivation. Female mice that received oral treatment with SAS at a dose of 8 mg/kg/day also presented inhibited Sx_c^- and changes in behavioral parameters of motivation [30]. In mammals, maternal behavior involves highly motivational mechanisms [74–76], and according to Bridges (2015) [77], maternal care leads to the expression of several types of behavior present

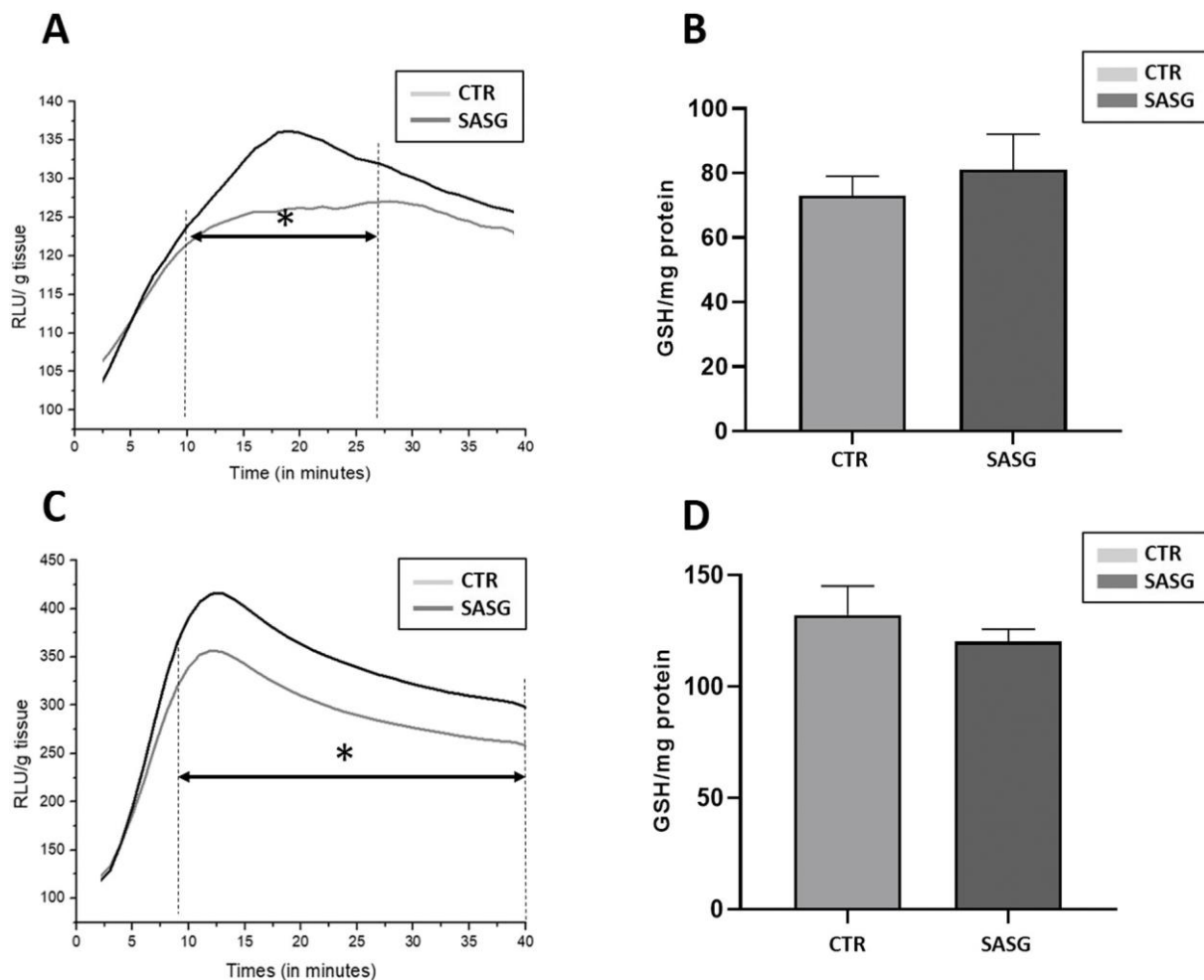


Fig. 5. Effect of maternal exposure to SAS on lipid hydroperoxide levels of control and SAS. (A and C). The tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence was monitored continuously for 40 min on tissue homogenates. Each curve represents a Gaussian fit of the mean of 600 readings of emitted light. The entire curves were employed to perform statistical comparison by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Curves represent the means of 5 animals. Both analyses were performed at the same significance level (* $p < 0.05$) compared with control. The limits indicate the points where quantitative differences were detected. (B and D) show data of total GSH analysis of ovarian tissues of F1 females. No differences were detected by the Student's t-test. (A and B) show data of infancy (PND 21) and (C and D) of adults.

Table 2

Coefficient of lordosis, lordosis score, and lordosis magnitudes in F1 female rats.

Parameters	CTR (10)	SASG (10)
LQ (%)	80 [72.50–90]	90 [82.50–100]
Lordosis score	2.02 ± 0.25	2.30 ± 0.36*
Lordosis magnitude 0		
1	{21/100}	{13/100}
2	{16/100}	{11/100}
3	{44/100}	{42/100}
	{19/100}	{34/100}*

Data for the lordosis coefficient (LQ = (no. lordosis postures/total mounts) × 100) are given as median [interquartile range] and were compared using the Mann–Whitney test. Lordosis score (total no. lordosis points/total no. lordosis responses) are given as the mean ± standard deviation, and were compared using the Student's t-test. Data for lordosis magnitude (ranked on a scale of 0–3, where 0 is the absence of lordosis and 3 is maximum lordosis) are in brackets and show the number of observations in each lordosis magnitude group/number of total of observations, * $p < 0.05$ compared with Fisher's exact test. Numbers in parentheses represent the number of animals per group. F1 generation born of F0 female rats treated with 300 mg/kg/day of sulfasalazine (SAS). CTR: control group; SASG: sulfasalazine group.

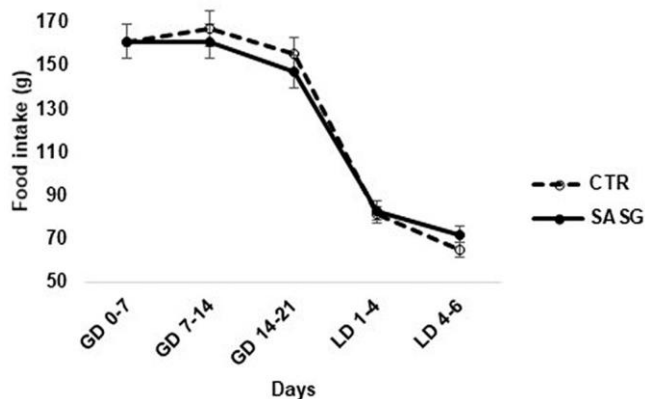


Fig. 6. Food intake in F1 female rats from Gestational Day (GD) 0 until Lactational day (LD) 6. F1 females born to F0 rats treated with 300 mg/kg/day sulfasalazine (SAS) during gestation and lactation periods (from GD 0 to LD 21). Data are presented as mean ± standard deviation (n = 10 per group). There were no significant differences between the SAS-treated group and their control group (CTR), ($p > 0.05$, repeated-measures ANOVA).

Table 3

Evaluation of maternal behavior in F1 female rats.

Parameters	CTR (8)	SASG (9)
Time to retrieve 1st pup (s)	33.00 [27.25–63.75]	51.00 [35.50–94.50]
No. of Retrievals	8.00 [6.25–9.75]	8.00 [5.50–12.00]
No. of Pup contacts	2.00 ± 1.85	2.22 ± 1.30
Nest building (s)	180.50 [51.75–264.50]	85.00 [63.00–245.50]
Grooming pup (s)	258.75 ± 73.65	189.00 ± 77.09
Nursing (s)	247.50 [0.00–326.50]	128.00 [0.00–217.50]
Self-grooming (s)	18.50 [12.25–33.00]	23.00 [13.50–31.00]
Off pup (s)	1130.00 ± 183.08	1287.56 ± 191.18

Data are given as mean ± standard deviation or as median [interquartile range] with the significance of differences analyzed using the Student's *t*-test or *Mann-Whitney* test as appropriate. There were no significant differences between groups. Numbers in parentheses represent the number of animals per group. Parameter with (s) means time in seconds spent exhibiting that particular behavior during the observation period. F1 generation born of F0 female rats treated with 300 mg/kg/day of sulfasalazine during gestation and lactation periods. CTR: control group; SASG: sulfasalazine group.

Table 4

Fertility parameters assessed in F1 female rats.

Parameters	CTR (10)	SASG (10)
Implantation rate (%)	82.02 ± 10.94	82.91 ± 5.53
Pre-implantation loss (%)	17.98 ± 10.94	17.09 ± 5.53
Post-implantation loss (%)	7.14 [0.00–17.53]	8.01 [5.00–21.84]
Fetal viability (%)	92.86 [82.47–100.00]	91.99 [78.16–95.00]

Data are given as means ± standard deviation or as median [interquartile range], (*n* = 10 per group). The significance of differences was analyzed using the Student's *t*-test or *Mann-Whitney* test as appropriate. There were no significant differences between groups, *p* > 0.05. F1 female born of F0 female rats treated with 300 mg/kg/day of sulfasalazine. CTR: control group; SASG: sulfasalazine group.

ted by mothers, which support the development of their offspring. The latencies and presence of pup retrieval behavior for the nest formation can be used to evaluate the neurobiological capacity of females to present maternal behavior [77]. Thus, we hypothesized that treatment with SAS may have inhibited the Sx_c^- in the CNS of F0 females, interrupting or reducing glutamate release, culminating in the reduction in maternal care motivation of dams for their pups.

Regarding the female offspring, intrauterine and lactational exposure to SAS did not influence the AGD at PND 1 and PND 21, and did not affect the onset of maturity, observed by vaginal opening and the day of the first estrus, as well as the estrous cyclicity, or the histomorphometric parameters of reproductive organs in adulthood. Thus, it is suggested that in utero and lactational exposure to

SAS did not disturb the sexual hormone levels during development, since all these parameters are hormone dependent.

With respect to analysis of oxidative stress, in the *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) assay, the oxidative stress previously suffered by the tissue induces the consumption of antioxidants and augments the formation of lipid hydroperoxides, resulting in increased photon emission [52,78,79]. The enhancement in CL curves of the SASG groups in both ages evaluated (infancy and adult life) correspond to an increase in the levels of lipid peroxidation in the ovarian tissue. Lipid peroxidation promotes alterations in the structure of membranes capable of interrupting the cell homeostasis, and/or resulting in the loss of the capacity of membrane selectivity [80]. The relation between SAS and reactive oxygen species (ROS) in the reproductive system of females is unclear. Unfortunately, the scarcity of material due to the reduced size of ovaries, mainly in the rats on PND 21, did not allow glutamate quantification in ovarian tissue of these animals. Together the CL result with the amount of GSH reflect the extent of oxidative damage caused in the SASG, pointing to a change in the oxidative state of cell membranes of ovarian tissue of F1 females in both infancy and adult life, instead of direct modification of the antioxidant capacity of the tissue. However, although maternal exposure to SAS changed parameters related to oxidative stress, this change was not enough to bring about reproductive repercussions.

Concerning sexual behavior, maternal exposure to SAS during early development increased the lordosis score and frequency, with the F1 females presenting lordosis of magnitude 3. These results suggest that the alterations in sexual behavior might have occurred through the direct effect of SAS in the CNS of F1 females. SAS may have induced an insufficient amount of glutamate during hypothalamic sexual differentiation. In rodents, during this sensitive window of neuronal plasticity, two distinct processes occur in the male brain: (1) masculinization, which enables sexual behavior expression of males and (2) defeminization, characterized by loss of responsivity to estradiol and progesterone, which results in lordosis in adult life [63,81]. In the female brain, the feminization process occurs in the absence of neuronal estradiol levels in this critical period of development [81,82]. In addition, γ -aminobutyric acid (GABA) is a neurotransmitter synthesized by the enzyme glutamic acid decarboxylase from glutamate [83]. Although in adults, GABA promotes an inhibitory effect [84–86], in the neonatal brain, GABA presents an excitatory effect [87]. GABA is related to the hypothalamic-pituitary-gonadal axis during all stages of development in a complex way, from the GnRH cell migration the preovulatory LH surge arises [88]. Differently from males, females present a larger number of cells in the anteroventral periventricular nucleus [89]. This difference in size is very important to support the cyclic pattern of LH release and ensure ovulation in adult females [90]. Furthermore, females also present a larger amount of dopaminergic,

GABA/glutamate, and neurons that express Kiss-1 than males [91–93]. During development of the neonate brain, the release of glutamate in the ventrolateral-ventromedial nucleus (VMHvl) modulates the hypothalamic sexual differentiation and presents a sexually dimorphic phenotype [94]. In females, glutamatergic signalization in the VMHvl depends on glutamate from astrocytes and can be related to the process of feminization behavior [94]. Moreover, Yang and colleagues (2013) [95] show that in females, the ablation in neurons with progesterone receptor (PR) expression in VMHvl decrease the sexual receptivity, without inducing changes in estrous cyclicity or in maternal behavior of these females. Thus, the alterations in the sexual behavior expression of F1 females observed in this study may have been caused by an unbalance of glutamate levels in the brain of these animals during early development.

Physiological and behavioral events that permeate the expression of maternal care in females begin in perinatal life and extend until adulthood [77]. Thus, maternal exposure to exogenous substances, such as drugs can impair the expression of maternal behavior of the female offspring. However, maternal exposure to SAS during the early life stages did not induce alterations in parameters of maternal behavior in F1 females or in the fertility of F1 females.

In summary, the SAS effects observed in the current study represent a relevant concern for public health, since SAS treatment impaired the maternal motivation of dams and induced alterations in sexual

behavior and in the lipid peroxidation of ovarian tissues in the female offspring.

Furthermore, it is important to highlight, that to our knowledge, this is the first study to investigate the reproductive outcomes of SAS treatment in F0 and the long-time effects on reproductive parameters in F1 female rats. Therefore, further investigations, such as Sx_c^- , neurotransmitters analyses, mainly glutamate, and molecular analyses are necessary to investigate the mechanisms by which maternal treatment with SAS treatment induced these reproductive alterations in the female offspring.

Declaration of competing interest

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for providing a Doctoral scholarship to Simone Forcato, and CNPQ (National Council for Scientific and Technological Development Brazil) and to the Araucaria Foundation for providing an Initiation Scientific scholarship to Ana Beatriz de Oliveira Aquino and to Nathaly de Moura Camparoto, and to Bruno H. Forcato for designing the Graphical abstract.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120303>.

References

- [1] R.A. Levy, G.R. de Jesús, N.R. de Jesús, E.M. Klumb, Critical review of the current recommendations for the treatment of systemic inflammatory rheumatic diseases during pregnancy and lactation, *Autoimmun. Rev.* 15 (2016) 955–963, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.014>.
- [2] J. Lodowska, A. Gruchlik, D. Wolny, J. Wawrzyczek, Z. Dzierzewicz, L. Węglarz, The effect of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid on the secretion of interleukin 8 by human colon myofibroblasts, *acta pol. Pharm. -Drug Res.* 72 (2015) 917–921. [3] M. Abbasi, M.J. Mousavi, S. Jamalzei, R. Alimohammadi, M.H. Bezvan, H. Mohammadi, S. Aslani, Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 10018–10031, <https://doi.org/10.1002/jcp.27860>.
- [4] M. Birru Talabi, M.E.B. Clowse, Antirheumatic medications in pregnancy and breastfeeding, *Curr. Opin. Rheumatol.* 32 (2020) 238–246, <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000710>.
- [5] K.K. Viktil, A. Engeland, K. Furu, Outcomes after anti-rheumatic drug use before and during pregnancy: a cohort study among 150 000 pregnant women and expectant fathers, *Scand. J. Rheumatol.* 41 (2012) 196–201, <https://doi.org/10.3109/03009742.2011.626442>.
- [6] B. Nørgård, L. Pedersen, L.A. Christensen, H.T. Sørensen, Therapeutic drug use in women with crohn's disease and birth outcomes: a danish nationwide cohort study, *Am. J. Gastroenterol.* 102 (2007) 1406–1413, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01216.x>.
- [7] E. Esbjørner, G. Jamerot, L. Wranne, Sulphasalazine and sulphapyridine serum levels in children to mothers treated with sulphasalazine during pregnancy and lactation, *Acta Paediatr. Scand.* 76 (1987) 137–142, <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1987.tb10430.x>.
- [8] G. Jamerot, M.B. Into-Malmberg, E. Esbjørner, Placental transfer of sulphasalazine and sulphapyridine and some of its metabolites, *Scand. J. Gastroenterol.* 16 (1981) 693–697, <https://doi.org/10.3109/00365528109182032>.
- [9] C.M. Berlin, S.J. Yaffe, Disposition of salicylazosulfapyridine (Azulfidine) and metabolites in human breast milk, *Dev. Pharmacol. Ther.* 1 (1980) 31–39.
- [10] A.K.A. Khan, S.C. Truelove, Placental and mammary transfer of sulphasalazine, *Br. Med. J.* 2 (1979) 1553, <https://doi.org/10.1136/bmj.2.6204.1553>.
- [11] Goodman & Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Digital Edition, 12th ed., McGraw-Hill Companies, Inc, New York, NY, 2011.
- [12] M.A. Peppercorn, P. Goldman, Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites, *Gastroenterology* 64 (1973) 240–245.
- [13] H. Sontheimer, R.J. Bridges, Sulfasalazine for brain cancer fits, *Expert Opin. Investig. Drugs* 21 (2012) 575–578, <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.670634>.
- [14] A.C.F. Vieira, A.C. Serra, F.J. Veiga, A.M.A. Rocha, Diclofenac-β-cyclodextrin for colonic drug targeting: in vivo performance in rats, *Int. J. Pharm.* 500 (2016) 366–370, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.024>.
- [15] T.T. Kararli, Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals, *Biopharm. Drug Dispos.* 16 (1995) 351–380, <https://doi.org/10.1002/bdd.2510160502>.
- [16] M.R. Peltier, S.C. Tee, W.L. Kinzler, J.C. Smulian, in: Effect of Sulfasalazine on Basal and Bacteria-stimulated Interleukin-8 Production by Endocervical Epithelial Cells 61, 2009, pp. 190–195, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00681.x>.
- [17] M. Lappas, M. Permezel, H.M. Georgiou, G.E. Rice, Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro, *Biol. Reprod.* 67 (2002) 668–673, <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.668>.
- [18] C. Wahl, S. Liptay, G. Adler, R.M. Schmid, Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1163–1174, <https://doi.org/10.1172/JCI992>.
- [19] H.T. Gan, Y.Q. Chen, Q. Ouyang, Sulfasalazine inhibits activation of nuclear factor-κB in patients with ulcerative colitis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20 (2005) 1016–1024, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03862.x>.
- [20] S.O. Osawe, E.O. Farombi, Quercetin and rutin ameliorates sulphasalazine-induced spermotoxicity, alterations in reproductive hormones and steroidogenic enzyme imbalance in rats, *Andrologia* 50 (2018), <https://doi.org/10.1111/and.12981>. [21] G. Ragni, G. Bianchi Porro, M. Ruspa, G. Barattini, C. Lombardi, M. Petrillo, Abnormal semen quality and low serum testosterone in men with inflammatory bowel disease treated for a long time with Sulfasalazine, *Andrologia* 16 (1984) 162–167, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1984.tb00258.x>.
- [22] S.M. Ho, A. Cheong, M.A. Adgent, J. Veevers, A.A. Suen, N.N.C. Tam, Y.K. Leung, W.N. Jefferson, C.J. Williams, Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders, *Reprod. Toxicol.* 68 (2017) 85–104, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.07.011>.
- [23] J.F. Aleixo, M. Pereira, B.G. Montagnini, M. Pereira, S. Forcato, E.G. Moreira, G. S. Ceravolo, M.L. Vieira, A. Kiss, D. Gerardin, Effect of paracetamol treatment on maternal care and reproductive outcomes in female rat offspring, *Reprod. Fertil. Dev.* 32 (2012) 1311–1325, <https://doi.org/10.1071/RD20007>.
- [24] S. Forcato, D.R.B.D.S. Novi, N.O. Costa, L.I. Borges, M.L.M.D. Goes, G.S. Ceravolo, D.C.C. Gerardin, In utero and lactational exposure to metformin induces reproductive alterations in male rat offspring, *Reprod. Toxicol.* 74 (2017), <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.023>.
- [25] M.L. Vieira, R.Y. Hamada, N.I. Gonzaga, A.D. Bacchi, M. Barbieri, E.G. Moreira, D. C.C. Gerardin, S. de F.P. Mesquita, Could maternal exposure to the antidepressants fluoxetine and St. John's Wort induce long-term reproductive effects on male rats? *Reprod. Toxicol.* 35 (2013) 102–107, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.07.006>.
- [26] B.G. Montagnini, K.V. Pemoncine, L.I. Borges, N.O. Costa, E.G. Moreira, J. A. Anselmo-Franci, A. Kiss, D. Gerardin, Investigation of the potential effects of triclosan as an endocrine disruptor in female rats: uterotrophic assay and two-generation study, *Toxicology* 410 (2018) 152–165, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.005>.

- [27] A.H. dos Santos, M.L. Vieira, N. de Azevedo Camin, J.A. Anselmo-Franci, G. S. Ceravolo, G.G. Pelosi, E.G. Moreira, A.C.I. Kiss, D.C.C. Gerardin, S. de F.P. Mesquita, In utero and lactational exposure to fluoxetine delays puberty onset in female rats offspring, *Reprod. Toxicol.* 62 (2016) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.006>.
- [28] J.E. Levine, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Fourth, Elsevier Inc, Amsterdam, 2015, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.01003-6>.
- [29] J.K. Findlay, K.J. Hutt, M. Hickey, R.A. Anderson, How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biol. Reprod.* 93 (2015) 1–7, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133652>.
- [30] M.G. Nashed, R.G. Ungard, K. Young, N.J. Zagal, E.P. Seidlitz, J. Fazzari, B.N. Frey, G. Singh, Behavioural effects of using sulfasalazine to inhibit glutamate released by cancer cells: a novel target for cancer-induced depression, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–11, <https://doi.org/10.1038/srep41382>.
- [31] V. Lutgen, J. Resch, K. Qualmann, N.J. Raddatz, C. Panhans, E.M. Olander, L. Kong, S. Choi, J.R. Mantsch, D.A. Baker, Behavioral assessment of acute inhibition of system xc₋ in rats, *Psychopharmacology* 231 (2014) 4637–4647, <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3612-4>.
- [32] P.E. Micevych, R.L. Meisel, Integrating neural circuits controlling female sexual behavior, *Front. Syst. Neurosci.* 11 (2017) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00042>.
- [33] M. Pereira, J.I. Morrell, Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation, *J. Neuroendocrinol.* 23 (2011) 1020–1035, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02200.x>.
- [34] S. Vermeire, F. Carbone, P.G. Coulie, V. Geenen, J.M.W. Hazes, P.L. Masson, F. De Keyser, E. Louis, Management of inflammatory bowel disease in pregnancy, *J. Crohn's Colitis* 6 (2012) 811–823, <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.04.009>.
- [35] G. Jansen, J. Van Der Heijden, R. Oerlemans, W.F. Lems, I. Ifergan, R.J. Scheper, Y. G. Assaraf, B.A.C. Dijkman, Sulfasalazine is a potent inhibitor of the reduced folate carrier: implications for combination therapies with methotrexate in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 2130–2139, <https://doi.org/10.1002/art.20375>.
- [36] S. Hernandez-Diaz, M.M. Werler, A.M. Walker, A.A. Mitchell, Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 1608–1614, <https://doi.org/10.1056/NEJM200011303432204>.
- [37] C.G. Skorpen, M. Hoeltzenbein, A. Tincani, R. Fischer-Betz, E. Elefant, C. Chambers, J. Da Silva, C. Nelson-Piercy, I. Cetin, N. Costedoat-Chalumeau, R. Dolhain, F. Forger, M. Khamashta, G. Ruiz-Irastorza, A. Zink, J. Vencovsky, M. Cutolo, N. Caeyers, C. Zumbühl, M. Østensen, The EULAR points to consider for use of antirheumatic drugs before pregnancy, and during pregnancy and lactation, *Ann. Rheum. Dis.* 75 (2016) 795–810, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208840>.
- [38] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), in: Office of the Science Advisor Risk Assessment Forum, Recommended Use of Body Weight 3/4 as the Default Method in Derivation of the Oral Reference Dose, *Epa/100/R11/0001*, 2011, pp. 1–39. [39] M.M. Ommati, R. Heidari, A. Jamshidzadeh, M.J. Zamiri, Z. Sun, S. Sabouri, J. Wang, F. Ahmadi, N. Javanmard, K. Seifi, S. Mousapour, B.S. Yeganeh, Dual effects of sulfasalazine on rat sperm characteristics, spermatogenesis, and steroidogenesis in two experimental models, *Toxicol. Lett.* 284 (2018) 46–55, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.034>.
- [40] B. Dik, G. Sonmez, H.E. Faki, E. Bahcivan, Sulfasalazine treatment can cause a positive effecon lps-induced endotoxic rats, *Exp. Anim.* 67 (2018) 403–412, <https://doi.org/10.1538/expanim.18-0029>.
- [41] V. Alonso, V. Linares, M. Belles, M.L. Albina, J.J. Sirvent, J.L. Domingo, D. J. Sanchez, Sulfasalazine induced oxidative stress: a possible mechanism of male infertility, *Reprod. Toxicol.* 27 (2009) 35–40, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.10.007>.
- [42] M. Horimoto, Y. Isobe, Y. Isogai, M. Tachibana, Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexanedione, *Reprod. Toxicol.* 14 (2000) 55–63, [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(99\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(99)00061-1).
- [43] C.M. Higashi, A.K. Matsumoto, J.G. Gameiro, K.F. Moura, L. Higachi, L.C. Oliveira, D.S. Barbosa, E.G. Moreira, G.S. Ceravolo, Does fish oil or folic acid prevent vascular changes in female progeny caused by maternal exposure to fluoxetine? *Life Sci.* 152 (2016) 165–170, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.042>.
- [44] J. Flint, S. Panchal, A. Hurrell, M. Van De Venne, M. Gayed, K. Schreiber, S. Arthanari, J. Cunningham, L. Flanders, L. Moore, A. Crossley, N. Purushotham, A. Desai, M. Piper, M. Nisar, M. Khamashta, D. Williams, C. Gordon, I. Giles, B. Standards, in: BSR and BHPR guideline on prescribing drugs in pregnancy and breastfeeding — part I: standard and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs and corticosteroids, 2016, pp. 1–5, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev404>.
- [45] A. Jahanbin, E. Shadkam, H.H. Miri, A.S. Shirazi, M. Abtahi, Maternal folic acid supplementation and the risk of oral clefts in offspring, *J. Craniofac. Surg.* 29 (2018) e534–e541, <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000004488>.
- [46] A.E. Czeizel, I. Dudas, A. Vereczkey, F. B' anhidry, Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects, *Nutrients* 5 (2013) 4760–4775, <https://doi.org/10.3390/nu5114760>.
- [47] A.C.I. Kiss, B. Woodside, L.F. Felicio, J. Anselmo-Franci, D.C. Damasceno, Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of wistar rats, *Physiol. Behav.* 107 (2012) 292–300, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.08.001>.
- [48] B.G. Montagnini, K.M. Silveira, B.C. Pierone, N. de Azevedo Camin, J.A. Anselmo-Franci, S. de Fatima Paccola, A.C.I. Mesquita, D.C.C. Gerardin Kiss, Reproductive parameters of female wistar rats treated with methylphenidate during development, *Physiol. Behav.* 167 (2016) 118–124, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.08.017>.
- [49] M.S. Golub, C.A. Sobin, Statistical modeling with litter as a random effect in mixed models to manage "intra-litter likeness", *Neurotoxicol. Teratol.* 77 (2020), 106841 <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.106841>.
- [50] R.H. Gallavan, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp, V.L. Reynolds, Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights, *Reprod. Toxicol.* 13 (1999) 383–390, [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(99\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(99)00036-2).
- [51] T. Pedersen, H. Peters, Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary, *Reproduction* 17 (1968) 555–557, <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170555>.
- [52] F.A. Guamier, A.L. Cecchini, A.A. Suzukawa, A.L. Maragon, A.N. Simao, M. T. D. Gomes, R. Cecchini, Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor, *Muscle Nerve* 42 (2010) 950–958, <https://doi.org/10.1002/mus.21798>.
- [53] R. Cecchini, F.J. de A. Oliveira, Oxidative stress of liver in hamsters infected with Leishmania (L.) Chagasi, *J. Parasitol.* 86 (2000) 1067–1072, [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1067:OSOLIH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1067:OSOLIH]2.0.CO;2).
- [54] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K).
- [55] F. Tietze, Enzymic method for quantitative nanogram amounts of Total glutathione: determination and oxidized, *Anal. Biochem.* 27 (1969) 502–522, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5).
- [56] F.K. Marcondes, F.J. Biachi, A.P. Tanno, Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations, *Braz. J. Biol.* 62 (2002) 609–614, <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>.
- [57] V.A. Chistyakov, A.A. Dem'yanenko, S.V. Alexandrova, L.V. Gutnikova, V. N. Prokof'ev, O.N. Kosheleva, Effect of plastoquinone derivative 10-(60-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on estrous cycle and 17 β -estradiol level in rats, *Biochemistry* 77 (2012) 1382–1386, <https://doi.org/10.1134/S0006297912120061>.
- [58] N. De Azevedo Camin, M.L. Vieira, B.G. Montagnini, A.C.I. Kiss, D.C.C. Gerardin, Effects of maternal exposure to the galactagogue sulphiride on reproductive parameters in female rats, *Physiol. Behav.* 140 (2015) 247–253, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.047>.
- [59] O.A. Ramirez, H.F. Carrer, A.G. Nasello, Prenatal amphetamine exposure: ovulation, sexual behavior and hypothalamic monoamine content in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11 (1979) 605–609, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(79\)90250-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(79)90250-8).
- [60] F.A. Beach, Prolonged hormone deprivation and pretest cage adaptation as factors affecting the display of lordosis by female rats, *Physiol. Behav.* 16 (1976) 807–808, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90254-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90254-7).
- [61] D. Fitzroy Hardy, J.F. Debold, Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat, *Physiol. Behav.* 7 (1971) 643–645, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(71\)90120-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(71)90120-X).
- [62] M. Welsh, P.T.K. Saunders, M. Finken, H.M. Scott, G.R. Hutchison, L.B. Smith, R. M. Sharpe, Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1479–1490, <https://doi.org/10.1172/JCI34241>.
- [63] J.M. Schwarz, M.M.M., The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat, *Horm. Behav.* 54 (2008) 662–668, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.07.004>.
- [64] N.J. MacLusky, F. Naftolin, Sexual differentiation of the central nervous system, *Science* 211 (1981) 1294–1303, <https://doi.org/10.1126/science.6163211>, 80–.
- [65] M.T. Guerra, W.R. Scarano, F.C. de Toledo, J.A.A. Franci, W.D.G. Kempinas, Reproductive development and function of female rats exposed to di-n-butyl-phthalate (DBP) in utero and during lactation, *Reprod. Toxicol.* 29 (2010) 99–105, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.10.005>.
- [66] A.M. Simundic, Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in biochemia medica journal, *Biochem. Medica.* 22 (2012) 15–23, <https://doi.org/10.11613/bm.2012.003>.
- [67] F.B. Brasil M.R. De Oliveira, Maternal folic acid consumption during gestation and its long-term effects on offspring's liver: a systematic review, 17 (n.d.) 7–15.
- [68] G. Angelo, Life Stages: Pregnancy and Lactation 30, Linus Pauling Inst. (Micronutrient Inf. Center)/ Oregon State Univ, 2016. <https://pi.oregonstate.edu/mic/life-stages/pregnancy-lactation>. (Accessed 8 November 2021).
- [69] P.W. Gout, A.R. Buckley, C.R. Simms, N. Bruchovsky, Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x-cystine transporter: a new action for an old drug, *Leukemia* 15 (2001) 1633–1640, <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402238>.
- [70] E. Bentea, A. Villers, C. Moore, A.J. Funk, S.M. O'Donovan, L. Verbruggen, O. Lara, P. Janssen, L. De Pauw, N.B. Declercq, E.A.K. DePasquale, M.J. Churchill, H. Sato, E. Hermans, L. Arckens, C.K. Meshul, L. Ris, R.E. McCullumsmith, A. Massie, Corticostriatal dysfunction and social interaction deficits in mice lacking the cystine/glutamate antiporter, *Mol. Psychiatry* (2020), <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0751-3>.
- [71] D. de Bundel, A.S. Schallier, E. Loyens, R. Fernando, H. Miyashita, J. van Liefvering, K. Vermoesen, S. Bannai, H. Sato, Y. Michotte, I. Smolders, A. Massie, Loss of system xc₋ does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility, *J. Neurosci.* 31 (2011) 5792–5803, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011>.
- [72] A. Massie, A. Schallier, S.W. Kim, R. Fernando, S. Kobayashi, H. Beck, D. De Bundel, K. Vermoesen, S. Bannai, I. Smolders, M. Conrad, N. Plesnila, H. Sato, Y. Michotte, Dopaminergic neurons of system xc₋-deficient mice are highly protected against 6-hydroxydopamine-induced toxicity, *FASEB J.* 25 (2011) 1359–1369, <https://doi.org/10.1096/fj.10-177212>.
- [73] F. Berkenbosch, L.M. Refolo, V.L. Friedrich Jr., D. Casper, M. Blum, N.K. Robakis, The Alzheimer's amyloid precursor protein is produced by type I astrocytes in primary cultures of rat neuroglia, *J. Neurosci. Res.* 25 (1990) 431–440, <https://doi.org/10.1002/jnr.490250321>.
- [74] K.O. Smiley, S.R. Ladyman, P. Gustafson, D.R. Grattan, R.S.E. Brown, Neuroendocrinology and adaptive physiology of maternal care, *curr top, Behav. Neurosci.* 43 (2019) 161–210, <https://doi.org/10.1007/7854>.
- [75] D.E. Olazabal, M. Pereira, D. Agrati, A. Ferreira, A.S. Fleming, G. Gonzalez-Mariscal, F. Levy, A.B. Lucion, J.I. Morrell, M. Numan, N. Uriarte, Flexibility and

- adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37 (2013) 1875–1892, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.004>.
- [76] M. Numan, Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat, *Dev. Psychobiol.* 49 (2007) 12–21, <https://doi.org/10.1002/dev.20198>.
- [77] R.S. Bridges, Neuroendocrine regulation of maternal behavior, *Front Neuroendocr.* 36 (2015) 178–196, <https://doi.org/10.1016/j.yfme.2014.11.007>.
Neuroendocrine.
- [78] K. Zimiani, F.A. Guarnier, H.C. Miranda, M. Angelica, E. Watanabe, R. Cecchini, Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia / reperfusion as evaluated by chemiluminescence, *Nitric Oxide* 13 (2005) 196–203, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.07.002>.
- [79] D.S. Barbosa, R. Cecchini, M.Z. El Kadri, M.A.M. Rodríguez, R.C. Burini, I. Dichi, Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids, *Nutrition* 19 (2003) 837–842, [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(03\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(03)00162-X).
- [80] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th ed., Oxford University Press, New York, 2015 <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
- [81] M.J. Baum, Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3 (1979) 265–284, [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(79\)90013-7](https://doi.org/10.1016/0149-7634(79)90013-7).
- [82] E.J. Nordeen, P. Yahr, A regional analysis of estrogen binding to hypothalamic cell nuclei in relation to masculinization and defeminization, *J. Neurosci.* 3 (1983) 933–941, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.03-05-00933.1983>.
- [83] M.G. Erlander, N.J.K. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel, A.J. Tobin, Two genes encode distinct glutamate decarboxylases, *Neuron* 7 (1991) 91–100, [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90077-D](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90077-D).
- [84] M.M. McCarthy, K.F. Malik, H.H. Feder, Increased GABAergic transmission in medial hypothalamus facilitates lordosis but has the opposite effect in preoptic area, *Brain Res.* 507 (1990) 40–44, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90519-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90519-H).
- [85] A. Fernandez-Guasti, K. Larsson, C. Beyer, Effect of bicuculline on sexual activity in castrated male rats, *Physiol. Behav.* 36 (1986) 235–237, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90009-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90009-0).
- [86] A. Fernandez-Guasti, K. Larsson, C. Beyer, GABAergic control of masculine sexual behavior, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 (1986) 1065–1070, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90456-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90456-9).
- [87] E. Cherubini, C. Rovira, J.L. Gaiarsa, R. Corradetti, Y. Ben ari, GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons, *Int. J. Dev. Neurosci.* 8 (1990) 481–490, [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(90\)90080-L](https://doi.org/10.1016/0736-5748(90)90080-L).
- [88] J.A. Maffucci, A.C. Gore, Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 274 (2009) 69–127, [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)02002-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)02002-9).
- [89] S.J. Semaan, A.S. Kauffman, Sexual differentiation and development of forebrain reproductive circuits, *Curr. Opin. Neurobiol.* 20 (2010) 424–431, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.04.004>.
- [90] S.L. Petersen, S. Krishnan, L.K. Aggison, K.A. Intlekofer, P.J. Moura, Sexual differentiation of the gonadotropin surge release mechanism: a new role for the canonical NfκB signaling pathway, *Front. Neuroendocrinol.* 33 (2012) 36–44, <https://doi.org/10.1016/j.yfme.2011.06.002>.
- [91] A.S. Kauffman, M.L. Gottsch, J. Roa, A.C. Byquist, A. Crown, D.K. Clifton, G. E. Hoffman, R.A. Steiner, M. Tena-Sempere, Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat, *Endocrinology* 148 (2007) 1774–1783, <https://doi.org/10.1210/en.2006-1540>.
- [92] E.N. Ottem, J.G. Godwin, S. Krishnan, S.L. Petersen, Dual-phenotype GABA/ glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function, *J. Neurosci.* 24 (2004) 8097–8105, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2267-04.2004>.
- [93] R.B. Simerly, Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways, *Behav. Brain Res.* 92 (1998) 195–203, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00191-5).
- [94] S.L. Liang, The glutamine-glutamate cycle regulates synaptic glutamate release in the ventrolateral ventromedial nucleus of the hypothalamus of perinatal female rats, *J. Neuroendocrinol.* 30 (2018) 0–3, <https://doi.org/10.1111/jne.12642>.
- [95] C.F. Yang, M.C. Chiang, D.C. Gray, M. Prabhakaran, M. Alvarado, S.A. Juntti, E. K. Unger, J.A. Wells, N.M. Shah, Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males, *Cell* 153 (2013) 896–909, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.017>.

ANEXO C –Aceite emitido pela revista *Reproduction, Fertility and Development* (Qualis A2 da CBIJ) referente aos dados dos ratos da geração F1.

