



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MILENE LEIVAS VIEIRA

**EXPOSIÇÃO LACTACIONAL À SULPIRIDA:  
AVALIAÇÃO DO CUIDADO MATERNO E DE PARÂMETROS  
REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE  
MASCULINA DE RATOS**

MILENE LEIVAS VIEIRA

**EXPOSIÇÃO LACTACIONAL À SULPIRIDA:  
AVALIAÇÃO DO CUIDADO MATERNO E DE PARÂMETROS  
REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE  
MASCULINA DE RATOS**

Dissertação apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela C. C. Gerardin

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

V658e	<p>Vieira, Milene Leivas. Exposição lactacional à Sulpirida : avaliação do cuidado materno e de parâmetros reprodutivos e comportamentais na prole masculina de ratos / Milene Leivas Vieira. – Londrina, 2013. 65 f. : il.</p> <p>Orientador: Daniela Cristina Ceccatto Gerardin. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Galactogogos – Efeito fisiológico – Teses. 2. Lactação – Teses. 3. Aparelho genital masculino – Teses. 4. Próstata – Teses. 5. Testículos – Teses. 6. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Gerardin, Daniela Cristina Ceccatto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 612.61:615.2</p>
-------	--

MILENE LEIVAS VIEIRA

**EXPOSIÇÃO LACTACIONAL À SULPIRIDA: AVALIAÇÃO DO  
CUIDADO MATERNO E DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS E  
COMPORTAMENTAIS NA PROLE MASCULINA DE RATOS**

Dissertação apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela C. C. Gerardin  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Estefânia Gastaldello Moreira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Aldo Bolten Lucion  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul –  
UFRGS

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ariele Cristina Arena  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislaïne Garcia Pelosi Gomes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de Janeiro de 2013.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por colocar em meu caminho pessoas especiais e ainda permitir que elas permaneçam.

Aos meus familiares: pais, irmãos, sogros e cunhadas (os) por me incentivarem e por torcerem sempre por mim.

Ao meu querido esposo, Ivan, pelo amor, dedicação, companheirismo e muito incentivo. Sem você, a caminhada teria sido muito mais difícil.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Daniela, que além de ter me passado um pouco de seus conhecimentos com muita paciência, ainda se tornou uma amiga especial.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Estefânia pela grande ajuda e disponibilidade com os experimentos comportamentais, além dos ensinamentos em estatística; à Prof<sup>a</sup> Suzana, também pela ajuda e disponibilidade dos experimentos em seu laboratório, além dos ensinamentos em embriologia; à Prof<sup>a</sup> Ana Carolina, por passar um pouco seus conhecimentos em comportamento materno e mesmo de longe ajudar a interpretá-los e à Prof<sup>a</sup> Glaura pela ajuda com a motilidade e a morfologia espermática. Agradeço também aos professores das nucleadoras que ajudaram com esclarecimentos das dúvidas ou com recursos, enriquecendo assim esse trabalho como o Prof<sup>o</sup> Newton Canteras, Prof<sup>o</sup> Luciano Felício e Prof<sup>a</sup> Janete Anselmo Franci.

Agradeço aos companheiros e amigos de laboratório que participaram da conclusão desse trabalho: Alice, Aline, Bruno, Kennia, Luiza, Nathália e Sara.

Agradeço aos companheiros de Mestrado, em particular ao André, Andrey e Fancis, por tornarem divertidas as viagens à São Paulo. E as amigas Natália Cunha e Vivian, pela cumplicidade.

Agradeço, finalmente, à Capes pela concessão da bolsa de Mestrado e a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

***“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”***

*Cora Carolina*

VIEIRA, Milene Leivas. **Exposição lactacional à Sulpirida: avaliação do cuidado materno e de parâmetros reprodutivos e comportamentais na prole masculina de ratos.** 2013. 65f. Dissertação (Mestrado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina – PR.

## RESUMO

A incapacidade em produzir quantidades de leite suficiente para nutrir o bebê nos primeiros dias do pós-parto tem levado as mães a recorrerem à farmacoterapia, fazendo o uso de galactagogos. Estes atuam bloqueando receptores dopaminérgicos, aumentando, desta forma, os níveis de prolactina. O antipsicótico Sulpirida tem sido documentado como um efetivo galactagogo, porém é excretado no leite e neonatos acabam sendo expostos a esta droga durante uma fase do desenvolvimento do organismo, podendo levar à alterações funcionais e morfológicas na vida adulta. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição materna à Sulpirida, durante a lactação, poderia comprometer o cuidado materno e/ou o desenvolvimento reprodutivo dos descendentes machos. As ratas foram tratadas diariamente, por gavagem, com Sulpirida 2,5 mg/kg ou 25 mg/kg durante a lactação. O comportamento materno foi avaliado no dia pós-natal 5 e 10. Na vida adulta, foram avaliados os seguintes parâmetros nos machos: peso de órgãos da reprodução; dosagem de testosterona plasmática; contagem, morfologia e motilidade espermática; histomorfometria testicular e, comportamento e preferência sexual. O tratamento com Sulpirida não prejudicou o cuidado materno, mas nos filhotes causou aumento no peso da próstata, na dose de 25 mg/kg, e um dano testicular, evidenciado pela redução no peso testicular e no volume dos túbulos seminíferos, além de alterações histopatológicas observadas pelo aumento na porcentagem de túbulos seminíferos anormais em ambas as doses. Os dados mostraram que a exposição maternal à Sulpirida pode ter impacto no desenvolvimento reprodutivo dos filhotes de ratos machos.

**Palavras-chaves:** Galactagogo. Antagonista dopaminérgico. Testículo. Próstata.

VIEIRA, Milene Leivas. **Exposição lactacional à Sulpirida**: avaliação do cuidado materno e de parâmetros reprodutivos e comportamentais na prole masculina de ratos. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina – PR.

### **ABSTRACT**

Galactagogues are drugs that are purported to enhance milk production. These drugs act by blocking dopamine receptors which increase prolactin levels. The antipsychotic Sulpiride is documented to be effective as a galactagogue, but transfers through milk and the neonates are exposed to this drug during a phase of development of the organism and may lead to functional and morphological changes in adulthood. The aim of the present study was to evaluate if maternal exposure to Sulpiride during lactation could disrupt maternal care and/or male offspring reproductive development. The dams were treated daily, by gavage, with Sulpiride 2.5 mg/kg or 25mg/kg during lactation. Maternal behavior was analyzed on postnatal days 5 and 10. At postnatal day 90, it was observed the following parameters in males: reproductive organ weights, plasma testosterone levels, count, morphology and motility, and testicular histomorphometry, behavior and sexual preference. Sulpiride treatment did not impair maternal care, but in male offspring caused an increase in prostate weight, in the 25 mg/kg dose, and a testicular damage shown by reduction in testis weight and volume of seminiferous tubule, also histopathological alterations such as an increased percentage of abnormal seminiferous tubules in both dose. This data shows that maternal exposure to Sulpiride may impact the reproductive development of male rats.

**Keywords:** Galactagogue. Dopamine antagonist. Testis. Prostate.

## SUMARIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>07</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenho experimental</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Animais e tratamento</b>	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Parâmetros analisados nas mães</b>	<b>14</b>
3.3.1	Toxicidade geral materna	14
3.3.2	Comportamento Materno	15
3.3.3	Ejeção de leite	16
3.3.4	Avaliação da atividade geral	17
<b>3.4</b>	<b>Parâmetros analisados nos filhotes</b>	<b>18</b>
3.4.1	Desenvolvimento físico dos filhotes	18
3.4.2	Avaliação da atividade geral dos filhotes	18
3.4.3	Desenvolvimento reprodutivo dos filhotes na vida adulta	18
<b>3.5</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Parâmetros maternos</b>	<b>28</b>
4.1.1	Toxicidade geral materna	28
4.1.2	Comportamento Materno	30
4.1.3	Ejeção de leite	33
4.1.4	Avaliação da atividade geral	34
<b>4.2</b>	<b>Parâmetros analisados nos filhotes</b>	<b>37</b>
4.2.1	Desenvolvimento físico dos filhotes	37
4.2.2	Atividade geral dos filhotes	40
4.2.3	Desenvolvimento reprodutivo dos filhotes	42
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão</b>	<b>59</b>
	<b>Referências</b>	<b>60</b>

## 1. Introdução

O leite materno é considerado o melhor alimento para os bebês (Zuppa et al., 2010) devido aos seus conhecidos benefícios para a criança e para a mãe (Chaves et al., 2008). A produção do leite materno é iniciada durante o parto, com a expulsão da placenta, diminuição dos níveis de progesterona e aumentos nos níveis de prolactina. Esta produção é um processo fisiológico complexo, que envolve fatores físicos e emocionais, além da interação de hormônios, cujo mais importante acredita-se ser a prolactina (Lawrence & Lawrence, 2011). A incapacidade em produzir quantidades de leite suficiente para nutrir o bebê nos primeiros dias do pós-parto é uma das principais causas de abandono precoce do aleitamento (Amir, 2006). E devido a isso, as mães têm recorrido à farmacoterapia, fazendo o uso de galactagogos (Lawrence & Lawrence, 2011).

Galactagogos são drogas que auxiliam na iniciação e manutenção da produção adequada de leite (Gabay, 2002; Anderson & Valdes, 2007). As drogas utilizadas atualmente para este fim (Metoclopramida, Domperidona, Sulpirida) são antagonistas dopaminérgicos, que agem através da interação do hipotálamo com a hipófise anterior bloqueando os receptores de dopamina, neutralizando a influência inibitória desta sobre a secreção de prolactina, com conseqüente aumento da produção de leite (Anderson & Valdes, 2007).

A Sulpirida, um antipsicótico do grupo das benzamidas, tem sido documentada como um efetivo galactagogo (Lewis & Howie, 1987; Gabay, 2002; Lasich, 2005), já que a hiperprolactinemia é um efeito colateral que acompanha o tratamento com este fármaco (Katzung, 2005). Atua de forma

seletiva bloqueando os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos pertencentes à família D2 (Caley & Weber, 1995). Atualmente são reconhecidos cinco receptores dopaminérgicos diferentes, distribuídos em duas famílias distintas: o grupo dos receptores semelhantes a D<sub>1</sub> (receptor D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>), que aumentam AMPc através da ativação da adenilciclase; e o grupo dos receptores semelhantes a D<sub>2</sub> (receptor D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>), que diminuem o AMPc, através da inibição da adenilciclase, inibem os canais de cálcio e abrem os canais de potássio (Katzung, 2005).

A dopamina é um importante neurotransmissor envolvido na regulação dos comportamentos reprodutivos: comportamento sexual e comportamento materno (Stolzenberg & Numan, 2011). O cuidado materno é essencial para a sobrevivência e o desenvolvimento saudável dos descendentes (Numan et al., 2005). Os principais componentes do comportamento materno em ratas puérperas são: recuperação dos filhotes para o ninho, limpeza dos filhotes, amamentação e construção do ninho (Canteras, 2011). Estas respostas maternas iniciais são influenciadas por eventos hormonais ocorridos no final da gestação, incluindo o aumento de estradiol e prolactina, com a queda brusca dos níveis plasmáticos de progesterona (Numan, 2006). Entretanto, a manutenção desse comportamento durante o período do pós-parto remanescente é controlado principalmente por fatores não hormonais (tais como os estímulos multi-sensoriais provenientes dos filhotes) (Silva et al., 2001). Acredita-se que o estradiol induza uma cascata de sinalização que estimula o início do comportamento materno, porém a interação da fêmea com seus filhotes induz a liberação de dopamina no centro hipotalâmico responsável pelo comportamento materno (área medial pré-optica), onde este

neurotransmissor exerce os mesmos efeitos de sinalização, ativados pelo estradiol e assim participa da manutenção a longo-prazo do comportamento materno (Miller & Lonstein, 2005). Além disso, outros autores (Lonstein & Morrel, 2007; Stolzenberg & Numan, 2011) sugerem que a interação hipotalâmica com o sistema dopaminérgico mesolímbico também é responsável pela regulação das respostas maternas. Em animais, tem sido demonstrado que a dopamina, além de estar envolvida na manutenção, também participa do início do cuidado materno (Bridges, 1985; Bridges, 1990; Hansen, 1994; Lonstein et al., 1998) e que a exposição materna a antagonistas dopaminérgicos (Silva et al., 2001; Byrnes et al., 2002), podem afetar interação mãe-filhote.

Além disso, sabe-se que a Sulpirida é excretada de forma inalterada no leite (Aono et al., 1979; Lewis & Howie, 1987; Gabay, 2002; Lasich, 2005; Schaefer, 2007; Zuppa et al., 2010) portanto, neonatos acabam sendo expostos a este fármaco que tem o potencial para bloquear os receptores dopaminérgicos nos descendentes (Lewis & Howie, 1987). Sabe-se que a prolactina tem um papel importante na regulação do crescimento e da função normal de todos os tecidos sensíveis aos andrógenos (Jedlinska et al., 1995) onde, níveis alterados de prolactina comprometem o funcionamento do sistema reprodutor de animais adultos (Cheung, 1983; Laszczyńska et al., 1992; Jedlinska et al., 1995; De Rosa et al., 1998; Huang et al., 2008; Henderson et al., 2008; Mishra & Mohanty, 2010). Desta forma a exposição, durante a lactação, à Sulpirida é preocupante, uma vez que, poderia interferir no desenvolvimento de neonatos e comprometer funcionamento normal do sistema reprodutor durante a vida adulta.

Baseado nessas considerações, o presente estudo foi conduzido em ratos com a proposta de avaliar se a exposição materna à Sulpirida, durante a lactação, poderia comprometer o cuidado materno e/ou o desenvolvimento reprodutivo dos descendentes. Além disso, sabe-se que a transmissão dopaminérgica influencia a atividade motora (Millan et al., 2004) e antagonistas dopaminérgicos podem comprometê-la. Sendo assim, parâmetros relacionados com a atividade geral foram incorporados a este estudo com o objetivo de assegurar que a função motora não interferisse com o cuidado materno e o comportamento sexual.

## **2.1. Objetivo geral**

Conduzir um estudo experimental para avaliar os efeitos da exposição materna à Sulpirida, em parâmetros comportamentais e reprodutivos na prole masculina, desde o desmame até a vida adulta. Além disso, verificar se esta exposição poderia comprometer o cuidado materno.

## **2.2. Objetivos Específicos**

— Avaliar indicadores de toxicidade geral (ganho de peso, ingestão de ração, bem-estar geral e atividade geral) e de parâmetros do comportamento materno em ratas tratadas durante a lactação com Sulpirida.

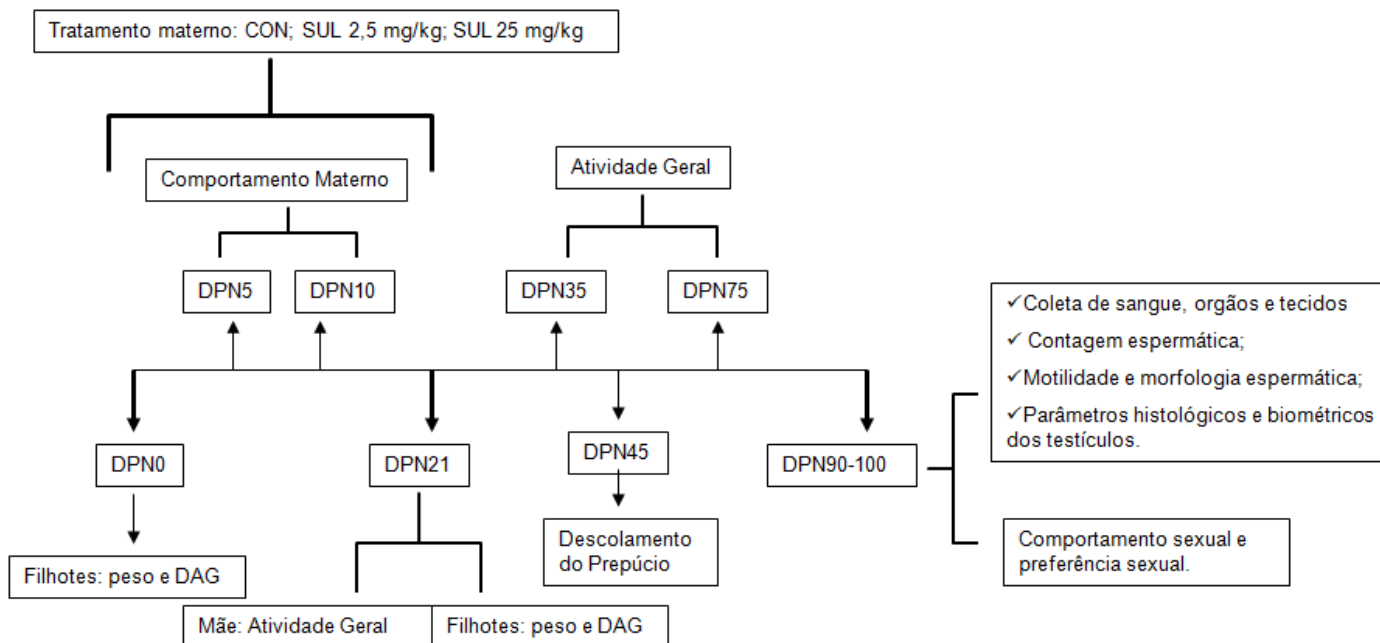
— Avaliar a atividade geral dos filhotes machos adolescentes (35 dias) e adultos (75 dias) expostos à Sulpirida durante a lactação.

— Avaliar parâmetros reprodutivos (do nascimento à vida adulta) dos filhotes machos, expostos à Sulpirida durante a lactação como: distância anogenital; dia do descolamento do prepúcio; parâmetros espermáticos (contagem, morfologia e motilidade espermática); histologia testicular; peso dos órgãos relacionados à reprodução; dosagem de testosterona plasmática; comportamento e preferência sexual.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Desenho experimental

O diagrama abaixo (Figura 1) resume o desenho experimental empregado nesse trabalho.



**Figura 1.** Diagrama do desenho experimental. DPN: dia pós-natal; DAG: distância anogenital; CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

#### 3.2. Animais e tratamento

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos e fêmeas (85-90 dias de idade), provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências

Fisiológicas do CCB, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ , umidade de  $55 \pm 5\%$ , fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvital ®) à vontade.

Para o acasalamento, ao final da tarde de cada dia foi colocado um macho em cada gaiola contendo duas fêmeas. Na manhã do dia seguinte, o macho foi retirado da gaiola das fêmeas, e foram coletadas células da mucosa vaginal através de esfregaço. A prenhez foi considerada positiva quando se observou, ao microscópio óptico, a presença de células características da fase estro concomitante com espermatozóides nas lâminas do esfregaço. Esse dia foi considerado como o primeiro dia de prenhez, ocasião em que as fêmeas foram identificadas e colocadas em gaiolas individuais e aleatoriamente separadas em 3 grupos com 20 ratas prenhes por grupo:

-Grupo Sulpirida 2.5 (SUL): As ratas receberam por gavagem Sulpirida (Equilid ®) na dose de 2,5 mg/Kg do primeiro dia de lactação (dia do nascimento, considerado dia pós-natal 0: DPN0) até o 21º dia após o nascimento dos filhotes (DPN21), ocasião onde ocorreu o desmame.

-Grupo Sulpirida 25 (SUL): As ratas receberam por gavagem Sulpirida (Equilid ®) na dose de 25 mg/Kg do DPN0 até o DPN21.

-Grupo CON: Grupo controle, onde as ratas receberam por gavagem água destilada do DPN0 até o DPN21.

O tratamento foi realizado uma vez ao dia, obedecendo sempre a mesma rotina de horários de aplicação (entre 12:00 e 14:00 h).

Em humanos, a dose típica para indução da lactação é de 50 mg 2 a 3 vezes ao dia (Hallbauer, 1997; Gabay, 2002; Lasich, 2005; Zuppa et al., 2010),

o que corresponde a, aproximadamente 1,7 à 2,5 mg/Kg. Assume-se que animais são mais resistentes que humanos, então foi escolhido para este estudo, além de 2,5 mg/kg, a dose de 25 mg/kg, o que corresponde a 10 vezes mais a dose indicada para humanos.

No DPN1, o número de filhotes em cada ninhada foi reduzido para oito com o objetivo de que todos recebessem quantidades iguais de leite evitando que o tamanho das ninhadas interferisse no desenvolvimento dos animais, esse número foi mantido com cada mãe até o DPN21. Para cada avaliação realizada, somente um filhote de cada ninhada foi utilizado para evitar o efeito ninhada (homogeneidade genética ou variabilidade materna). Portanto, a ninhada foi considerada a unidade experimental.

Todos os procedimentos nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com o protocolo CEEA 26/11.

### **3.3. Parâmetros analisados nas mães**

#### *3.3.1. Toxicidade geral materna*

O peso corporal materno foi medido no DPN0, DPN7, DPN14 e DPN21 e a ingestão de ração foi medida no DPN7, DPN14 e DPN21. Também foram observados sinais de toxicidade como lacrimejação, piloereção, padrão respiratório alterado e tremores.

### 3.3.2. *Comportamento Materno*

Para investigar os efeitos do tratamento com Sulpirida, durante a lactação na interação mãe-filhote, dois tipos de avaliação do comportamento materno foram conduzidos. No experimento 1, os filhotes foram removidos de sua gaiola moradia e retornados depois de 30 minutos, e a partir daí a interação mãe-filhote foi observada por 30 minutos. No experimento 2, interação entre mãe-filhote sem perturbação foi gravada durante 6 horas. O experimento 1 foi conduzido no DPN5 e o experimento 2 foi conduzido nos DPN5 e DPN10. Esses dias foram escolhidos porque no DPN5 a lactação tem um custo energético menor e os filhotes têm uma capacidade motora limitada, enquanto que no DPN10 a lactação tem um custo energético maior e os filhotes já desenvolveram melhor a capacidade motora. Todas as análises comportamentais foram realizadas entre as 8:00 e 14:00 horas.

**Experimento 1:** Observações do comportamento materno depois da remoção dos filhotes.

Para este comportamento foram utilizadas 10 mães por grupo. No dia do teste, todos os filhotes foram removidos de sua caixa moradia e o ninho destruído. Depois de 30 minutos, os filhotes foram retornados à caixa e a interação mãe-filhote foi avaliada durante 30 minutos. Os eventos analisados foram: latência para recuperação dos filhotes, tempo fora do ninho (definido como a quantidade de tempo que a rata passou sem nenhuma interação com os filhotes independente da sua posição na caixa), agrupamento dos filhotes, limpeza própria (limpeza das mamas, para estímulo de descida de leite), limpeza dos filhotes, construção de ninho e amamentação na posição de

cifose. As mães que recuperaram todos os filhotes ao ninho e amamentaram na posição de cifose por 3 minutos consecutivos foram classificadas como tendo o comportamento maternal completo. Todas as análises comportamentais foram feitas usando o programa Etholog (Ottoni, 2000).

### **Experimento 2:** Observações da interação mãe-filhote sem perturbação.

Para este comportamento foram utilizadas 10 mães por grupo. Três dias antes da avaliação as ratas foram transferidas para caixas transparentes de acrílico para acomodação. A interação mãe-filhote foi gravada nessa caixa moradia por 6 horas. Uma câmera acoplada a um computador na sala adjacente foi ligada às 8:00 e desligada às 14:00 h na fase clara do ciclo. O comportamento materno foi pontuado cada minuto durante este período, num total de 360 pontuações, de acordo com os comportamentos apresentados pela rata como: tempo fora do ninho, amamentação, recuperação dos filhotes, limpeza própria e/ou dos filhotes. O número total de observações foi usado para calcular a porcentagem de observações em amamentação, limpeza própria e/ou dos filhotes e tempo fora do ninho.

#### *3.3.3. Ejeção de leite*

A ejeção de leite foi avaliada no DPN5 e DPN10 através de metodologia modificada de Ladyman e Woodside (2009). Após análise do comportamento materno sem perturbação, descrito na seção 3.3.2, foi selecionado o maior período que a mãe permaneceu amamentando os filhotes no ninho e esse foi utilizado para analisar a latência para a primeira ejeção de leite, assim como o

intervalo entre cada ejeção através do reflexo dos filhotes ao receber o leite (“Stretch response”) (Lau & Henning, 1985).

### 3.3.4. Avaliação da atividade geral

No DPN 21, as mães foram submetidas ao teste de atividade geral no campo aberto (Broadhurst, 1960). O aparelho consistiu de uma superfície circular de madeira com 72 cm de diâmetro, circundada por uma parede de acrílico. A superfície foi pintada de branco e dividida em partes semelhantes por círculos concêntricos e segmentados de retas (Figura 2). Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e as seguintes variáveis foram gravadas durante uma sessão de 3 minutos (Moreira et al., 2001):

- locomoção: número de espaços invadidos pelo animal com as quatro patas,
- levantar: número de vezes que o animal se apoiou sobre as patas traseiras;
- limpeza: tempo, em segundos, que o animal gastou se limpando.

Este teste comportamental foi gravado por uma câmera de vídeo acoplada em um computador em uma sala adjacente.



**Figura 2.** Modelo do aparelho utilizado para o teste de campo aberto.

### **3.4. Parâmetros analisados nos filhotes**

#### *3.4.1. Desenvolvimento físico dos filhotes*

Os filhotes machos foram pesados semanalmente nos DPN0, DPN7, DPN14 e DPN21. No DPN0 e no DPN 21, a distância anogenital (DAG, distância do ânus até o tubérculo genital) foi obtida através de um paquímetro. A DAG foi normalizada através da sua divisão pela raiz cúbica do peso corporal (Gallavan et al., 1999). O dia da separação prepucial foi avaliado como um indicador do início da maturidade sexual.

#### *3.4.2. Atividade geral dos filhotes*

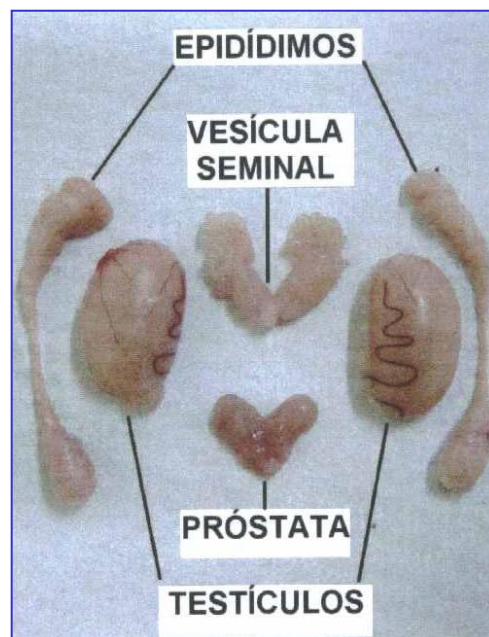
Os filhotes machos foram submetidos à avaliação comportamental no teste de campo aberto nas idades DPN35 e DPN75, de acordo com a metodologia descrita na seção 3.3.4. Os animais foram usados somente uma vez.

#### *3.4.3. Desenvolvimento reprodutivo dos filhotes machos na vida adulta*

Para a avaliação dos parâmetros reprodutivos na vida adulta, foram utilizados 2 machos (DPN90-100) de cada ninhada: um para peso dos órgãos, parâmetros espermáticos e morfometria testicular, e outro para avaliação do comportamento sexual e preferência.

### 3.4.3.1. Retirada de órgãos reprodutivos

Um rato macho de cada ninhada (n=20 animais/grupo) foi pesado e submetido à eutanásia pela inalação de éter etílico. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal, em seringas contendo heparina, sempre no mesmo horário para determinação dos níveis plasmáticos de testosterona. O testículo direito, epidídimo direito, próstata ventral e vesícula seminal (sem a glândula coaguladora e com secreção) foram removidos (Figura 3) e seus pesos foram determinados empregando-se balança analítica. O testículo e o epidídimo direito foram armazenados e congelados a -20°C para contagem espermática. O testículo esquerdo também foi removido e armazenado para análise histopatológica.



**Figura 3.** Foto dos órgãos sexuais retirados dos animais para pesagem. Epidídimos, testículos, próstata e vesícula seminal sem a glândula coaguladora.

#### 3.4.3.2. Avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona

Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 2.500 rpm por 20 minutos a 2° C, para separação do plasma, o qual foi congelado a -20°C até o momento da determinação hormonal. O nível plasmática de testosterona (20 amostras/grupo) foi determinado por radioimunoensaio, utilizando-se o “kit” ImmuChem® Double Antibody Testosterone. As variações intra e inter-análises foram de 1,75% e 20%, respectivamente.

#### 3.4.3.3. Contagem espermática

O testículo e o epidídimo removidos dos animais (conforme descrito na seção 3.4.3.2) foram utilizados para determinação da concentração de células germinativas (n=15 animais/grupo). As porções epididimárias foram separadas logo após a coleta em cabeça/corpo e cauda. A túnica albugínea do testículo foi retirada, o parênquima testicular e as porções epididimárias foram pesados e homogeneizados com uma mistura de 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton X100. As espermátides, no testículo, e os espermatozóides, no epidídimo, resistentes a homogeneização foram contados utilizando câmara de Neubauer (4 campos por animal, Figura 4).

*Contagem das cabeças de espermátides no testículo e cálculo da produção diária de espermatozóides:* O nº de espermatozóides produzidos pelo testículo por dia foi estimado pela razão entre o nº total de espermátides por testículo dividido por 6,1, que é o nº de dias que essas espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio germinativo.

*Contagem do nº e cálculo do trânsito de espermatozóides no epidídimo:*

O nº de espermatozóides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo dos animais foi estimado segundo a técnica descrita por Robb et al. (1978) com adaptações de Fernandes et al (2007). O tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo foi calculado dividindo-se o nº de espermatozóides na cabeça/corpo ou cauda epididimária, pelo valor obtido na produção diária de espermatozóides de cada animal.



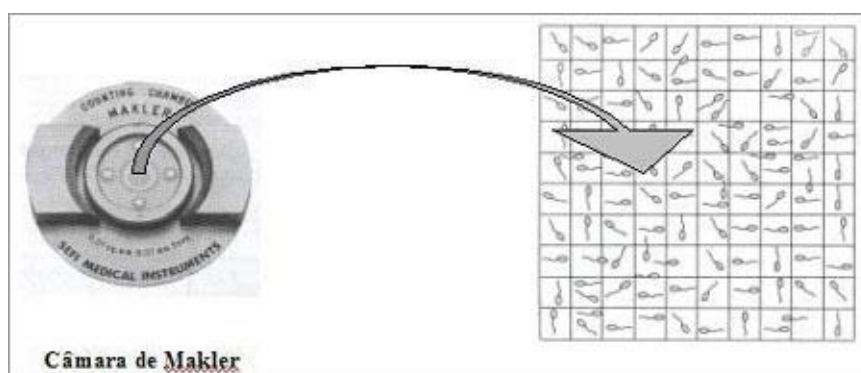
**Figura 4.** Câmara de Neubaer utilizada para contagem espermática. À esquerda, foto do modelo utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior, através do microscópio, de um dos campos do aparelho

#### 3.4.3.4. Motilidade e morfologia espermática

Imediatamente após a eutanásia dos animais e retirada de sangue, foi retirado sêmen do ducto deferente direito (n=11-12 animais/grupo), diluído em 1 ml HTF modificado (Fluído Tubular Humano, Irvine Scientific®) e pré aquecido com ajuda de uma placa aquecedora a 34 °C . Uma alíquota de 10 µl foi colocada na câmara de Makler (Irvine) (Figura 5) e analisada na fase de contraste do microscópio (OSM-223287, Olympus) com aumento de 100x. Foram avaliados 100 espermatozóides por animal e classificados em: móvel

(motilidade progressiva) e imóvel (Perobelli et al., 2010).

Para morfologia espermática, o sêmen foi retirado, por lavagem, do ducto deferente esquerdo com o auxílio de uma seringa e agulha com 1,0 ml de formolsalina (10%). Foi preparado um esfregaço em lâmina histológica e depois de 90 minutos de secagem foram analisados 200 espermatozóides por animal na fase de contraste do microscópio (aumento 400x) (Seed et al., 1996). As anormalidades morfológicas foram classificadas em duas categorias gerais: morfologia de cabeça (sem curvatura característica ou forma isolada, isto é, sem a cauda anexada) ou morfologia de cauda (quebrada ou isolada, isto é, sem cabeça anexada) (Filler, 1993).



**Figura 5.** Câmara de Makler. À esquerda, foto do modelo da câmara utilizada. À direita, representação esquemática da vista superior do aparelho, através do microscópio, com espermatozóides.

#### 3.4.3.5. *Parâmetros biométricos e análises histológicas do testículo*

O testículo esquerdo foi dissecado, pesado e fixado em solução de Bouin por 24 horas e depois foi estocado em etanol 70°C (n=15 animais/grupo). Posteriormente foi cortado em fragmentos de tecido, desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em

parafina. Foram feitos cortes com 5 µm de espessura, corados com Hematoxilina e Eosina.

O diâmetro tubular testicular médio de cada animal foi obtido pela mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que se encontravam com o contorno mais circular possível. Esta medição foi realizada utilizando-se o programa computacional BEL view, com uso de câmara acoplada ao microscópio de luz comum (OSM-223287, Olympus) com objetiva de 100x.

O volume dos componentes do testículo (tecido intersticial e epitélio seminífero) foi estimado a partir da contagem de 3000 pontos por animal, utilizando-se retículo de 100 intersecções (pontos), em aumento de 400x. Cálculo da densidade do volume dos componentes do testículo:

$$V_v = \frac{P_p}{P_t}$$

- Onde, Pp são os pontos que incidiram na estrutura e Pt o total de pontos, ou seja, 3000.

Como a densidade do testículo é de, aproximadamente 1,0 (~1,03 – 1,04) para subseqüentes cálculos morfométricos, o peso do testículo foi considerado igual ao volume do testículo (França & Godinho, 2003). Para obter um volume testicular mais preciso, subtraiu-se do peso bruto do testículo, o peso da túnica albugínea (~6.5%).

O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo foi expresso em metros e calculado considerando-se o volume ocupado pelos túbulos no testículo e do diâmetro tubular médio encontrado para cada animal pelo emprego da fórmula:

$$CT = \frac{VTS}{\pi R^2}$$

- Onde, VTS é o volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo;  $\pi$ : 3,1417 e R é o diâmetro tubular/2

Foram analisados 200 túbulos por animal em 3 cortes transversais do testículo, não consecutivos, em objetiva de 400x para determinar a porcentagem de túbulos seminíferos com alterações.

#### 3.4.3.6. *Comportamento sexual*

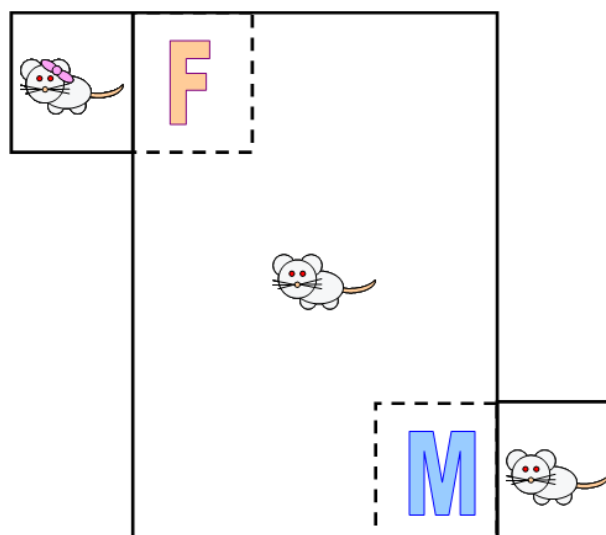
O comportamento sexual foi observado nos ratos adultos (DPN90-110, n=20 animais/grupo) durante a fase escura do ciclo, sob uma luz vermelha fraca. Os animais foram colocados no ciclo claro/escuro invertido 15 dias antes das avaliações para adaptação. As observações começaram sempre 4 horas depois do início da fase escura e foram gravadas por uma câmera de vídeo acoplada a um computador em uma sala adjacente. Para avaliação do comportamento sexual, cada macho foi colocado em uma gaiola de acrílico e, depois de 5 minutos, uma fêmea em estro natural foi introduzida na gaiola. Durante 30 minutos os parâmetros observados foram (Gerardin et al., 2006):

- latência da 1ª intromissão, 1ª ejaculação, 1ª intromissão pós-ejaculação;
- número total de intromissões e ejaculações.

Se o macho não apresentou monta, a avaliação foi interrompida e repetida em outro dia. Se o macho não apresentou monta novamente na segunda avaliação, ele foi considerado sexualmente inativo.

#### 3.4.3.7. *Teste de preferência sexual*

Os mesmos animais avaliados no comportamento sexual foram submetidos ao teste de preferência sexual (Agmo, 2003). Para este teste foi utilizado um arena retangular com 50 x 50 x 100 cm (altura x largura x comprimento), apresentando duas aberturas que se comunicavam com duas arenas menores, ambas com 25 cm<sup>2</sup> (Figura 6). As arenas menores posicionavam-se diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal era fechada com uma tela de arame. Para este teste foi colocado, uma fêmea em estro natural (incentivo sexual) em uma das arenas pequenas, e na outra um macho sexualmente ativo (incentivo social). O piso da arena principal possuía duas áreas delimitadas de 25 cm<sup>2</sup> (zonas), em frente a cada abertura das arenas menores. Estas áreas foram chamadas de zona de incentivo sexual (zona da fêmea) e zona de incentivo social (zona do macho). O macho experimental foi posicionado no centro da arena principal e observado durante 20 minutos. O número de visitas e o tempo gasto visitando cada zona de incentivo foram registrados, e um escore de preferência (Agmo, 2003) foi calculado pelo (tempo de permanência na zona de incentivo da fêmea/tempo total gasto nas duas zonas de incentivos) x100.



**Figura 6.** Representação esquemática da vista superior da arena do teste de preferência sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea (sexual) e do macho (social), respectivamente.

### 3.5. Análises estatísticas

Inicialmente, uma análise exploratória foi realizada para avaliar a distribuição dos dados (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) de cada variável. Para variáveis que apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, foram conduzidas análises paramétricas, com os dados sendo apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Por outro lado, para as outras variáveis foram aplicados testes não paramétricos, com a apresentação dos dados como mediana (1<sup>o</sup>- 3<sup>o</sup> quartil). As diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA): peso corporal e ingestão de ração das mães, comportamento materno sem perturbação, ejeções de leite, peso e DAG dos filhotes.

- ANOVA fatorial: observações do comportamento materno depois da remoção dos filhotes; descolamento do prepúcio; locomoção e levantar no campo aberto das mães e dos filhotes nas duas idades; peso corporal dos animais com DPN90-110 e dos órgãos reprodutivos; contagem e morfologia espermática; comportamento sexual e teste de preferência sexual (tempo passado na zona da fêmea e zona do macho e número de visitas).

- Kruskal-Wallis: limpeza das mães e dos filhotes no teste de campo aberto; níveis plasmáticos de testosterona; motilidade espermática; parâmetros biométricos do testículo e porcentagem de túbulos seminíferos anormais; escore de preferência no teste de preferência sexual.

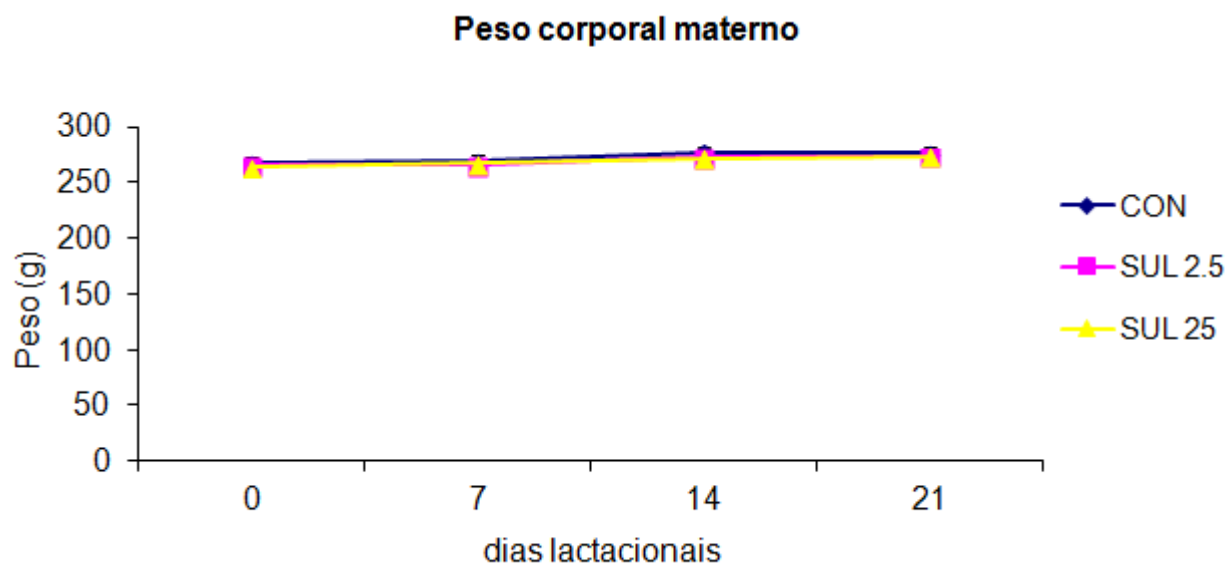
## **4. Resultados**

### *4.1. Parâmetros maternos*

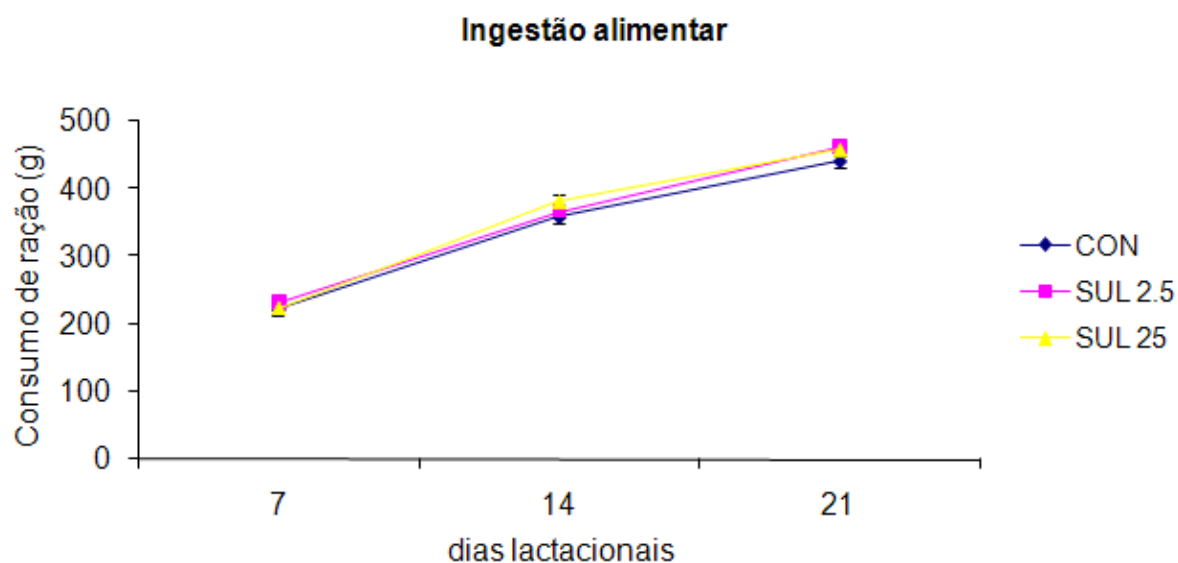
#### *4.1.1. Toxicidade geral materna*

RMANOVA indicou que o peso materno (Figura 7A) e a ingestão de ração (Figura 7B) não foram afetados pelo tratamento com Sulpirida durante a lactação ( $p > 0,05$ ).

A.



B.



**Figura 7.** Peso corporal (A) e consumo de ração (B) das mães durante a lactação. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM de 20 mães/grupo,  $p > 0,05$  RMANOVA. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

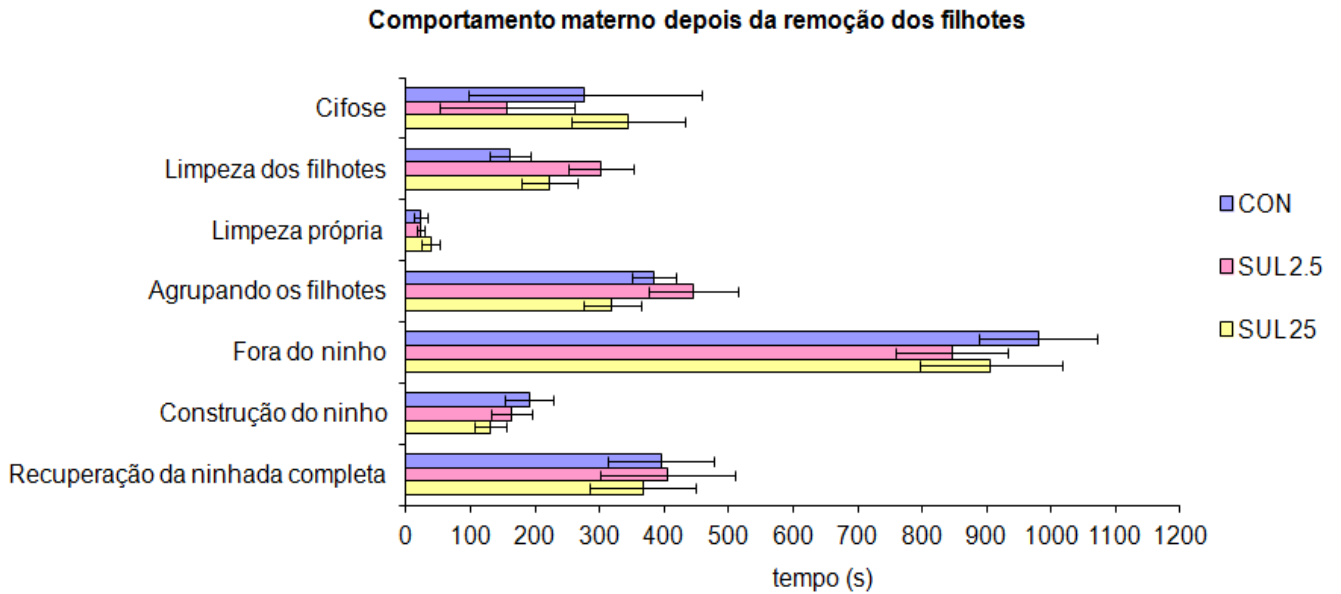
#### *4.1.2. Comportamento materno*

##### *4.1.2.1. Comportamento materno depois da remoção dos filhotes*

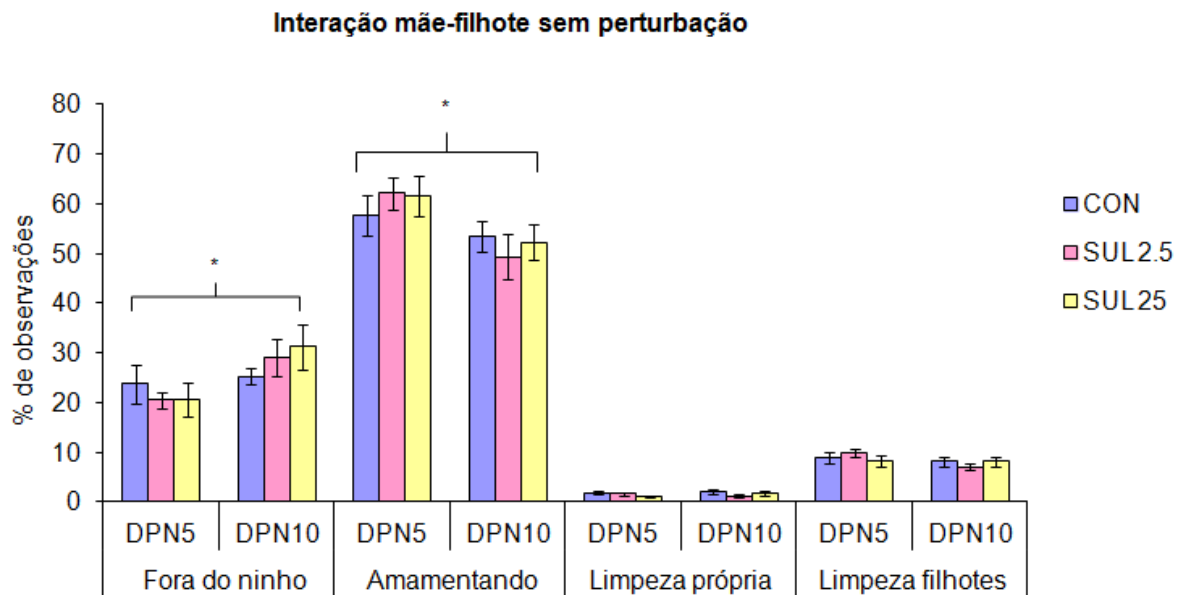
ANOVA indicou que não houve diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ) em todos os parâmetros avaliados (Figura 8) como: recuperação da ninhada completa, tempo fora do ninho, tempo construindo ninho, tempo agrupando os filhotes, tempo gasto com a limpeza própria e/ou dos filhotes ou no tempo de amamentação em cifo.

##### *4.1.2.2. Observações da interação mãe-filhote sem perturbação*

Os parâmetros observados neste comportamento (Figura 9) não foram alterados pelo tratamento com Sulpirida ( $p>0,05$ ). RMANOVA mostrou somente um efeito significativo ( $p<0,05$ ) entre os dias lactacionais, onde a porcentagem de observações em posição de amamentação foi maior no DPN5 em relação ao DPN10 (Figura 9) e a porcentagem fora do ninho foi maior no DPN10 (Figura 9) em relação ao DPN5.



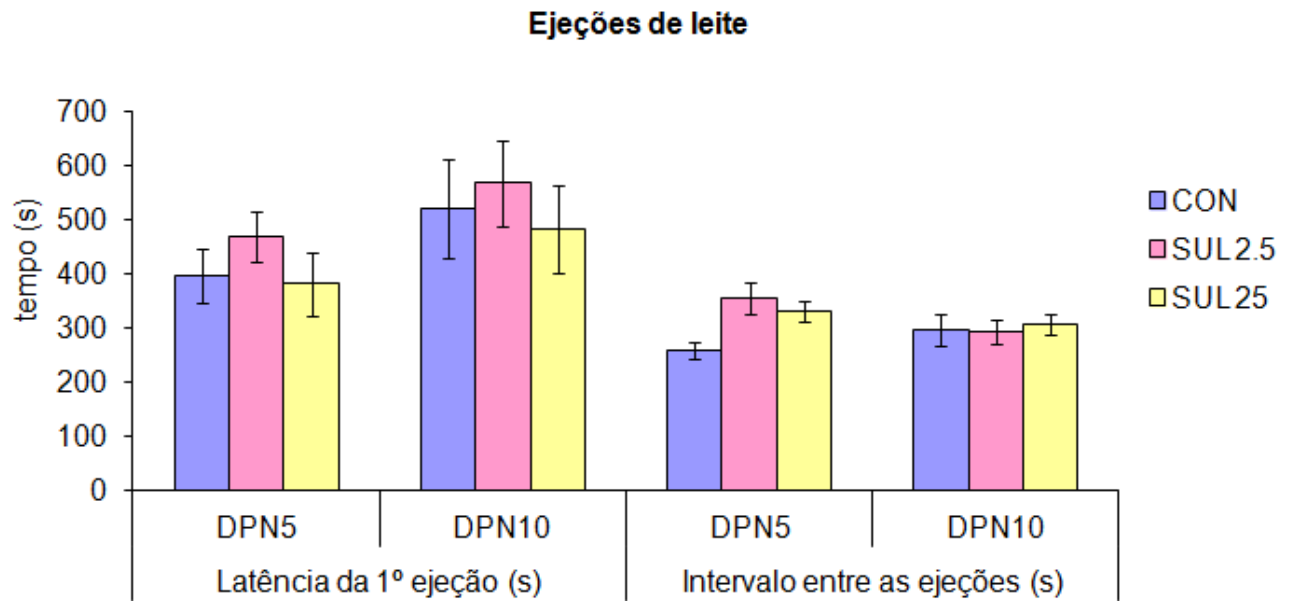
**Figura 8.** Parâmetros observados durante o comportamento materno depois da remoção dos filhotes. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 mães/grupo.  $p > 0,05$ , ANOVA. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.



**Figura 9.** Porcentagem de observações durante interação mãe-filhote sem perturbação. Dados apresentados com média  $\pm$  EPM de 10 mães/grupo. \* $p < 0,05$ , RMANOVA indicou apenas efeito do período. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

#### 4.1.3. Ejeção de leite

O tratamento com Sulpirida não interferiu na latência da 1ª ejeção de leite (Figura 10), assim como também não alterou o intervalo entre as ejeções (Figura 10) como indicado por RMANOVA, ( $p > 0,05$ ).



**Figura 10.** Latência para 1ª ejeção (s) e intervalo entre as ejeções (s) de leite. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 mães/grupo.  $p > 0,05$ , RMANOVA. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

#### *4.1.4. Atividade geral*

Os parâmetros avaliados no campo aberto (Tabela 1) demonstram que as mães tratadas com Sulpirida não tiveram alterações em nenhuma das funções avaliadas neste teste ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1. Atividade geral das mães dos diferentes grupos experimentais no DPN21.**

	<b>CON {20}</b>	<b>SUL 2.5 {20}</b>	<b>SUL 25 {20}</b>
Locomoção (n)	54,55 ± 2,65	51,95 ± 2,51	53,15 ± 2,62
Levantar (n)	26,85 ± 1,75	24,95 ± 1,65	23,80 ± 1,97
Limpeza (s)	9,02 (0,00-40,82)	7,35(0,00-44,68)	8,86 (0,00-30,30)

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados de locomoção e levantar são apresentados como média ± EPM,  $p > 0,05$ , ANOVA. Dados de limpeza está apresentada como mediana (1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> quartil),  $p > 0,05$ , teste Kruskal-Wallis. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

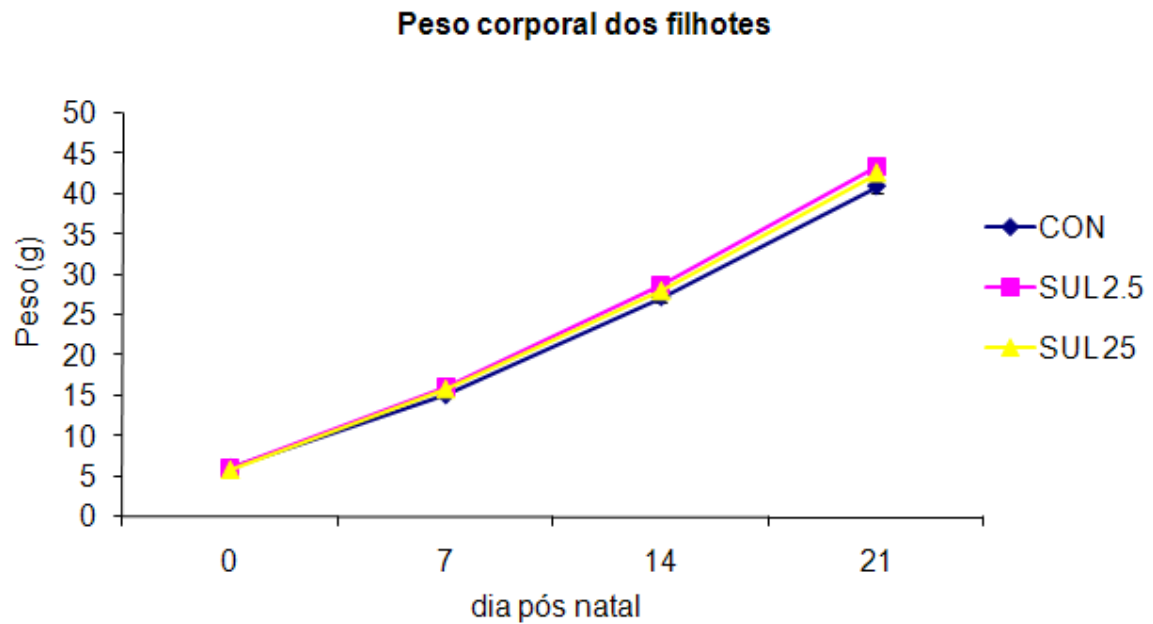
## 4.2. Parâmetros analisados nos filhotes

### 4.2.1. Desenvolvimento físico dos filhotes

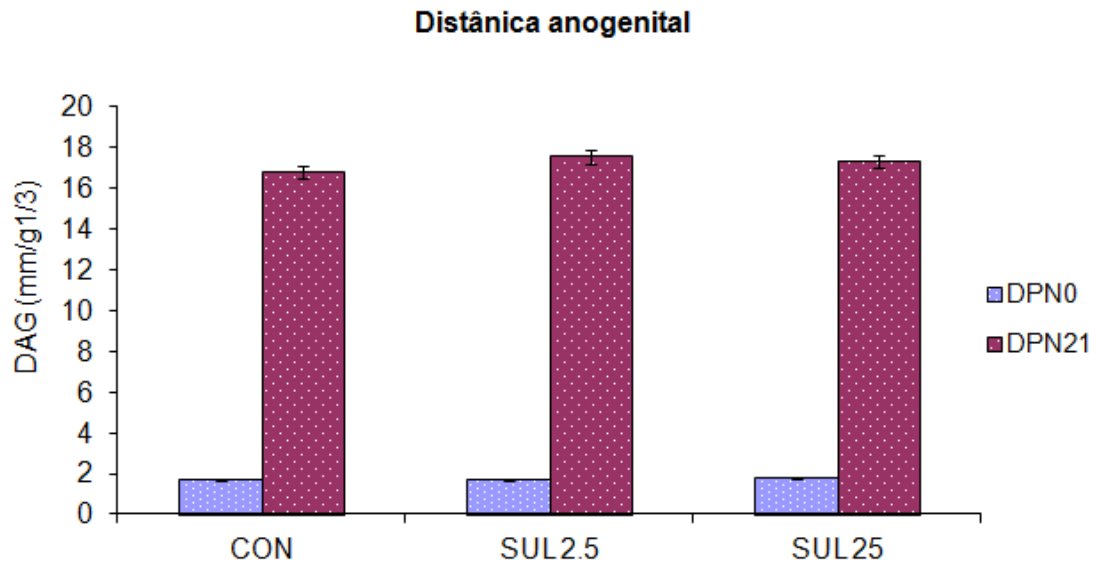
O peso dos filhotes machos (Figura 11) durante o período lactacional não foi influenciado pela exposição à Sulpirida como indicado por RMANOVA ( $p > 0,05$ ). Houve apenas efeito da idade ( $p < 0,05$ ), refletindo o aumento de peso dos filhotes no decorrer do desenvolvimento.

Em relação à DAG ( $\text{mm/g}^{1/3}$ , Figura 12) a idade foi também o único fator significativo ( $p < 0,05$ ).

O dia do descolamento do prepúcio não foi influenciado pela exposição à Sulpirida (CON:  $48,18 \pm 0,49$ , SUL 2.5:  $47,08 \pm 0,67$ , SUL 25:  $46,71 \pm 0,48$ ), como mostrado pela ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Peso corporal dos filhotes durante o período lactacional. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM de 20 ninhadas/grupo. RMANOVA indicou apenas efeito da idade, refletindo o ganho de peso durante o desenvolvimento dos filhotes. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.



**Figura 12.** DAG (mm/g<sup>1/3</sup>) dos filhotes nos DPN0 e DPN21. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM de 20 ninhadas/grupo. RMANOVA indicou apenas efeito da idade, refletindo aumento da DAG pelo desenvolvimento dos filhotes. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

#### *4.2.2. Atividade geral dos filhotes*

Os comportamentos (locomoção, levantar e limpeza) avaliados no campo aberto (Tabela 2) nos DPN 35 e DPN 75 não foram influenciados pela exposição à Sulpirida ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2. Atividade geral no campo aberto dos filhotes machos com DPN 35 e DPN 75 dos diferentes grupos experimentais.**

	<b>CON {20}</b>	<b>SUL 2.5 {20}</b>	<b>SUL 25{20}</b>
<b>DPN 35</b>			
Locomoção (n)	59,20±3,56	52,70±3,86	59,66±3,74
Levantar (n)	23,54±1,81	23,22±2,30	24,10±1,58
Limpeza (s)	3,59(0,00-11,73)	3,95(0,00-10,97)	2,62(0,00-14,47)
<b>DPN 75</b>			
Locomoção (n)	66,30±4,42	69,75±4,74	69,75±5,52
Levantar (n)	24,05±2,26	19,55±1,91	22,58±2,00
Limpeza (s)	4,82(0-12,61)	3,19(0-16,63)	4,26(0-14,76)

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados de locomoção e levantar são apresentados como média ± EPM,  $p > 0,05$ , ANOVA. Limpeza está apresentada como mediana (1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> quartil),  $p > 0,05$ , teste Kruskal-Wallis. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

#### *4.2.3. Desenvolvimento reprodutivo dos filhotes na vida adulta*

##### *4.2.3.1. Peso corporal e de órgãos reprodutivos e avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona*

O peso corporal, peso dos órgãos reprodutivos e níveis plasmáticos de testosterona dos animais no DPN90-110 estão apresentados na Tabela 3.

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que não houve nenhuma alteração dos níveis plasmáticos de testosterona entre os grupos. ANOVA complementada com Bonferroni indicou que a exposição lactacional à Sulpirida no grupo SUL 25 aumentou o peso corporal e o peso absoluto da próstata e reduziu o peso relativo do testículo ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CON. No grupo SUL 2.5, ANOVA complementada com Bonferroni, indicou uma diminuição do peso absoluto e relativo do testículo ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo CON. Nenhuma diferença estatística foi observada nos outros parâmetros.

**Tabela 3. Peso corporal, peso dos órgãos reprodutivos e níveis plasmáticos de testosterona de ratos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN90-100.**

	CON {20}	SUL 2.5 {20}	SUL 25 {20}
Níveis plasmáticos de testosterona (ng/ml)	3,00(0,97-3,62)	3,64(2,27-4,86)	2,41(1,46-3,29)
Peso corporal (g)	385,56±8,00	385,47±6,12	415,06±7,14*
<b>Peso absoluto (g)</b>			
Testículo	1,56±0,03	1,45±0,02*	1,52±0,08
Epidídimo	0,52±0,02	0,50±0,01	0,54±0,03
Próstata	0,36±0,02	0,34±0,02	0,44±0,03*
Vesícula seminal cheia	0,64±0,02	0,59±0,03	0,65±0,04
Vesícula seminal vazia	0,19±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01
<b>Peso relativo (g/100g)</b>			
Testículo	0,41±0,01	0,38±0,01*	0,37±0,02 *
Epidídimo	0,14±0,005	0,13±0,003	0,14±0,006
Próstata	0,10±0,01	0,09±0,01	0,11±0,01
Vesícula seminal cheia	0,17±0,01	0,15±0,01	0,16±0,01
Vesícula seminal vazia	0,05±0,002	0,05±0,003	0,05±0,003

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, \*p<0,05 quando comparado ao CON, ANOVA complementada com Bonferroni. Níveis plasmáticos de testosterona estão apresentados como mediana (1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> quartil) p>0,05, teste Kruskal-Wallis. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

#### *4.2.3.2. Contagem, morfologia a e motilidade espermática.*

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros avaliados na contagem espermática. A exposição materna à Sulpirida não alterou nenhum dos parâmetros avaliados em nenhuma das doses (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

No entanto, na morfologia espermática foi observado um aumento na porcentagem de cabeças anormais (ANOVA complementada com Bonferroni,  $p < 0,05$ ) e um aumento na porcentagem de espermatozoides imóveis no grupo SUL 25 quando comparado ao CON ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis complementado com teste Dunn) (Tabela 5).

**Tabela 4. Contagem espermática de ratos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN90-100.**

Parâmetros	CON {15}	SUL 2.5 {15}	SUL 25 {15}
Nº de espermatozóides por testículo ( $10^6$ /testículo)	123,63±2,75	113,49±6,11	117,02±7,09
Nº de espermatozóides por testículo ( $10^6$ /g/testículo)	83,56±2,73	77,77±4,45	79,88±4,37
Produção diária de espermatozóides	20,27±0,45	18,28±1,19	19,18±1,16
Nº de espermatozóides na cabeça/corpo do epidídimo ( $\times 10^6$ /órgão)	79,56±5,15	76,25±7,52	77,10±9,73
Nº de espermatozóides na cabeça/corpo do epidídimo ( $\times 10^6$ /g/órgão)	281,39±24,18	286,71±33,40	258,20±28,82
Nº de espermatozóides na cauda do epidídimo ( $\times 10^6$ /órgão)	122,35±8,61	122,33±5,33	121,56±5,55
Nº de espermatozóides na cauda do epidídimo ( $\times 10^6$ /g/órgão)	504,61±38,61	508,16±24,40	483,55±33,11
Tempo de trânsito de espermatozóides na cabeça/corpo (dias)	3,97±0,26	4,50±0,42	3,77±0,43
Tempo de trânsito na cauda (dias)	6,09±0,46	7,40±0,90	6,60±0,50

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados com média  $\pm$  EPM,  $p > 0,05$ , ANOVA. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

**Tabela 5. Morfologia e motilidade espermática de ratos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN90-100.**

Parâmetros (%)	CON	SUL 2.5	SUL 25
Espermatozóides com cabeça normal	81,77±1,90	78,00±2,46	76,08±1,61
Espermatozóides com cabeça anormal	13,59±1,50	15,56±1,77	19,71±1,63*
Espermatozóides móveis	84,00(81,50-88,50)	75,00(72,00-78,00)	72,00(61,00-77,75)*
Espermatozóides imóveis	16,00(11,50-18,50)	25,00(22,00-28,00)	26,50(21,50-31,00)*

Dados de morfologia espermática são apresentados como média ± EPM de 11-12 animais/grupo, \*p< 0,05, ANOVA complementada com Bonferroni. Dados de motilidade espermática são apresentados como mediana (1º-3º quartil), \*p<0,05, teste Kruskal-Wallis complementado com Dunn. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

#### 4.2.3.3. *Parâmetros biométricos e análises histológicas do testículo*

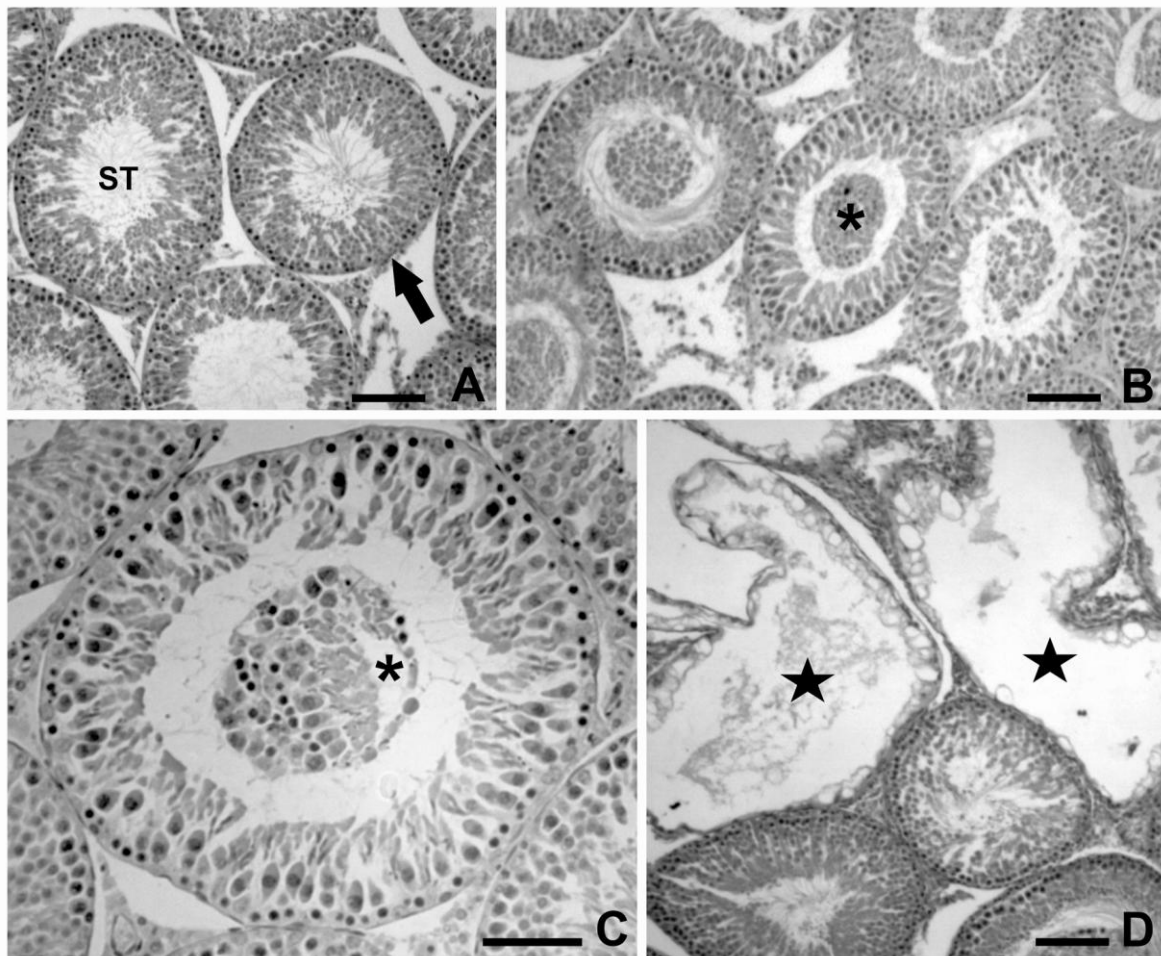
Os parâmetros biométricos dos testículos estão apresentados na Tabela 6. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que não houve alterações ( $p > 0,05$ ) no diâmetro e no comprimento total dos túbulos seminíferos nos animais expostos à Sulpirida em relação ao controle. Por outro lado, mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no volume dos túbulos seminíferos nos animais do grupo expostos à SUL 25 e uma tendência ( $p < 0,06$ ) à redução do volume testicular em ambas as doses em relação ao grupo controle (Tabela 6).

A histologia do epitélio seminífero (Figura 12) mostrou aumento significativo ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn) na porcentagem de túbulos seminíferos anormais [% mediana (1<sup>o</sup>–3<sup>o</sup> quartil), de 15 animais/grupo: CON: 0,00 (0,00–1,25), SUL 2.5: 2,00 (1,00–6,00)\*, SUL 25: 5,00 (1,25–9,00)\*] de ambas as doses quando comparadas com o animais controle. A principal alteração histológica observada nesses animais foi uma extensiva descamação das células germinativas. Muitos túbulos seminíferos dos animais expostos à Sulpirida, principalmente do grupo SUL 25, demonstraram perda severa de células germinativas imaturas.

**Tabela 6. Parâmetros biométricos do testículo de ratos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN90-100.**

	CON {15}	SUL 2.5 {15}	SUL 25 {15}
Volume testicular (ml)	1,43(1,37-1,53)	1,37(1,27-1,48) <sup>#</sup>	1,38(1,28-1,42) <sup>#</sup>
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	1,12(1,09-1,16)	1,03(0,98-1,14)	1,02(0,96-1,07) <sup>*</sup>
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	300,97(279,89-308,95)	296,32(287,94-304,40)	294,34(283,49-305,01)
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	15,80(15,20-17,72)	14,90(13,60-16,90)	14,40(12,90-16,95)

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como mediana (1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> quartil), \*p<0,05 e <sup>#</sup>p<0,06, pelo teste Kruskal-Wallis complementado com Dunn. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.



**Figura 13.** Microfotografias (análise histopatológica) das secções dos túbulos seminíferos dos animais do grupo controle, expostos à água destilada (A) ou expostos à Sulpirida 2,5 mg/kg (B e C) ou Sulpirida 25 mg/Kg (D), coradas por Hematoxilina e Eosina. Foto A: apresenta os túbulos seminíferos com aspecto normal, mostrando as células germinativas organizadas em camadas concêntricas, constituindo o epitélio seminífero (seta). Foto B e C: demonstram descamação das células germinativas (asterisco). Foto D: mostra a depleção do epitélio seminífero com grave perda de células germinativas (estrelas). Escalas- (A, B e D) = 10  $\mu$ m, (C) = 50  $\mu$ m.

#### *4.2.3.4. Comportamento sexual e preferência sexual*

ANOVA demonstrou que a exposição à Sulpirida não alterou o comportamento sexual (Tabela 7), nem a preferência sexual (Tabela 8).

**Tabela 7. Comportamento sexual de ratos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN90-100.**

	CON	SUL 2.5	SUL 25
Latencia 1 <sup>a</sup> intromissão(s)	175.06±30.77(16/20)	234.12±32.33(17/20)	146.82±24.94(17/20)
Nº de intromissões até 1 <sup>a</sup> ejaculação	17.13±1.58(16/20)	20.53±2.87(17/20)	14.24±1.42(17/20)
Latencia 1 <sup>a</sup> ejaculação (s)	709.00±80.61(16/20)	784.76±84.11(17/20)	469.80±48.16(15/20) <sup>&amp;</sup>
Latencia 1 <sup>a</sup> intromissão pós-ejaculação (s)	328.64±18.36(15/20)	336.07±18.25(15/20)	300.33±20.22(15/20)
Nº de intromissões pós-ejaculação	19.57±2.16(15/20)	14.40±1.65(15/20)	21.20±1.23(15/20) <sup>&amp;</sup>
Nº de ejaculações	2.20±0.20(15/20)	2.00±0.15(17/20)	2.73± 0.18(15/20) <sup>&amp;</sup>

Dados apresentados como média ± EPM,  $p > 0,05$ , ANOVA, &  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SUL 2.5. Número entre parênteses representam o número de animais que apresentaram comportamento pelo número total de animais do grupo. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

**Tabela 8. Preferência sexual de ratos machos dos diferentes grupos experimentais no DPN90-100.**

	<b>CON {20}</b>	<b>SUL 2.5 {20}</b>	<b>SUL 25 (20)</b>
Tempo na zona do macho (s)	237,25±27,88	299,75±39,27	300,25±24,21
Tempo na zona da fêmea (s)	568,20±45,70	489,15±41,61	516,60±39,62
Nº de visitas na zona do macho	16,95±1,40	19,15±1,36	18,75±1,26
Nº de visitas na zona da fêmea	20,75±1,45	20,40±1,20	20,00±1,33
Escore de preferência %	0,69(61,51-84,76)	0,62(54,76-76,66)	0,62(55,67-73,50)

Números entre chaves representam o número de animais usados em cada grupo. Dados apresentados como média ± EPM,  $p > 0,05$ , ANOVA. Escore de preferência está apresentado como mediana (1º-3º quartil), analisado pelo teste Kruskal-Wallis. CON: grupo controle tratado com água destilada; SUL2.5: grupo tratado com Sulpirida 2,5 mg/kg; SUL 25: grupo tratado com Sulpirida 25mg/kg.

## 5. Discussão

A avaliação da toxicidade materna é fundamental em estudos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento. Os principais indicadores não-invasivos são o ganho de peso corporal e o consumo de ração (Bacchi et al., 2012). O tratamento com Sulpirida, em ambas as doses, não alterou o peso corporal, bem como o consumo de ração das ratas durante o período de lactação. Entretanto, ganho de peso excessivo e obesidade são alguns dos efeitos colaterais do tratamento clínico com drogas antipsicóticas (Baptista et al., 2002) e pesquisas feitas em ratas (Parada et al., 1989; Baptista et al., 2004) confirmam esses achados. É importante observar que nesses estudos, o tratamento não foi realizado no mesmo período do presente trabalho. Sabe-se que a lactação envolve um enorme investimento energético, além de alterações metabólicas (Woodside et al., 2008), podendo justificar a ausência de interferência neste parâmetro.

As vias dopaminérgicas mesolímbica e estriatal influenciam a função motora (O'Connor & Brown, 1982), sendo que os agonistas dopaminérgicos estimulam e os antagonistas inibem esta função. Alguns antipsicóticos, com atividades nos receptores de dopamina, têm como consequência efeitos colaterais extrapiramidais (discinesia e parkinsonismo, entre outros) (Simón et al., 2000). Com relação à Sulpirida, observa-se que somente em altas doses (a partir de 40mg/kg) este fármaco pode comprometer a função motora de ratos adultos (Bruhwyler et al., 1990; Asmakova et al., 1999; Simón et al., 2000). Pode-se sugerir que no presente estudo, as doses utilizadas não foram suficientes causar alterações na atividade motora, tanto nas mães, quanto nos filhotes.

Em relação ao cuidado com a prole, estudos em animais relatam que a dopamina está envolvida no início e manutenção desse comportamento (Bridges et al., 1985; Bridges et al., 1990; Hansen 1994; Lonstein et al., 1998). Numan e colaboradores (2005) verificaram que a administração intracerebroventricular de eticloprida, antagonista dopaminérgico do tipo D2, não afetou o comportamento materno, dado este que corrobora com os resultados do presente estudo. Porém, existem resultados conflitantes na literatura. Um estudo demonstrou prejuízo na recuperação dos filhotes após a administração aguda de pimozida (Silva et al.,2001), que embora tenha alta afinidade para antagonizar receptores de dopamina tipo D2, ainda tem potencial de inibir receptores de opióides (Friedman et al., 2011), os quais também estão envolvidos na regulação do comportamento materno (Teodorov et al. 2008). Por outro lado, o prejuízo na recuperação da ninhada pela administração de clepobride na fase do pós-parto, pode ter ocorrido pela separação mãe-filhote por 15 minutos (Byrnes et al.,2002). Acredita-se que os déficits em recuperar os filhotes podem ser superados pelo aumento do tempo de separação entre mãe e filho (Hansen, 1994), supostamente devido ao fato que o aumento no tempo de separação aumenta a motivação da mãe em recuperá-los (Byrnes et al 2002). Diferentes resultados podem estar relacionados com diferença na metodologia de avaliação do comportamento materno, drogas com perfil farmacológico distinto ou até mesmo na dosagem utilizada.

O comportamento sexual de machos também está presente em duas fases, a inicial, com comportamentos variados que envolvem atrair e cortejar a fêmea, chamada de fase apetitiva, seguida por uma sequência de movimentos

copulatórios estereotipados, chamada de fase consumatória (Canteras, 2011). A dopamina é liberada no núcleo medial pré-óptico antes e durante o acasalamento, facilitando a motivação sexual e a atividade copulatória (Hull & Dominguez, 2006). Essa liberação é regulada pelos hormônios gonadais, principalmente a testosterona, sendo necessária para ativar todos os aspectos do comportamento copulatório (Canteras, 2011). Assim, os níveis de testosterona estão associados com o aumento da atividade dopaminérgica no núcleo medial pré-óptico durante o comportamento sexual de ratos (Hull et al., 1995), o que demonstra a importância de ambos, dopamina e testosterona, na integridade deste comportamento. No presente estudo, o bloqueio de receptores dopaminérgicos pela administração de Sulpirida, durante o desenvolvimento, não comprometeu o comportamento sexual, sugerindo desta forma, que não houve prejuízo das vias dopaminérgicas, além de não interferir no nível plasmático de testosterona na vida adulta.

No presente trabalho a exposição materna à maior dose de Sulpirida levou ao aumento no peso corporal da prole masculina na vida adulta. Assim como no comportamento materno, há dados contraditórios na literatura em relação a este parâmetro. Baptista e colaboradores (1988) demonstraram que o tratamento durante 21 dias (20mg/kg) em ratos machos pré púberes (15 dias de idade) com Sulpirida aumentou o ganho de peso desses animais, e esse aumento perdurou dois meses depois do término do tratamento. Enquanto Parada e colaboradores (1989) mostraram que o tratamento de ratos adultos, com este fármaco, não traz os mesmos efeitos no peso corporal. Desta forma, consideramos que os mecanismos pelo qual a exposição à Sulpirida aumentou o peso corporal não podem ser inferidos neste trabalho e deve ser abordado

em estudos futuros.

Entre os parâmetros que podem ser utilizados na avaliação de efeitos tóxicos no trato reprodutor masculino, está a determinação dos pesos absoluto e relativo do testículo, epidídimo, hipófise, vesícula seminal e próstata (Clegg et al., 2001). Entretanto, considera-se o peso absoluto, uma vez que a diminuição do órgão nem sempre está relacionada com uma diminuição aparente do peso corporal, pois o peso relativo pode não mostrar uma diferença significativa se o peso corporal e do órgão mudar na mesma direção, mascarando os resultados (Collins et al., 1999; Clegg et al., 2001). No presente estudo, foi observado aumento no peso absoluto da próstata ventral dos animais expostos à maior dose de Sulpirida. O aumento no peso da próstata pode estar relacionado com o aumento do peso corporal, porém é importante observar que somente essa glândula sexual acessória estava aumentada. Aumento no peso da próstata também foi demonstrado em animais adultos tratados com Sulpirida (Sánchez et al., 2008) ou Metaclopramida (Sánchez et al., 2012), onde os autores justificaram como sendo a hiperprolactinemia uma das principais causas. Embora não haja relatos na literatura avaliando os efeitos adversos da exposição materna à Sulpirida no sistema reprodutor dos descendentes machos e os níveis de prolactina nos filhotes não tenham sido determinados, a hiperprolactinemia pode ser uma das possíveis explicações para o resultado também encontrado no presente trabalho, pois essa alteração é um dos efeitos colaterais observado em filhotes expostos, via lactação, a drogas antipsicóticas como Sulpirida (Lewis & Howie, 1987; Mishra & Mohanty, 2010). Além disso, as células prostáticas epiteliais de ratos (Van Coppenolle et al., 2001) e humanos (Nevalainen et al., 1997) expressam receptores para prolactina e este hormônio

participa da regulação do crescimento e desenvolvimento normal da próstata, principalmente em animais imaturos (Costello & Franklin, 1994), reforçando o envolvimento da prolactina nos resultados encontrados.

No hipotálamo, a prolactina altera a liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e ainda pode atuar diretamente na hipófise regulando a liberação do hormônio luteinizante (LH) (Henderson et al. 2008). Tem sido demonstrado que o aumento nos níveis de prolactina diminui a secreção de LH em resposta ao GnRH em roedores e humanos (Cheung, 1983) levando indiretamente alterações nas gônadas. No presente estudo, o dano testicular foi demonstrado pela diminuição no peso absoluto na dose de 2,5 mg/kg, bem como alterações morfométricas e histopatológicas em ambas as doses, e um aumento na porcentagem de espermatozoides imóveis e anormais na maior dose. Assim como na próstata, a prolactina tem um papel importante na regulação da função testicular de roedores (Jedlinska et al., 1995) e o aumento nos seus níveis está geralmente associada com a regressão do epitélio seminífero (Jedlinska et al., 1995; Mishra & Mohanty, 2010), deformidades no espermatozoide (Laszczyńska et al., 1992) e diminuição da motilidade espermática (Huang et al., 2008) e em humanos afeta a qualidade do fluido seminal (De Rosa et al., 1998), corroborando com nossos resultados. Entretanto, as alterações histológicas testiculares encontradas foram focais e dispersas, não sendo suficientes para prejudicar a produção espermática diária, bem como, o nível plasmático de testosterona.

Outra explicação para as alterações reprodutivas encontradas poderia ser a ação direta da Sulpirida nos órgãos, pois receptores dopaminérgicos são expressos não somente na hipófise, mas também em alguns órgãos

periféricos, principalmente durante o desenvolvimento (Saifetyarova et al., 2012). Receptores dopaminérgicos do tipo D2 têm sido encontrados na próstata (Sánchez et al., 2008), no testículo (túbulos seminíferos) (Otth et al., 2007) e no espermatozóide (Otth et al., 2007; Ramírez et al., 2009) de ratos . Embora o papel desses receptores ainda seja desconhecido (Otth et al., 2007), a presença deles indica que esses órgãos e células são alvos em potencial tanto para dopamina endógena quanto para drogas antipsicóticas (Ramírez et al., 2009).

## 6. Conclusão

O presente estudo demonstrou que o uso da Sulpirida durante a lactação não causa toxicidade geral e não prejudica o comportamento materno das ratas lactantes, assim como a função motora das ratas e dos filhotes.

Entretanto, a exposição materna à Sulpirida alterou parâmetros relacionados ao sistema reprodutivo da prole masculina, demonstrando que, mesmo durante a lactação, induz alterações que na maioria das vezes só poderão ser identificadas na vida adulta.

Como o aleitamento materno proporciona, além de proximidade entre mãe e bebê, também inúmeros benefícios para a saúde de ambos, é importante estimular essa prática e até mesmo fazer uso de medicamentos para mantê-la quando necessário. Porém, este estudo demonstra a necessidade da realização de novas pesquisas que investiguem a influência da Sulpirida e outros galactagogos no desenvolvimento do sistema reprodutivo da prole, garantindo a segurança destas drogas tanto da mãe quanto dos descendentes.

Além disso, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de analisar os efeitos indiretos da Sulpirida no sistema dopaminérgico durante o desenvolvimento, bem como, o real papel da dopamina no sistema reprodutor.

## 7. Referências

1. Agmo A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. *Behav Neurosci* 2003;117:55-68.
2. Amir LH. Breastfeeding — managing ‘supply’ difficulties. *Aust Fam Physician* 2006; 35(9):686–9.
3. Anderson PO, Valdés V. A critical review of pharmaceutical galactagogues. *Breastfeeding Med* 2007;2(4):229-242.
4. Aono T, Shioji T, Aki T, Hirota K, Nomura A, Kurachi K. Augmentation of puerperal lactation by oral administration of sulpiride. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48(3):478-482.
5. Appendix P, Protocol # 9. Use of Galactagogues in Initiating or Augmenting Maternal Milk Supply. In Lawrence RA, Lawrence RM, editors. *Breastfeeding, 7<sup>th</sup> Edition A Guide for the Medical Professional*. USA: Elsevier; 2011 p.1015-1019.
6. Asmakova LS, Kalinina TS, Ostrovskaya RU, Gudasheva TA, Zaitseva NI, Bondarenko NA, et al. Comparison of antipsychotic activity and discriminative stimulus effects of the novel acylprolyltyrosine containing compound, GZR-123, and sulpiride. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;64(2):359-62.
7. Bacchi AD, Ponte B, Vieira ML, De Paula JCC, Mesquita SFP, Gerardin DCC et al. Developmental exposure to *Passiflora incarnata* induces behavioral alterations in the male progeny. *Reprod Fertil Dev* 2012 *epud ahead of print*.
8. Baptista T, Araujo de Baptista E, Ying Kin NM, Beaulieu S, Walker D, Joobar R, et al. Comparative effects of the antipsychotics sulpiride or risperidone in rats. I: bodyweight, food intake, body composition, hormones and glucose tolerance. *Brain Res* 2002;957(1):144-51.
9. Baptista T, de Baptista EA, Lalonde J, Plamondon J, Kin NM, Beaulieu S et al. Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28(8):1305-11.
10. Baptista T, Parada MA, Murzi E. Puberty modifies effects on body weight in rats. *Neurosc Lett* 1988;92:161-64
11. Bridges RS, DiBiase R, Loundes DD, Doherty PC. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 1985;227:782-4.
12. Bridges RS, Numan M, Ronshein PM, Mann PE, Lupini CE. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(20):8003-7.
13. Broadhurst, PL. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk, HJ, editor. *Experiments in personality*. London: Rutledge and Kegan Paul; 1960, p. 31-61.
14. Bruhwylér J, Chleide E, Liégeois JF, Delarge J, Mercier M. Anxiolytic potential of sulpiride, clozapine and derivatives in the open-field test.

- Pharmacol Biochem Behav 1990;36(1):57-61.
15. Byrnes EM, Rigerio BA, Bridges RS. Dopamine antagonists during parturition disrupt maternal care and the retention of maternal behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73(4):869-75.
  16. Caley CF, Weber SS. Sulpiride: an antipsychotic with selective dopaminergic antagonist properties. *Ann Pharmacother* 1995;29:152-60
  17. Canteras N. Hypotalamic Goal-directed Behavior-Ingestive, Reproductive and Defensive. In: Watson C et. al. editors. *The Mouse Nervous System*. USA: Academic Press; 2011 p. 538-61.
  18. Chaves RG, Lamounier JA, Santiago LB, Vieira, G. O. Uso de galactogogos na prática clínica para manejo do aleitamento materno. *Med Minas Gerais*, 2008;18(1):S146-53.
  19. Cheung CY. Prolactin suppresses luteinizing hormone secretion and pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone by a direct action at the anterior pituitary. *Endocrinology* 1983;113:632–8.
  20. Clegg ED, Perreault D, Klinefelter GR. Assessment of male reproductive toxicity. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis; 2001 p. 1263–300.
  21. Collins TFX, Sprando RL, Shackelford ME, Hansen DK, Welsh JJ. Food and drug administration proposed testing guidelines for reproduction studies. *Reg Toxicol Pharm* 1999;30:29–38.
  22. Costello LC, Franklin RB. Effect of prolactin on prostate. *Prostate* 1994; 24:162-6.
  23. De Rosa M, Colao A, Di Sarno A, Ferone D, Landi ML, Zarrilli S, et al. Cabergoline treatment rapidly improves gonadal function in hyperprolactinemic males: a comparison with bromocriptine. *Eur J Endocrinol* 1998;138(3):286-93.
  24. Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CD, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. Reproductive effects in male exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 2007;23(1):106-12.
  25. Filler R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: Chapin RE, Heindel JH, editors. *Male reproductive toxicology*. San Diego, CA: Academic Press Inc.; 1993. p. 334–43.
  26. França LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium, cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003;68:1554–61.
  27. Friedman JI, Lindenmayer JP, Alcantara F, Bowler S, Parak M, White L, et al. Pimozide augmentation of clozapine inpatients with schizophrenia and schizoaffective disorder unresponsive to clozapine monotherapy. *Neuropsychopharmacology* 2011;36(6):1289-95.
  28. Gabay MP. Galactogogues: Medications that induce lactation. *J Hum Lact* 2002;18:274-9.

29. Gallavan RH Jr, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol* 1999;13(5):383-90
30. Gerardin DCC, Bernardi MM, Moreira EG, Pereira OCM. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;83:618-23.
31. Hallbauer U. Sulpiride (Eglonyl)-use to stimulate lactation. *S Afr Med J* 1997; 87(6):774-5.
32. Hansen S. Maternal behavior of female rats with 6-OHDA lesions in the ventral striatum: characterization of the pup retrieval deficit. *Physiol Behav* 1994; 55: 615-20.
33. Henderson HL, Townsend J, Tortonesi DJ. Direct effects of prolactin and dopamine on the gonadotroph response to GnRH. *J Endocrinol* 2008;197(2): 343-50.
34. Huang WJ, Wang PS, Yeh JY. The effect of hyperprolactinemia on epididymal sperm motility in rats. *Fertil Steril* 2008;90:S313.
35. Hull EM, Dominguez JM. Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res* 2006; 1126:66–75.
36. Hull EM, Du J, Lorrain DS, Matuszewich L. Extracellular dopamine in the medial preoptic area: implications for sexual motivation and hormonal control of copulation. *J Neurosci* 1995;15:7465–71.
37. Jedlinska M, Rozewiecka L, Ziecik AJ. Effect of hypoprolactinaemia and hyperprolactinaemia on LH secretion, endocrine function of testes and structure of seminiferous tubules in boars. *J Reprod Fertil* 1995;103:265-72.
38. Katzung BG. *Farmacologia Básica & Clínica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006.
39. Ladyman SR, Woodside B. Regulation of maternal food intake and mother–pup interactions by the Y5 receptor. *Physiol Behav* 2009;97:91-7.
40. Lasich AJ. Sulpiride and breastfeeding. *Afr Med J* 2005;95(9):624-6.
41. Laszczyńska M, Rózewicka L, Kuchnio M, Piasecka M, Marchlewicz M. Evaluation of spermatozoa of rat in hyperprolactinaemia induced by Metoclopramide. *Andrologia* 1992;24(2):101-8.
42. Lau C, Henning SJ. Investigation of the nature of the “stretch response” in suckling rats. *Physiol Behav* 1985;34:649-51.
43. Lewis M, Howie PW. Induction of transient hyperprolactinaemia in neonatal rats by direct or maternal treatment with the dopamine receptor blocker, sulpirida. *Acta Endocrinol* 1987;115:357-64.
44. Lonstein JS, Morrell JI. Neuroendocrinology and neurochemistry of maternal motivation and behavior. In: Blaustein, JA, editor. *Behavioral Neurochemistry and Neuroendocrinology*, Vol. XIV. Berlin: Springer-Verlag; 2007, p. 954.

45. Lonstein JS, Simmons DA, Swann JM, Stern JM. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience* 1998;82:267-81.
46. Millan MJ, Seguin L, Gobert A, Cussac D, Brocco M. The role of dopamine D3 compared with D2 receptors in the control of locomotor activity: a combined behavioural and neurochemical analysis with novel, selective antagonists in rats. *Psychopharmacology* 2004;174(3):341-57.
47. Miller SM, Lonstein JS. Dopamine d1 and d2 receptor antagonism in the preoptic area produces different effects on maternal behavior in lactating rats. *Behav Neurosci* 2005;119:1072–83.
48. Mishra AC, Mohanty B. Lactational exposure to atypical antipsychotic drugs disrupts the pituitary-testicular axis in mice neonates during post-natal development. *J Psychopharmacol* 2010; 24(7):1097–104.
49. Moreira EG, Vassilieff I, Vassilieff VS. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol Teratol* 2001;23:489-95.
50. Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen, PM, Harkonen PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest* 1997;99:618–27.
51. Numan M, Fleming AS, Levy F. Maternal behavior. In: Neil JD et al., editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3th Edition. USA: Elsevier; 2005, p.1921-93.
52. Numan M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behav Cogn Neurosci Rev* 2006;5:163-90.
53. Numan M, Numan MJ, Pliakou N, Stolzenberg DS, Mullins OJ, Murphy JM, et al. The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 2005;119(6):1588-604.
54. O'Connor SE, Brown RA. The pharmacology of sulpiride - a dopamine receptor antagonist. *Gen Pharmacol* 1982;13(3):185-93.
55. Ottoni, E.B., EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput*, 2000;32(3) : 446-9.
56. Otth C, Torres M, Ramírez A, Fernandez JC, Castro M, Rauch MC, et al. Novel identification of peripheral dopaminergic D2 receptor in male germ cells. *J Cell Biochem* 2007;100(1):141-50.
57. Parada MA, Hernandez L, Paez X, Baptista T, Puig de Parada M, de Quijada M. Mechanism of the body weight increase induced by systemic sulpiride. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;33(1):45-50.
58. Perobelli JE, Martinez MF, Franchi CAS, Fernandez CDB, Camargo JLV, Kempinas WG. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A* 2010;73(13):991–1002.

59. Ramírez AR, Castro MA, Angulo C, Ramió L, Rivera MM, Torres M, et al. The presence and function of dopamine type 2 receptors in boar sperm: a possible role for dopamine in viability, capacitation, and modulation of sperm motility. *Biol Reprod* 2009;80:753-61.
60. Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978;54(1):103-7.
61. Saifetyarova YY, Saprónova AY, Ugryumov MV. Endocrine function of dopaminergic neurons of the whole rat brain in ontogeny: control of prolactin secretion. *Dokl Biol Sci* 2012;443(6):753-6.
62. Sánchez P, Torres JM, Castro B, Frías JF, Ortega E. Effects of metoclopramide on mRNA levels of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes in prostate of adult rats. *J Physiol Biochem* 2012 Jul 18 *in press*.
63. Sánchez P, Torres JM, Vílchez P, Del Moral RG, Ortega E. Effects of sulpiride on mRNA levels of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes in prostate of adult rats. *IUBMB Life* 2008;60(1):68-72.
64. Schaefer C. Psychotropic Drugs. In: Schaefer C, Peters PWJ, Miller RK, editors. *Drugs During Pregnancy and Lactation, 2th Edition —Treatment options and risk assessment*. United Kingdom: Academic Press; 2007, p. 708–37.
65. Seed J, Chapi RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RE, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol* 1996;10(3):237-44.
66. Silva MR, Bernardi MM, Felício LF. Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;68(3):461-8.
67. Simón VM, Parra A, Miñarro J, Arenas MC, Vinader-Caerols C, Aguilar MA. Predicting how equipotent doses of chlorpromazine, haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000;10(3):159-64.
68. Stolzenberg DS, Numan M. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35(3):826-47.
69. Teodorov E, Tomita AT, Banon GP, Gil IG, Bernardi MM, Felício LF. Behavioral effects of acute stimulation of kappa-opioid receptors during lactation. *Pharmacol Biochem Behav*.2008;90(4):534-9.
70. Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F, Le Bourhis X, Ahidouch A, Croix D, et al. Effects of hiperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280 (1): E120-9.
71. Woodside B, Augustine RA, Ladyman SR, Naef L, Grattan DR .Role of prolactin in the metabolic adaptations to pregnancy and lactation. In: R.S. Bridges, editor. *Neurobiology of the Parental Mind*. USA: Elsevier; 2008 p. 249-68.

72. Zuppa AA, Sindico P, Orchi C, Carducci C, Cardiello V, Romagnoli C, Catenazzi P. Safety and Efficacy of Galactogogues: Substances that Induce, Maintain and Increase Breast Milk Production. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2010;13(2):162–74.