



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**EFEITOS DO TRATAMENTO REPETIDO COM
METILFENIDATO SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS
EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**

Londrina

2014



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**EFEITOS DO TRATAMENTO REPETIDO COM
METILFENIDATO SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS
EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**

Londrina – PR

2014

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**EFEITOS DO TRATAMENTO REPETIDO COM
METILFENIDATO SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS
EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**

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^ª Dr^ª Daniela Cristina Ceccatto Gerardin

Londrina

2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M758e Montagnini, Bruno Garcia.

Efeitos do tratamento repetido com Metilfenidato sobre parâmetros reprodutivos em ratos machos e fêmeas / Bruno Garcia Montagnini. – Londrina, 2014.
62 f. : il.

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, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Medicamentos – Efeito fisiológico – Teses. 2. Dopamina – Teses. 3. Fecundidade – Efeito das drogas – Teses. 4. Reprodução humana – Teses. 5. 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.

CDU 612:615

BRUNO GARCIA MONTAGNINI

**EFEITOS DO TRATAMENTO REPETIDO COM METILFENIDATO
SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM RATOS MACHOS E
FÊMEAS**

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: Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto
Gerardin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 20 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, aos que sempre pude contar com apoio e carinho, por mais que a vida nos distancie. Aos meus pais, que sempre deram o bom exemplo, honestidade, caráter e amor acima de tudo. Agradeço pela compreensão e ajuda que tive e sei que sempre terei.

Agradeço à minha noiva, Claudia, sem a qual nada valeria a pena.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Daniela. Excelente educadora que contribuiu de forma excepcional com minha formação nessa etapa. Sou grato pela paciência, dedicação e boa vontade.

Agradeço à Prof^a Estefânia, Prof^a Suzana e Prof^a Glaura, pelas valiosas contribuições nas metodologias empregadas nesse trabalho. Agradeço também a Prof^a Janete, da USP Ribeirão Preto, que ajudou com recursos para as análises hormonais.

Agradeço as colegas e amigas de trabalho, pela convivência e pela colaboração para a conclusão deste trabalho: Milene, Alice, Nathália Camin, Nathália Orlandin, Luiza, Sara, Kennia, Bruna, Marina, Vanessa e Aline.

Agradeço aos amigos, e em especial aos amigos de infância, Gabriel e Marina, como irmãos para mim. E também aos companheiros de música: Ageu Caetano, Giuliano Pelaquin, Rodrigo Viana e Júlio Ricardo.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado e a todas as pessoas que não foram aqui citadas, que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

E por fim, agradeço a Deus por todas as bênçãos.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

MONTAGNINI, Bruno Garcia . **Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato sobre parâmetros reprodutivos em ratos machos e fêmeas**. 2014.62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O Metilfenidato (MFD) é um estimulante do sistema nervoso central que atua pelo bloqueio da recaptação de dopamina e noradrenalina, sendo o principal fármaco utilizado no tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade em crianças e adolescentes. Durante a puberdade, mudanças nos sistemas de neurotransmissores (incluindo o sistema dopaminérgico) influenciam a liberação de hormônios gonadais e no desenvolvimento de estruturas encefálicas que serão responsáveis pela função reprodutiva. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento repetido com MFD durante o desenvolvimento sobre parâmetros reprodutivos em ratos machos e fêmeas adultos. Ratos Wistar receberam MFD, via gavagem, nas doses de 2,5 mg/kg/dia e 5,0 mg/kg/dia, a partir do dia pós-natal (DPN) 21 ao DPN 60, além do grupo controle que recebeu água destilada nos mesmos períodos. Ao longo do tratamento, foram observados nos animais: peso corporal, distância anogenital e instalação da puberdade. Após o tratamento foi observado nas fêmeas: ciclo estral, concentração plasmática de estradiol, peso dos órgãos reprodutivos, comportamento sexual, comportamento materno e teste de fertilidade; enquanto que nos machos adultos, foram observados: concentração plasmática de testosterona, peso dos órgãos reprodutivos, motilidade, viabilidade e morfologia espermática, histomorfometria testicular, comportamento copulatório e de preferência sexual. O tratamento com MFD não afetou nenhum dos parâmetros analisados nas fêmeas. No entanto, nos machos adultos (DPN 100), ocorreu um aumento no percentual de espermatozoides com anormalidades de cauda e no volume do tecido intersticial no testículo, além de mudanças na população de células germinativas. Este trabalho demonstrou que a administração repetida de MFD, durante períodos correspondentes a infância até início da vida adulta, interferiu na espermatogênese em ratos.

Palavras-chaves: Metilfenidato. Dopamina. Função reprodutiva. Fertilidade. Comportamento reprodutivo.

MONTAGNINI, Bruno Garcia . **Effects of repeated treatment with methylphenidate on reproductive parameters in male and female rats.** 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Methylphenidate is a stimulant of the central nervous system with acts by blocking the reuptake of dopamine and norepinephrine and is the main drug used to treat Attention Deficit Disorder and Hyperactivity in children and adolescents. During puberty, changes in neurotransmitter systems (including dopaminergic system) are engaged on the release of gonadal hormones and the development of cephalic structures responsible for reproductive function. This study investigated the effects of repeated treatment with Methylphenidate during development on reproductive parameters of adult male and female rats. Wistar rats received Methylphenidate, via gavage, at doses of 2.5 mg/kg/day and 5.0 mg/kg/day from post-natal day (PND) 21 to PND 60, and the control group received distilled water in the same periods. Throughout the treatment, body weight, anogenital distance, and puberty initiation were observed. In adult females, the estrous cycle, estradiol plasmatic level, weight of reproductive organs, sexual and maternal behavior and fertility assay were observed. In adult males, testosterone plasmatic level, weight of reproductive organs, sperm motility, viability and morphology, histomorphology of the testis, copulatory behavior and sexual incentive motivation test were observed. The treatment with Methylphenidate did not affect any of the parameters analyzed in females. However, in adult males (PND 100), it was observed an increased in spermatozoa with tail abnormalities and in the volume of interstitial tissue in the testis, as well as changes in germ cell population. This study demonstrated that repeated administration of Methylphenidate during periods corresponding childhood to early adulthood interfered on testicular function in rats at adult life.

Keywords: Methylphenidate. Dopamine. Reproductive function. Fertility. Reproductive behavior.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	12
3.2	ANIMAIS E TRATAMENTO	12
3.3	PARÂMETROS ANALISADOS EM MACHOS E FÊMEAS DURANTE O TRATAMENTO	14
3.3.1	Peso Corporal	14
3.3.2	Desenvolvimento Físico	14
3.4	PARÂMETROS ANALISADOS NA VIDA ADULTA (DPN 90-100).....	15
3.4.1	Fêmeas	15
3.4.1.1	Desenvolvimento reprodutivo	15
3.4.2	Machos	18
3.4.2.1	Desenvolvimento reprodutivo	18
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4	RESULTADOS	29
4.1	PARÂMETROS ANALISADOS NAS FÊMEAS	29
4.1.1	Peso Corporal e Desenvolvimento Físico.....	29
4.1.2	Parâmetros Reprodutivos Analisados no DPN 90-100	30
4.1.2.1	Avaliação do ciclo estral	30
4.1.2.2	Peso corporal e de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de estradiol	31
4.1.2.3	Comportamento sexual	33
4.1.2.4	Comportamento materno	33
4.2	PARÂMETROS ANALISADOS NOS MACHOS.....	34
4.2.1	Peso Corporal e Desenvolvimento Físico.....	34
4.2.2	Parâmetros Reprodutivos Analisados no DPN 100	35
4.2.2.1	Peso corporal e de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona	35
4.2.2.2	Parâmetros espermáticos	36
4.2.2.3	Parâmetros histomorfométricos de testículo	38
4.2.2.4	Comportamento copulatório e preferência sexual	41
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é caracterizado por sintomas proeminentes de desatenção podendo estar combinados ou não com hiperatividade e impulsividade. De acordo com DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), subtipos são apresentados com base na predominância dos sintomas: desatenção predominante, hiperatividade/impulsividade predominante, e forma combinada. É uma desordem geralmente diagnosticada na infância, com prevalência mundial relativamente alta, variando de 2,2% a 17,8% (SKOUNTI; PHILALITHIS; GALANAKIS, 2007). No Brasil, a incidência em crianças e adolescentes pode variar de 10,1% a 17,1% (VASCONCELOS et al. 2003; FONTANA et al, 2007).

Embora os mecanismos neurobiológicos no desenvolvimento do TDAH ainda não estejam bem esclarecidos, o papel da sinalização dopaminérgica e noradrenérgica é amplamente discutido na literatura (ARNSTEN, 2006; ENGERT, PRUESSNER, 2008; GOLD et al., 2014). Ambas as catecolaminas desempenham um papel fundamental nas funções executivas do córtex pré-frontal, muitas vezes deficiente em pacientes com TDAH (DEL CAMPO et al. 2011). Sabe-se que diversas variantes genéticas estão relacionadas com a etiologia do TDAH (THAPAR et al., 2013), com uma contribuição genética de 77% de hereditariedade (BIEDERMAN, 2005). Outros fatores ambientais, tais como baixo peso ao nascer, prematuridade e exposição intra-uterina ao tabaco também estão fortemente ligados com o desenvolvimento da doença (THAPAR et al., 2013).

Estudos longitudinais relatam que os sintomas da TDAH infantil podem permanecer até a maturidade com uma margem de persistência que chega a superar 60% das crianças diagnosticadas (BARKLEY et al., 2002; MANNUZZA et al., 1998; RASMUSSEN; GILLBERG, 2000). Mesmo tendo sido estabelecido como um transtorno comumente

manifestado durante a infância, o TDAH também pode acometer indivíduos adultos, mostrando uma prevalência de 2,5% nesta população (SIMON et al., 2009).

O tratamento com psicoestimulantes tem-se mostrado bastante efetivo na diminuição dos sintomas do TDAH (CAMPBELL; RANDALL, 1977) e por melhorar a atenção, são utilizados em crianças desde a década de 30 (BRADLEY, 1937). Dentre os psicoestimulantes, o Metilfenidato é o principal agente farmacológico, prescrito no tratamento de TDAH (BOLAÑOS et al., 2003).

Estimulante do sistema nervoso central, o Metilfenidato atua pelo bloqueio dos transportadores responsáveis pela recaptação de dopamina e noradrenalina no encéfalo, aumentando a oferta desses neurotransmissores na fenda sináptica (BECKMAN et al., 2008; CASTLE et al., 2007; GUMY; HUISSOUD; DUBOIS-ARBER, 2010; PEREIRA; DEL BEL, 2010; VOLKOW et al., 1999). Contudo, este fármaco parece atuar de modo mais específico sobre o sistema dopaminérgico, em comparação a outros psicoestimulantes como a anfetamina, que também interage sobre os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (KUCZENSKI; SEGAL, 1997; STAHL, 2006; UNIS et al., 1985).

Ao longo do desenvolvimento, desde a gestação até os períodos da adolescência, ocorrem importantes mudanças na arquitetura e plasticidade cerebral, mudanças estas que podem ser influenciadas por fármacos psicoestimulantes (ANDERSEN, 2003; BUTZ; WORGOTTER; VAN OUYEN, 2009; GIEDD et al., 2009). Dados na literatura demonstraram que o tratamento precoce com Metilfenidato pode resultar em danos neurais e alterações comportamentais, como diminuição da neurogênese hipocampal (LAGACE et al., 2006) e perda da sensibilidade a estímulos de recompensa (BOLAÑOS et al., 2003), como visto em ratos tratados do 20º ao 35º dia de idade na dose de 2mg/kg (ip), duas vezes ao dia.

É bem estabelecido que a maturação sexual e o início da puberdade em ratos envolvem mudanças qualitativas e quantitativas sobre os sistemas de neurotransmissores (incluindo o

sistema dopaminérgico) atuando na modulação da secreção de GnRH e seus efeitos sobre a ação e liberação de LH e FSH (DE VRIES, 1990; GENAZZANI et al., 2000; MAFFUCI; GORE, 2009). Durante o período perinatal, existe uma primeira janela de neurodesenvolvimento importante para o estabelecimento da função reprodutiva, onde o hipotálamo é sensível à presença de hormônios gonadais, período este denominado de organizacional. Na puberdade, por sua vez, apresenta um segundo período, ativacional, no qual, influenciado pelo ambiente, experiências ou estressores, os hormônios sexuais moldam, por fim, estruturas encefálicas que serão responsáveis pela função reprodutiva e comportamento sexual (BEYER; FEDER, 1987; WADDEL; McCARTHY, 2012).

Desse modo, enquanto os hormônios esteroidais são frequentemente relacionados como necessários para estimular o hipotálamo, regulando o comportamento reprodutivo na vida adulta, evidências também sugerem a interação dopamina-esteróide nessa regulação. Um dos mecanismos pelos quais o estradiol ativa o comportamento sexual masculino é através da potencialização da atividade dopaminérgica na área pré-óptica hipotalâmica (CLANCY; ZUMPE; MICHAEL, 2000). Além disso, no hipotálamo, o estradiol tem sido encontrado agindo em conjunto com a dopamina através da ativação de vias de sinalização intracelulares para estimular o comportamento sexual feminino (STOLZENBERG; NUMAN, 2011).

Contudo, apesar da eficácia do Metilfenidato na redução dos sintomas do TDAH (GREENHILL et al., 2006), pouco se sabe a respeito dos efeitos que o tratamento, durante o desenvolvimento do organismo, pode causar sobre a função reprodutiva e ainda, se as alterações podem persistir após o término do tratamento. Dessa forma, a administração repetida de Metilfenidato durante os períodos críticos do desenvolvimento encefálico é preocupante, pois aumenta a disponibilidade de dopamina na fenda sináptica, a qual parece estar envolvida em ambos os efeitos organizacionais e ativacionais sobre a função reprodutiva (HULL et al., 1998).

Assim, considerando 1) que o TDAH é uma doença que acomete uma grande porcentagem de crianças e adolescentes; 2) que o Metilfenidato, comumente prescrito no tratamento do TDHA, é um inibidor da recaptura de dopamina, neurotransmissor este, envolvido na regulação e manutenção de comportamentos reprodutivos; 3) os potenciais efeitos em longo prazo que este fármaco pode desempenhar sobre o comportamento e na função cerebral; e 4) a escassez de estudos que avaliem os efeitos persistentes relacionados à função reprodutiva; o presente estudo justifica-se pela busca de possíveis alterações morfofuncionais desencadeadas no sistema reprodutor pela administração repetida de Metilfenidato em ratos machos e fêmeas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse estudo foi conduzido em ratos machos e fêmeas com o propósito de avaliar se a administração repetida com Metilfenidato em períodos correspondentes a infância até início da vida adulta (MARCO et al., 2011) pode resultar em alterações sobre a função reprodutiva, mesmo após o término do tratamento.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

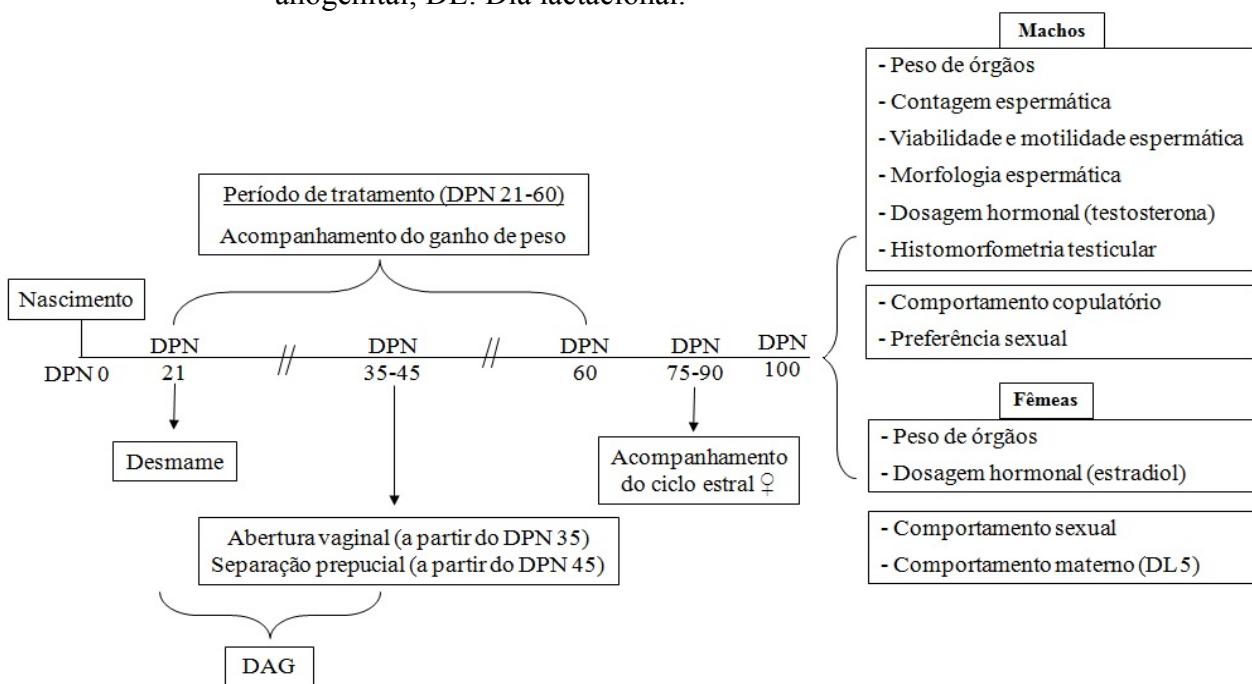
- Avaliar a instalação da puberdade verificada pelo dia da abertura vaginal, nas fêmeas, e pelo dia da separação prepucial, nos machos;
- Nas fêmeas, avaliar a função reprodutiva por meio do acompanhamento do ciclo estral, peso de órgãos reprodutivos e dosagem hormonal (estradiol);
- Nos machos, avaliar a função reprodutiva por meio do peso de órgãos reprodutivos, dosagem hormonal (testosterona), parâmetros espermáticos e histomorfometria testicular;
- Avaliar o comportamento sexual e materno, nas fêmeas, e comportamento copulatório e de preferência sexual, nos machos.

3 MATERIAL 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; DL: Dia lactacional.



3.2 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados ratos albinos Wistar (DPN 85-90), machos e fêmeas, 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 $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvilab®, Colombo, PR) à vontade.

Para o acasalamento, foi colocado um macho para cada duas fêmeas em cada gaiola ao final da tarde. 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 observado, ao microscópio óptico, a presença de espermatozoides e células características da fase estro nas lâminas do esfregaço. Esse dia foi considerado como primeiro dia de prenhez, ocasião em que as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o dia pós-natal (DPN) 0, sendo que no DPN 1, o número de filhotes em cada ninhada foi reduzido para oito (4 machos e 4 fêmeas, quando possível) 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 DPN 21, ocasião em que ocorreu o desmame. Os filhotes foram separados em três grupos, sendo que apenas um único filhote por ninhada de cada gênero foi utilizado para compor cada grupo:

- Grupo controle (CTR): Filhotes (26 machos e 28 fêmeas) receberam, por gavage, água destilada, a partir DPN 21 até o DPN 60.

- Grupo Metilfenidato (MFD) 2,5: Filhotes (26 machos e 20 fêmeas) receberam, por gavage, MFD na dose de 2,5 mg/kg/dia, a partir DPN 21 até o DPN 60.

- Grupo Metilfenidato (MFD) 5,0: Filhotes (26 machos e 22 fêmeas) receberam, por gavage, MFD na dose de 5,0 mg/kg/dia, a partir DPN 21 até o DPN 60.

O tratamento foi feito uma vez ao dia, obedecendo sempre a mesma rotina de horários de administração (entre 16:00 e 18:00 h). Os comprimidos de Metilfenidato (Ritalina®, Novartis) foram macerados e dissolvidos em água destilada (BETHANCOURT; VÁSQUEZ; BRITTON, 2011) momentos antes do tratamento.

Em crianças, a dose efetiva de Metilfenidato para tratamento do TDAH é de 0,3 a 1,0 mg/kg por dia (SOLANTO, 2000). Foi aplicado o ajuste de dose utilizando a escala $BW^{3/4}$

(ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006) adotando os valores aproximados para os pesos de uma criança com 6 anos de idade (30 kg) e o de um rato recém desmamado (30 g). Desse modo, a dose equivalente em ratos corresponde, aproximadamente, a valores entre 1,7 e 5,5 mg/kg. A dose de 5,0 mg/kg, se aproxima portanto, da dose terapêutica máxima utilizada em humanos, além disso, já é descrito na literatura que esta dose em ratos não compromete o ganho de peso ao longo do tratamento (BECKMAN et al., 2008).

Todos os procedimentos nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA 16381.2012.45).

3.3 PARÂMETROS ANALISADOS EM MACHOS E FÊMEAS DURANTE O TRATAMENTO (DPN 21-60)

3.3.1 Peso Corporal

Embora os animais tenham sido pesados diariamente, para processamento estatístico foram utilizados os dados obtidos a cada três dias a partir do DPN 21 (DPN 21, 24, 27, 30, etc) até o fim do tratamento (DPN 60). Também foram observados sinais gerais de toxicidade como lacrimejamento, piloereção, tremores e padrão respiratório anormal.

3.3.2 Desenvolvimento Físico

A distância anogenital (DAG, distância do ânus até o tubérculo genital) foi obtida semanalmente, através de um paquímetro, até a ocorrência da abertura vaginal ou do descolamento do prepúcio. A DAG foi normalizada por sua divisão pela raiz cúbica do peso corporal (GALLAVAN et al., 1999). A abertura vaginal (CTR n=28/ MFD 2,5 n=20/ MFD

5,0 n=22) foi observada a partir do DPN 30 e a separação precocial (CTR n=26/ MFD 2,5 n=26/ MFD 5,0 n=26) a partir do DPN 45, para a determinação da instalação da puberdade.

3.4 PARÂMETROS REPRODUTIVOS ANALISADOS NA VIDA ADULTA (DPN 90-100)

3.4.1 Fêmeas

3.4.1.1 Desenvolvimento reprodutivo

Para a avaliação da função reprodutiva, cada grupo (CTR, MFD 2,5 e MFD 5,0) foi dividido em dois subgrupos (*A* e *B*). O subgrupo *A*, designado para acompanhamento do ciclo estral, peso dos órgãos reprodutivos (CTR n=14/ MFD 2,5 n=10/ MFD 5,0 n=10) e dosagem hormonal (n=10/grupo), e o subgrupo *B*, para avaliação comportamental e fertilidade (CTR n=14/ MFD 2,5 n=10/ MFD 5,0 n=12).

A.1. Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral, das ratas da linhagem utilizada no presente trabalho, dura de 4 a 5 dias (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). O ciclo estral foi acompanhado durante 15 dias a partir do DPN 75, sempre no mesmo horário. Foram coletadas células da mucosa vaginal com auxílio de cotonete, previamente embebido em solução fisiológica. O material foi espalhado numa lâmina, umedecido com uma gota de salina e observado ao microscópio óptico para identificação da fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro). Os coeficientes de estro, diestro/metaestro e proestro 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.2. Concentração plasmática de estradiol durante a fase de estro e retirada dos órgãos reprodutivos

Após o término do acompanhamento do ciclo estral (DPN 90) e durante a fase de estro, as fêmeas foram pesadas, anestesiadas com éter etílico e submetidas à laparotomia. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal em seringas heparinizadas. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 2°C) e o plasma congelado a -20°C para posterior análise. A concentração plasmática de estradiol foi obtida por radioimunoensaio usando 17 β -Estradiol (E2) Double Antibody RIA Kit (MP Biomedicals, Orangeburg, NY), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em duplicata onde o coeficiente de variação intra e inter-ensaio foram respectivamente 2,5% e 7,0%, e a concentração mínima detectável foi de 1,2 pg/ml.

Os órgãos reprodutivos, ovários e útero (com fluido), foram removidos e dissecados. Após secagem em papel de filtro, foram determinados os respectivos pesos úmidos, empregando-se balança analítica.

B.1. Avaliação comportamental sexual

A análise do comportamento sexual feminino seguiu a metodologia proposta por Felicio e Nasello (1989). Quinze dias antes da análise comportamental, os animais foram transferidos para o biotério com ciclo claro/escuro de 12x12 horas invertido, com controle de luminosidade, ruído e temperatura, para a perfeita adaptação das funções fisiológicas. No dia do experimento, foram coletadas células da mucosa vaginal 3 a 4 horas antes do início dos testes. Foram utilizadas apenas as fêmeas na fase de proesto e machos sexualmente

experientes. O teste comportamental foi filmado e analisado por um experimentador localizado fora do biotério de ciclo de luz invertida. Inicialmente, um rato macho foi colocado na gaiola de observação (caixa de policarbonato), onde permaneceu por pelo menos 10 min para adaptação. Em seguida, foi introduzida na mesma caixa a fêmea e o teste durou até que 10 montas tenham sido observadas (RAMIREZ; CARRER et al., 1979). Foram avaliados o coeficiente de lordose ($LQ = [\text{número de lordoses}/10 \text{ montas}] \times 100$) (BEACH, 1976) e também a frequência de cada grau de lordose, pontuada numa escala de 0 a 3 (em que 0 é classificado como ausência de lordose e 3 como lordose máxima), para calcular o escore de lordose (número total de pontos da lordose/número total de respostas da lordose) (HARDY; DEBOLD, 1971).

B.2. Comportamento Materno

Após a análise do comportamento sexual (item *B.1.*), as fêmeas permaneceram à noite com o rato e na manhã seguinte foram separadas em gaiolas individuais. As ratas que estavam prenhes (100%) foram utilizadas para análise do comportamento materno. Este comportamento foi analisado no dia lactacional (DL) 5 como descrito em Kiss et al. (2012). O teste foi filmado e analisado posteriormente. Esta metodologia foi realizada pela remoção da rata da caixa moradia e pela destruição do ninho. Após 30 min, os filhotes foram espalhados pela caixa, a rata reinsertida na gaiola e a interação mãe-filhote analisada por 30 min utilizando o programa EthoLog software (OTTONI, 2000). Foram observados: o tempo para recuperação da ninhada completa, tempo agrupando os filhotes, tempo gasto com a limpeza dos filhotes, tempo fora do ninho e tempo construindo ninho.

3.4.2 Machos

3.4.2.1 Desenvolvimento reprodutivo

Para a avaliação da função reprodutiva dos machos, cada grupo (CTR, MFD 2,5 e MFD 5,0) foi dividido em dois subgrupos (*C* e *D*). O subgrupo *C*, designado para dosagem hormonal (CTR n=10/ MFD 2,5 n=11/ MFD 5,0 n=12), peso dos órgãos reprodutivos, parâmetros espermáticos (CTR n=15/ MFD 2,5 n=15/ MFD 5,0 n=14) e histomorfometria testicular (CTR n=14/ MFD 2,5 n=14/ MFD 5,0 n=11), e o subgrupo *D*, para avaliação do comportamento sexual (copulatório e preferência sexual) (CTR n=11/ MFD 2,5 n=11/ MFD 5,0 n=12).

C.1. Concentração plasmática de testosterona e retirada dos órgãos reprodutivos

Animais dos grupos experimentais foram pesados, anestesiados com éter etílico e submetidos à laparotomia. Amostras de sangue foram coletadas da artéria aorta abdominal em seringas contendo heparina, sempre no mesmo horário. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 2°C) e o plasma congelado a -20°C para posterior análise. A concentração plasmática de testosterona foi obtida por radioensaio usando ImmuChem™ Double Antibody ¹²⁵I RIA Kit (MP Biomedicals, Orangeburg, NY) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em um mesmo ensaio onde o coeficiente de variação intra-ensaio e sensibilidade foram 10,1% e 0,035ng/ml respectivamente.

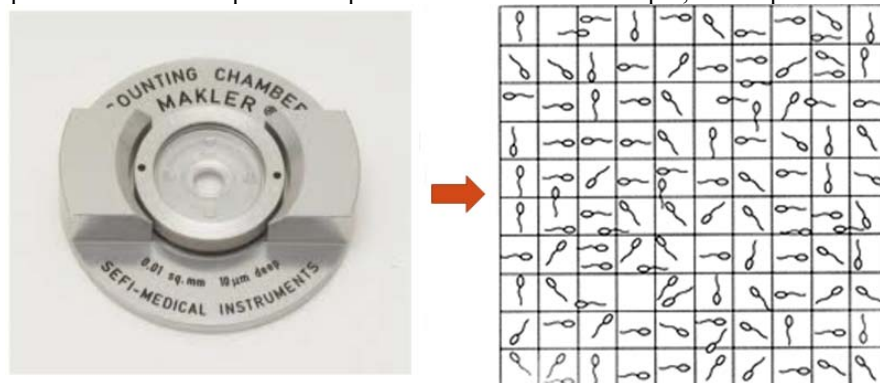
Após a coleta de sangue, os ductos deferentes direito e esquerdo foram retirados para análise de motilidade e viabilidade espermática (descrição item *C.2.* e *C.3.*) e morfologia de espermatozoides (*C.4.*). Os órgãos da reprodução (testículos, epidídimos, vesícula seminal

com secreção e sem secreção e próstata ventral) foram identificados, removidos e dissecados. Após secagem em papel de filtro, foram determinados os respectivos pesos úmidos, empregando-se balança analítica. O testículo e o epidídimo direito foram congelados para posterior contagem espermática (C.5.) e o testículo esquerdo foi preparado para análise dos parâmetros biométricos e análise histológica do testículo (C.6.).

C.2. Análise da motilidade espermática

A análise de motilidade espermática foi realizada de acordo com técnica descrita em Perobelli et al. (2010) e adaptada por Favareto et al. (2011). O ducto deferente direito foi seccionado nas extremidades anterior e posterior e raspado delicadamente com bastão de vidro para retirar os espermatozoides de seu interior. Os espermatozoides coletados foram imediatamente diluídos em meio HTF (Human Tubal Fluid, Irvine Scientific[®]) modificado com gentamicina, pré-aquecido com ajuda de uma placa aquecedora a 34°C para evitar a morte das células. Uma alíquota de 10 µl foi colocada em uma câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) e analisada sob microscopia de luz, aumento de 400x. Foram avaliados 200 espermatozoides por animal e classificados em: móvel (com motilidade progressiva) e imóvel. Paralelamente, uma pequena alíquota de solução HTF foi coletada para análise da viabilidade espermática (item C.3.).

Figura 2 - 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.



C.3. Análise da viabilidade espermática

Para a viabilidade espermática foi utilizado o método de coloração com eosina-nigrosina proposto por Bjorndahl, Soderlund e Kvist (2003). Uma pequena alíquota de 50 µl da amostra em meio HTF (item C.2.) foi misturada com eosina-nigrosina e diretamente examinado em microscopia óptica. Foram avaliados 100 espermatozoides por animal, sendo que os espermatozoides não corados foram classificados como viáveis e os espermatozoides corados foram classificados como inviáveis.

C.4. Análise da morfologia dos espermatozoides

A avaliação da morfologia dos espermatozoides foi realizada de acordo com Fernandes et al. (2007). O ducto deferente esquerdo dos animais foi seccionado nas extremidades anterior e posterior e lavado internamente com o auxílio de agulha e seringa contendo 1,0 ml de formol-salina (10%). O conteúdo foi colhido em um tubo e mantido sob refrigeração para posterior análise. Foi preparado esfregaço em lâmina histológica e após 90 min de secagem foram analisados 200 espermatozoides por animal em fase de contraste do microscópio (400x) (SEED et al., 1996). Anormalidades morfológicas foram classificadas em duas categorias gerais: morfologia de cabeça (sem curvatura característica ou forma isolada, ou seja, sem cauda anexada) ou morfologia de cauda (quebrada ou isolada, isto é, sem cabeça anexada) (FILLER, 1993).

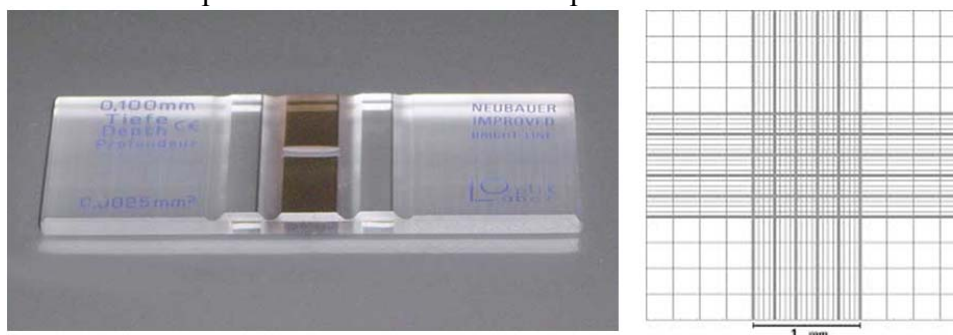
C.5. Contagem espermática

O testículo e o epidídimo direito, dos diferentes grupos experimentais, foram removidos e estocados a -20° C para posterior determinação da concentração de células germinativas

- *Número de espermátides maduras no testículo e cálculo da produção diária de espermatozóides*

Para a realização da contagem das espermátides no testículo, procedeu-se o descongelamento dos testículos dos ratos dos diferentes grupos experimentais seguido de homogeneização do material, segundo método descrito por Robb et al. (1978) e adaptado por Fernandes et al. (2007). Após o descongelamento, testículo foi decapsulado, o parênquima testicular pesado e colocado em um tubo de ensaio com tampa, onde foram adicionados 5ml de solução contendo NaCl (0,9%), Triton-X (0,05%) e Thimerosal (0,01%). Em seguida, este tubo foi tampado e pesado novamente para cálculo da primeira diluição. A amostra foi homogeneizada com pistilo 10N em velocidade máxima e, posteriormente, levado a um sonicador na potência 6, com 80mA por 30 segundos. Após nova diluição na proporção 1:10 na solução de Triton X100 (10 μ l do homogeneizado + 900 μ l de solução), uma alíquota foi transferida por meio de uma pipeta Pasteur para a câmara de Neubauer, onde as espermátides resistentes à homogeneização e sonicagem foram contadas (2 câmaras por animal, 5 campos por câmara). Para calcular a produção espermática diária, o número de espermátides no testículo foi dividido por 6,1, que é o n^o de dias em que essas espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio seminífero.

Figura 3 - Câmara de Neubauer utilizada para contagem espermática. À esquerda, foto do modelo utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior, através do microscópio de uma das câmaras do aparelho.



- Número e tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo

Os epidídimos direitos foram inicialmente divididos nas unidades cabeça/corpo e cauda. As porções epididimárias foram separadas logo após a coleta e congeladas a -20°C até a homogeneização e contagem dos espermatozóides de acordo com o mesmo procedimento descrito para o item anterior com a diferença que, antes da homogeneização, as peças foram cortadas em pequenos pedaços com tesoura bem afiada. Esse material foi diluído em 1ml da mistura contendo Triton X100 para cada 1ml da mistura para cada 200mg de cabeça/corpo. O tecido epididimário foi então homogeneizado, diluído 20vezes e contado em câmaras de Neubauer. O tempo de transito dos espermatozoides pelo epidídimo foi calculado dividindo-se o número de espermatozóides na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo, pelo valor obtido na produção diária de espermatozóides de cada animal (ROBB et al., 1978).

C.6. Parâmetros biométricos e análise histológica do testículo

O testículo esquerdo foi preservado em solução de glutaraldeído (4%) a 0,01M em tampão fosfato (pH 7,2). Posteriormente os fragmentos de testículo foram rotineiramente processados para inclusão em resina plástica de glicolmetacrilato (Historesin Embedding kit, LEICA) e cortes histológicos com $5\mu\text{m}$ de espessura foram corados em solução borato de sódio/azul de toluidina (0,1%) (CERRI; SASSO-CERRI, 2003) e analisados.

A composição dos dados volumétricos do parênquima testicular foi obtida usando contagem de pontos utilizado um retículo de 100 pontos em aumento 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 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).

O volume individual das células de Leydig foi determinado pela margem porcentual entre nucléolo e célula de Leydig. Inicialmente, foram contados os pontos incidentes sobre o citoplasma e os nucléolos das células de Leydig, totalizando 1000 pontos por animal. Em outra etapa, o diâmetro nuclear médio destas células foi obtido com auxílio de retículo micrométrico linear (10mm/100) adaptado a uma das oculares de 10x acoplado a uma objetiva de 100x (1000x de ampliação final). Quinze núcleos de células de Leydig por animal foram mensurados. Com base nos dados adquiridos, o volume nuclear foi calculado usando a fórmula $\frac{4}{3}\pi R^3$, onde R é o raio nuclear, o volume de citoplasma ([% de pontos que incidiram no citoplasma x volume nucleolar] / % de pontos que incidiram no núcleo) e, por conseguinte, o volume de cada uma das células de Leydig (volume nuclear + de volume citoplasmático) por animal. Estes valores foram expressos micrômetros cúbicos (μm^3) (FRANÇA et al., 2000). Com o volume das células de Leydig, o número de células de Leydig por testículo (10^6) foi calculada para cada animal.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido pela mensuração ao acaso de quinze secções transversais de túbulo seminífero por animal escolhidos de forma aleatória com perfis redondos ou arredondados. Essa medição foi realizada utilizando-se o programa computacional BELview, com uso de câmera acoplada ao microscópio de luz comum (OSM-223287, Olympus) com objetiva de 100x.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS), expresso em metros (10^6) 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 ($R = \text{diâmetro tubular}/2$) (ATTAL; COUROT, 1963; DORST; SAJONSKI, 1974).

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio VII do ciclo, classificado de acordo com o método acrossômico (RUSSELL et al., 1990), foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e dos nucléolos das células de Sertoli. Nessas contagens foram utilizadas cinco secções transversais de túbulo seminífero por animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados: espermatogônias do tipo A, espermatócitos I na fase pré-leptoteno/leptoteno, espermatócitos I em fase de paquíteno, espermatídes redondas e nucléolos das células de Sertoli.

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e a espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula proposta por Amann e Almqvist (1962):

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

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de retículo micrométrico linear (10mm/100) adaptado a uma das oculares de 10x e acoplado à objetiva de 100x, propiciando aumento final de 1000x. O número das células de Sertoli foi corrigido para o diâmetro nucleolar e a espessura do corte histológico; em virtude disto, contabilizou-se exclusivamente as células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou a aplicação da mesma fórmula citada anteriormente.

A população total de células de Sertoli por testículo foi obtida a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula

empregada por Hochereau-de Reviere e Lincoln (1978): Número de células de Sertoli ou célula germinativa por testículo = $[\text{CTTS } (\mu\text{m}) \times \text{n}^\circ \text{ corrigido de células de Sertoli por secção transversal}] / \text{espessura do corte } (\mu\text{m})$.

O índice de célula de Sertoli foi obtido pela razão entre o número de espermátides redondas por secção transversal e o número de nucléolos das células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero.

D.1. Estudo do comportamento copulatório dos ratos machos

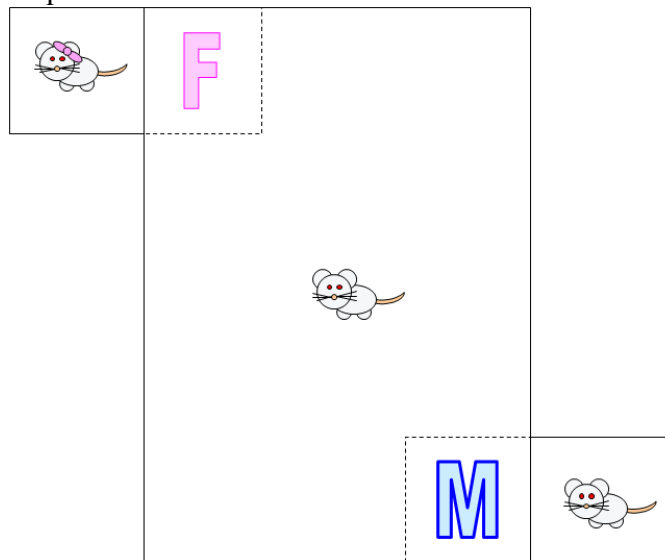
A análise do comportamento copulatório foi conduzida nas mesmas condições experimentais descritas no item *B.1*. As observações foram realizadas sempre 4h após o início da fase escura e foram capturados por câmera conectada a um monitor em sala adjacente. Cada macho foi inicialmente colocado na gaiola de observação (caixa de policarbonato) e após 10 min de aclimatação uma fêmea em estro natural foi introduzida na mesma caixa. Durante 30 min, as latências e frequências para intromissão e ejaculação foram observadas como descrito em Gerardin et al. (2006). Caso o macho não apresentasse comportamento dentro de 10 min, a avaliação era interrompida e repetida no dia seguinte. Machos que falharam na segunda avaliação foram considerados sexualmente inativos.

D.2. Preferência sexual

Após análise do comportamento copulatório, os machos foram submetidos ao teste de preferência sexual. Neste teste, foi utilizada uma arena retangular de 50 x 50 x 100 cm (altura x largura x comprimento) apresentando duas aberturas que se comunicavam com duas arenas menores, ambas com 25 cm². As arenas pequenas são diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal é fechada com uma tela de arame. Para o teste, foi colocada 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 com 25 cm² (zonas) na frente de 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 min. O número de visitas e o tempo total gasto visitando cada zona de incentivo foram registrados, e calculado o escore de preferência ($[\text{tempo de permanência na zona de fêmea} / \text{tempo total gasto em ambas as zonas de incentivo}] \times 100$) (AGMO, 2003).

Figura 4 - 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 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 conduzidas análises paramétricas com os dados apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Para fins de análise, os dados restantes foram transformados em raiz quadrada ou logaritmo natural antes de serem submetidos aos testes não-paramétricos, apresentados como mediana (1º e 3º quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) complementado com Bonferroni: peso corporal e DAG.
- ANCOVA complementado com Bonferroni: abertura vaginal e separação prepucial adotando o peso do dia como covariável.
- ANOVA complementado com Bonferroni: instalação da puberdade, peso corporal dos animais na vida adulta, peso de órgãos reprodutivos, concentração plasmática de estradiol, concentração plasmática de testosterona, comportamento materno, motilidade espermática, viabilidade espermática, morfologia espermática, contagem espermática, histomorfometria testicular, população de células germinativas no túbulo seminífero, comportamento copulatório e teste de preferência sexual.
- Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn: avaliação do ciclo estral, coeficiente de lordose e escore de lordose e número de ejaculações no teste de comportamento copulatório.

O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo software SPSS (IBM, SPSS statistics 19).

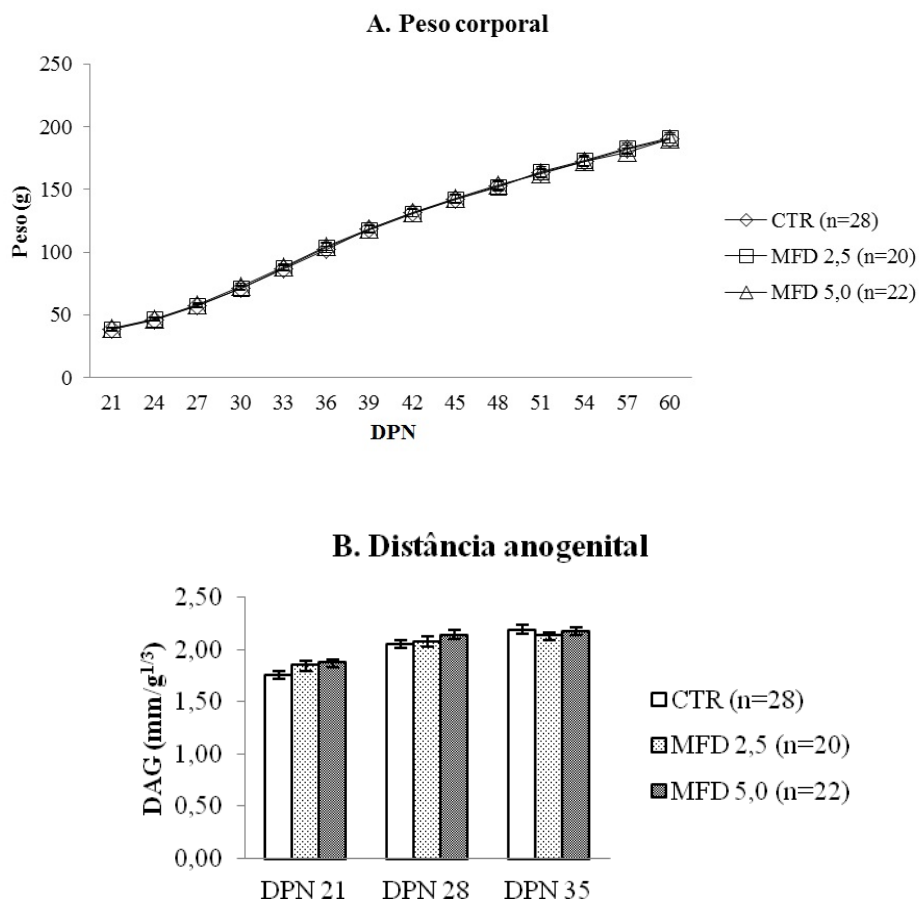
4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS ANALISADOS NAS FÊMEAS

4.1.1 Peso Corporal e Desenvolvimento Físico

RMANOVA indicou que o peso corporal (Figura 5A) e a DAG relativa ($\text{mm/g}^{1/3}$) (Figura 5B) não foram afetados durante o tratamento com Metilfenidato ($p>0,05$).

Figura 5 - Peso corporal (A) e DAG relativa (B) das fêmeas dos diferentes grupos experimentais. Dados apresentados como média \pm EPM, $p>0,05$, RMANOVA. DAG: Distância anogenital; DPN: Dia pós-natal. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.



O dia em que ocorreu a abertura vaginal não foi influenciado pelo tratamento com Metilfenidato (CTR: $36,03 \pm 0,56$, n=28/ MFD 2,5: $35,42 \pm 0,57$, n=20/ MFD 5,0: $35,00 \pm 0,63$, n=22) como indicado por ANCOVA ($p > 0,05$).

4.1.2 Parâmetros Reprodutivos Analisados no DPN 90-100

4.1.2.1 Avaliação do ciclo estral

A Tabela 1 apresenta os dados referentes à avaliação do ciclo estral. O teste de Kruskal-Wallis não indicou diferença entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Avaliação do ciclo estral em fêmeas adultas dos diferentes grupos experimentais.

	CTR [14]	MFD 2,5 [10]	MFD 5,0 [10]
Coefficiente de estro	26,67 (21,67-26,67)	26,67 (26,67-31,67)	26,67 (26,67-28,67)
Coefficiente de metaestro/diestro	53,33 (53,33-53,33)	46,67 (46,67-53,33)	53,33 (48,33-53,33)
Coefficiente de proestro	20,00 (20,00-25,00)	20,00 (20,00-26,67)	20,00 (20,00-20,67)

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como mediana (1° e 3° quartil), $p > 0,05$, Kruskal-Wallis. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

4.1.2.2 Peso corporal e de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de estradiol

O peso corporal e peso dos órgãos reprodutivos das fêmeas adultas estão apresentados na Tabela 2. Tanto o peso corpóreo quanto os pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos não foram afetados pelo tratamento com Metilfenidato (ANOVA, $p > 0,05$).

ANOVA indicou que não houve diferença nas concentrações plasmáticas de estradiol entre os grupos (CTR: $174,23 \pm 34,34$ / MFD 2,5: $227,06 \pm 52,00$ / MFD 5,0: $179,59 \pm 32,64$, pg/ml) ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Peso corporal e peso dos órgãos reprodutivos das fêmeas dos diferentes grupos experimentais.

	CTR [14]	MFD 2,5 [10]	MFD 5,0 [10]
Peso corporal (g)	$252,90 \pm 5,33$	$248,53 \pm 6,44$	$243,49 \pm 6,24$
Peso absoluto (g)			
Útero	$0,45 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,01$
Ovário (direito)	$0,04 \pm 0,002$	$0,04 \pm 0,002$	$0,04 \pm 0,002$
Ovário (esquerdo)	$0,04 \pm 0,002$	$0,04 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,003$
Peso relativo (g/100g)			
Útero	$0,07 \pm 0,003$	$0,07 \pm 0,002$	$0,07 \pm 0,002$
Ovário (direito)	$0,006 \pm 0,0004$	$0,006 \pm 0,0004$	$0,006 \pm 0,0004$
Ovário (esquerdo)	$0,006 \pm 0,0004$	$0,007 \pm 0,0004$	$0,007 \pm 0,0004$

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média \pm EPM, $p > 0,05$, ANOVA. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

4.1.2.3 Comportamento sexual

Em relação ao comportamento sexual, todas as montas foram acompanhadas por lordoses (LQ=100%) em todos os grupos experimentais. Além disso, o tratamento com Metilfenidato não alterou o escore de lordose (CTR: 2,95 (2,83-3,00), n=14/ MFD 2,5: 2,90 (2,80-3,00), n=10/ MFD 5,0: 3,00 (2,80-3,00), n=12) como mostrado pelo Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

4.1.2.4 Comportamento materno

Os parâmetros analisados no comportamento materno (DL 5), descritos na Tabela 3, não foram afetados pelo tratamento com Metilfenidato (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 3 - Parâmetros analisados durante o comportamento materno das fêmeas dos diferentes grupos experimentais no DL 5.

Parâmetros (s)	CTR	MFD 2,5	MFD 5,0
Tempo para recuperação da ninhada completa	427,03 ± 71,43 [12/14]	320,86 ± 50,94 [10/10]	379,29 ± 78,21 [10/12]
Tempo total agrupando os filhotes	129,44 ± 18,05 [14/14]	103,16 ± 15,85 [10/10]	159,51 ± 34,35 [9/12]
Tempo total na limpeza dos filhotes	349,44 ± 33,49 [14/14]	401,24 ± 89,09 [10/10]	354,59 ± 58,22 [12/12]
Tempo total fora do ninho	1126,15 ± 51,19 [14/14]	1102,55 ± 92,81 [10/10]	1112,56 ± 64,08 [12/12]
Tempo total de construção do ninho	160,98 ± 22,34 [14/14]	231,05 ± 50,51 [10/10]	190,46 ± 36,19 [11/12]

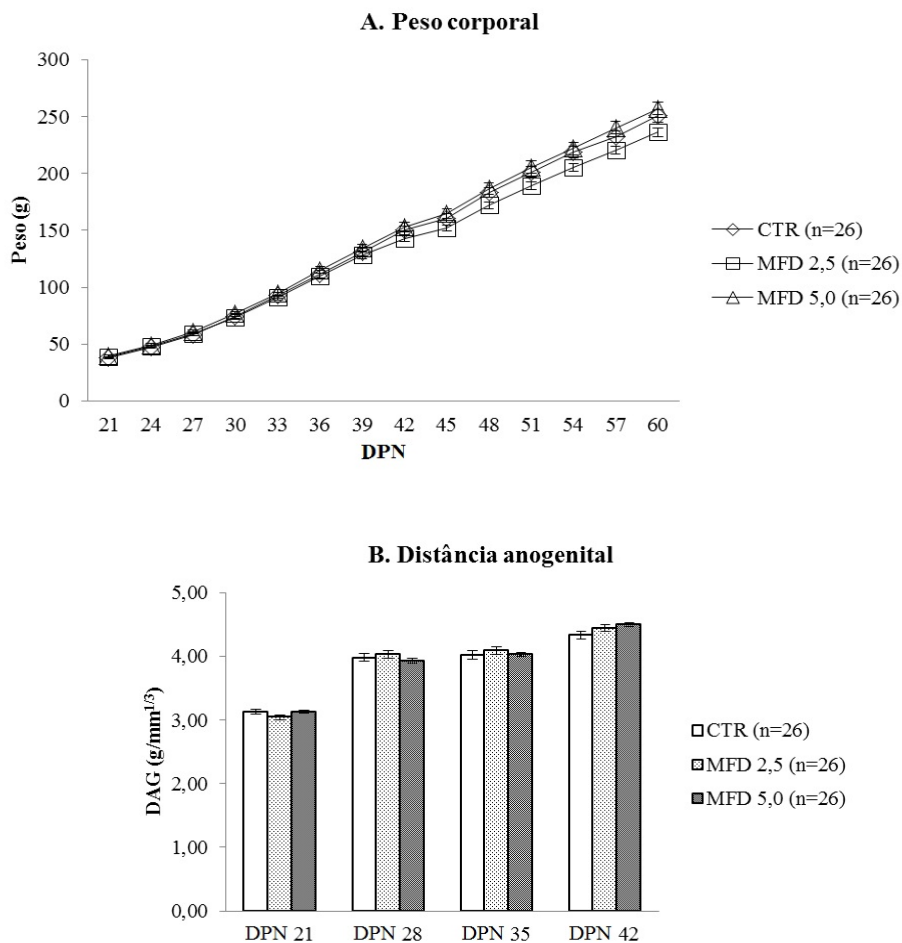
Números entre chaves indicam o número de animais que apresentaram comportamento pelo número total de animais por grupo. Dados apresentados como média ± EPM, $p>0,05$, ANOVA. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

4.2 PARÂMETROS ANALISADOS NOS MACHOS

4.2.1 Peso Corporal e Desenvolvimento Físico

O peso corporal (Figura 6A) e a DAG relativa ($\text{mm}/\text{g}^{1/3}$) (Figura 6B) não foram afetados durante o período de tratamento com Metilfenidato ($p > 0,05$), como indicados por RMANOVA.

Figura 6 - Peso corporal (A) e DAG relativa (B) dos machos dos diferentes grupos experimentais. Dados apresentados como média \pm EPM, $p > 0,05$, RMANOVA. DAG: Distância anogenital; DPN: Dia pós-natal. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.



O tratamento com Metilfenidato também não influenciou o dia da instalação da puberdade (CTR: $49,62 \pm 0,64$ / MFD 2,5: $49,31 \pm 0,62$ / MFD 5,0: $49,12 \pm 0,61$; $n=26$ /grupo), como mostrado pela ANCOVA.

4.2.2 Parâmetros Reprodutivos Analisados no DPN 100

4.2.2.1 Peso corporal e de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona

O peso corporal e dos órgãos reprodutivos dos machos adultos estão apresentados na Tabela 4. A administração repetida de Metilfenidato não afetou o peso corpóreo bem como os pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos (ANOVA, $p>0,05$).

ANOVA não indicou diferença na concentração plasmática de testosterona entre os grupos (CTR: $2,78 \pm 0,86$ $n=10$; MFD 2,5: $2,57 \pm 0,57$ $n=11$; e MFD 5,0: $2,31 \pm 0,43$ $n=12$, ng/ml) ($p>0,05$).

Tabela 4 - Peso corporal e peso dos órgãos reprodutivos dos machos dos diferentes grupos experimentais.

	CTR [15]	MFD 2,5 [15]	MFD 5,0 [14]
Peso corporal (g)	369,71 ± 6,67	358,91 ± 9,63	374,34 ± 12,07
Peso absoluto (g)			
Testículo (direito)	1,49 ± 0,04	1,47 ± 0,07	1,52 ± 0,03
Ducto deferente	0,09 ± 0,003	0,08 ± 0,002	0,09 ± 0,003
Epidídimo	0,50 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,51 ± 0,01
Próstata	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,03
Vesícula seminal cheia	0,60 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,60 ± 0,03
Vesícula seminal vazia	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Peso relativo (g/100g)			
Testículo (direito)	0,40 ± 0,001	0,42 ± 0,002	0,41 ± 0,001
Ducto deferente	0,023 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,024 ± 0,001
Epidídimo	0,14 ± 0,004	0,14 ± 0,005	0,14 ± 0,004
Próstata	0,10 ± 0,005	0,10 ± 0,005	0,10 ± 0,007
Vesícula seminal cheia	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Vesícula seminal vazia	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,003

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, $p > 0,05$, ANOVA. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

4.2.2.2 Parâmetros espermáticos

Os resultados de motilidade, viabilidade e morfologia espermática estão apresentados na Tabela 5. O tratamento com Metilfenidato não afetou os parâmetros para motilidade e viabilidade espermática (ANOVA, $p > 0,05$). No entanto, houve um aumento na porcentagem de espermatozoides com anormalidades de cauda nos animais do grupo MFD 2,5 quando comparado ao grupo CTR (ANOVA complementada com Bonferroni, $p < 0,05$).

Tabela 5 - Viabilidade, motilidade e morfologia espermática de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros (%)	CTR	MFD 2,5	MFD 5,0
Espermatozoides viáveis	84,55 ± 2,09 [11]	78,55 ± 1,40 [11]	78,70 ± 3,04 [10]
Espermatozoides móveis	78,50 ± 2,28 [12]	75,00 ± 2,15 [11]	72,60 ± 4,46 [10]
Espermatozoides com cabeça anormal	15,07 ± 1,09 [15]	18,60 ± 1,29 [15]	15,96 ± 1,36 [14]
Espermatozoides com cauda anormal	1,17 ± 0,15 [15]	2,27 ± 0,27 [15]*	1,79 ± 0,31 [14]

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, *p<0,05 comparado ao CTR, ANOVA complementado com Bonferoni. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros avaliados na contagem espermática. O tratamento com Metilfenidato não alterou nenhum dos parâmetros avaliados (ANOVA, p>0,05).

Tabela 6 - Contagem espermática de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTR [15]	MFD 2,5 [15]	MFD 5,0 [14]
Nº de espermátides (10 ⁶ /testículo)	136,26 ± 8,07	123,23 ± 10,62	130,45 ± 8,09
Nº de espermátides (10 ⁶ /g/testículo)	98,85 ± 4,37	93,89 ± 6,95	98,08 ± 6,59
Produção espermática diária	21,46 ± 1,10	19,78 ± 1,70	21,39 ± 1,32
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (10 ⁶ /órgão)	71,87 ± 4,99	65,18 ± 6,45	73,66 ± 4,57
Nº de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo (10 ⁶ /g/órgão)	272,20 ± 17,99	265,96 ± 27,20	284,51 ± 17,35
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (10 ⁶ /órgão)	109,49 ± 8,74	94,66 ± 10,37	106,03 ± 7,34
Nº de espermatozoides na cauda do epidídimo (10 ⁶ /g/órgão)	542,82 ± 42,67	449,20 ± 44,81	512,05 ± 29,51
Tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo do epidídimo (dias)	3,48 ± 0,28	3,44 ± 0,29	3,55 ± 0,27
Tempo de trânsito espermático na cauda (dias)	5,26 ± 0,46	4,80 ± 0,48	5,14 ± 0,47

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, p>0,05, ANOVA. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

4.2.2.3 Parâmetros histomorfométricos de testículo

Os volumes dos componentes do parênquima testicular dos machos estão apresentados na Tabela 7. Houve um aumento no volume do tecido intersticial ($p < 0,05$) nos grupos MFD 2,5 e 5,0 em relação ao CTR (ANOVA complementado com Bonferroni), como observado também na figura 7.

Tabela 7 - Composição volumétrica do parênquima testicular de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.

Volume (μ l)	CTR [14]	MFD 2,5 [14]	MFD 5,0 [11]
Parênquima	1390,93 \pm 40,86	1428,07 \pm 40,43	1415,36 \pm 31,02
Túbulo seminífero	1124,14 \pm 39,73	1088,00 \pm 37,88	1068,27 \pm 27,10
Tecido intersticial	266,79 \pm 12,56	337,93 \pm 15,20*	347,09 \pm 17,86*
Células de Leydig	35,77 \pm 2,13	34,66 \pm 1,99	35,61 \pm 2,23

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média \pm EPM, * $p < 0,05$ comparado ao CTR, ANOVA complementado com Bonferroni. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

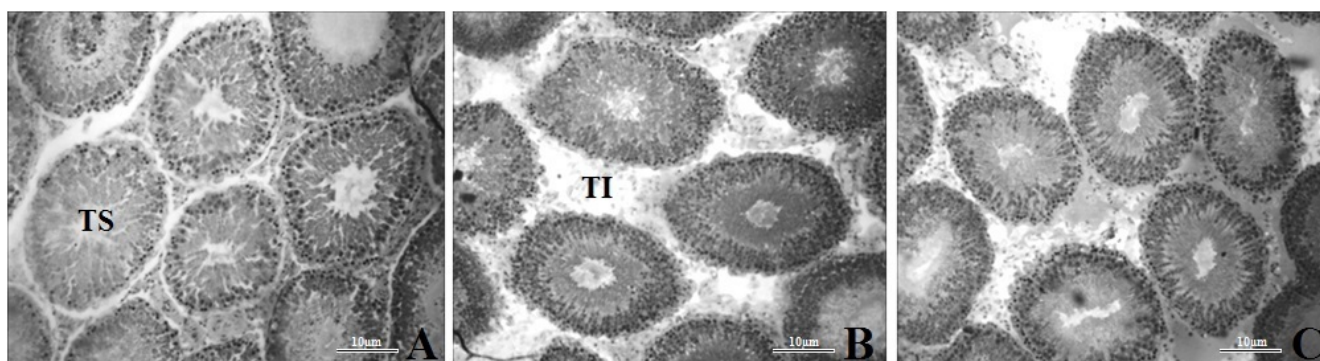


Figura 7. Micrografias das secções testiculares dos animais do grupo controle (A) ou tratados com MFD 2,5 mg/kg (B) ou MFD 5,0 mg/kg (C), corados por azul de toluidina. TS, túbulo seminífero; TI, tecido intersticial. Escala de barra: 10 μ m.

Os Parâmetros biométricos do parênquima testicular, número de células de Sertoli, número de células de Leydig e índice de célula de Sertoli (Tabela 8) não foram afetados pelo tratamento repetido com Metilfenidato (ANOVA, $p>0,05$).

Tabela 8 - Parâmetros biométricos do parênquima testicular, número de células de Sertoli, número de células de Leydig e índice de célula de Sertoli de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.

	CTR [14]	MFD 2,5 [14]	MFD 5,0 [11]
Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm)	427,43 \pm 8,06	413,61 \pm 8,37	407,04 \pm 4,49
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	7,88 \pm 0,29	8,19 \pm 0,37	8,22 \pm 0,20
Nº de células de Leydig por testículo (10^6)	29,46 \pm 2,02	32,12 \pm 2,47	36,46 \pm 2,61
Nº de células de Sertoli por testículo (10^7)	2,26 \pm 0,10	2,12 \pm 0,14	2,27 \pm 0,33
Índice de célula de Sertoli	6,21 \pm 0,33	7,25 \pm 0,47	6,52 \pm 0,031

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média \pm EPM, $p>0,05$, ANOVA. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

Por outro lado, ANOVA complementado com Bonferroni mostrou um aumento ($p < 0,05$) nas espermatogônias do tipo A no grupo MFD 5,0 e uma diminuição na população de espermatócitos I na fase de préleptóteno/leptóteno no grupo MFD 2,5 em relação ao grupo CTR (Tabela 9).

Tabela 9 - População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do Ciclo do Epitélio Seminífero de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.

	CTR [14]	MFD 2,5 [14]	MFD 5,0 [11]
Espermatogônia tipo A	0,47 ± 0,03	0,54 ± 0,04	0,59 ± 0,03*
Espermatócitos I em fase de preleptóteno/leptóteno	27,88 ± 0,94	23,45 ± 1,19*	26,67 ± 1,10
Espermatócitos I em fase de paquíteno	29,14 ± 1,50	33,10 ± 1,31	33,09 ± 0,91
Espermátides redondas	87,57 ± 2,85	93,53 ± 2,98	89,30 ± 1,65
Nucléolos de células de Sertoli	14,55 ± 0,71	13,57 ± 1,00	13,80 ± 0,58

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, * $p < 0,05$ comparado ao CTR, ANOVA complementado com Bonferroni. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

4.2.2.4 Comportamento copulatório e preferência sexual

Em relação ao comportamento sexual dos machos, o tratamento repetido com Metilfenidato não alterou o comportamento copulatório (Tabela 10), nem a preferência sexual (Tabela 11) (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabela 10 - Comportamento copulatório de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.

	CTR	MFD 2,5	MFD 5,0
Latência para 1ª intromissão (s)	161,50 ± 32,95 [8/11]	132,14 ± 46,55 [7/11]	145,56 ± 29,55 [9/12]
Nº de intromissões até 1ª ejaculação	20,00 ± 3,29 [8/11]	20,29 ± 4,62 [7/11]	17,89 ± 2,10 [9/12]
Latência para 1ª ejaculação (s)	895,88 ± 94,80 [8/11]	807,57 ± 112,78 [7/11]	789,78 ± 88,68 [9/12]
Latência para 1ª intromissão pós-ejaculação (s)	356,88 ± 19,91 [8/11]	290,67 ± 35,46 [6/11]	323,67 ± 21,08 [9/12]
Nº de intromissões pós-ejaculação	15,25 ± 0,56 [8/11]	17,67 ± 2,92 [6/11]	15,44 ± 3,73 [9/12]
Nº de ejaculações	2,00 (1,50-2,00) [8/11]	2,00 (1,00-2,00) [7/11]	2,00 (2,00-2,00) [9/12]

Números entre chaves indicam o número de animais que apresentaram comportamento pelo número total de animais por grupo. Dados apresentados como média ± EPM, $p > 0,05$, ANOVA. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

Tabela 11 - Preferência sexual de ratos machos dos diferentes grupos experimentais.

	CTR [11]	MFD 2,5 [11]	MFD 5,0 [12]
Tempo na zona do macho (s)	222,09 ± 24,72	234,64 ± 45,63	257,42 ± 59,89
Tempo na zona da fêmea (s)	592,18 ± 69,81	433,91 ± 75,54	443,42 ± 74,36
Nº de visitas na zona do macho	15,27 ± 1,40	15,00 ± 1,61	14,67 ± 1,69
Nº de visitas na zona da fêmea	18,27 ± 1,74	15,36 ± 1,00	16,00 ± 2,35
Escore de preferência	69,86 ± 5,20	65,39 ± 6,47	62,15 ± 7,20

Números entre chaves indicam o número de animais/grupo. Dados apresentados como média ± EPM, $p > 0,05$, ANOVA. CTR: Grupo controle tratado com água destilada; MFD 2,5: grupo tratado com Metilfenidato 2,5 mg/kg; MFD 5,0: grupo tratado com Metilfenidato 5,0 mg/kg.

5 DISCUSSÃO

O padrão de crescimento de um animal, ao longo do tratamento, é usado como um indicador seguro na investigação de efeitos tóxicos para o organismo (JOHNSON, 1981). Em seres humanos, o efeito adverso mais comumente associado ao tratamento com Metilfenidato é a perda de peso, mas que tende a desaparecer com o tempo (POULTON; COWELL, 2003; PTACEK; KUZELOVA; PACLT, 2009). Em ratos, a administração repetida, via gavagem, de Metilfenidato pode reduzir o ganho de peso de forma dose-dependente, como observado em animais juvenis em doses acima de 50mg/kg/dia (BECKMAN et al., 2008), bem como em adultos em doses acima de 20mg/kg (TEO et al., 2002). No presente estudo, a administração repetida, da infância até o início da vida adulta, nas doses de 2,5 e 5,0mg/kg, não alterou o peso corpóreo ao longo do tratamento. No intuito de descartar a possibilidade de alterações reprodutivas ocasionadas pela perda de peso corpóreo, uma vez que a diminuição neste parâmetro está relacionada com alterações na maturação sexual (GLASS; SWERDLOFF, 1980; HOLEHAN; MERRY, 1985), optou-se por doses de Metilfenidato que não influenciassem no desenvolvimento ponderal.

A puberdade tem início pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em resposta a liberação pulsátil de GnRH hipotalâmico (EBLING, 2005; TSUTSUMI; WEBSTER, 2009). O hipotálamo recebe aferentes neurais e neuroendócrinos de diversos sistemas de neurotransmissores, modulando, por sua vez, a liberação de GnRH (CIECHANOWSKA et al., 2010). Liu e Herbison (2013) demonstraram que aferentes dopaminérgicos, provenientes do núcleo paraventricular anteroventral, atuam como um dos mais potentes inibidores da excitabilidade dos neurônios que secretam GnRH. No presente estudo, os animais foram tratados durante a puberdade, período no qual ocorre

importante rearranjo na arquitetura e plasticidade cerebral, definindo mudanças neuroendócrinas e comportamentais que podem persistir por toda a vida (SISK; ZEHR, 2005). No entanto, o tratamento com Metilfenidato não afetou o início da puberdade, tanto em machos quanto em fêmeas. São poucos os estudos na literatura investigando os efeitos deste fármaco sobre a instalação da puberdade. Em primatas, foi observado atraso na ocorrência da decida testicular (doses crescentes de 3mg/kg a 25mg/kg ao dia) (MATTISON et al., 2011), que é um marcador fiável do início da puberdade nestes animais (TERASAWA; FERNANDEZ, 2001). Embora, neste caso, a divergência entre os resultados possa ser explicada por características inter-espécies, a ausência de dados na literatura restringe a discussão. Além disso, o presente estudo é o primeiro a investigar os efeitos do Metilfenidato sobre o início da puberdade em ratos machos.

Apesar de, nas fêmeas não ter sido observada alteração na instalação da puberdade e no ciclo estral, dados da literatura demonstram comprometimento nestes parâmetros. A administração subcutânea nas doses de 450µg/dia (CHATTERJEE-CHAKRABARTY et al., 2005) e 70mg/kg/dia, (GREELEY; KIZER, 1980) retardou a ocorrência da abertura vaginal e também reduziu a duração média do ciclo estral após a interrupção do tratamento. Diferentes resultados podem estar associados à via de administração e à diminuição no peso corpóreo observada nos estudos citados anteriormente. Além disso, outro fator que deve ser considerado é o período de tratamento, uma vez que, em Greeley e Kizer (1980), ratas tratadas a partir do DPN 21-23 não apresentaram tais alterações, diferentemente daquelas tratadas a partir do DPN 5-7, sugerindo que o tratamento mais precoce pode levar a comprometimentos persistentes sobre o ciclo estral.

Alterações de peso de órgãos são frequentemente associadas com os efeitos tóxicos relacionados ao tratamento de uma droga (SELLERS et al., 2007). Há indícios de que o Metilfenidato possa promover mudanças no perfil de hormônios sexuais devido à

interferência na liberação pulsátil de GnRH hipotalâmico (CHATTERJEE-CHAKRABARTY et al., 2005) ou, em machos, também, por ação direta sobre a função das células de Leydig (ADRIANI et al., 2006), podendo comprometer o peso de órgãos hormônio-dependentes. O Metilfenidato é um fármaco comumente prescrito para crianças e adolescentes com TDAH, cujo tratamento pode se estender até o início da vida adulta. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos deste medicamento, 40 dias, aproximadamente, após o término do tratamento. O peso dos órgãos reprodutivos, tanto em machos quanto em fêmeas adultos, não foi alterado pelo tratamento durante a infância até início da vida adulta. Dados na literatura demonstram que o tratamento, na dose de 10mg/kg, causou diminuição no peso testicular, observado ao final do tratamento (CANSU et al., 2011). No entanto, o mesmo efeito não foi descrito na dose de 5mg/kg (CANSU et al., 2011), corroborando com nossos resultados. Além disso, o tratamento com uma dose substancialmente maior (100mg/kg) levou a uma redução no peso da próstata, não sendo mais observada após 30 dias do fim do tratamento. Este mesmo padrão de resposta também foi encontrado em fêmeas, que apresentaram aumento transitório no peso dos ovários (TEO et al., 2002). Assim, com base na literatura, sugere-se que, provavelmente, as doses utilizadas nesse estudo, não tenham causado alterações nos pesos de órgãos hormônio-dependentes, e em havendo alterações, essas não foram persistentes. Em estudo conduzido por 11 semanas em ratos adultos, ao final do estudo, houve redução da concentração plasmática de testosterona pela administração de Metilfenidato (10mg/kg, por gavagem) (KIANIFARD; HASANZADEH; KIANIFARD, 2013), contudo, como visto em Adriani et al. (2006), essa redução parece também ser transitória, uma vez que ocorreu normalização da concentração desse hormônio após dois meses do término do tratamento na dose de 2mg/kg (ip, uma vez ao dia). Assim como nos machos, o tratamento com Metilfenidato também não interferiu na concentração plasmática de estradiol nas fêmeas.

Resultados semelhantes podem ser encontrados em Chatterjee-Chakrabarty et al. (2005), onde os valores de estradiol circulantes, ao final do tratamento, permaneceram inalterados em relação aos animais controle. Diante disso, sugere-se que o tratamento com Metilfenidato durante o desenvolvimento não interferiu nas concentrações plasmáticas de hormônios sexuais, testosterona e estradiol, na vida adulta.

Com relação ao comportamento sexual, é proposto que projeções provenientes da área pré-óptica medial hipotalâmica interagem com o sistema mesolímbico dopaminérgico, promovendo os aspectos apetitivos e consumatórios sobre o comportamento sexual e materno (STOLZENBERG; NUMAN, 2011). De fato, o funcionamento neurocomportamental na vida adulta pode ser influenciado por experiências ambientais, emocionais e por interferência por drogas durante o desenvolvimento (HYMAN, 2001; LADD et al., 2000; SPEAR, 2000; TEICHER et al., 2002). Apesar do Metilfenidato alterar os níveis de dopamina durante o desenvolvimento do organismo e que esse neurotransmissor está envolvido no estabelecimento dos comportamentos reprodutivos, não foram observadas alterações desses comportamentos, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Não existem estudos na literatura investigando a relação do Metilfenidato sobre o comportamento sexual em ratas fêmeas até o momento. Em ratos, houve um comprometimento do comportamento sexual após intervalo de seis semanas do tratamento (DPN 20-35) na dose de 4mg/kg/dia (ip) (BOLAÑOS et al., 2003). Sabe-se que a administração intraperitoneal de Metilfenidato quando comparado com a mesma dose oral, tem uma maior biodisponibilidade central para induzir a resposta locomotora (GERASIMOV et al., 2000). Assim, sugere-se que os resultados divergentes encontrados entre nosso estudo e em Bolaños et al., (2003) possam estar relacionados com a menor biodisponibilidade inerente à via de administração utilizada.

Sabe-se que as projeções dopaminérgicas, nigrostriatal e mesolímbica, estão envolvidas no início e na manutenção do comportamento materno em animais (KINSLEY et al., 1994; NUMAN; STOLZENBERG, 2009; ROBINSON; ZITZMAN; WILLIAMS, 2011). No presente estudo, as ratas tratadas com Metilfenidato não apresentaram alterações no comportamento materno. Existe escassez de estudos avaliando os efeitos do Metilfenidato sobre o comportamento materno. Em fêmeas virgens de camundongos CD-1, a administração subcutânea de Metilfenidato (5mg/kg) diminuiu o comportamento materno causando redução no tempo de limpeza dos filhotes e no tempo de amamentação na posição de cifose (LEUSSIS et al., 2008). Vale ressaltar que em Leussis et al. (2008), o comportamento foi avaliado uma hora após a administração da droga, ou seja, as alterações no comportamento materno encontradas podem ser decorrentes da proximidade no tempo entre o tratamento e a análise do comportamento. Desse modo, pode-se supor que, no presente estudo, o Metilfenidato não está mais presente em níveis plasmáticos circulantes nas fêmeas, o que sugere, sobretudo, que provavelmente as vias neurais relacionadas ao comportamento materno não foram afetadas pelo tratamento durante o desenvolvimento. Fármacos que atuam de forma similar ao Metilfenidato, como Cocaína e Metanfetamina, podem afetar o comportamento materno (SLAMBEROVÁ; CHAROUSOVÁ; POMETLOVÁ, 2005; VERNOTICA; ROSENBLATT; MORRELL, 1999; PEEKE et al., 1994). No entanto, fica difícil a comparação entre os resultados, uma vez que esses psicoestimulantes diferem quanto a afinidade aos transportadores, além de alterar outros neurotransmissores como noradrenalina e serotonina (FOWLER et al., 2007; VOLKOW et al., 1999). Além disso, ainda que a dopamina seja o principal neurotransmissor envolvido na facilitação do comportamento materno (NUMAN, 2006), noradrenalina e serotonina também podem modular esse comportamento (OLAZABAL et al., 2004; THOMAS; PALMITER, 1997).

Nos machos, o tratamento com Metilfenidato causou aumento do volume do tecido intersticial no testículo de ambos os grupos tratados. O testículo é integrado pelos túbulos seminíferos, onde ocorre o processo de espermatogênese (GRISWOLD, 1998), e pelo compartimento intersticial entre os túbulos, o qual possui função endócrina (DUFAU, 1988). O tecido intersticial é composto por células de Leydig, células mesenquimais, células mióides, células endoteliais, pericitos e macrófagos (ARIYARATNE; CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA, 2000). Com exceção das células de Leydig, a contagem diferencial de todas as células intersticiais não foi realizada neste estudo, e dessa forma, não foi possível identificar se as alterações quantitativas em outros componentes do tecido intersticial estariam presentes aqui.

Nossos resultados mostraram ainda que o tratamento repetido com Metilfenidato promoveu aumento da porcentagem de espermatozoides com anormalidades na cauda no grupo MFD 2,5; mas não no grupo MFD 5,0 quando comparado ao CTR. O comportamento de curva dose-resposta não-monotônica (bifásica) está ligada a diversas substâncias químicas em que se observa o aumento na resposta à dose mais baixa seguido de um decréscimo na dose mais elevada, ou vice-versa (CONOLLY; LUTZ, 2004). Relações dose-resposta bifásicas para a dopamina e/ou seus agonistas são revisados por Calabrese (2001) em diversos parâmetros (locomoção, sensibilidade à dor, pressão arterial diastólica, tensão arterial, secreção de prolactina, liberação de ocitocina, frequência cardíaca, memória e atividade da adenilato ciclase neuronal). Contudo, nenhuma evidência para este mesmo padrão de resposta para o Metilfenidato foi descrito até o momento. Tem sido demonstrado que receptores de dopamina e noradrenalina estão presentes ao longo da cauda e no acrossomo de espermatozoides, além do tecido testicular e em todas as células germinativas em fase pré- e pós-meiótica (ADEOYA-OSIGUWA; GIBBONS; FRASER, 2006; OTTH et al., 2007). Embora o papel da sinalização

dopaminérgica e noradrenérgica ainda não sejam esclarecidos, estes resultados sugerem que o Metilfenidato pode ter uma ação direta no testículo e epitélio germinativo. Além disso, foi também observado, nos machos, alterações na população de células germinativas induzindo um aumento no número de espermatogônias do tipo A no grupo MFD 5,0 enquanto que no grupo MFD 2,5 houve diminuição no número de espermatócitos I na fase preleptóteno/leptóteno. O processo de espermatogênese constitui um processo altamente organizado no qual células germinativas haplóides são originadas a partir de espermatogônias diplóides masculinas (HESS; FRANÇA, 2008). A espermatogênese em ratos leva cerca de 48-53 dias (CLERMONT, 1972) e é possível que o tratamento tenha prejudicado gametogênese e as mudanças decorrentes ainda estavam presentes mesmo após 40 dias do fim do tratamento, provavelmente por afetar diretamente as células germinativas (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986). Além disso, sabe-se que a progressão de espermatogônias tipo A até a fase de espermatócitos em paquíteno é um processo dependente de FSH (BOITANI; POLITI; MENNA, 1993), e que este hormônio possui importante papel regulatório sobre a proliferação e renovação das espermatogônias do tipo A na fase inicial da espermatogênese (DING et al., 2011; MEACHEM et al., 1998). Embora, no presente estudo não tenha sido mensurado a concentração de FSH, pode-se sugerir também uma ação do Metilfenidato sobre a liberação de GnRH, e conseqüentemente, alterando FSH, uma vez que dados da literatura demonstram que vias dopaminérgicas participam na modulação da liberação de GnRH (LIU; HERBISON, 2013). No entanto, até o presente momento, não existe base na literatura que reforce esta hipótese, correlacionando o Metilfenidato e sua influência sob a liberação de gonadotrofinas em ratos machos, embora alterações na espermatogênese já tenham sido demonstradas em diversos estudos (ADRIANI et al., 2006; CANSU et al., 2011; KIANIFARD; HASANZADEH; KIANIFARD, 2013). Desta forma, os dados da

literatura, bem como os do presente estudo, direcionam para uma ação direta do Metilfenidato sobre a espermatogênese. Estes resultados ressaltam a necessidade de mais pesquisas voltadas para a compreensão dos mecanismos envolvidos.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que a administração repetida de Metilfenidato durante períodos correspondentes a infância até início da vida adulta interferiu na morfologia testicular e na espermatogênese em ratos, observado pelas alterações no volume do tecido intersticial do parênquima testicular, na população de células germinativas e por alterações morfológicas na cauda dos espermatozoides, mesmo após o término do tratamento. Os resultados encontrados neste estudo podem ser atribuídos a alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ou ainda, por ação direta do Metilfenidato na gônada masculina, visto que, nas fêmeas, o tratamento não alterou nenhum dos parâmetros reprodutivos analisados.

Logo, torna-se evidente a necessidade de mais pesquisas investigando os mecanismos pela qual o Metilfenidato pode atuar sobre as células germinativas masculinas.

REFERÊNCIAS

1. ADEOYA-OSIGUWA, S. A.; GIBBONS, R.; FRASER, L. R. Identification of functional α_2 - and α -adrenergic receptors in mammalian spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 21, n. 6, p. 1555–63, 2006.
2. ADRIANI, W.; LEO, D.; GUARINO, M.; NATOLI, A.; DI CONSIGLIO, E.; DE ANGELIS, G.; TRAINA, E.; TESTAI, E.; PERRONE-CAPANO, C.; LAVIOLA, G. Short-Term Effects of Adolescent Methylphenidate Exposure on Brain Striatal Gene Expression and Sexual/Endocrine Parameters in Male Rats. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1074, p. 52–73, 2006.
3. AGMO, A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 117, n. 1, p. 55–68, 2003.
4. AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, v. 45, n. 6, 774–81, 1962.
5. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed. (DSM-V), Arlington, VA.
6. ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, n. 1-2, p. 3–18, 2003.
7. ARIYARATNE, H. B.; CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA, S. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 3, p. 680–90, 2000.
8. ARNSTEN, A. F. Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: circuits and pathways. *The Journal of Clinical Psychiatry*. v. 67, n. 8, p. 7-12, 2006.
9. ATTAL, J.; COUROT, M. Development testiculaire et établissement de la spermatogenese chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, v. 3, n. 3, p. 219–41, 1963.
10. BARKLEY, R. A.; FISCHER, M.; SMALLISH, L.; FLETCHER, K. The persistence of attention-deficit/hyperactivity disorder into young adulthood as a function of reporting source and definition of disorder. *Journal of Abnormal Psychology*, v. 111, n. 2, p. 279–89, 2002.
11. 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. 807–8, 1976.

12. BECKMAN, D. A.; SCHNEIDER, M.; YOURENEFF, M.; TSE, F. L. Juvenile Toxicity Assessment of d,l-Methylphenidate in Rats. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, v. 83, n. 1, p. 48–67, 2008.
13. BETHANCOURT, J. A.; VÁSQUEZ, C. E.; BRITTON, G. B. Sex-dependent effects of long-term oral methylphenidate treatment on spontaneous and learned fear behaviors. *Neuroscience Letters*, v. 496, n. 1, p. 30–4, 2011.
14. BEYER, C.; FEDER, H. H. Sex steroids and afferent input: their roles in brain sexual differentiation. *Annual Review of Physiology*, v. 49, p. 349–64, 1987.
15. BIEDERMAN J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biological Psychiatry*. v. 57, n. 11, p. 1215–20, 2005.
16. BJORND AHL, L.; SODERLUND, L.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin–nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, v. 18. n, 4, p. 813–6, 2003.
17. BOITANI, C.; POLITI, M. G.; MENNA, T. Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biology of Reproduction*, v. 48, n. 4, p. 761–7, 1993.
18. BOLAÑOS, C. A.; BARROT, M.; BERTON, O.; WALLACE-BLACK, D.; NESTLER, E. J. Methylphenidate Treatment during Pre- and Periadolescence Alters Behavioral Responses to Emotional Stimuli at Adulthood. *Biological Psychiatry*, v. 54, n. 12, p. 1317–29, 2003.
19. BRADLEY, C. The behavior of children receiving Benzedrine. *American journal of Psychiatry*, v. 94, p. 577–85, 1937.
20. BUTZ, M.; WORGOTTER, F.; VAN OUYEN, A. Activity-dependent structural plasticity. *Brain Research Reviews*, v. 60, n. 2, p. 287–305, 2009.
21. CALABRESE, E. J. Dopamine: Biphasic Dose Responses. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 31, n. 4–5, p. 563–83, 2001.
22. CAMPBELL, B. A.; RANDALL, P. J. Paradoxical effects of amphetamine on preweanling and postweanling rats. *Science*, v. 195, n. 4281, p. 888–91, 1977.
23. CANSU, A.; EKINCI, O.; EKINCI, O.; SERDAROGLU, A.; ERDOGAN, D.; COSKUN, Z. K.; GÜRGEN, S. G. Methylphenidate has dose-dependent negative effects on rat spermatogenesis: decreased round spermatids and testicular weight and increased p53 expression and apoptosis. *Human & Experimental Toxicology*, v. 30, n. 10, p. 1592–600, 2011.
24. CASTLE, L.; AUBERT, R. E.; VERBRUGGE, R. R.; KHALID, M.; EPSTEIN, R. S. Trends in medication treatment for ADHD. *Journal of Attention Disorders*, v. 10, n. 4, p. 335–42, 2007.

25. CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. *Micron*, v. 34, n. 8, p. 365–72, 2003.
26. CHATTERJEE-CHAKRABARTY, S.; MILLER, B. T.; COLLINS, T. J.; NAGAMANI, M. Adverse effects of methylphenidate on the reproductive axis of adolescent female rats. *Fertility and Sterility*. v. 84, n. 2, p. 1131–8, 2005.
27. CHISTYAKOV, V. A.; DEM'YANENKO, S. V.; ALEXANDROVA, A. A.; GUTNIKOVA, L. V.; PROKOF'EV, V. N.; KOSHELEVA, O. N. Effect of plastoquinone derivative 10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on estrous cycle and 17 β -estradiol level in rats. *Biochemistry (Mosc)*, v. 77, n. 12, p. 1382–6, 2012.
28. CIECHANOWSKA, M.; LAPOT, M.; MATEUSIAK, K.; PRZEKOP, F. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reproductive Biology*, v. 10, n. 2, p. 85–124, 2010.
29. CLANCY, A. N.; ZUMPE, D.; MICHAEL, R. P. Estrogen in the medial preoptic area of male rats facilitates copulatory behavior. *Hormones and Behavior*, v. 38, n. 2, p. 86–93, 2000.
30. CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, v. 52, n. 1, p. 198–236, 1972.
31. CONOLLY, R. B.; LUTZ, W. K. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences*, v. 77, n. 1, p. 151–7, 2004.
32. DE VRIES, G. J. Sex differences in neurotransmitters systems. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 2, n. 1, p. 1–14, 1990.
33. DEL CAMPO, N.; CHAMBERLAIN, S. R.; SAHAKIAN, B. J.; ROBBINS, T. W. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*. v. 69, n. 12, p. e145–57, 2011.
34. DING, L. J.; YAN, G. J.; GE, Q. Y.; YU, F.; ZHAO, X.; DIAO, Z. Y.; WANG, Z. Q.; YANG, Z. Z.; SUN, H. X.; HU, Y. L. FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. *FEBS Letters*, v. 585, n. 15, p. 2437–44, 2011.
35. DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens wahrend der postnatalen entwicklug. *Monaths Veterinary Medicine*, v. 29, p. 650–2, 1974.

36. DUFAU, M. L. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annual Review of Physiology*, v. 50, p. 483–508, 1988.
37. EBLING, F. J. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction*, v. 129, n. 6, p. 675–83, 2005.
38. ENGERT, V.; PRUESSNER, J. C. Dopaminergic and Noradrenergic Contributions to Functionality in ADHD: The Role of Methylphenidate. *Current Neuropharmacology*. v. 6, p. 322–328, 2008.
39. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Harmonization in interspecies extrapolation: use of BW^{3/4} as default method in derivation of the oral RfD; 2006
40. FAVARETO, A.P.; FERNANDEZ, C. D.; DA SILVA, D. A.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KEMPINAS, W. G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with Cisplatin at peri-puberty. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 109, n. 2, p. 85–96, 2011.
41. FELICIO, L. F.; NASELLO A. G. Effect of acute bromopride treatment on rat prolactin levels and sexual behavior. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 22, n. 8, p. 1011–4, 1989.
42. FERNANDES, G. S. A.; ARENA, A. C.; FERNANDEZ, C. D.; MERCADANTE, A.; BARBISAN, L. F; KEMPINAS, W. G. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*, v. 23, n. 1, p. 106–12, 2007.
43. FILLER, R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. 1993. In: CHAPIN, R. E.; HEINDEL, J. H., editors. *Male reproductive toxicology*. San Diego, California: Academic Press; p. 334–43.
44. FONTANA, R. S.; VASCONCELOS, M. M.; WERNER Jr., J.; GÓES, F. F.; LIBERAL, E. F. Prevalência de TDAH em quatro escolas públicas brasileiras. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 65, n. 1, 2007.
45. FOWLER, J. S.; KROLL, C.; FERRIERI, R.; ALEXOFF, D.; LOGAN, J.; DEWEY, S. L.; SCHIFFER, W.; SCHLYER, D.; CARTER, P.; KING, P.; SHEA, C.; XU, Y.; MUENCH, L.; BENVENISTE, H.; VASKA, P.; VOLKOW, N. D. PET Studies of d-methamphetamine pharmacokinetics in primates: comparison with l-methamphetamine and (–)-cocaine. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 48, n. 10, p. 1724–32, 2007.
46. FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis morphometry, seminiferous epithelium, cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Feliscatus*). *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 5, p. 1554–61, 2003.

47. FRANÇA, L. R.; SILVA, V. A. Jr.; CHIARINI-GARCIA, H.; GARCIA, S. K.; DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 6, p. 1629–36, 2000.
48. GALLAVAN, R. H. Jr.; HOLSON, J. F.; STUMP, D. G.; KNAPP, J. F.; REYNOLDS, V. L. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reproductive Toxicology*, v. 13, n. 5, p. 383–90, 1999.
49. GENAZZANI, A. R.; BERNARDI, F.; MONTELEONE, P.; LUISI, S.; LUISI, M. Neuropeptides, neurotransmitters, neurosteroids, and the onset of puberty. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 900, p. 1–9, 2000.
50. GERARDIN, D. C. C.; BERNARDI, M. M.; MOREIRA, E. G.; PEREIRA, O. C. M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 83, n. 4, p. 618–623, 2006.
51. GERASIMOV, M. R.; FRANCESCHI, M.; VOLKOW, N. D.; GIFFORD, A.; GATLEY, S. J.; MARSTELLER, D.; MOLINA, P. E.; DEWEY, S. L. Comparison between Intraperitoneal and Oral Methylphenidate Administration: A Microdialysis and Locomotor Activity Study. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 295, n. 1, p. 51–7, 2000.
52. GIEDD, J. N.; LALONDE, F. M.; CELANO, M. J.; WHITE, S. L.; WALLACE, G. L.; LEE, N. R.; LENROOT, R. K. Anatomical brain magnetic resonance imaging of typically developing children and adolescents. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 48, n. 5, p. 465–470, 2009.
53. GLASS, A. R.; SWERDLOFF, R. S. Nutritional influences on sexual maturation in the rat. *Federation Proceedings*, v. 39, n. 7, p. 2360–4, 1980.
54. GOLD, M. S.; BLUM, K.; OSCAR-BERMAN, M.; BRAVERMAN, E. R. Low dopamine function in attention deficit/hyperactivity disorder: should genotyping signify early diagnosis in children? *Postgrad Med.* v. 126, n. 1, p. 153–77, 2014.
55. GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research (Part B)*. v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.
56. GREELEY, G. H. Jr.; KIZER, J. S. The effects of chronic methylphenidate treatment on growth and endocrine function in the developing rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 215, n. 3, p. 545–51, 1980.

57. GREENHILL, L.; KOLLINS, S.; ABIKOFF, H.; MCCRACKEN, J.; RIDDLE, M.; SWANSON, J.; MCGOUGH, J.; WIGAL, S.; WIGAL, T.; VITIELLO, B.; SKROBALA, A.; POSNER, K.; GHUMAN, J.; CUNNINGHAM, C.; DAVIES, M.; CHUANG, S.; COOPER, T. Efficacy and safety of immediate-release methylphenidate treatment for preschoolers with ADHD. *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 45, n. 11, p. 1284–93, 2006.
58. GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 9, n. 4, p. 411–6, 1998.
59. GUMY, C.; HUISSOUD, T.; DUBOIS-ARBER, F. Prevalence of Methylphenidate Prescription Among School-Aged Children in a Swiss Population: Increase in the Number of Prescriptions in the Swiss Canton of Vaud, From 2002 to 2005, and Changes in Patient Demographics. *Journal of Attention Disorders*, v. 14, n. 3, p. 267–72, 2010.
60. HARDY, D. F.; 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. 643–5, 1971.
61. HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 636, p. 1–15, 2008.
62. HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T.; LINCOLN, G. A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, n. 2, p. 209–13, 1978.
63. HOLEHAN, A. M.; MERRY, B. J. The control of puberty in the dietary restricted female rat. *Mechanism of Ageing and Development*, v. 32, n. 2–3, p. 179–91, 1985.
64. HULL, E.M.; LORRAIN, D.S.; DU, J.; MATUSZEWICH, L.; BITRAN, D.; NISHITA, J.K.; SCALETTA, L.L. Organizational and activational effects of dopamine on male sexual behavior. 1998. In: ELLIS, L., EBERTZ, L., editors. *Males, Females and Behavior: Toward Biological Understanding*. Greenwood Press, p. 79–96.
65. HYMAN, S. E. Mood disorders in children and adolescents: An NIMH perspective. *Biological Psychiatry*, v. 49, n. 12, p. 962–9, 2001.
66. JOHNSON, A. M. Analysis of animal weight gains in chronic toxicity studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. v. 7, n. 2, p. 307–16, 1981.
67. KIANIFARD, D.; HASANZADEH, S.; KIANIFARD, L. The study of time dependent administration of methylphenidate on the microscopic indices of spermatogenesis and sperm analysis in adult rats. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, v. 3, n. 2, p. 121–5, 2013.

68. KINSLEY, C. H.; TURCO, D.; BAUER, A.; BEVERLY, M.; WELLMAN, J.; GRAHAM, A. L. Cocaine alters the onset and maintenance of maternal behavior in lactating rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 47, n. 4, p. 857–64, 1994.
69. KISS, A. C. I.; WOODSIDE, B.; FELÍCIO, L .F.; ANSELMO-FRANCI, J.; DAMASCENO, D. C. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. *Physiology & Behavior*, v. 107, n. 3, p. 292–300, 2012.
70. KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *Journal of Neurochemistry*, v. 68, n. 5, p. 2032–7, 1997.
71. LADD, C. O.; HUOT, R. L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B.; MEANEY, M. J.; PLOTSKY, P. M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Progress in Brain Research*, v. 122, p. 81–103, 2000.
72. LAGACE, D. C.; YEE, J. K.; BOLAÑOS, C. A.; EISCH, A. J. Juvenile Administration of Methylphenidate Attenuates Adult Hippocampal Neurogenesis. *Biological Psychiatry*, v. 60, n. 10, p. 1121–1130, 2006.
73. LEUSSIS, M. P.; BOND, T. L.Y.; HAWKEN, C. M.; BROWN, R. E. Attenuation of maternal behavior in virgin CD-1mice by methylphenidate hydrochloride. *Physiology and Behavior*, v. 95, n. 3, p. 395–399, 2008.
74. LIU, X.; HERBISON, A. E. Dopamine Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Excitability in Male and Female Mice. *Endocrinology*. v. 154, n. 1, p. 340–50, 2013.
75. MAFFUCI, J. A.; GORE, A. C. Chapter 2: Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 274, p. 69–127, 2009.
76. MANNUZZA, S.; KLEIN, R.; BESSLER, A.; MALLOY, P.; LAPADULA, M. Adult psychiatric status of hyperactive boys grown up. *The American Journal of Psychiatry*, v.155, n. 4, p. 493–8, 1998.
77. MARCO, E. V.; ADRIANI, W.; RUOCCO, L.; CANESE, R.; SADILE, A. G.; LAVIOLA, G. Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: The issue of early adolescent. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 8, p. 1722–39, 2011.
78. MATTISON D. R.; PLANT, T. M.; LIN, H. M.; CHEN, H. C.; CHEN, J. J.; TWADDLE, N. C.; DOERGE, D.; SLIKKER, W. JR.; PATTON, R. E.; HOTCHKISS, C. E.; CALLICOTT, R. J.; SCHRADER, S. M.; TURNER, T. W.; KESNER, J. S.; VITIELLO, B.; PETIBONE, D. M.; MORRIS, S. M. Pubertal delay

- in male nonhuman primates (*Macaca mulatta*) treated with methylphenidate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 108, n. 39, p.16301–6, 2011.
79. MEACHEM, S. J.; WREFORD, N. G.; STANTON, P. G.; ROBERTSON, D. M.; MCLACHLAN, R. I. Follicle-stimulating hormone is required for the initial phase of spermatogenic restoration in adult rats following gonadotropin suppression. *Journal of Andrology*, v. 19, n. 6, p. 725–35, 1998.
80. NUMAN, M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, v. 5, n. 4, p. 163–90, 2006.
81. NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 30, n. 1, p. 46–64, 2009.
82. OLAZABAL, D. E.; ABERCROMBIE, E.; ROSENBLATT, J. S.; MORRELL, J. I. The content of dopamine, serotonin, and their metabolites in the neural circuit that mediates maternal behavior in juvenile and adult rats. *Brain Research Bulletin*, v. 63, n. 4, p. 259–68, 2004.
83. OTTH, C.; TORRES, M.; RAMÍREZ, A.; FERNANDEZ, J. C.; CASTRO, M.; RAUCH, M. C.; BRITO, M.; YAÑEZ, A. J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; SLEBE, J. C.; CONCHA, I. I. Novel identification of peripheral dopaminergic D2 receptor in male germ cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 100, n. 1, p. 141–50, 2007.
84. OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods. Instruments and Computers*, v. 32, n. 3, p. 446–9, 2000.
85. PEEKE, H. V.; DARK, K. A.; SALAMY, A.; SALFI, M.; SHAH, S. N. Cocaine exposure prebreeding to weaning: maternal and offspring effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 48, n. 2, p. 403-10, 1994.
86. PEREIRA, A. C. C. I.; DEL BEL, E. Metilfenidato - principal tratamento para o Déficit de Atenção e Hiperatividade: características neuroquímicas e seus efeitos em modelos experimentais. *Neurobiologia*, v. 73, n. 2, p. 127–32, 2010.
87. PEROBELLI, J. E.; MARTINEZ, M. F.; FRANCHI, C. A. S.; FERNANDEZ, C. D.; CAMARGO, J. L.; KEMPINAS, W. D. G. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, v. 73, n. 13–14, p. 991–1002, 2010.
88. POULTON, A.; COWELL, C. T. Slowing of growth in height and weight on stimulants: A characteristic pattern. *Journal of Pediatrics and Child Health*, v. 39, n. 3, p. 180–5, 2003.

89. PTACEK, R.; KUZELOVA, H.; PACLT, I. Effect of Stimulants on Growth of ADHD Children: A Critical Review. *Activitas Nervosa Superior*, v. 51, n. 4, p. 140–6, 2009.
90. 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. 605–9, 1979.
91. RASMUSSEN, P.; GILLBERG, C. Natural outcome of ADHD with developmental coordination disorder at age 22 years: a controlled, longitudinal, community-based study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 39, n. 11, p. 1424–31, 2000.
92. 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. 103–7, 1978.
93. ROBINSON, D. L.; ZITZMAN, D. L.; WILLIAMS, S. K. Mesolimbic dopamine transients in motivated behaviors: focus on maternal behavior. *Frontiers in Psychiatry*, v. 2, n. 23, p. 1–13, 2011.
94. RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. 1990. In: RUSSEL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P. editors. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater, Florida: Cache River Press. p. 1–40.
95. SEED, J.; CHAPI, R. E.; CLEGG, E. D.; DOSTAL, L. A.; FOOTE, R. E.; HURTT, M. E.; KLINEFELTER, G. R.; MAKRIS, S. L.; PERREAULT, S. D.; SCHRADER, S.; SEYLER, D.; SPRANDO, R.; TREINEN, K. A.; VEERAMACHANENI, D. N.; WISE, L. D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology*, v. 10, n. 3, p. 237–44, 1996.
96. SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFFER, K. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 5, p. 751–5, 2007.
97. SIMON, V.; CZOBOR, P.; BALINT S.; MESZAROS A.; BITTER, I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *British Journal of Psychiatry*, v. 194, n. 3, p. 204–11, 2009.
98. SISK, C. L.; ZEHR, J. L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 26, n. 3-4, p. 163–74, 2005.

99. SKOUNTI, M.; PHILALITHIS, A.; GALANAKIS, E. Variations in prevalence of attention deficit hyperactivity disorder worldwide. *European Journal of Pediatrics*, v. 166, n. 2, p. 117–23, 2007.
100. SLAMBEROVÁ, R.; CHAROUSOVÁ, P.; POMETLOVÁ, M. Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during pre-mating, gestation and lactation. *Reproductive Toxicology*, v. 20, n. 1, p. 103–10, 2005.
101. SOLANTO, M. V. Clinical psychopharmacology of AD/HD: Implications for animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 24, n. 1, p. 27–30, 2000.
102. SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 24, n. 4, p. 417–63, 2000.
103. STAHL, S. M. *Psicofarmacologia: Base Neurocientífica e aplicações práticas*. 2006. In: _____, editors. *Psicofarmacologia da Recompensa e Drogas de Abuso*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
104. STOLZENBERG, D. S.; NUMAN, M. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 3, p. 826–47, 2011.
105. TEICHER, M. H.; ANDERSEN, S. L.; POLCARI, A.; ANDERSON, C. M.; NAVALTA, C. P. Developmental neurobiology of childhood stress and trauma. *The Psychiatric Clinics of North America*, v. 25, n. 2, p. 397–426, 2002.
106. TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, v. 179, n. 3, p. 183–96, 2002.
107. TERASAWA, E. I.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological Mechanisms of the Onset of Puberty in Primates. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 1, p. 111–51, 2001.
108. THAPAR, A.; COOPER, M.; EYRE, O.; LANGLEY, K. What have we learnt about the causes of ADHD? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 54, n.1, p. 3–16, 2013.
109. THOMAS, S. A.; PALMITER, R. D. Impaired maternal behavior in mice lacking norepinephrine and epinephrine. *Cell*, v. 91, n. 5, p. 583–92, 1997.
110. TSUTSUMI, R.; WEBSTER, N. J. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine Journal*, v. 56, n. 6, p. 729–37, 2009.
111. U.S. EPA. Guideline for mutagenicity assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/630/R-98/003, 1986.

112. UNIS, A. S.; DAWSON, T. M.; GEHLERT, D. R.; WAMSLEY, J. K. Autoradiographic localization of [³H] methylphenidate binding sites in the brain. *European Journal of Pharmacology*, v. 113, n. 1, p. 155–7, 1985.
113. VASCONCELOS, M. M.; WERNER Jr., J.; MALHEIROS, A. F. A.; LIMA, D. F. N.; SANTOS, I. S. O.; BARBOSA, J. B. Prevalência do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade numa escola pública primária. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 61, n. 1, p. 67–73, 2003.
114. VERNOTICA, E. M.; ROSENBLATT, J. S.; MORRELL, J. I. Microinfusion of cocaine into the medial preoptic area or nucleus accumbens transiently impairs maternal behavior in the rat. *Behavioral Neuroscience*, v. 113, n. 2, p. 377–90, 1999.
115. VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FOWLER, J. S.; FISCHMAN, M.; FOLTIN, R.; ABUMRAD, N. N.; GATLEY, S. J.; LOGAN, J.; WONG, C.; GIFFORD, A.; DING, Y. S.; HITZEMANN, R.; PAPPAS, N. Methylphenidate and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain, *Life Sciences*, v. 65, n. 1, p. 7–12, 1999.
116. WADDEL, J.; McARTHUR, M. M. Sexual Differentiation of the Brain and ADHD: What Is a Sex Difference in Prevalence Telling Us? In: *Behavioral Neuroscience of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Its Treatment. Current Topics in Behavioral Neurosciences*, v. 9, p. 341–60, 2012.