



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MATHEUS AZEVEDO BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HORMONAIS E DA  
ESTEROIDOGÊNESE EM RATOS PERIPÚBERES  
EXPOSTOS MATERNALMENTE À FLUOXETINA**

**MATHEUS AZEVEDO BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HORMONAIS E DA  
ESTEROIDOGÊNESE EM RATOS PERIPÚBERES  
EXPOSTOS MATERNALMENTE À FLUOXETINA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, associada Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Estefânia Gastaldello  
Moreira

Londrina  
2018

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

Barbosa, Matheus Azevedo.

Avaliação de parâmetros hormonais e da esteroidogênese em ratos peripúberes expostos maternalmente à fluoxetina / Matheus Azevedo Barbosa. - Londrina, 2018. 44 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Esteroidogênese - Tese. 2. proteína StAR - Tese. 3. 3 $\beta$ -HSD - Tese. 4. Hormônios Esteroidais - Tese. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

MATHEUS AZEVEDO BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HORMONAIS E DA  
ESTEROIDOGÊNESE EM RATOS PERIPÚBERES EXPOSTOS  
MATERNALMENTE À FLUOXETINA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, associada Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Ernane Uchôa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Guilherme Bracarense Filgueiras  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de março de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e da possibilidade de concluir mais essa etapa;

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Estefânia G. Moreira, por todo o apoio, orientação e dedicação que tive a honra de receber durante os 5 anos em que estive no laboratório;

A todos os amigos que cultivei no departamento, pela amizade, companheirismo e disposição a ajudar em todos os momentos, sendo eles relacionados ou não ao trabalho;

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Ciências Fisiológicas, que mantêm o departamento funcionando da melhor maneira possível;

À CAPES por conceder a bolsa de Mestrado e à Fundação Araucária por conceder o fomento necessário ao trabalho;

Gostaria de agradecer ao meu pai, Carlos Alberto, minha mãe, Valéria e ao meu irmão, Gabriel, por todo o incentivo a seguir em frente dado desde o começo da minha vida, e à minha namorada, Michelle, pelo suporte nas partes árduas da caminhada desenvolvida ao longo do Mestrado;

A meus amigos de longa data pela amizade verdadeira e duradoura que não conhece tempo, distância ou ausência;

À Universidade Estadual de Londrina por proporcionar a oportunidade da pós-graduação.

Acredito que ainda há diversas pessoas a quem agradecer, pois a motivação ao trabalho não começa só nas atividades, mas no bom dia e nas gentilezas da vida, então, muito obrigado a todos por tudo.

BARBOSA, Matheus Azevedo. **Avaliação de parâmetros hormonais e da esteroidogênese em ratos peripúberes expostos maternalmente à fluoxetina.** 2018. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Antidepressivos são usados amplamente ao redor do mundo, principalmente para o tratamento de distúrbios do humor, transtornos de ansiedade e síndrome algica. Mulheres que fazem uso destes fármacos, costumam continuar a sua utilização durante a gravidez. A classe de antidepressivos mais prescrita a grávidas é a dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, que inclui a fluoxetina. Sabe-se que a fluoxetina pode atravessar a barreira hematoplacentária e ser excretada no leite materno. Conseqüentemente, ocorre a exposição indireta do infante por meio dessas vias. Sabendo que a fluoxetina altera o balanço de neurotransmissores no sistema nervoso central, vários estudos experimentais mostram que a exposição maternal a essa droga induz efeitos adversos no sistema nervoso, reprodutor e cardíaco. O presente estudo teve como objetivo avaliar, em filhotes machos e fêmeas pré-púberes e/ou púberes, o efeito da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação em parâmetros relacionados aos hormônios esteroidais: data da instauração da puberdade, concentração plasmática de testosterona, estrógeno, progesterona e corticosterona, expressão da proteína StAR (proteína regulatória aguda da esteroidogênese) e da enzima 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase) em ovário, testículo e adrenal. O único parâmetro que diferiu de maneira estatisticamente significativa entre os grupos foi a concentração plasmática de progesterona, a qual se mostrou aumentada nas ratas expostas maternalmente à fluoxetina ( $t_{15}=-3,34$ ,  $p=0,004$ ). Frente aos resultados obtidos, a exposição maternal à fluoxetina parece não impactar de maneira generalizada a esteroidogênese, tendo impacto somente a síntese/liberação da progesterona. Acredita-se que esse efeito se deve à inervação serotoninérgica no hipotálamo, pituitária e ovários, responsáveis pela regulação e síntese do hormônio. Estudos futuros são necessários para investigar o mecanismo envolvido no aumento da concentração plasmática de progesterona em ratas pré-púberes expostas à FLX.

**Palavras-chave:** Esteroidogênese. Proteína StAR. 3 $\beta$ -HSD. Corticosterona. Progesterona. Estrógeno. Testosterona.

BARBOSA, Matheus Azevedo. **Evaluation of hormonal parameters and steroidogenesis in peripubescent rats maternally exposed to fluoxetine.** 2018. 44 p. Dissertation (Master's Degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

### ABSTRACT

Antidepressants are widely used around the world, mainly for the treatment of mood disorders, anxiety and pain syndrome. Women who use this drug often continue to use it during pregnancy. The selective serotonin reuptake inhibitors, which includes fluoxetine, are the main class of antidepressants prescribed to pregnant women. It is known that fluoxetine can cross the placental blood barrier and be excreted in breast milk. Consequently, indirect exposure of the infant via these routes occurs. Knowing that fluoxetine alters the balance of neurotransmitters in the central nervous system, several studies show that maternal exposure to this drug leads to various adverse effects on the nervous, reproductive and cardiac systems. The aim of the present study was to evaluate the effect of exposure to fluoxetine during gestation and lactation on parameters related to steroid hormones in pre-pubertal and/or pubertal males and females: date of puberty onset, plasmatic testosterone, estrogen, progesterone and corticosterone concentrations, expression of StAR (acute regulatory protein of steroidogenesis) protein and 3 $\beta$ -HSD enzyme (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) in ovary, testis and adrenal gland. The only parameter that reached statistical significance between the groups was the plasmatic progesterone concentration, which was increased in the rats maternally exposed to fluoxetine ( $t_{15} = -3.34$ ,  $p = 0.004$ ). The maternal exposure to fluoxetine does not seem to broadly affect steroidogenesis, impacting only the synthesis/release of progesterone. It is hypothesized that it may be due to serotonergic innervation that reaches the components, hypothalamus, pituitary and ovary, responsible for regulating the synthesis and release of the hormone. Further studies are needed to investigate the mechanism involved in the increased plasmatic progesterone concentration.

**Key-words:** Steroidogenesis. StAR protein. 3 $\beta$ -HSD. Corticosterone. Progesterone. Estrogen. Testosterone.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Via de síntese dos hormônios esteroidais (adaptado de Spritzer et al. (2012)).....	13
<b>Figura 2</b> – Delineamento experimental. DG: dia gestacional, DPN: dia pós-natal. Fonte: Próprio autor.....	17
<b>Figura 3</b> – Células de Leydig (A), córtex da adrenal (B) e folículo maduro (C). Fonte: Departamento de Histologia/UEL.....	30
<b>Figura 4</b> – Ganho de massa corpórea materno no decorrer da gestação e lactação em animais tratados ou não com FLX. Dados expressos em média±EPM de 21-23 animais em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou efeito do tempo ( $p \leq 0,001$ ).....	22
<b>Figura 5</b> – Número de filhotes nascidos vivos provenientes de mãe tratadas ou não com FLX. Dados expressos como média±EPM de 22-23 ninhadas em cada grupo. $p=0,662$ , teste t de <i>Student</i> .....	23
<b>Figura 6</b> – Ganho de massa corporal de filhotes expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 21-23 ninhadas em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou efeito do tempo. ( $p \leq 0,001$ ).....	23
<b>Figura 7</b> – Dia da abertura vaginal (A) e do descolamento do prepúcio (B) em animais expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 11-12 animais em cada grupo. $p=0,621$ (A) e $p=0,865$ . Teste t de <i>Student</i> .....	24
<b>Figura 8</b> – Representação percentual das ratas expostas ou não à FLX com abertura vaginal nos diferentes dias avaliados (A) e representação percentual dos ratos expostos ou não à FLX com descolamento do prepúcio nos diferentes dias avaliados (B) .....	28

<b>Figura 9</b> – Concentração plasmática de estrógeno no DPN 28 (A) e no dia da abertura vaginal (B) e de testosterona no DPN 38 (C) e no dia do descolamento do prepúcio (D) em animais expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 10-13 animais em cada grupo. p=0,538 (A), p=0,639 (B), p=0,374 (C) e p=0,927 (D), teste t de <i>Student</i> .....	26
<b>Figura 10</b> – Concentração plasmática de progesterona no DPN28 em animais expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 7-8 animais em cada grupo. *p=0,004, teste t de <i>Student</i> .....	27
<b>Figura 11</b> – Concentração plasmática da corticosterona basal e estimulada com ACTH em ratos púberes expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 11-12 animais em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou efeito do estímulo com ACTH (p<0,001) .....	28
<b>Figura 12</b> – Exemplo de imunomarcção para as proteínas 3β-HSD (A) e StAR (B) no córtex da adrenal. Fonte: Próprio autor.....	29
<b>Figura 13</b> – Densidade óptica nos tecidos imunomarcados para proteína StAR (A) e 3β-HSD (B) em ratos (testículo e adrenal) e ratas (ovário) pré-púberes. Dados expressos em média±EPM de 5-6 animais em cada grupo. A: p=0,269; p=0,127; p=0,059. B: p=0,437; p=0,734; p=0,738. Teste t de <i>Student</i> .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 $\beta$ -HSD	3-B-Hidroxiesteroide Desidrogenase
5-HT	Serotonina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CTL	Controle
DAB	3-3'Diaminobenzidina
DG	Dia Gestacional
DPN	Dia Pós-Natal
FLX	Fluoxetina
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPG	Hipotálamo-Pituitária-Gônadas
IHC	Imuno-histoquímica
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
LH	Hormônio Luteinizante
PBS	Tampão Salina Fosfato
StAR	Proteína Regulatória Aguda da Esteroidogênese

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
3.1	ANIMAIS E TRATAMENTO .....	16
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	16
3.3	ACOMPANHAMENTO DA ABERTURA VAGINAL E DESCOLAMENTO DO PREPÚCIO.....	18
3.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	18
3.5	TESTE DE ESTÍMULO POR ACTH .....	21
3.6	DOSAGEM HORMONAL PLASMÁTICA .....	21
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	22
4.1	TOXICIDADE GERAL.....	22
4.2	ABERTURA VAGINAL E DESCOLAMENTO DO PREPÚCIO .....	24
4.3	DOSAGEM HORMONAL PLASMÁTICA .....	26
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICAS.....	30
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de antidepressivos estende-se pelo mundo inteiro, não só para o tratamento de distímia e depressão, mas também para síndromes álgicas e transtornos de ansiedade. Mulheres que tenham alguma dessas desordens e engravidem ou venham a manifestar essas desordens durante a gestação podem ter indicação de uso de antidepressivos para melhorar sua qualidade de vida e, conseqüentemente, a do bebê. A classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (5-HT) (ISRS), a qual inclui a fluoxetina (FLX), é a mais comumente prescrita às gestantes (HUYBRECHTS et al., 2013; JIMENEZ-SOLEM et al., 2013; ZOEGA et al., 2015).

Sabe-se que a FLX atravessa a barreira placentária e pode ser encontrada no cordão umbilical, (HENDRICK et al., 2003) placenta e líquido amniótico (POHLAND et al., 1989). A FLX pode, ainda, ser encontrada no leite materno (HEIKKINEN et al., 2003). Assim, o uso de FLX pelas mães pode levar fetos e lactentes a se desenvolverem com maior disponibilidade de 5-HT em seus organismos. Durante a embriogênese, a 5-HT é um fator trófico, regulando o desenvolvimento dos sistemas monoaminérgicos (WHITAKER-AZMITIA et al., 1995).

Em humanos, o uso materno de ISRS foi associado a aumento do risco de nascer abaixo do peso (JENSEN et al., 2013b) e diminuição no índice de APGAR, escala que avalia a adaptação do recém-nascido ao ambiente extrauterino (JENSEN et al., 2013a).

Em animais experimentais, alterações funcionais e/ou morfológicas têm sido descritas nos sistemas nervoso central (LISBOA et al., 2007; FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008; GENTILE; GALBALLY, 2011; SMIT-RIGTER et al., 2012; FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2016; ÂMELLEM et al., 2017), cardiovascular (HIGASHI et al., 2016; MARQUES et al., 2017) e reprodutivo (GOUVÊA et al., 2008; VIEIRA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016).

Em ratos, foi descrito que concentrações aumentadas de 5-HT durante o período pré-natal podem resultar em menor hidrólise de fosfoinosítídeo após estímulo de receptores serotoninérgicos (ROMERO; TOSCANO; DEL RIO,

1994), menor expressão de transportadores de 5-HT (MONTERO; DE CEBALLOS; DEL RIO, 1990) bem como de receptores serotoninérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos (JASON; COOPER; FRIEDMAN, 1981; DE CEBALLOS et al., 1985). Esses estudos indicam que a exposição materna à FLX e o consequente aumento da disponibilidade de 5-HT no organismo fetal pode resultar no desenvolvimento de um encéfalo com alterações bioquímicas que podem levar a alterações funcionais.

É interessante notar que, entre os efeitos descritos em animais experimentais expostos durante o período perinatal à FLX, alguns se relacionam com os hormônios esteroides. Francis-Oliveira (2013) observou que ratos e ratas púberes expostas diariamente a 5 mg/kg de FLX durante a gestação e amamentação apresentaram menor concentração plasmática de corticosterona após estresse agudo de imobilização do que seus controles, embora essa redução não tenha atingido significância estatística. Usando o mesmo protocolo experimental, Bacchi (2016) relatou menor expressão da enzima 3- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) na adrenal de ratos e ratas púberes. Pawluski et al. (2012) relataram menor concentração plasmática de corticosterona e menor densidade de receptores glicocorticoides em ratos púberes (mas não em ratas) expostos durante a gestação a 5 mg/kg de fluoxetina, via bomba subcutânea. Finalmente, dos Santos et al. (2016), relataram atraso da abertura vaginal em ratas expostas à FLX seguindo o mesmo protocolo de Francis-Oliveira (2013) e Bacchi (2016).

Os efeitos hormonais da FLX podem decorrer de alterações funcionais nos sistemas monoaminérgicos pois, como anteriormente relatado, a 5-HT é uma molécula sinalizadora importante para seus desenvolvimentos. Esses sistemas comunicam-se com os eixos hipotálamo-pituitária-gônada (HPG) e/ou hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) por meio de: (1) presença de receptores de dopamina do tipo D<sub>1</sub> no hipotálamo (JABER et al., 1997); (2) inervação serotoninérgica do hipotálamo pelos núcleos da Rafe (PARENT; DESCARRIES; BEAUDET, 1981), levando à regulação da liberação do GnRH pela 5-HT (ARIAS et al., 1990); (3) presença de receptores de 5-HT e dopamina na glândula pituitária (DE SOUZA, 1986); (4) presença de receptores de 5-HT (HENRIKSEN; DIZEYI; ABRAHAMSSON, 2012) e de dopamina (REY-ARES et al., 2007) nos ovários; (6) efeitos da 5-HT nos testículos, como indução da contração dos ductos deferentes

(HAY; WADSWORTH, 1982) e regulação do fluxo sanguíneo testicular (COLLIN; DAMBER; BERGH, 1996) e presença de receptores de dopamina nas células de Leydig (GONZALEZ et al., 2015); (7) presença de células produtoras de 5-HT (BRINDLEY et al., 2017) e de receptores de dopamina (PIVONELLO et al., 2004) no córtex da adrenal (BRINDLEY et al., 2017). Portanto, alterações nestes sistemas podem resultar em alterações na síntese e/ou liberação de hormônios esteroides. Ainda mais, sabe-se que a 5-HT também influencia o próprio desenvolvimento do eixo HPA mediante alteração nos receptores de glicocorticoides que, por fim, atuam no desenvolvimento do eixo HPA (MEANEY et al., 1994; LAPLANTE; DIORIO; MEANEY, 2002; ANDREWS; MATTHEWS, 2004).

Os hormônios esteroides são peças-chave na manutenção da homeostase do organismo e da capacidade reprodutiva. Toda a cadeia de síntese dos esteroides (Figura 1) começa com a conversão do colesterol em pregnenolona pela enzima colesterol desmolase, localizada na matriz mitocondrial. Pensava-se que esse era o passo limitante à síntese esteroidal, porém, hoje em dia, sabe-se que para ocorrer a ação da colesterol desmolase, o colesterol deve ser translocado para o interior da mitocôndria e o componente responsável por essa translocação é a proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR), tornando-a, assim, a peça-chave na regulação da esteroidogênese (STOCCO, 2001). Após a síntese da pregnenolona, ocorre a formação de progesterona por intermédio da enzima  $3\beta$ -HSD, que também é importante na síntese de glicocorticoides e mineralocorticoides (RASMUSSEN; EKSTR; ZAMARATSKAIA, 2013)



foram quantificados em dias que antecederiam a abertura vaginal ou descolamento do prepúcio bem como no dia no qual esses marcadores foram observados já que para que a maturação sexual ocorra é necessário um pico de hormônios sexuais (SPRITZER et al., 2012). Finalmente, para se avaliar a funcionalidade da glândula adrenal, quantificou-se a corticosterona plasmática basal e após estímulo com hormônio liberador de corticotrofina (ACTH). A funcionalidade da adrenal somente foi investigada em machos pois estudos prévios em nosso laboratório (FRANCIS-OLIVEIRA, 2013) e o estudo de Pawluski et al (2012) detectaram ausência de efeito em fêmeas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, em ratos, se a exposição à FLX durante a gestação e amamentação influencia marcadores relacionados à esteroidogênese de filhotes machos e fêmeas durante o estabelecimento da puberdade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, em filhotes machos e/ou fêmeas expostos à FLX durante a gestação e amamentação:

1. As idades nas quais a abertura vaginal e descolamento do prepúcio ocorreram;
2. A concentração plasmática de estrógeno e progesterona em ratas pré-púberes (dia pós-natal (DPN) 28);
3. A concentração plasmática de estrógeno em ratas púberes (dia da abertura vaginal);
4. A concentração plasmática de testosterona em ratos pré-púberes (DPN 38) e púberes (dia do descolamento do prepúcio);
5. A concentração plasmática de corticosterona basal e de corticosterona após estímulo com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em ratos púberes;
6. A expressão da proteína StAR e da enzima  $3\beta$ -HSD no testículo e adrenal em machos (DPN 38) e nos ovários em fêmeas (DPN 28).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

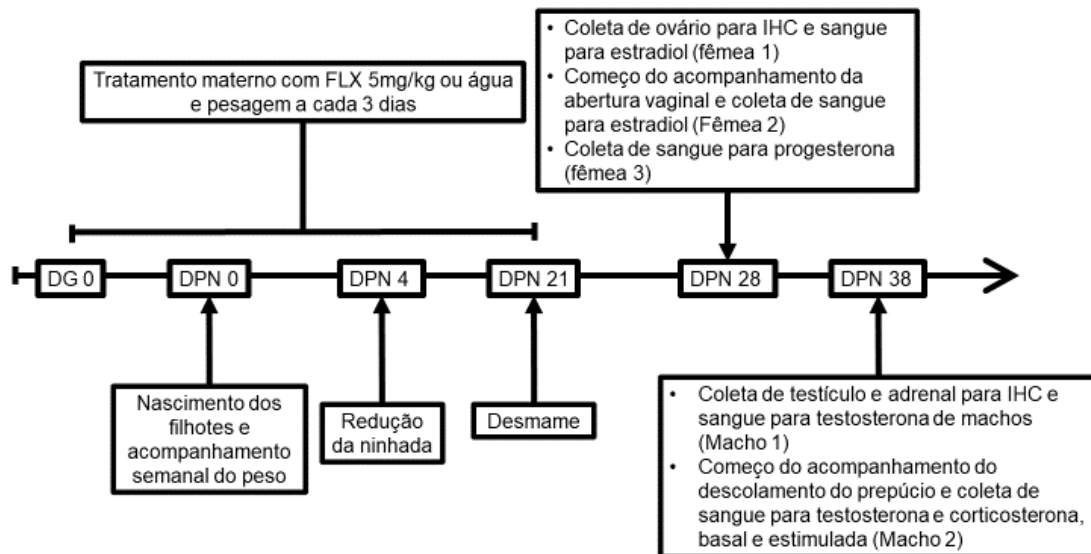
Ratos (n=18) e ratas (n=45) Wistar virgens, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina constituíram a geração parental. Eles foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas sob condições padronizadas (temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração *ad libitum*. Ao final das tardes, um rato foi colocado em uma gaiola com uma rata na fase proestro e na manhã do dia seguinte, esfregaços vaginais foram realizados para diagnóstico da prenhez. A presença de células características da fase estro do ciclo estral e de espermatozoides indicaram prenhez positiva. Nesse dia, denominado dia gestacional 0 (DG0), as ratas foram alocadas para os grupos experimentais. As ratas do grupo controle (CTL) foram tratadas com água, enquanto as ratas do grupo FLX receberam 5 mg/kg de FLX (Daforin® solução oral, EMS, Brasil). O tratamento foi por gavagem, diário e durou toda a gestação e lactação (desmame no DPN 21). O regime de tratamento adotado tem sido usado em nosso laboratório e as premissas adotadas para a escolha da dose podem ser encontradas em Lisboa et al. (2007) com a diferença que o cálculo, no presente estudo, foi para ratos e não camundongos como na referida literatura.

No dia do nascimento (DPN 0) os filhotes foram contados e a ninhada, pesada. No DPN 4, ninhadas contendo mais de 10 filhotes foram reduzidas. Ninhadas contendo menos de 8 filhotes, foram descartadas. A padronização do número de filhotes por ninhada é importante para se minimizar diferenças entre as ninhadas em relação à disponibilidade de leite e cuidado maternos.

#### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Figura 2 ilustra o delineamento experimental empregado nesse estudo.

**Figura 2** – Delineamento experimental. DG: dia gestacional, DPN: dia pós-natal.



Fonte: Próprio autor.

Foram utilizadas 45 ninhadas: 22 do grupo CTL e 23 do grupo FLX. De cada ninhada, foram separados 2 machos e 3 fêmeas, que foram assim utilizados:

- Fêmea 1: No DPN 28, foi decapitada e teve sangue e ovários coletados. O sangue foi utilizado para dosagem plasmática de estrógeno e os ovários foram utilizados para imuno-histoquímica (IHC) para a proteína StAR e para a enzima  $3\beta$ -HSD.
- Fêmea 2: Foi acompanhada a abertura vaginal a partir do DPN 28 e, assim que constatada total abertura, a rata foi decapitada e teve seu sangue coletado para dosagem plasmática de estrógeno.
- Fêmea 3: No DPN 28, foi decapitada e teve seu sangue coletado para a dosagem plasmática de progesterona.
- Macho 1: No DPN 38, foi decapitado e teve sangue, testículo esquerdo e a adrenal esquerda coletados. O sangue foi utilizado para dosagem plasmática de testosterona, enquanto que os testículos e a adrenal foram utilizados para IHC para a proteína StAR e para a enzima  $3\beta$ -HSD.

- Macho 2: Foi acompanhado o descolamento do prepúcio a partir do DPN 38 e, assim que constatado o total descolamento, foi realizado o teste de estímulo por ACTH e coleta de sangue para dosagem de corticosterona e testosterona plasmáticas.

A cada 3 dias as fêmeas foram pesadas para ajuste do volume de FLX administrado.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEL, sob protocolo nº 13046.2016.24.

### 3.3 ACOMPANHAMENTO DA ABERTURA VAGINAL E DESCOLAMENTO DO PREPÚCIO

A partir do DPN 28, foi acompanhada diariamente a abertura vaginal das ratas, enquanto os machos tiveram o descolamento do prepúcio observado todos os dias a partir do DPN 38 (USEPA, 2009a, 2009b). No dia da abertura/descolamento total, os animais foram pesados e decapitados para a coleta de sangue e órgãos acima especificados.

### 3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os órgãos coletados foram preparados para análise por IHC com os anticorpos anti-3 $\beta$ -HSD (bs-3906R, BIOSSUSA®, EUA) e anti-StAR (FL-285, Santa Cruz Biotechnology®, EUA), realizada no laboratório Logos, Londrina, PR seguindo o protocolo do próprio laboratório. Após a coleta, as adrenais, ovários e testículos foram fixados em paraformaldeído 4% por 4, 4 e 24 horas, respectivamente. Em seguida, o material foi incluído em parafina e cortado em secções de 7mm em micrótomo para a confecção das lâminas de IHC.

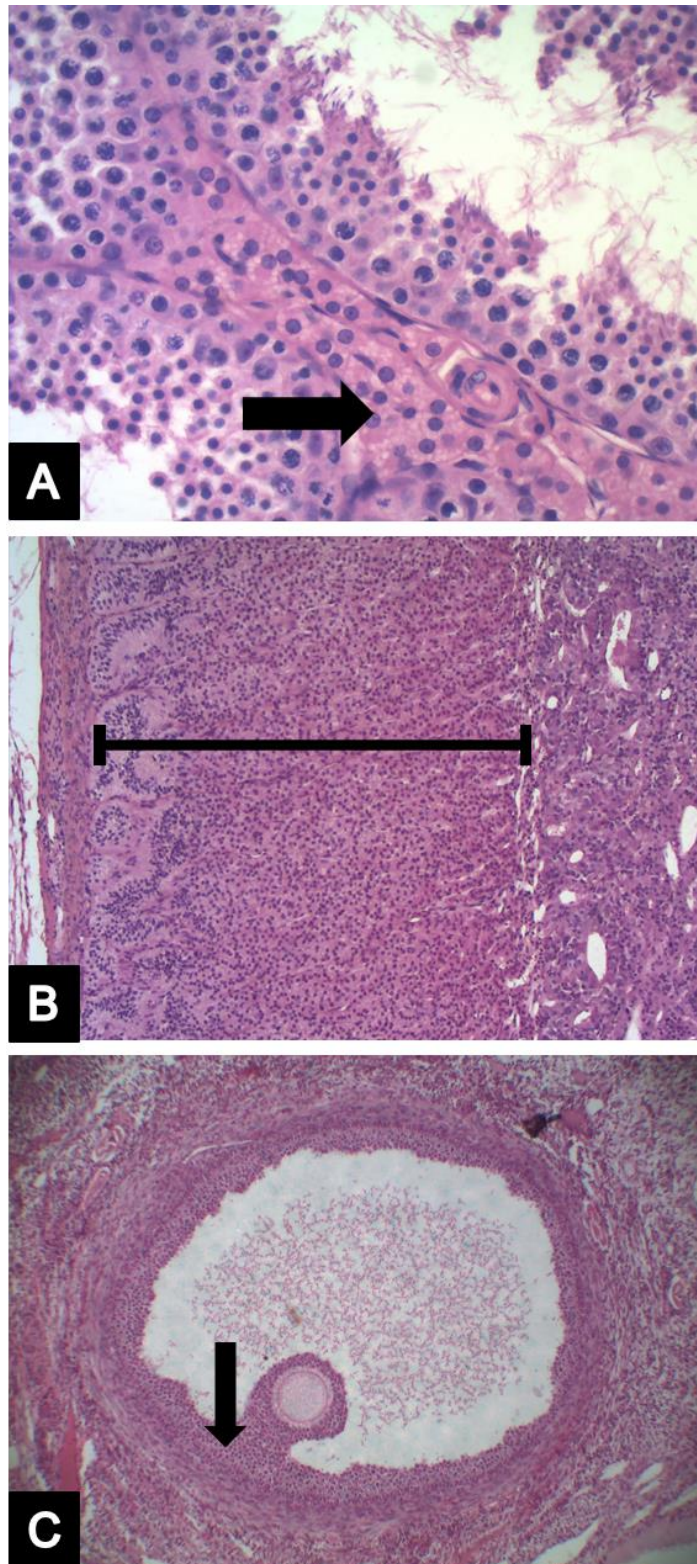
As secções, já nas lâminas, foram desparafinizadas em estufa a 50°C por 3 horas e, em seguida, passaram por 2 banhos de xilol 100% por 15 e 5 minutos, respectivamente, 1 lavagem em álcool/xilol (1:1), 2 lavagens em álcool 100% e em água corrente. Em seguida, as lâminas foram colocadas em panela de pressão com solução de bloqueio (Tampão Tris 0,6g/L + EDTA 0,4g/L, pH 8,8) por 3

minutos para que houvesse a recuperação antigênica, expondo os sítios de ligação dos anticorpos. Após essa etapa, as lâminas passaram por banho-maria para que houvesse o resfriamento dos cortes e foram lavadas em água corrente. O próximo passo foi a incubação dos cortes em solução de bloqueio da enzima peroxidase (peróxido de hidrogênio 10%) por 10 minutos e, em seguida, seguiram para banho em tampão salina fosfato (PBS) 0,1M por 5 minutos. Seguindo o bloqueio da peroxidase, os anticorpos anti-StAR ou anti-3 $\beta$ -HSD, ambos diluídos em soluções 1:100, foram depositados acima dos cortes com auxílio de micropipeta e as lâminas foram levadas à estufa para incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS e levadas a banho de PBS por 5 minutos, para que, em seguida, fosse depositado o sistema de detecção por *horseradish peroxidase* (peroxidase de rábano, HiDef Detection, Cell Marque, EUA) intercalado novamente com lavagem de PBS e banhos na mesma solução por 5 minutos. Para finalizar, a lâmina foi acrescida de solução de 3-3'diaminobenzidina (DAB, Cell Marque, EUA) 0,05% por 1 minuto e lavada em água corrente. Em seguida, procedeu-se a contracoloração banhando a lâmina em hematoxilina por 1 minuto, 4 lavagens em álcool 100%, amoníaco por 1 minuto, 3 lavagens em álcool (80%, 95%, 95%) e secagem na estufa por 5 minutos a 50°C. Ao final, foi adicionada a lamínula, tendo como meio de montagem o Ery-Mount (Easy Path, Brasil).

Depois de prontas as lâminas, a imunorreatividade foi avaliada por densidade óptica em microscópio de luz (Axiophot Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera Moticam 2500, 5.0 MP, USB 2.0 e com ajuda do software Motic Images Plus 3.0. Foram obtidas, já com background corrigido, 2 imagens de cada lâmina, das quais foram selecionadas áreas de 100x100 pixels que fossem ocupadas inteiramente pela região desejada e a quantificação da marcação foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH, EUA) com auxílio do plug-in Colour\_Deconvolution.

As áreas selecionadas para a fotografia das lâminas corresponderam às regiões onde se encontravam as células responsáveis por sintetizar os hormônios esteroides, ou seja, células de Leydig no testículo, zona cortical da adrenal e folículo maduro nos ovários conforme mostrado nas Figuras 3A, 3B e 3C, respectivamente.

**Figura 3** – Células de Leydig (A), córtex da adrenal (B) e folículo maduro (C).



Fonte: Departamento de Histologia/UEL.

### 3.5 TESTE DE ESTÍMULO POR ACTH

Os ratos foram anestesiados com tiopental (50mg/kg, intraperitoneal) para canulação da artéria femoral. Em seguida, ainda com o animal anestesiado, foram coletados 2mL de sangue para dosagem de corticosterona basal. Após a coleta, foi administrado por via intraperitoneal, a dose de 1µg de ACTH (Synacthen®, Novartis, EUA), a qual foi escolhida em ensaio piloto. Depois de 15 minutos, o animal foi decapitado e foi coletado sangue novamente para a dosagem de corticosterona estimulada. Esse teste teve o intuito de avaliar a capacidade funcional da glândula adrenal (DIJKSTRA; BINNEKADE; TILDERS, 1996).

### 3.6 DOSAGEM HORMONAL PLASMÁTICA

Após decapitação, o sangue foi coletado em tubos de vidro heparinizados e centrifugado a 2000 rotações por minuto por 15 minutos a 4°C para separação do plasma, que foi congelado em freezer -80°C até o dia da dosagem. A concentração plasmática de progesterona foi obtida por radioimunoensaio usando ImmuChem™ Double Antibody Progesterone <sup>125</sup>I RIA Kit (MP Biomedicals, EUA) (variação intra-ensaio: 5,9%, concentração mínima detectável: 1ng/mL). A dosagem da corticosterona plasmática foi realizada com o kit Corticosterone ELISA Kit (Cayman Chemical, EUA) (variação intra-ensaio: 7,2%, concentração mínima detectável: 8,2pg/mL), a de testosterona plasmática com ARCHITECT 2<sup>nd</sup> Generation Testosterone (Axis-Shield Diagnostics Ltd., Reino Unido) (variação intra-ensaio: 3,13%, concentração mínima detectável: 0,15nmol/L) e o estrógeno plasmático com ARCHITECT Estradiol (variação intra-ensaio: 7%, concentração mínima detectável: 10pg/mL), todos seguindo as instruções do fabricante.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

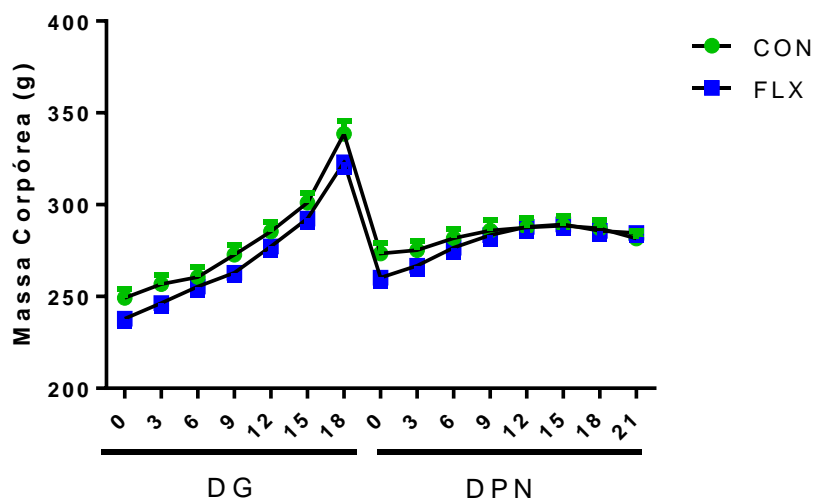
Os dados foram analisados quanto à homogeneidade de variâncias e normalidade da distribuição. Como os dados atingiram as premissas para análise paramétrica, eles foram analisados por ANOVA para medidas repetidas (ganho de massa corporal materno, ganho de massa corporal dos filhotes, dosagem plasmática de corticosterona basal e estimulada) ou pelo teste t de *Student* (demais parâmetros). Adotou-se como valor significativo  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 TOXICIDADE GERAL

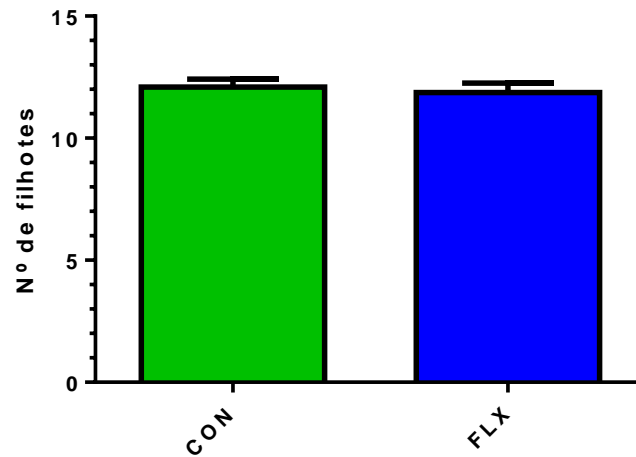
A Figura 4 mostra o ganho de massa corpórea materno durante a gestação e lactação. ANOVA para medidas repetidas indicou efeito significativo do fator tempo [ $F_{(14, 588)}=227,34$ ,  $p \leq 0,001$ ], representando as flutuações nessa variável durante o período de prenhez e amamentação. Não houve, contudo, efeito do fator tratamento [ $F_{(1, 42)}=0,99$ ,  $p=0,33$ ], ou seja, as oscilações de massa corpórea foram similares em ambos os grupos. O número total de filhotes por ninhada (Figura 5) também não diferiu entre os grupos ( $t_{43}=0,44$ ,  $p=0,66$ ).

**Figura 4** – Ganho de massa corpórea materno no decorrer da gestação e lactação em animais tratados ou não com FLX. Dados expressos em média $\pm$ EPM de 21-23 animais em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou efeito do tempo ( $p \leq 0,001$ ).



Fonte: Próprio autor.

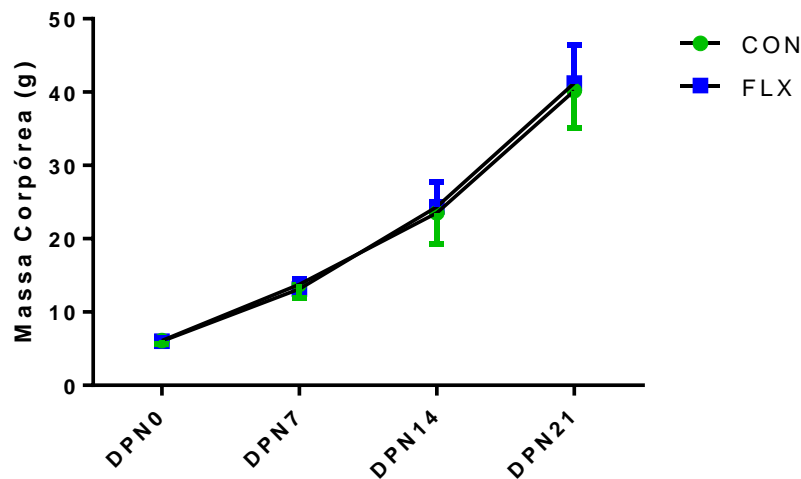
**Figura 5** – Número de filhotes nascidos vivos provenientes de mãe tratadas ou não com FLX. Dados expressos como média±EPM de 22-23 ninhadas em cada grupo.  $p=0,662$ , teste t de *Student*.



Fonte: Próprio autor.

Em relação ao ganho de massa corpórea dos filhotes (Figura 6), efeito similar ao observado com as mães foi indicado pela ANOVA para medidas repetidas, ou seja, houve alteração no decorrer do tempo [ $F_{(3, 126)}=1457,63$ ,  $p \leq 0,001$ ] mas não houve diferença entre os dois grupos [ $F_{(1, 42)}=0,17$ ,  $p=0,68$ ].

**Figura 6** – Ganho de massa corporal de filhotes expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 21-23 ninhadas em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou efeito do tempo. ( $p \leq 0,001$ ).

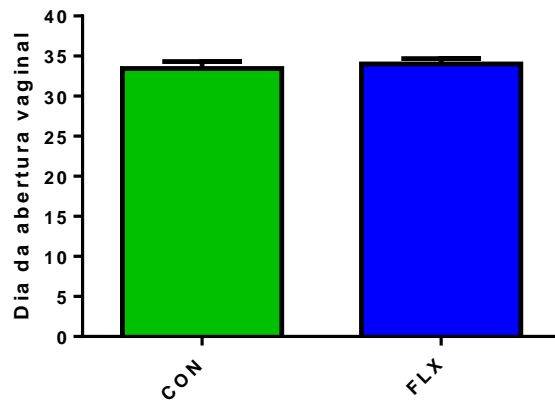
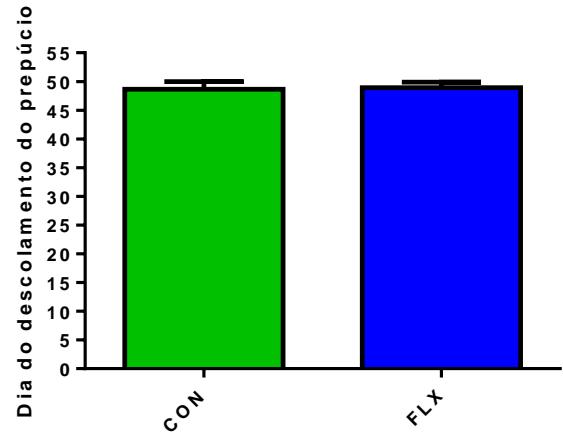


Fonte: Próprio autor.

#### 4.2 ABERTURA VAGINAL E DESCOLAMENTO DO PREPÚCIO

O teste t de Student indicou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto aos dias nos quais ocorreram a abertura vaginal ( $t_{21} = -0,501$ ,  $p = 0,621$ ) e o descolamento do prepúcio ( $t_{21} = -0,17$ ,  $p = 0,865$ ) (Figura 7). A Figura 8 mostra uma curva de sobrevivência, a qual mostra a porcentagem cumulativa de animais que tinham atingido o marco (abertura vaginal ou descolamento do prepúcio) em cada dia de avaliação. É interessante notar que nos dias iniciais de avaliação, isto é, entre os DPN 31 e 34, havia menor número de ratas do grupo exposto à FLX com a presença de abertura vaginal.

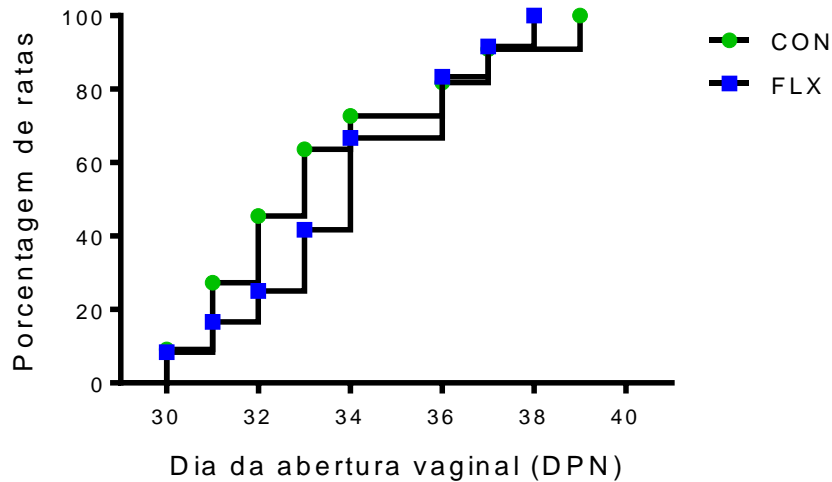
**Figura 7** – Dia da abertura vaginal (A) e do descolamento do prepúcio (B) em animais expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 11-12 animais em cada grupo.  $p=0,621$  (A) e  $p=0,865$  (B). Teste t de *Student*.

**A****B**

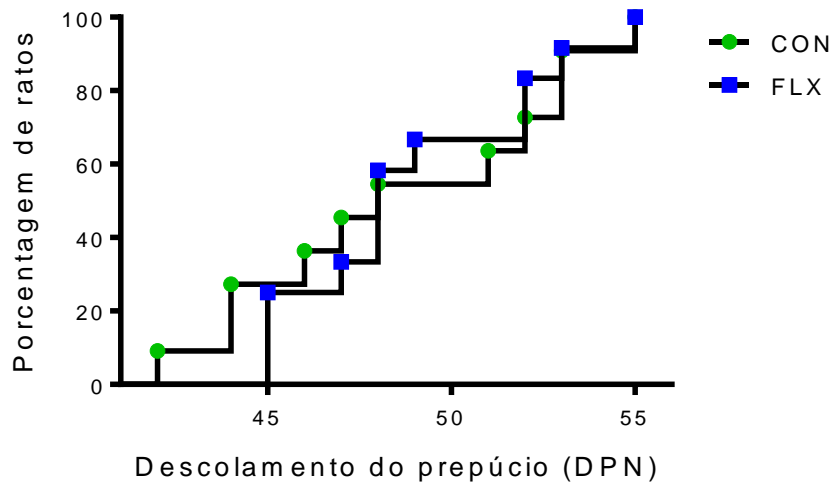
Fonte: Próprio autor.

**Figura 8** – Representação percentual das ratas expostas ou não à FLX com abertura vaginal nos diferentes dias avaliados (A) e representação percentual dos ratos expostos ou não à FLX com descolamento do prepúcio nos diferentes dias avaliados (B).

**A**



**B**



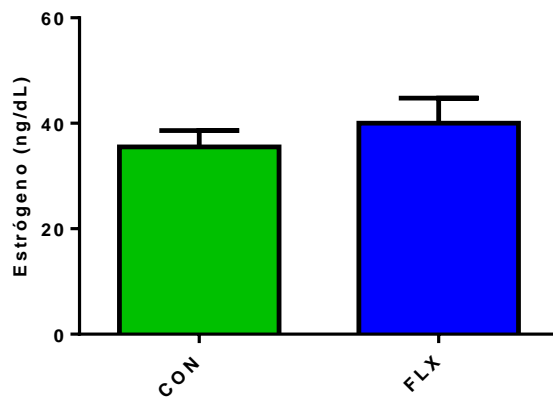
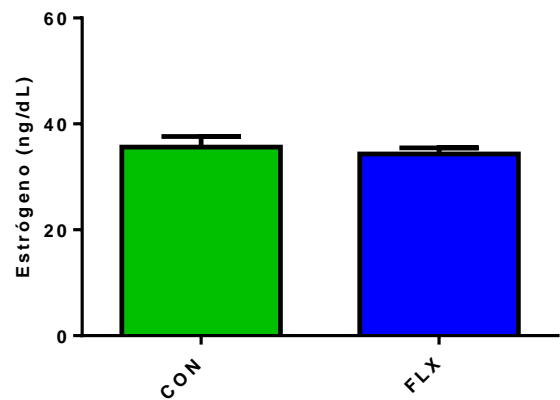
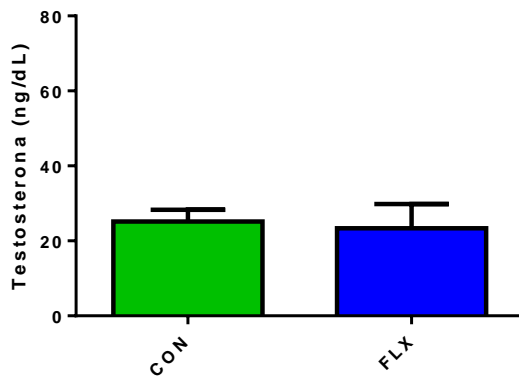
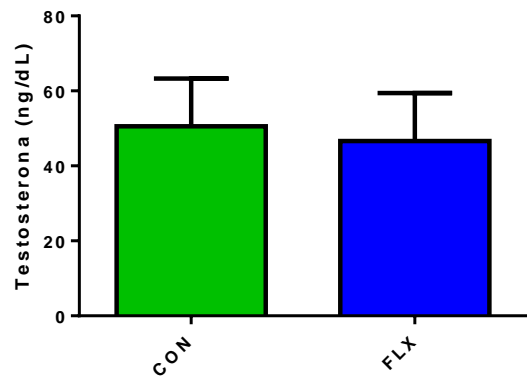
Fonte: Próprio autor.

#### 4.3 DOSAGEM HORMONAL PLASMÁTICA

Quanto às dosagens plasmáticas dos hormônios, não foi detectada alteração na concentração de estrógeno no dia em que ocorreu a abertura vaginal

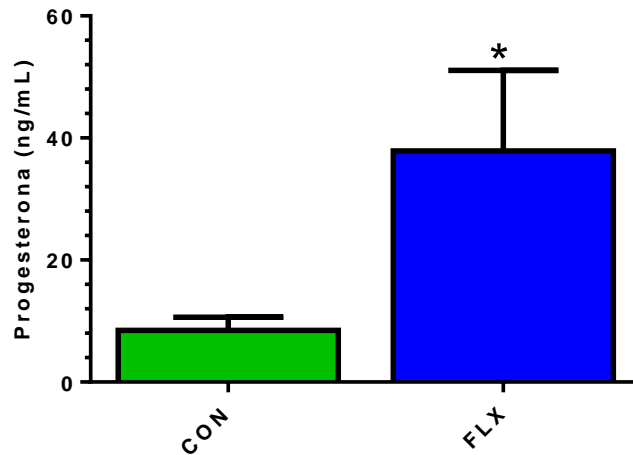
( $t_{21}=0,476$ ,  $p=0,639$ ) e de testosterona no dia do descolamento do prepúcio ( $t_{17}=-0,093$ ,  $p=0,927$ ) conforme mostrado nas Figuras 9B e D. As Figuras 9A e C mostram que esses hormônios também não estavam alterados em dias que antecediam a ocorrência desses marcos do desenvolvimento sexual, ou seja, no DPN 28 de fêmeas ( $t_{21}=0,627$ ,  $p=0,538$ ) e DPN 38 de machos ( $t_{17}=0,913$ ,  $p=0,374$ ). No DPN 28, a concentração plasmática de progesterona também foi quantificada no sangue dos filhotes fêmeas (Figura 10) e o teste t de *Student* indicou que as ratas expostas à FLX apresentaram aumento desse hormônio quando comparadas às ratas controles ( $t_{15}=-3,34$ ,  $p=0,004$ ).

**Figura 9** – Concentração plasmática de estrógeno no DPN 28 (A) e no dia da abertura vaginal (B) e de testosterona no DPN 38 (C) e no dia do descolamento do prepúcio (D) em animais expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 10-13 animais em cada grupo.  $p=0,538$  (A),  $p=0,639$  (B),  $p=0,374$  (C) e  $p=0,927$  (D), teste t de *Student*.

**A****B****C****D**

Fonte: Próprio autor.

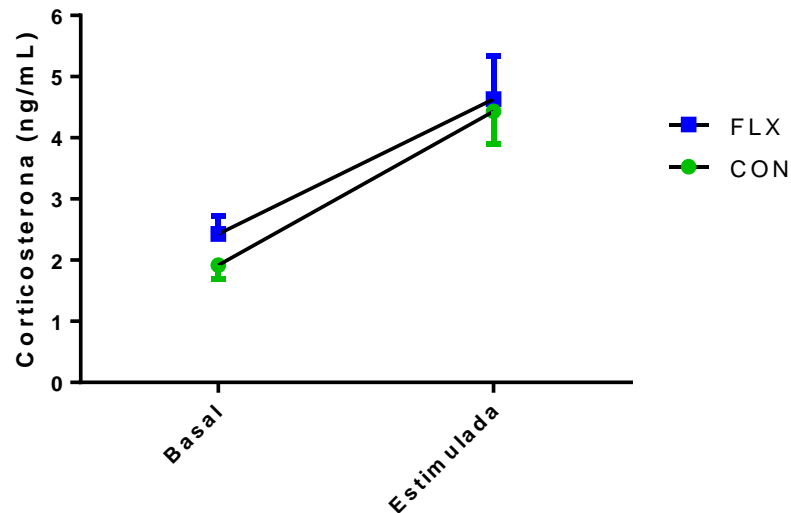
**Figura 10** – Concentração plasmática de progesterona no DPN28 em animais expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 7-8 animais em cada grupo. \* $p=0,004$ , teste t de *Student*.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 11 apresenta a concentração plasmática de corticosterona. ANOVA para medidas repetidas indicou haver efeito do estímulo por ACTH [ $F_{(1,20)}=40,207$ ,  $p<0,001$ ], ou seja, em ambos os grupos houve aumento na concentração da corticosterona após estímulo. Indicou, ainda, ausência de efeito da exposição à FLX [ $F_{(1,20)}=0,173$ ,  $p=0,682$ ] tanto na concentração basal quanto na estimulada.

**Figura 11** – Concentração plasmática da corticosterona basal e estimulada com ACTH em ratos púberes expostos ou não à FLX. Dados expressos em média±EPM de 11-12 animais em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou efeito do estímulo com ACTH ( $p<0,001$ ).



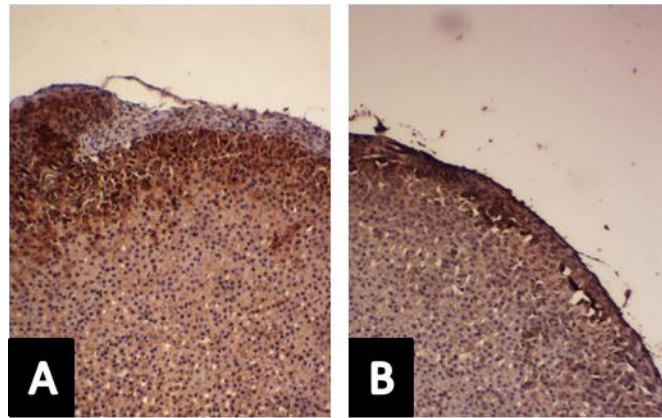
Fonte: Próprio autor.

#### 4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICAS

O teste t de *Student* revelou não haver diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação para a proteína StAR no testículo ( $t_{10}=-1,17$ ,  $p=0,269$ ), adrenal ( $t_{10}=1,665$ ,  $p=0,127$ ) e ovário ( $t_9=-2,156$ ,  $p=0,059$ ) (Figura 13A) e enzima  $3\beta$ -HSD no testículo ( $t_9=-0,814$ ,  $p=0,437$ ), adrenal ( $t_{10}=-0,349$ ,  $p=0,734$ ) e ovário ( $t_{10}=-0,344$ ,  $p=0,738$ ) (Figura 13B).

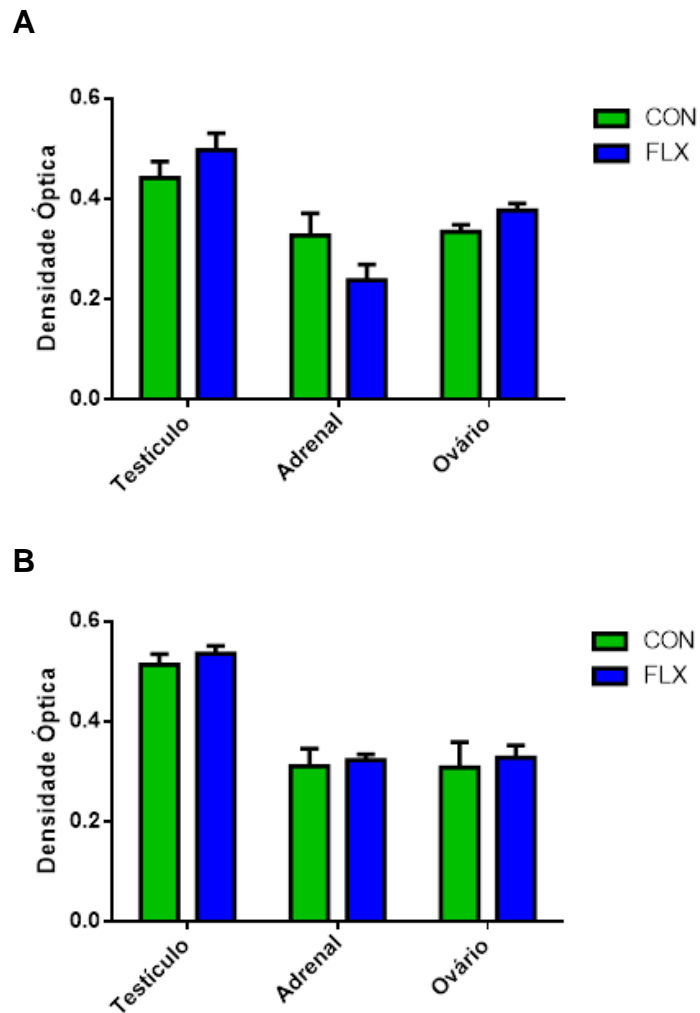
A Figura 12 ilustra um exemplo de imunomarcação para a  $3\beta$ -HSD e para a StAR obtidas nesse estudo.

**Figura 12** – Exemplo de imunomarcção para as proteínas 3 $\beta$ -HSD (A) e StAR (B) no córtex da adrenal.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 13** – Densidade óptica nos tecidos imunomarcados para proteína StAR (A) e  $3\beta$ -HSD (B) em ratos (testículo e adrenal) e ratas (ovário) pré-púberes. Dados expressos em média $\pm$ EPM de 5-6 animais em cada grupo. A:  $p=0,269$ ;  $p=0,127$ ;  $p=0,059$ . B:  $p=0,437$ ;  $p=0,734$ ;  $p=0,738$ . Teste t de *Student*.



Fonte: Próprio autor.

## 5. DISCUSSÃO

Esse trabalho objetivou avançar na avaliação de possíveis efeitos da exposição maternal à FLX sobre a esteroidogênese de filhotes utilizando, para isso, avaliação de marcadores já investigados, ou seja, abertura vaginal (DOS SANTOS et al., 2016), expressão da enzima  $3\beta$ -HSD na adrenal (BACCHI, 2016) e concentração plasmática de corticosterona (FRANCIS-OLIVEIRA, 2013), associada à avaliação de marcadores nunca antes investigados. As abordagens inéditas incluíram: 1) quantificação de hormônios sexuais em dois momentos (pré-instalação da puberdade e dia da instalação da puberdade) para permitir avaliar se possíveis atrasos na instalação da puberdade decorreria de menor disponibilidade basal do hormônio sexual e/ou de menor concentração no pico do hormônio, que deve ocorrer no dia da instalação da puberdade; 2) quantificação, no mesmo animal, da concentração plasmática basal e estimulada por ACTH para avaliar a funcionalidade da glândula adrenal e 3) a análise da expressão de duas proteínas-chave para a esteroidogênese em três tecidos nos quais esse processo ocorre, o que possibilitaria investigar se os impactos sobre a esteroidogênese seriam tecido-específicos.

Em relação aos marcadores de instalação da puberdade avaliados, ausência de efeito sobre o descolamento do prepúcio foi também observado por Ramos et al. (2016) após regime de exposição semelhante ao nosso com a dose de 7,5 mg/kg/dia. Por outro lado, nossos dados não corroboram o atraso de abertura vaginal relatado por Dos Santos et al. (2016) que adotaram um regime de exposição idêntico ao adotado no presente estudo. Entretanto, é digno de nota que, embora não estatisticamente significativo, pequeno atraso na abertura vaginal foi também observado no presente estudo. É interessante observar, ainda, que no trabalho de Dos Santos et al. (2016) a análise estatística pode ter tido mais poder para indicar diferenças uma vez que os autores analisaram 27 ninhadas controles e 28 ninhadas expostas à FLX, diferentemente do presente estudo que analisou, respectivamente, 11 e 12 ninhadas.

A liberação dos hormônios sexuais testosterona e progesterona é regulada pelo hormônio luteinizante (LH) e o estrógeno tem sua liberação regulada principalmente pelo hormônio folículo-estimulante (FSH), enquanto que esses, secretados pela glândula pituitária, têm sua liberação regulada pelo hormônio

liberador de gonadotrofina (GnRH), secretado pelo hipotálamo (SPRITZER et al., 2012). Para a instauração da puberdade, existe uma mudança no padrão secretório dos hormônios supracitados. A quantificação de estrógeno e de testosterona em dias que antecediam a instauração da puberdade, bem como no dia em que a mesma ocorreu revelou ausência de efeito da exposição à FLX sobre a concentração desses hormônios. Esses dados são condizentes com a ausência de efeito observada na abertura vaginal e descolamento de prepúcio, ou seja, como nesse estudo a FLX não alterou as concentrações de hormônios sexuais, ela não influenciou também os marcadores de instauração da puberdade. Não encontramos, na literatura, estudos que tenham avaliado a concentração de hormônios esteroides em animais peri-púberes e púberes expostos maternalmente à FLX. Estudos que avaliaram a concentração plasmática em animais adultos após regime de exposição similar ao nosso indicaram ausência de efeito sobre a concentração de testosterona (GOUVÊA et al., 2008; VIEIRA et al., 2013) e de estradiol (DOS SANTOS et al., 2016). No presente estudo, pudemos observar nos animais de ambos os grupos a ocorrência de um aumento da concentração plasmática de testosterona no dia do descolamento do prepúcio, mas o mesmo não ocorreu com a concentração plasmática de estrógeno, ou seja, não observamos aumento da concentração plasmática de estrógeno no dia da abertura vaginal quando comparado com o valor obtido no DPN 28. Uma possível explicação para o fato, seria de que não foi acompanhado o período estral das ratas, ou seja, não estavam todas na mesma fase do ciclo estral no dia da abertura vaginal. O aumento dessa concentração hormonal talvez pudesse ter sido observado se todas as ratas estivessem na mesma fase no dia da abertura vaginal ou se o sangue tivesse sido coletado no dia do primeiro estro.

No presente estudo, avaliamos, ainda, a concentração plasmática de progesterona e essa se mostrou aumentada em ratas peri-púberes expostas maternalmente à FLX. Não encontramos, na literatura, outro estudo que tenha avaliado esse hormônio. O fato da progesterona, mas não o estrógeno, estar alterada pode ser explicada por diferentes fatores. Inicialmente, vale lembrar que a liberação da progesterona é regulada pelo LH e a do estrógeno, principalmente pelo FSH. Assim, é possível que o impacto da exposição à FLX se dê indiretamente por meio de alteração da síntese e/ou liberação do LH, fazendo-se necessária a

quantificação plasmática desse hormônio nas ratas, ou da sua responsividade no sistema, requerendo análise da via de sinalização e dos seus receptores. Um outro fator que deve ser considerado é a menor confiabilidade analítica da dosagem de estrógeno, uma vez que os kits comercialmente disponíveis não são espécie-específicos. E finalmente, devemos considerar que a progesterona tem sido mais aceita que o estrógeno como marcador hormonal devido à sua menor flutuação durante o ciclo estral (SPRITZER et al., 2012) e, como no presente estudo nós não acompanhamos o ciclo estral das ratas, maior variabilidade nas concentrações de estrógeno pode ter ocorrido.

Também foi avaliada a funcionalidade da glândula adrenal. Em condições fisiológicas, a corticosterona tem sua liberação regulada pelo ACTH, que por sua vez, é liberado sob regulação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (HANLEY; VAN DE KAR, 2003). O eixo HPA é modulado pela 5-HT (DE SOUZA, 1986) (HANLEY; VAN DE KAR, 2003) e, possíveis alterações no desenvolvimento do sistema serotoninérgico desencadeadas pela exposição materna à FLX poderia impactar esse eixo. Não observamos alterações nas concentrações plasmáticas basais nem tampouco na estimulada por ACTH de corticosterona em filhotes pré-púberes indicando que a exposição à FLX durante a gestação e amamentação não impactou a capacidade da glândula adrenal de produzir e secretar a corticosterona, e que a resposta do organismo ao ACTH está preservada. Os estudos publicados que investigaram o efeito da exposição à FLX durante o desenvolvimento sobre a concentração plasmática de glicocorticoides diferem entre si nos protocolos experimentais, variando dose, modelo animal, via de administração, período de exposição e condição materna. Pawluski et al. (2012) relataram que a exposição a 5mg/kg/dia de FLX, subcutânea, durante a amamentação levou à diminuição da corticosterona plasmática em ratos Sprague-Dawley púberes. Entretanto, um trabalho do mesmo grupo não detectou diferença estatisticamente significativa nos filhotes com 5 e 8 semanas expostos a 5mg/kg 2 vezes ao dia por via oral de FLX durante a amamentação (KNAEPEN et al., 2013). Finalmente, em um estudo prévio do nosso grupo (BACCHI, 2016), no qual foi adotado o mesmo regime de exposição do presente trabalho, foi encontrada ausência de efeito da exposição à FLX sobre a concentração plasmática basal de corticosterona. Entretanto, chamava a atenção que a concentração estimulada por ACTH, apresentava-se biologicamente, mas não

estatisticamente, reduzida nos animais expostos à FLX. Como no estudo de Bacchi (2016) animais diferentes foram empregados para a coleta de plasma para a quantificação basal e estimulada, no presente estudo adotamos um protocolo experimental que permitiu a coleta de sangue do mesmo animal, visando reduzir, assim, a variabilidade dos dados. Apesar dessa abordagem, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais.

Em consonância com a ausência de alteração nas concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona e corticosterona observada nesse estudo, também não observamos alterações na expressão de moléculas-chave para a esteroidogênese, StAR e 3 $\beta$ -HSD, nas três estruturas avaliadas, ou seja, ovário, testículo e adrenal. Dessas análises, somente a marcação para 3 $\beta$ -HSD na adrenal já havia sido realizada em filhotes seguindo o mesmo protocolo de exposição (BACCHI, 2016) e diminuição na imunomarcação foi observada nos animais tratados com FLX durante a gestação e lactação. No presente momento, não podemos oferecer explicação para essa discrepância de resultados. Quanto à proteína StAR, existe um único estudo mostrando menor expressão do mRNA de StAR no testículo de ratos tratados diretamente com 10mg/kg de FLX por 28 dias a partir dos 49 dias de idade (SAKR et al., 2015). Porém, por ser um trabalho com tratamento direto do animal experimental e não exposição maternal, os resultados não são comparáveis com os nossos.

Finalmente, deve-se observar que, assim como em trabalhos anteriores (FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013; BACCHI, 2016; DOS SANTOS et al., 2016; HIGASHI et al., 2016; MATSUMOTO et al., 2016), o regime de exposição adotado no presente estudo não influenciou ganho de massa corporal maternal durante todo o tratamento, número de filhotes nascidos vivos e ganho de massa corpórea dos filhotes, sugerindo ausência tanto de toxicidade geral nas mães quanto de prejuízo do desenvolvimento físico dos filhotes (ICH, 2005).

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo, a exposição à FLX durante a gestação e amamentação não resultou em alteração de marcadores físicos (abertura vaginal e descolamento do prepúcio), hormonais (concentração plasmática de estrógeno, testosterona e corticosterona) e imunohistoquímicos (StAR e 3 $\beta$ -HSD) da esteroidogênese sugerindo que o impacto da FLX na esteroidogênese, se existente, não parece ser robusto. Estudos futuros são necessários para investigar o mecanismo envolvido no aumento da concentração plasmática de progesterona em ratas pré-púberes expostas à FLX.

## 7. REFERÊNCIAS

- ÂMELLEM, I.; SURESH, S.; CHANG, C. C.; TOK, S. S. L.; TASHIRO, A. A critical period for antidepressant-induced acceleration of neuronal maturation in adult dentate gyrus. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 9, p. e1235, 2017.
- ANDREWS, M. H.; MATTHEWS, S. G. Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: serotonergic involvement. **Stress**, v. 7, n. 1, p. 15–27, 2004.
- ARIAS, P.; SZWARCFARB, B.; DE RONDINA, D. C.; CARBONE, S.; SVERDLIK, R.; MOGUILVSKY, J. A. In vivo and in vitro studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in prepubertal and peripubertal female rats. **Brain Research**, v. 523, n. 1, p. 57–61, 1990.
- BACCHI, A. D. **Efeito da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação sobre o eixo corticotrófico e vias dopaminérgicas em ratos**. Universidade Estadual de Londrina, 2016.
- BRINDLEY, R. L.; BAUER, M. B.; BLAKELY, R. D.; CURRIE, K. P. M. Serotonin and serotonin transporters in the adrenal medulla: A potential hub for modulation of the sympathetic stress response. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 943–954, 2017.
- COLLIN, O.; DAMBER, J. E.; BERGH, A. Testicular blood flow and testosterone concentrations in the spermatic venous blood in rats with experimental cryptorchidism. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 17–22, 1996.
- DE CEBALLOS, M. L.; BENEDI, A.; URDIN, C.; DEL RIO, J. Prenatal exposure of rats to antidepressant drugs down-regulates beta-adrenoceptors and 5-HT<sub>2</sub> receptors in cerebral cortex. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 10, p. 947–952, 1985.
- DE SOUZA, E. B. Serotonin and dopamine receptors in the rat pituitary gland: autoradiographic identification, characterization, and localization. **Endocrinology**, v. 119, n. 4, p. 1534–1542, 1986.

DIJKSTRA, I.; BINNEKADE, R.; TILDERS, F. J. H. Diurnal variation in resting levels of corticosterone is not mediated by variation in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin but involves splanchnic nerve integrity. **Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 540–547, fev. 1996.

DOS SANTOS, A. H.; VIEIRA, M. L.; DE AZEVEDO CAMIN, N.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; CERAVOLO, G. S.; PELOSI, G. G.; MOREIRA, E. G.; KISS, A. C. I.; MESQUITA, S. de F. P.; GERARDIN, D. C. C. In utero and lactational exposure to fluoxetine delays puberty onset in female rats offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 62, p. 1–8, jul. 2016.

FAVARO, P. d N.; COSTA, L. C.; MOREIRA, E. G. Maternal fluoxetine treatment decreases behavioral response to dopaminergic drugs in female pups. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 6, p. 487–494, 2008.

FRANCIS-OLIVEIRA, J. **Avaliação neurofuncional de ratos expostos à fluoxetina durante a gestação e lactação**. Universidade Estadual de Londrina, 2013.

FRANCIS-OLIVEIRA, J.; PONTE, B.; BARBOSA, A. P. M.; VERÍSSIMO, L. F.; GOMES, M. V.; PELOSI, G. G.; DE BRITTO, L. R. G.; MOREIRA, E. G. Fluoxetine exposure during pregnancy and lactation: Effects on acute stress response and behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 195–203, 2013.

GENTILE, S.; GALBALLY, M. Prenatal exposure to antidepressant medications and neurodevelopmental outcomes: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 128, n. 1–2, p. 1–9, 2011.

GONZALEZ, C. R.; GONZALEZ, B.; MATZKIN, M. E.; MUNIZ, J. A.; CADET, J. L.; GARCIA-RILL, E.; URBANO, F. J.; VITULLO, A. D.; BISAGNO, V. Psychostimulant-induced testicular toxicity in mice: Evidence of cocaine and caffeine effects on the local dopaminergic system. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142713, 2015.

GOUVÊA, T. S.; MORIMOTO, H. K.; DE FARIA, M. J. S. S.; MOREIRA, E. G.; GERARDIN, D. C. C. Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 3, p. 416–419, 2008.

HANLEY, N. R. S.; VAN DE KAR, L. D. Serotonin and the neuroendocrine regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and disease. **Vitamins and Hormones**, v. 66, p. 189–255, 2003.

HAY, D. W. P.; WADSWORTH, R. M. The contractile effects of 5-Hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens. **British Journal of Pharmacology**, v. 77, n. 4, p. 605–613, 1982.

HEIKKINEN, T.; EKBLAD, U.; PALO, P.; LAINE, K. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 73, n. 4, p. 330–337, abr. 2003.

HENDRICK, V.; STOWE, Z. N.; ALTSHULER, L. L.; HWANG, S.; LEE, E.; HAYNES, D. Placental passage of antidepressant medications. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 5, p. 993–996, maio 2003.

HENRIKSEN, R.; DIZEYI, N.; ABRAHAMSSON, P. A. Expression of serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>4</sub> in ovary and in ovarian tumours. **Anticancer Research**, v. 32, n. 4, p. 1361–1366, 2012.

HIGASHI, C. M.; MATSUMOTO, A. K.; GAMEIRO, J. G.; MOURA, K. F.; HIGACHI, L.; OLIVEIRA, L. C.; BARBOSA, D. S.; MOREIRA, E. G.; CERAVOLO, G. S. Does fish oil or folic acid prevent vascular changes in female progeny caused by maternal exposure to fluoxetine? **Life Sciences**, v. 152, p. 165–170, 2016.

HUYBRECHTS, K. F.; PALMSTEN, K.; MOGUN, H.; KOWAL, M.; AVORN, J.; SETOGUCHI-IWATA, S.; HERNÁNDEZ-DÍAZ, S. National trends in antidepressant medication treatment among publicly insured pregnant women. **General Hospital Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 265–271, 2013.

ICH. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2). **ICH Harmonised Tripartite Guideline**, v. 5, 2005.

JABER, M.; ROBINSON, S. W.; MISSALE, C.; CARON, M. G. Dopamine receptors and brain function. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 11, p. 1503–1519, 1997.

JASON, K. M.; COOPER, T. B.; FRIEDMAN, E. Prenatal exposure to imipramine alters early behavioral development and beta adrenergic receptors in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 217, n. 2, p. 461–466, 1981.

JENSEN, H. M.; GRON, R.; LIDEGAARD, O.; PEDERSEN, L. H.; ANDERSEN, P. K.; KESSING, L. V. Maternal depression, antidepressant use in pregnancy and Apgar scores in infants. **The British Journal of Psychiatry**, v. 202, n. 5, p. 347–351, 2013a.

JENSEN, H. M.; GRØN, R.; LIDEGAARD, Ø.; PEDERSEN, L. H.; ANDERSEN, P. K.; KESSING, L. V. The effects of maternal depression and use of antidepressants during pregnancy on risk of a child small for gestational age. **Psychopharmacology**, v. 228, n. 2, p. 199–205, 2013b.

JIMENEZ-SOLEM, E.; ANDERSEN, J. T.; PETERSEN, M.; BROEDBAEK, K.; ANDERSEN, N. L.; TORP-PEDERSEN, C.; POULSEN, H. E. Prevalence of antidepressant use during pregnancy in Denmark, a nation-wide cohort study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e63034, 2013.

KNAEPEN, L.; RAYEN, I.; CHARLIER, T. D.; FILLET, M.; HOUBART, V.; VAN KLEEF, M.; STEINBUSCH, H. W.; PATIJN, J.; TIBBOEL, D.; JOOSTEN, E. A.; PAWLUSKI, J. L. Developmental fluoxetine exposure normalizes the long-term effects of maternal stress on post-operative pain in sprague-dawley rat offspring. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e57608, 2013.

LAPLANTE, P.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor. **Developmental Brain Research**, v. 139, n. 2, p. 199–203, 2002.

LISBOA, S. F. S.; OLIVEIRA, P. E.; COSTA, L. C.; VENÂNCIO, E. J.; MOREIRA, E. G. Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. **Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 49–56, 2007.

MARQUES, B. V. D.; HIGASHI, C. M.; DANIELLA, D. R. B.; ZANLUQUI, N. G.; GREGÓRIO, T. F.; PINGE-FILHO, P.; GERARDIN, D. C. C.; PELOSI, G. G.; MOREIRA, E. G.; CERAVOLO, G. S. Intrauterine and lactation exposure to fluoxetine blunted in the offspring the aortic adaptive response induced by acute restraint stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 813, p. 147–152, 2017.

MATSUMOTO, A. K.; HIGASHI, C. M.; BONIFÁCIO, K. L.; BARBOSA, M. A.; KLEIN, R. M.; FILGUEIRAS, G. B.; CERAVOLO, G. S.; MOREIRA, E. G. Co-exposure to fish oil or folic acid does not reverse effects in the progeny induced by maternal exposure to fluoxetine. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 56, p. 1–8, 2016.

MEANEY, M. J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE S, J. W. S.; TANNENBAUM, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. The role of serotonin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 260–274, 1994.

MONTERO, D.; DE CEBALLOS, M. L.; DEL RIO, J. Down-regulation of 3H-Imipramine binding sites in rat cerebral cortex after prenatal exposure to antidepressants. **Life Sciences**, v. 46, p. 1619–1626, 1990.

PARENT, A.; DESCARRIES, L.; BEAUDET, A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3h]5-hydroxytryptamine. **Neuroscience**, v. 6, n. 2, 1981.

PAWLUSKI, J. L.; RAYEN, I.; NIESSEN, N. A.; KRISTENSEN, S.; VAN DONKELAAR, E. L.; BALTHAZART, J.; STEINBUSCH, H. W.; CHARLIER, T. D. Developmental fluoxetine exposure differentially alters central and peripheral measures of the HPA system in adolescent male and female offspring. **Neuroscience**, v. 220, p. 131–141, 2012.

PIVONELLO, R.; FERONE, D.; DE HERDER, W. W.; DE KRIJGER, R. R.; WAAIJERS, M.; MOOIJ, D. M.; VAN KOETVELD, P. M.; BARRECA, A.; DEL BASSO DE CARO, M. L.; LOMBARDI, G.; COLAO, A.; LAMBERTS, S. W. J.; HOFLAND, L. J. Dopamine receptor expression and function in human normal adrenal gland and adrenal tumors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4493–4502, 2004.

POHLAND, R. C.; BYRD, T. K.; HAMILTON, M.; KOONS, J. R. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 98, n. 2, p. 198–205, abr. 1989.

RAMIREZ, V. D.; SAWYER, C. H. Advancement of puberty in the female rat by estrogen. **Endocrinology**, v. 76, n. June, p. 1158–1168, 1965.

RAMOS, A. C.; DOS SANTOS, A. H.; SILVEIRA, K. M.; KISS, A. C. I.; MESQUITA, S. F. P.; GERARDIN, D. C. C. Maternal treatment with fluoxetine promotes testicular alteration in male rat pups. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 8, p. 1206–1213, 2016.

RASMUSSEN, M. K.; EKSTR, B.; ZAMARATSKAIA, G. Regulation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 17926–17942, 2013.

REY-ARES, V.; LAZAROV, N.; BERG, D.; BERG, U.; KUNZ, L.; MAYERHOFER, A. Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, p. 1–10, 2007.

ROMERO, G.; TOSCANO, E.; DEL RIO, J. Effect of prenatal exposure to antidepressants on 5-HT-stimulated phosphoinositide hydrolysis and 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain. **General Pharmacology**, v. 25, n. 5, p. 851–856, 1994.

SAKR, H. F.; ABBAS, A. M.; ELSAMANOUDY, A. Z.; GHONEIM, F. M. Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 515–527, 2015.

SHEN, W.; CHEN, J.; YIN, J.; WANG, S. L. Selenium protects reproductive system and foetus development in a rat model of gestational lead exposure. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 773–780, 2016.

SMIT-RIGTER, L. A.; NOORLANDER, C. W.; VON OERTHEL, L.; CHAMEAU, P.; SMIDT, M. P.; VAN HOOFT, J. A. Prenatal fluoxetine exposure induces life-long serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor-dependent cortical abnormalities and anxiety-like behaviour. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 865–870, fev. 2012.

SPRITZER, P. M.; DOS REIS, F. M.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Gônadas. In: **Fisiologia**. 4° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 1335.

STOCCO, D. M. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 8, p. 1245–1254, 2001.

USEPA. Endocrine disruptor screening program test Guideline 890.1500: Pubertal development and thyroid function in intact juvenile/peripubertal male rats. **Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p. 1–28, 2009a.

USEPA. Endocrine disruptor screening program test guidelines OPPTS 890.1450: Pubertal development and thyroid function in intact juvenile/peripubertal female rats. **Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p. 1–31, 2009b.

VIEIRA, M. L.; HAMADA, R. Y.; GONZAGA, N. I.; BACCHI, A. D.; BARBIERI, M.; MOREIRA, E. G.; MESQUITA, S. de F. P.; GERARDIN, D. C. C. Could maternal exposure to the antidepressants fluoxetine and St. John's Wort induce long-term reproductive effects on male rats? **Reproductive Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 102–107, 2013.

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; DRUSE, M.; WALKER, P.; LAUDER, J. M. Serotonin as a developmental signal. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 19–29, 1995.

ZOEGA, H.; KIELER, H.; NORGAARD, M.; FURU, K.; VALDIMARSDOTTIR, U.; BRANDT, L.; HAGLUND, B. Use of SSRI and SNRI antidepressants during pregnancy: A population-based study from Denmark, Iceland, Norway and Sweden. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144474, 2015.