



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELIANE SWELY AMADOR MONTEIRO SANCHES

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DE
CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO CLORIDRATO DE
BUPROPIONA DURANTE A ESPERMATOGÊNESE E DOS
POSSÍVEIS EFEITOS TERATOGÊNICOS,
DESENVOLVIMENTO PÓS NATAL E COMPORTAMENTAIS
NA PROLE**

ELIANE SWELY AMADOR MONTEIRO SANCHES

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DE
CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO CLORIDRATO DE
BUPROPIONA DURANTE A ESPERMATOGÊNESE E DOS
POSSÍVEIS EFEITOS TERATOGÊNICOS,
DESENVOLVIMENTO PÓS NATAL E COMPORTAMENTAIS
NA PROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes.

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria José Sparça Salles.

Londrina
2017

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

SANCHES, ELIANE SWELY AMADOR MONTEIRO.

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO CLORIDRATO DE BÚPROPIONA DURANTE A ESPERMATOGÊNESE E DOS POSSÍVEIS EFEITOS TERATOGÊNICOS, DESENVOLVIMENTO PÓS NATAL E COMPORTAMENTAIS NA PROLE / ELIANE SWELY AMADOR MONTEIRO SANCHES. - Londrina, 2017.
109 f. : il.

Orientador: GLAURA SCANTAMBURLO ALVES FERNANDES.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2017.

Inclui bibliografia.

1. Toxicidade testicular - Tese. 2. Teratogenese - Tese. 3. Desenvolvimento pós-natal - Tese. 4. Avaliação comportamental - Tese. I. FERNANDES, GLAURA SCANTAMBURLO ALVES . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

ELIANE SWELY AMADOR MONTEIRO SANCHES

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS
EXPOSTOS AO CLORIDRATO DE BUPROPIONA DURANTE A
ESPERMATOGÊNESE E DOS POSSÍVEIS EFEITOS
TERATOGENICOS, DESENVOLVIMENTO PÓS NATAL E
COMPORTAMENTAIS NA PROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marina Trevizan Guerra
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campus
de Três Lagoas

Londrina, 09 de outubro de 2017.

Dedico,

À minha mãe que sempre esteve do meu lado,
ajudando-me a trilhar o melhor caminho e a
tomar as melhores decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor, Pai Todo Poderoso, por me guiar, me dar forças e por ter sido a fonte da minha determinação. Por ter sido minha maior fortaleza e amparo em cada amanhecer.

À Profa Maria José Sparça Salles pela ideia do projeto e pelos ensinamentos, não só acadêmicos mas também pelas lições de vida.

À Profa Glaura Scantamburlo Alves Fernandes pelo imenso carinho, pela compreensão, pelas palavras de conforto e pela orientação.

À Profa Estefania Estefânia Gastaldello Moreira e ao Guilherme Bracarense pela disponibilidade, paciência e por me terem possibilitado conhecer e trabalhar numa área completamente diferente da qual estava acostumada.

À Universidade Estadual de Londrina, aos laboratórios: Laboratório de Toxicologia do Desenvolvimento, Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução e ao Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas pelo suporte material e humano para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro na forma de bolsa, o que me permitiu dedicar exclusivamente à pesquisa.

À Profa. Marina Trevizan Guerra e ao Prof. Wander Rogério Pavanelli por aceitarem o convite para serem membros da banca avaliadora.

Ao Felipe Tsuzuki e ao Fábio Joinhas pelo companheirismo, pelo apoio emocional e por toda ajuda e comprometimento durante a realização dos experimentos. Por terem entrado comigo nessa empreitada e por ficarem ao meu lado durante os períodos mais críticos do experimento. Sem vocês não teria conseguido. Por todas as risadas e por serem sempre uma alegria nos meus dias de UEL.

À Ana Paula Franco Punhagui, Carolina Ferreira Sampaio, Géssica Dultra Gonçalves, Gláucia Heloisa Siervo, Henrique Rodrigues Vieira, Rafaela Pires Erthal por toda a paciência e por não terem me deixado desistir. Por cada palavra de conforto e por terem se mostrado um grande presente de Deus em minha vida.

À Jackson Gabriel Miyamoto, Mariana Marques Bertozzi, Stephanie Badaró Garcia, Tiago Henrique Zaninelli pelo companheirismo nas aulas.

Ao Caio Martins, Márjori Fitola Yokoyama, Victor Fattori e Larissa Staurengo Ferrari pelas contribuições indiretas neste trabalho e pelos ensinamentos.

À minha turma do mestrado, pelos obstáculos vencidos ao longo das aulas, por todo conhecimento e alegrias compartilhadas.

À Profa Marina Trevisan Guerra, Prof Waldiceu Aparecido Verri Jr, Profa Sílvia Ponzoni pelas palavras de incentivo.

À Melyssa da Costa, Carlos Lourenço, Dário Tormena, Osmar Ferreira e Matheus Barbosa por todo apoio técnico sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pela dedicação e por terem contribuído com a minha formação.

Ao Sergio Camargo Sisti e ao Prof Wander Pavanelli pela paciência, disponibilidade e por toda ajuda nas questões burocráticas e institucionais.

À Ágatha Cristina Freire e Dúnia Isabel Tavares por serem meu porto seguro, minhas confidentes e por terem sido meu apoio dos dias mais difíceis. Por terem acreditado em mim em dias que eu não acreditava e por terem me mostrado o valor de uma amizade sincera.

Aos meus amigos: Caroline Silva, Clau Fortes, Elody Semedo, Isamara Silva, Jandira Rodrigues, Jessica Sanches Évora, Josilene Santos, Letícia Coelho, Liliane Marlise Tavares, Luís Felipe Nogueira, Rafael Alexandre e Ricardo José Gomes que mesmo de longe faziam com que meus dias fossem mais alegres e mais leves.

Ao Edir Monteiro por ser o melhor conselheiro e amigo do mundo. Pela paciência, por ser meu ouvinte e por me ajudar a manter com os pés no chão.

Ao meu amor Pedro Gabriel Barros pelo companheirismo e cumplicidade. Por todo empenho e dedicação à nossa relação e pelas incansáveis vezes em que me mostrou a luz em todos os momentos difíceis.

Às famílias: Brazão de Pina, Coelho Silva e Santos Gomes por todo o apoio emocional. E, principalmente, agradeço à minha família. À minha mãe e ao meu pai, pela vida, pela educação e por me ensinarem a importância da perseverança. Por todo amor, carinho e compreensão e por apoiarem minhas escolhas e estarem sempre ao meu lado. À minha irmã por ser meu braço direito, por ser uma pessoa forte e determinada em quem me espelho e por ter estado ao meu lado em todos os momentos. Às minhas primas Astrid Neiva e Adla Arleth, ao meu irmão Edson Frederico, à minha madrinha Isabel, meu tio Mário, à minha tia Odeth e tia Lucinda pelo apoio incondicional e por serem um exemplo para mim. À minha avó Florizinha por ter me ensinado desde sempre a cultivar a minha fé em Deus.

“É ka pamodi galu kanta ki madrugada dja txiga.”

Ditado popular caboverdiano

SANCHES, Eliane Swely Amador Monteiro. **Avaliação da função reprodutiva de camundongos expostos ao Cloridrato de Bupropiona durante a espermatogênese e dos possíveis efeitos teratogênicos, desenvolvimento pós natal e comportamental na prole.** 2017. 109 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017

RESUMO

O Cloridrato de Bupropiona (BUP) é um fármaco inibidor de recaptura de dopamina e noradrenalina muito utilizado em diversos regimes terapêuticos. Em homens, o potencial para causar disfunção sexual e alterar parâmetros espermáticos é relatado. Contudo, as consequências desta exposição sobre a descendência desses indivíduos são ainda pouco exploradas. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do BUP sob a função reprodutiva de camundongos adultos expostos durante a espermatogênese e investigar as consequências desta exposição sobre o desenvolvimento intrauterino, teratogenicidade, desenvolvimento pós-natal e as possíveis alterações comportamentais na prole desses animais. Para isso, camundongos machos adultos foram distribuídos em: grupo exposto (n=33) BUP 40mg/Kg por 45 dias e grupo controle (n=33) solução salina, sob o mesmo delineamento experimental. No 35º dia de tratamento, foram colocados para acasalar com fêmeas (n=92). No 46º dia os machos foram eutanasiados, órgãos vitais e sexuais foram analisados para determinação da função reprodutiva. No 18º dia de prenhez as fêmeas (n=52) foram eutanasiadas para avaliação do desenvolvimento intrauterino e avaliação da presença de malformações congênitas na prole. Para avaliação pós-natal a prenhez das fêmeas (n=20) foi deixada pra ocorrer sem interrupções. A prole de ambos os sexos foi avaliada do dia pós natal (DPN) 1 ao DPN60. Os parâmetros para avaliação comportamental foram analisados nos dias DPN25 e 60. Para cada idade foi utilizado um macho e uma fêmea de cada ninhada, que foram submetidos ao teste de campo aberto. Nos machos expostos ao BUP, verificou-se a diminuição do escore de Johnsen, do número de células de Sertoli e de Leydig. Além disso, foi constatado que houve diminuição nos níveis de testosterona sérica, alterações morfológicas de cabeça e cauda de espermatozoides e também diminuição na produção diária de espermatozoides pelo testículo. Na prole do grupo BUP observou-se que, houve aumento da ocorrência de alterações externas (cifose e membros inferiores retroversos), alterações nos ossos do crânio (ossificação incompleta de supra/exocipital) e nos ossos do esterno. O desenvolvimento físico (peso e comprimento corpóreo distância anogenital, erupção de dentes incisivos e desdobramento de orelhas) e a ontogenia reflexa (pressão palmar, endireitamento de postura, geotaxia negativa e reflexo de andar adulto) foram retardados na prole de animais expostos ao BUP. Além do mais, os parâmetros de ansiedade e estresse também se mostraram alterados. Conclui-se que o fármaco testado apresenta efeito tóxico sobre a função testicular dos machos expostos. A exposição paterna ao BUP induziu alterações na prole que foram observados durante os estádios de desenvolvimento e que persistiram até a idade adulta desses animais.

Palavras-chave: BUP. Exposição paterna. Teratogênese. Ontogenia reflexa. Campo aberto.

SANCHES, Eliane Swely Amador Monteiro. **Evaluation of the reproductive performance of mice exposed to bupropion hydrochloride during spermatogenesis and possible teratogenic effects, influence in postnatal development and behavior in offspring.** 2017. 109 pp. Master's Degree Dissertation – Experimental Pathology Postgraduation Program – States University of Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Bupropion Hydrochloride (BUP) is a dopamine and noradrenaline reuptake inhibitor drug widely used in a variety of therapeutic regimens. In men, the potential to cause sexual dysfunction and alter sperm parameters is reported. However, the consequences of this exposure on the offspring of these individuals are still little explored. The aim of this study was to evaluate the effects of BUP on the reproductive function of mice exposed during spermatogenesis and investigate the consequences of this exposure on intrauterine development, teratogenicity, postnatal development and possible behavioral changes in the offspring. For this, adult male mice were distributed in: exposed group (n=33) BUP 40mg/kg for 45 days and control group (n=33) saline under the same experimental design. On the 35th day of treatment, they were placed to mate with females (n=92). On day 46 the males were euthanized, vital and sexual organs were analyzed to determine the reproductive function. On the 18th day of pregnancy, females (n=52) were euthanized for evaluation of intrauterine development and the presence of congenital malformations. For postnatal evaluation, the pregnancy of the females (n=20) was allowed to occur without interruption. The offspring of both sexes were evaluated from postnatal day (PND) 1 to PND60. The parameters for behavioral evaluation were analyzed on PND25 and 60. For each age one male and one female from each litter were submitted to open field test. The exposed group showed decrease in the Johnsen score, Sertoli and Leydig cell count. In addition, it was found that there was a decrease in serum testosterone levels, morphological changes in sperm head and tail, and also a decrease in the daily production of spermatozoa by the testis. In the offspring, there was an increase in the occurrence of external alterations (kyphosis and retroversion of the lower limbs), changes in the skull bones (incomplete supra/exoccipital ossification) and in the sternum bones. The physical development (weight and body length, anogenital distance, eruption of incisor teeth and pinna detachment) and reflex ontogeny (palmar pressure, posture straightening, negative geotaxis and adult walking reflex) were delayed in the offspring from the animals exposed to BUP. Moreover, the anxiety and stress parameters were also altered. It is concluded that BUP has a toxic effect on the testicular function of the exposed males. These results demonstrate that paternal exposure to BUP induced developmental changes which were present throughout the developmental stages of the offspring and persisted into adulthood.

Keywords: BUP. Paternal exposure. Teratogenesis. Reflex ontogeny. Open field.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema anatômico do sistema genital masculino humano e do	
.....	
.....	13
Figura 2 - Ação dos hormônios LH e FSH nos testículos	15
Figura 3 - Fases do processo de espermatogênese	16
Figura 4 - Cronograma e dinâmica do desenvolvimento de células germinativas em	
camundongos.....	18
Figura 5 - Similaridades entre a estrutura química do Cloridrato de Bupropiona e da	
Catinona.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	Barreira hemato testicular
BUP	Cloridrato de Bupropiona
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CGP	Células germinativas primordiais
Cmax	Concentração máxima
CTE	Célula tronco espermatogonial
CYP2B6	Cytochrome P450 2B6
DAG	Distância Anogenital
DE	Dia embrionário
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DPOC	Doença obstrutiva crônica
DPN	Dia pós-natal
DSM	Manual de Diagnóstico e Estatística de Distúrbios Mentais
DSP	Daily sperm production
EA	Espermátides alongadas
E	Espermatozoides
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de crescimento epidérmico)
ER	Espermátides arredondadas
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento de fibroblastos)
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)

FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor (Receptor para hormônio Folículo Estimulante)
FVR	Fetal viability rate
GIP	Peso superior à idade de prenhez
IGD	Internet Gaming Disorder (Distúrbios associados a Jogos na Internet)
IGF-I	Insulin-Like Growth Factor-I (Fator de crescimento semelhante a insulina-I)
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptura neuronal de serotonina
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
LHR	Luteinizing Hormone Receptor (Receptor do Hormônio Luteinizante)
LWPA	Lower weight for pregnancy age
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)
PILR	Post-implantation loss rate
PND	Postnatal day
POMC	Pró-opiomelanocortin (Pró-opiomelanocortina)
RR	Reabsorption rate.
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein (Proteína Reguladora Aguda Esteroidogênica)
SEM	Standard error of the mean (Erro padrão da media)
TBH	Transtorno Bipolar do Humor
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TDSH	Transtorno do Desejo Sexual Hipoativo

TGF- α e TGF- β Transforming growth factor alpha and beta (Fatores de crescimento transformadores alfa e beta)

UWPA Upper weight for pregnancy age.

WAP Weight appropriate for pregnancy age.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Anatomia e fisiologia do sistema genital masculino humano em comparação com a de camundongos machos adultos	13
1.2 Cloridrato de Bupropiona.....	22
1.3 Cloridrato de Bupropiona e função reprodutiva.....	28
1.4 Cloridrato de Bupropiona e desenvolvimento intrauterino, pós-natal e comportamental.....	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1 Geral.....	35
3.2. Específicos	35
4. ARTIGO I	36
5. ARTIGO II	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	87
8. ANEXO – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais	106

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e fisiologia do sistema genital masculino humano em comparação com a de camundongos machos adultos

O sistema genital masculino de humanos (Figura 1a) é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, pênis e pelas glândulas acessórias: próstata, glândula seminal e bulbouretrais (DRABOVICH et al., 2014) os camundongos apresentam as mesmas estruturas (Figura 1c)

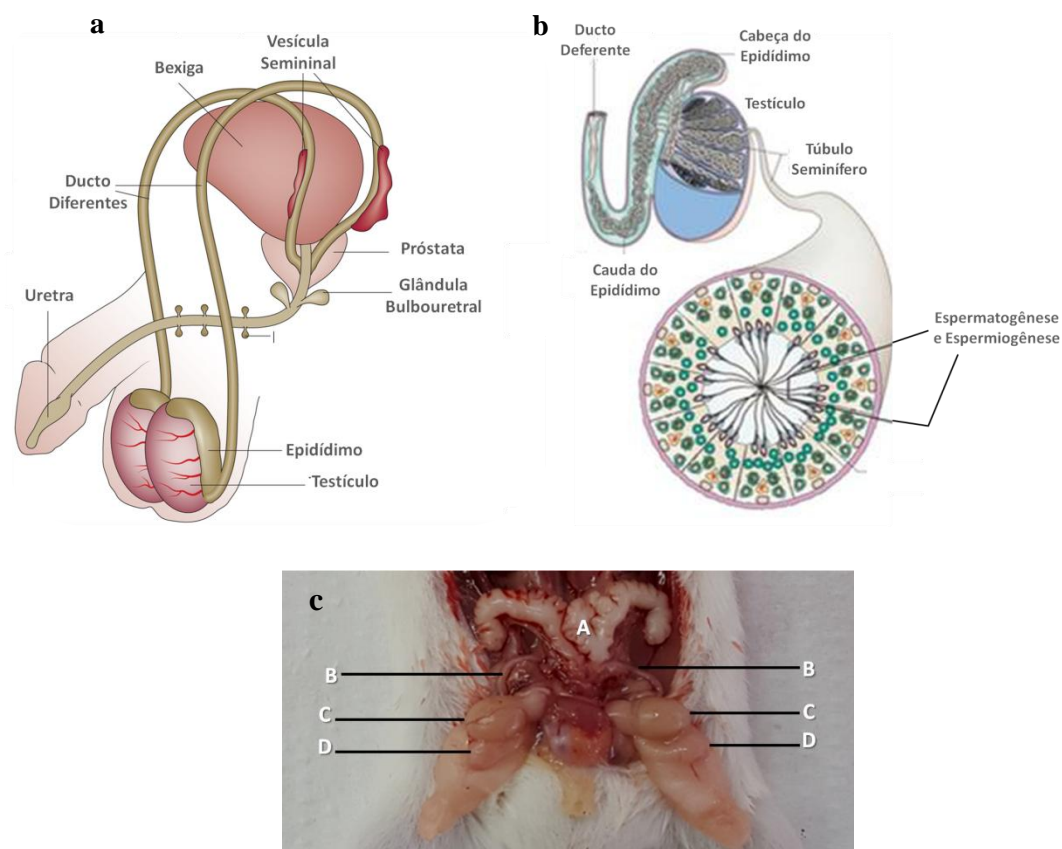


Figura 1 - Esquema anatômico do sistema genital masculino humano e do camundongo **a**. Anatomia do sistema genital masculino. **b**. Corte transversal de um testículo de camundongo, mostrando a localização dos túbulos seminíferos e os túbulos epididimários e uma representação esquemática da espermatogênese e espermiogênese em um túbulo seminífero. (modificado de DRABOVICH et al., 2014; BOHACEK & MANSURY, 2015). **c**. Anatomia do sistema reprodutor de camundongos machos adultos: A – Glândula seminal; B – Ducto Deferente; C – Testículo; D – Epidídimo. Próstata e glândulas bulbouretrais não demonstradas.

Os testículos são órgãos com função endócrina e exócrina, dispostos um do lado do outro no interior do escroto, são encapsulados e envoltos por tecido conjuntivo denso – a túnica albugínea - sendo formados por espaço intersticial e pelos túbulos

seminíferos (KRAWETZ, 2005) (Figura 1b). Os testículos possuem duas principais funções: a produção de gametas masculinos – os espermatozoides - e a produção do hormônio testosterona. Essas duas funcionalidades são reguladas pelo sistema nervoso central, principalmente pelos hormônios folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) por um sistema de *feedback* negativo (AMORY; BREMNER, 2001) (Figura 2). Anatomicamente, o testículo é dividido em dois compartimentos principais: o intersticial e o tubular (Figura 3).

O espaço intersticial é constituído por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, mastócitos ocasionais e as pelas células de Leydig (PINEAU et al., 1999). As células de Leydig possuem retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com enzimas que estão associadas à síntese de esteroides, o citoplasma é eosinofílico e o núcleo é arredondado ou alongado e nucléolo evidente e são essas células as responsáveis pela produção do hormônio testosterona (MORRI & CHRISTENSEN, 1980; HODGSON & HUDSON, 1983). A testosterona é produzida quando o LH se liga aos receptores na membrana plasmática da célula de Leydig (LHR) (Figura 2), estimulando a síntese de uma proteína reguladora esteroidogênica (StAR), que iniciará uma cascata de eventos, no qual o colesterol será convertido em pregnenolona nas mitocôndrias e em seguida será transferida para o retículo endoplasmático liso onde ocorrerá a conversão de pregnenolona em testosterona (ZIRKIN & CHEN, 2000).

Na puberdade a testosterona é responsável pelo aparecimento e manutenção das características sexuais secundárias (RICHMOND & ROGOL, 2007), já na fase adulta a testosterona é responsável pela manutenção da barreira hemato-testicular além de estimular a espermatogênese e a espermiogênese (MRUK & CHENG, 2015) (Figura 2).

A maior parte do parênquima testicular é ocupado pelo compartimento tubular, este é constituído pelos túbulos seminíferos, que são a unidade funcional do testículo (COOKE & SAUNDERS, 2002). Esses túbulos formam alças que possuem as extremidades conectadas à rede testicular, são compostos por: células mioídes (que envolvem o epitélio germinativo), células de Sertoli e células germinativas (Figura 3) (MRUK & CHENG, 2015). Na base do túbulo seminífero encontramos os núcleos das células de Sertoli, que são células epiteliais cilíndricas, com núcleo e nucleolo tripartido com heterocromatina associada.

As células de Sertoli são polarizadas e seu citoesqueleto é formado por microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários de vimentina e se estendem desde a base até ao lúmen do túbulo (Figura 3) (WEINBAUER, 2010; RATO et al., 2012).

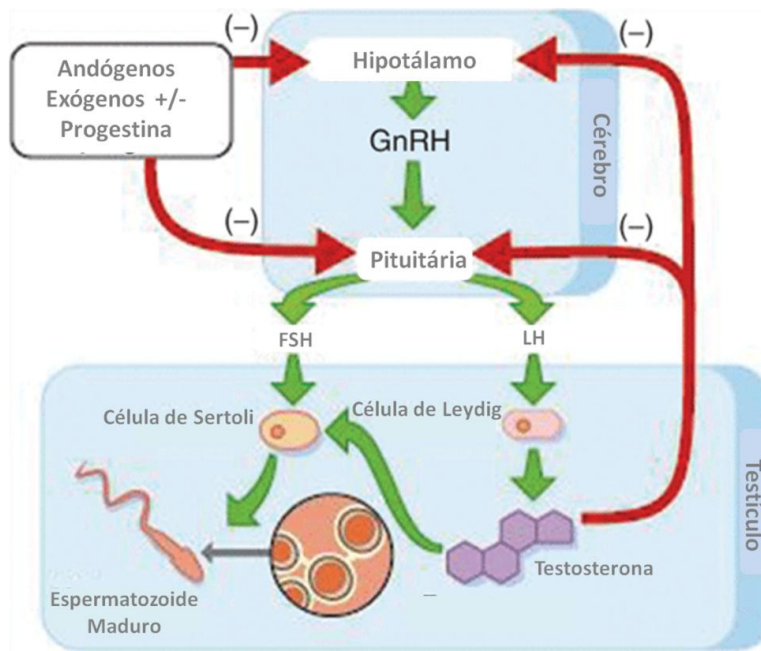


Figura 2 - Ação dos hormônios LH e FSH nos testículos LH- Hormônio Luteinizante; FSH- Hormônio Folículo estimulante; GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofina. (Adaptado de: <https://www.lowtestosteroneguide.net/general-info/how-is-testosterone-synthesized-in-our-body>).

O apoio estrutural para as células da linhagem germinativa e formação da barreira hemato-testicular são funções exercidas pelas células de Sertoli, por meio de junções oclusivas. Estas oclusões dividem o epitélio seminífero em 2 ambientes: o ambiente basal (onde localizam-se as espermatogônias e os espermatócitos I em pré-leptóteno) e o ambiente adluminal (onde localizam-se os espermatócitos I em zigóteno, espermatócitos II e espermátides em diferentes estágios de diferenciação). Esses ambientes proporcionam um meio isolado do sistema imune o que é de extrema importância para que o processo da espermatogênese ocorra de forma correta (FRANÇA et al. 2016).

Além disso as células de Sertoli são responsáveis pelo fornecimento de energia, secreção de nutrientes (aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas e íons metálicos), fatores de crescimento (fator de células-tronco, fatores de crescimento

espermatozóides (AMORY; BREMNER, 2001).

A partir de um corte transversal no testículo é possível observar centenas de túbulos seminíferos (Figura 1b), que encontram-se em diferentes estágios, no qual em cada estágio observa-se um conjunto específico de células germinativas que estão presentes num único ponto no túbulo ao mesmo tempo (HOGARTH & GRISWOLD, 2010). O número de estágios varia de espécie para espécie, no homem adulto existem apenas 6 estágios, enquanto que os camundongos possuem 12 estágios distintos (HESS & RENATO DE FRANCA, 2008). Os túbulos seminíferos estão densamente enovelados e se juntam para formar os túbulos retos que irão compor a rede testicular na região do mediastino, que converge posteriormente em 15-20 ductos eferentes que penetram em uma área espessa da túnica albugínea para formar a cabeça do epidídimo. Uma vez no epidídimo os ductos eferentes convergem em um túbulo único para formar o corpo e cauda do epidídimo que no final formará o ducto deferente (Figura 1b) (WOODWARD et al., 2002). O tamanho do túbulo seminífero varia conforme a espécie, o camundongos possui aproximadamente 20 túbulos por testículo e o comprimento pode chegar a 2 metros quando estendidos (BASCOM & OSTRUD, 1925).

Uma espermatogênese completa, em homens adultos possui a duração de aproximadamente 64 dias (HELLER & CLERMONT, 1963) e em camundongos a duração é de aproximadamente 35 dias (ADLER, 2000). Shalet (2009) definiu a espermatogênese como um conjunto de processos que culminam na produção de um grande número de espermatozóides a partir de uma população finita de células tronco germinativas, sendo produzidas continuamente ao longo da vida do indivíduo, sendo que essa produção em humanos costuma se prolongar além dos 50 anos de vida. Para que a espermatogênese ocorra de forma correta é necessário que ocorram interações celulares entre as células da linhagem germinativa e os componentes somáticos do testículo, sendo que, uma alteração em qualquer fase da espermatogênese pode levar à interrupção do funcionamento correto do tecido e culminar na infertilidade (AMORY; BREMNER, 2001).

Baseando-se em características morfológicas e funcionais, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: proliferativa (caracterizada por consecutivas divisões mitóticas das espermatogônias), meiótica (onde cada espermatócito em paquíteno dará origem a 4 espermátides haplóides e nessa fase ocorre a recombinação gênica) e espermiogênese (onde as espermátides arredondadas passa por modificações bioquímicas

e estruturas e diferenciam-se em espermatozoides) (GRISWOLD, 2016). O cronograma e dinâmica do desenvolvimento de células germinativas em camundongos encontra-se demonstrado na figura 4. Bohacek & Mansuy (2015), descreveram este processo do seguinte modo: as células germinativas começam a desenvolver-se logo após a fecundação, quando uma população de células pluripotentes dá origem a precursores de células germinativas primordiais (CGP) no epiblasto do dia embrionário (DE) 3.5-6.25.

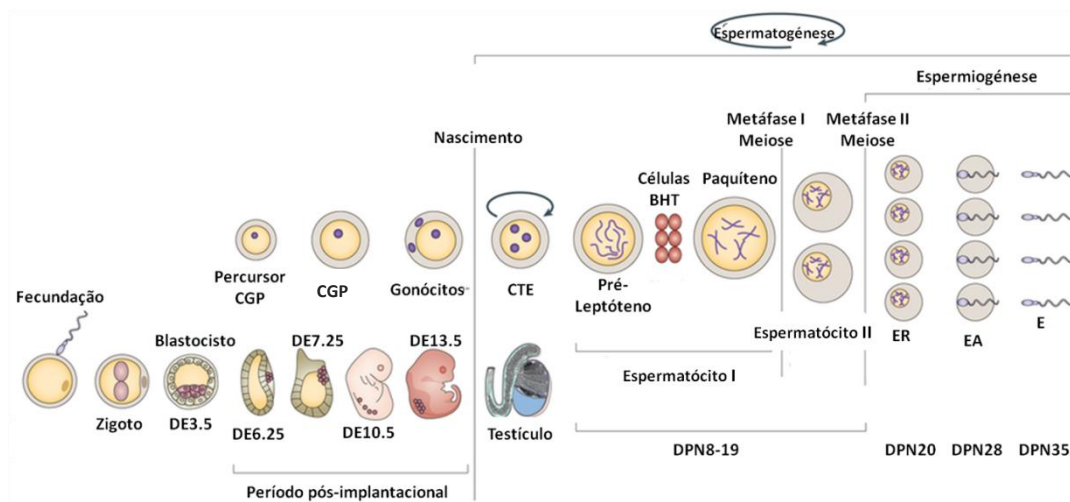


Figura 4 - Cronograma e dinâmica do desenvolvimento de células germinativas em camundongos. (modificado de: BOHACEK & MANSUY, 2015). CGP: Célula Germinativa Primordial; CTE: Célula Tronco Espermatogonial; ER: Espermátides Arredondadas; EA: Espermátides Alongadas; E: Espermatozoides; DE: Dia embrionário; DPN: Dia pós-natal.

As CGPs emergem do epiblasto em DE7.25 como aglomerados de cerca de 20 células que se instalam nas gônadas fetais, onde se proliferam rapidamente e migram para o cume genital, onde a determinação do sexo ocorre no DE12.5. As CGPs param de se dividir em DE13.5 e dão origem aos gonócitos. As células tronco espermatogoniais (CTE), que são células auto-renováveis que são mantidas ao longo da vida, proliferam-se por divisões mitóticas consecutivas, amadurecem e dão origem aos espermatogônias durante a primeira semana de vida pós-natal. As espermatogônias do tipo A proliferam-se por mitose e diferenciam-se em espermatogônias do tipo B, posteriormente as espermatogônia do tipo B dão origem a espermatócitos pré-leptóteno, seguido por leptóteno, zigóteno, paquíteno e espermatócitos diplóteno. Esses espermatócitos sofrem diacinese, completando a meiose I, até o dia pós natal (DPN) 19 e atravessam a barreira hemato testicular (BHT) estabelecida pelas células de Sertoli. A BHT torna-se funcional a partir do dia DPN20 (VITALE et al. 1973) e ao final desta fase temos a formação dos

espermátocitos II. Quando estes completam a meiose II (DPN20-22), dão origem às espermátides arredondadas que passarão pelo processo de espermiogênese (formação de acrossoma, alongamento e maturação da cauda e alterações nucleares) para formação de espermátides alongadas, em um processo de 16 passos em humanos e 12 passos em camundongo (CLERMONT, 1963; RUSSEL, 1990).

O término da espermatogênese culmina na espermição, onde ocorre é a liberação das espermátides maduras, dantes aderidas no epitélio seminífero, para o lúmen, que nessa fase já encontram-se diferenciadas em espermatozoides. As células de Sertoli, as células mioides peritubulares e as células contráteis, presentes no espaço intersticial, auxiliam na contração do túbulo seminífero para que os espermatozoides se desprendam do epitélio e prossigam o caminho em direção ao epidídimo (HOGARTH & GRISWOLD, 2010; KENT & GRISWOLD, 2014; MRUK & CHENG, 2015). Os espermatozoides que caem no lúmen e saem do testículo, já possuem a morfologia característica do espermatozoide, mas não apresentam motilidade nem capacidade para fecundar o ovócito II. Para a aquisição da capacidade de fertilização é necessário que os espermatozoides passem por diferentes fases de diferenciação pós-gonadal, sendo que, essas fases ocorrem durante o processo de passagem do gameta ao longo do túbulo epididimário (DACHEUX; DACHEUX, 2014).

O epidídimo de homens adultos é composto por 3 regiões: cabeça, corpo e cauda, sendo que, em roedores a cabeça é subdividida em segmento inicial e final (KRAWETZ, 2005). Durante a passagem pela cabeça até a cauda do epidídimo, os espermatozoides são banhados em um gradiente de RNases, glicosidasas e proteases para a remoção de todo o excesso de citoplasma remanescente (KRAWETZ, 2005). Na cabeça do epidídimo ocorrem as primeiras modificações espermáticas: a migração da gota citoplasmática, o início da capacidade móvel e da capacidade de ligação à zona pelúcida do ovócito II (DACHEUX; DACHEUX, 2014). Com o objetivo de formar um ambiente eletroneuro, na cabeça do epidídimo de roedores, as células basais reabsorvem cerca de 90% do fluído liberado pela rede testicular para assim aumentar a concentração de espermatozoides e com isso promover a melhora da sobrevivência e maturação destes, para assim, assegurar que um grande número de espermatozoides sejam liberados durante a ejaculação, promovendo a aleatoriedade da fertilização e a variação genética (HESS, 1997; CORNWALL, 2009; DACHEUX; DACHEUX, 2014). A motilidade é adquirida pelos espermatozoides durante a passagem pelo corpo e cauda do epidídimo. Além disso, os espermatozoides também passam pelo processo de

descapacitação, no qual ocorrem mudanças na membrana celular para evitar que a reação acrossômica ocorra antes do contato com o ovócito II (DACHEUX, 2014). Por fim, durante o ato sexual, os espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo são transportados para a uretra por contrações peristálticas da espessa cobertura muscular do ducto deferente.

O ducto deferente é composto por um lúmen estreito e uma espessa camada de músculo liso disposto em camadas circulares cercadas por camadas longitudinais internas e externas que se prolongam desde a cauda do epidídimo até a uretra (KOSLOV & ANDERSSON, 2013), sendo que, os espermatozoides passam por todas as glândulas anexas graças às contrações do ducto deferente (BRUSCHINI et al., 1977). Antes de chegar na próstata, o ducto deferente, dilata-se e forma a ampola, local onde a glândula seminal libera seu conteúdo para dentro do ducto deferente. Quando este penetra na próstata, os espermatozoides são banhados pelo líquido produzido por essa glândula.

A glândula seminal é uma glândula composta por dois lóbulos formados por uma mucosa pregueada forrada com epitélio cuboide e pseudoestratificado colunar. Sua principal função é secretar substâncias importantes para os espermatozoides (GONZALES, 2001), liberando cerca de 60% - 70% do volume presente no sêmen. Sendo assim, esta glândula é a principal fonte de frutose, citrato, inositol e prostaglandinas (CLAVERT et al., 1990) que são essenciais para a maturação, mobilidade dos espermatozoides, além de estimular a contração da musculatura lisa do ducto deferente. A glândula seminal também secreta semenogelina, responsável pela indução da coagulação do sêmen imediatamente após a ejaculação para assim formar um tampão vaginal que impede o retrocesso do sêmen da vagina (AUMÜLLER & RIVA, 1992).

A próstata humana é composta por epitélio basal e uma camada celular constituída por dois compartimentos distintos: o estromal e o epitelial (CAMPOS et al., 2008), sendo dependente de andrógenos. Juntamente com a glândula bulbouretral, compõe cerca de 40-30% do restante do fluido seminal. A próstata é responsável pela produção de grandes quantidades de citrato, zinco, espermina e fosfatase, além de antígeno prostático específico (PSA), que liquefaz o sêmen coagulado. A glândula bulbouretral é responsável pela liberação de muco que lubrifica, limpa e tampona a uretra (LIMA, 2003; LEITÃO 2013).

O líquido seminal é formado pelos fluídos que são produzidos e liberados pela glândula seminal, próstata e glândula bulbouretral. As principais funções são: a capacitação espermática, influenciar na competição dos espermatozoides, transporte de feromônios que atuam como atrativo feminino, modificação da velocidade dos espermatozoides, facilitação da movimentação espermática e controle do pH. Além disso, o líquido seminal possui propriedades alospermicidas, nutricionais, promove a reação acrossômica e a defesa espermática do sistema imunológico feminino (POIANI, 2006).

O pênis humano é formado por três corpos eréteis: dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso que envolve a uretra. O corpo do pênis dos roedores é formado por dois corpos cavernosos penianos e um corpo cavernoso uretral (CHIASSON, 1969). Histologicamente, o corpo cavernoso é constituído por tecido erétil com auréolas calibrosas, revestidas pela túnica albugínea (MURAKAMI; MIZUNO, 1986), enquanto que, o pênis do roedor apresenta um osso peniano localizado centralmente na glândula (HEBEL & STROMBERG, 1976).

Quando chegam na uretra, os espermatozoides já estão envoltos pelo líquido seminal, denominado de sêmen. Em mamíferos o sêmen é depositado dentro do lúmen vaginal devido à resposta do arco reflexo que leva à estimulação sensorial do pênis, seguida de estimulação motora simpática do músculo liso do sistema genital masculino e estimulação motora somática da musculatura associada à musculatura tubular do sistema genital masculino (STEERS, 1994).

A escolha do camundongo (classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*) como modelo neste estudo é devido ao fato de que, dentre todos os animais utilizados na prática científica, o camundongo é o mais utilizado desde o século XIX (SANTOS, 2002) e o mais conhecido fisiológico e funcionalmente (CHIRILLI, et al., 2007). O uso deste modelo experimental contribuiu com os estudos que culminaram no desenvolvimento de fármacos antidepressivos, interpretação do código genético e seu papel na síntese de proteínas e desenvolvimento de terapias genéticas (CARDOSO, 1998). O camundongo torna-se apto para reprodução com 60 dias de vida, porém os primeiros efeitos hormonais já são evidenciados com 30 dias de vida, em ambos os sexos. Além da fisiologia e estrutura do aparelho genital masculino desses animais serem muito semelhantes à de homens adultos. A prole abundante

característica da espécie torna-se de grande valia nos estudos de teratogênese e por serem animais de fácil manuseio e acomodação, facilitam os estudos de acompanhamento pós-natal e comportamental da prole.

1.2 Cloridrato de Bupropiona

O cloridrato de bupropiona (BUP, $\text{CH}_{13}\text{H}_{18}\text{ClNO}$) (Figura 5) é considerado um antidepressivo atípico não-tricíclico, pertencente à classe das aminocetonas. Também é conhecido como amfebutamona e é comercializado sob as denominações: Zyban, Voxra e Wellbutrin. Sua estrutura química é muito similar a de um outro estimulante do sistema nervoso central – a Catinona (Figura 5), ou Benzoiletanamina ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$) (FAVA, et al. 2005) – de uso controlado e considerado ilícito, sendo por isso um fármaco pertencente à classe das catinonas sintética. O BUP é metabolizado em 3 metabólitos ativos: hidroxibupropiona e os diastereoisômeros (treidrobupropiona e eritrohidrobupropiona), que exibem até cerca de 25-50% de potência comparados com o fármaco original (BONDAREV et al., 2003; DAMAJ et al. 2004).

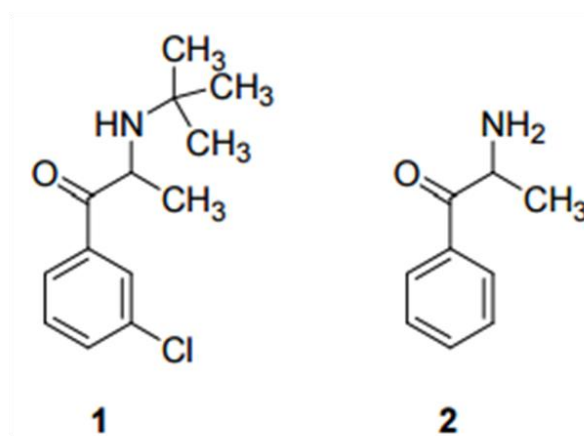


Figura 5-Similaridades entre a estrutura química do Cloridrato de Bupropiona e da Catinona. **1.** Cloridrato de Bupropiona; **2.** Catinona (Fonte: SHALABI et al., 2017).

O BUP é inibidor da atividade do citocromo P450 2D6 (CYP2D6) por isso, recomenda-se uma avaliação cautelosa do uso de BUP em pacientes em tratamento com fármacos metabolizados pelo CYP2D6 (KOTLYAR et al., 2005), uma vez que existe a possibilidade do BUP aumentar o nível sérico desses fármacos. O metabólito hidroxibupropiona é formado no citocromo P450 2B6 (CYP2B6) já os

diastereoisómeros são formados por ação da carbonil-redutase (NADPH) (CONNARN et al., 2015; SKARYDOVA et al., 2014).

Tanto o BUP quanto os seus metabólitos ativos apresentam meias-vidas longas: BUP ~ 21h, hidroxibupropiona ~ 20h, e os diastereoisómeros ~ 33-36h (JEFFERSON et al., 2005), além disso, a Cmax da treidrobupropiona e da hidroxibupropiona é ~ 3 e ~ 4-5 vezes maior no plasma que a do BUP, respectivamente (JEFFERSON et al., 2005). Cerca de 87% deste fármaco e de seus metabólitos são excretados na urina, deste percentual, 0,5% são excretados inalterados. Cerca de 10% do BUP é excretado nas fezes e apenas 0,1% permanece inalterado e circulante em humanos após uma dose oral (FINDLAY et al., 1981; SCHROEDER, 1983) e atinge o estado de equilíbrio após cinco dias de ingestão (HOLM & SPENCER, 2000). Estudos têm demonstrado uma baixa recuperação de BUP e de seus metabólitos (COLES & KHARASCH, 2007; JEFFERSON et al., 2005), isso sugere que outros metabólitos podem estar sendo formados (CONNARN et al., 2016), o que explicaria a farmacocinética e eficácia do BUP ser muito variável nos diferentes ensaios clínicos (HESSE et al., 2004; LAIZURE et al., 1985).

O BUP foi desenvolvido no final da década de 1970, sendo inicialmente comercializada nos Estados Unidos a partir de 1985, permanecendo menos de um ano no mercado devido à associação com convulsões. Em 1989 foi reintroduzido em apresentações com doses menores (SEGENREICH & MATTOS, 2004). Os principais efeitos colaterais observados no estudo feito por Patel e colaboradores (2016) foram: boca seca (5-34,5%), dor de cabeça (3-34%), insônia (1-27,8%) e náuseas (7-21%), além disso, outros efeitos colaterais raramente relatados incluem: convulsões, agitação, ansiedade, constipação, nasofaringite, tonturas e fadiga. Sendo que as taxas de descontinuação devido a eventos adversos variaram de 0 a 55%.

Inicialmente foi desenvolvido para terapias de cessão tabágica. Sendo que, mecanismo de ação está relacionado à redução da recaptção neuronal dos neurotransmissores dopamina e noradrenalina e com isso aumentar o tempo de ação destes neurotransmissores na fenda sináptica (PATEL, et al., 2016), levando à redução da compulsão pelos cigarros (JORENBY, 2002). Além disso, em doses terapêuticas o BUP inibe os efeitos excitatórios da nicotina no sistema mesolímbico de recompensa induzido pela liberação de dopamina. (MANSVELDER, et al., 2007). O BUP apresenta

potencial de inibir a recaptura de dopamina mil vezes maior do que para inibir a recaptura de noradrenalina e não possui efeitos na recaptura de serotonina, histamina, acetilcolina e adrenalina (STAHL et al., 2004), assim substituindo a liberação desses neurotransmissores pela nicotina, aliviando os sintomas da falta do tabaco (ASCHER et al., 1995). É importante salientar que em pacientes fumantes que desenvolvem Doença Obstrutiva Pulmonar Crônica (DPOC), estudos têm demonstrado que o uso de BUP não está relacionado ao risco de aumento de problemas cardíacos (KOTZ et al., 2017). O uso deste fármaco não está associado ao aumento de peso como consequência da privação tabágica (FLODEN et al., 2016), sendo este um grande atrativo para seu uso, visto que pacientes em tratamento costumam engordar de 4-6Kg devido à abstinência da nicotina (JAIN, 2003). A dose inicial é de 150 mg/dia até o terceiro dia, passando para 300 mg/dia, durante 12 semanas sendo indicada para adultos que consomem 15 ou mais cigarros por dia. As contraindicações incluem o uso em pessoas epiléticas, pessoas que utilizem outros compostos que possuem BUP na composição, em paciente em processo de retirada de álcool, pacientes que sofreram traumatismo cranioencefálico e pacientes que usem medicamentos que são inibidores da monoaminoxidase ou que possuem transtornos alimentares. (MARQUES et al., 2001).

Porém com o passar do tempo foi constatado que o BUP possuía potencial para ser utilizado em outros regimes terapêuticos. Nos EUA, desde 1990, este fármaco vem sendo utilizado para o tratamento da depressão (FAVA et al., 2005). Uma nova formulação foi lançada em 2007, e constatada a sua eficácia, em alguns países como o Reino Unido, onde o BUP é liberado apenas para terapias de cessão tabágica, este tem sido disponibilizado à população para o tratamento da depressão em regime de “off-label”. O aumento da procura e prescrição do BUP para o tratamento da depressão é devido ao fato do fármaco não levar ao aumento de peso e em alguns casos levar à diminuição deste (HEWETT et al., 2009, 2010; KOSHINO et al., 2013; THASE et al., 2006; COLEMAN et al., 1999; CROFT et al., 1999; JEFFERSON et al., 2006; SETTLE et al., 1999; WEIHS et al., 2002) e pelo fato de existirem vários relatos de que este não leva à disfunção sexual (CROFT et al., 1999; COLEMAN et al., 1999; COLEMAN et al., 2001; CLAYTON et al., 2006; HEWETT et al., 2010; THASE et al., 2006). Seus efeitos colaterais são descritos como sendo principalmente: boca seca, náusea e insônia (STAHL et al., 2004), cujo manejo terapêutico é mais simples. Esses efeitos são muito observados em pacientes que fazem uso de antidepressivos

pertencentes a outras classes, e quando o BUP foi combinado com outros fármacos antidepressivos foi constatado aumento de peso nesses pacientes (BLIER et al., 2010; CLAYTON et al., 2014). A prevalência da depressão em pacientes diabéticos rondam os 10-30% (ALI et al., 2006), o BUP vem sendo apontado como um fármaco promissor para o tratamento de pacientes nesses casos, porém mais estudos precisam ser realizados (ROOPAN & LARSEN, 2017). Pacientes com distúrbios psiquiátricos (depressão, transtorno bipolar do humor, transtorno de ansiedade e esquizofrenia) e que são tabagistas são cada vez mais comuns (DERVAUX & LAQUEILLE, 2016). Nesses casos, o uso de BUP têm-se demonstrado muito eficaz e sem risco de descompensação psiquiátrica (EVINS & CATHER, 2015; ROBERTS et al., 2016). Sendo assim, recomenda-se o uso do BUP como antidepressivo único ou combinado com outros antidepressivos (PATEL et al., 2016), particularmente se o ganho de peso ou a disfunção sexual forem problemas significativos, sendo que é considerado um medicamento de terceira ou quarta linha nesses casos.

Para tratamento do Transtorno Bipolar do Humor (TBH) o BUP apresenta benefícios muito similares a outros antidepressivos (LI et al., 2016), além disso outras classes de antidepressivos têm sido associados às mudanças de fase (maníaca e depressiva) que ocorrem no TBH, sendo que, o BUP tem demonstrado menor risco de causar essas mudanças de fase (LEVERICH et al., 2006; SHOPSIN, 1983; WRIGHT et al., 1985). Assim sendo, o BUP tem sido recomendado como tratamento de primeira linha, seja em monoterapia ou combinada com outras terapias, em diretrizes clínicas recentes com base em sua segurança para o tratamento do TBH (American Psychiatric A, 2002; YATHAM et al., 2013).

A obesidade, problemas metabólicos relacionados à obesidade e as complicações cardiovasculares relacionadas são mais comuns em pacientes com algum distúrbio psicológico (depressão, TBH, esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo) do que na população em geral. O BUP vem sendo recomendado para o tratamento desses pacientes em regimes de monoterapia (HASNAIN & VIEWEG, 2013) ou em combinação com a naltrexona (GREENWAY et al., 2010), por promover perda moderada de peso nesses casos. Nos casos de obesidade não ligados a distúrbios psicológicos, o BUP associado à naltrexona é o medicamento de primeira escolha (HALPERN & MANCINI, 2017). Apesar das dificuldades de se implementar um tratamento farmacológico para a obesidade, uma vez que, este ainda é considerado um

problema relacionado ao estilo de vida do paciente (HALPERN & HALPERN, 2015). A inibição de recaptura de noradrenalina e dopamina no núcleo arqueado, leva ao aumento dos níveis de ambos os neurotransmissores levando à excitação dos neurônio pró-opiomelanocortina (POMC) anorexigênicos que levam à supressão do apetite (GREENWAY et al., 2009). A naltrexona, um antagonista de opioides aprovado para tratamento de dependência de álcool e opioides, é um antagonista competitivo dos receptores de μ e κ -opioides, que leva ao bloqueio da sinalização da beta-endorfina. Isso promove um efeito mais pronunciado do BUP nos neurônios anorexigênicos (GREENWAY et al., 2009), refletindo assim na perda acentuada de peso de aproximadamente de 5kg, sendo que alguns pacientes chegam a perder até 12,9% do seu peso inicial (GADDE et al., 2001).

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um transtorno neurobiológico caracterizado por sintomas de desatenção, inquietude e impulsividade, é mais comum na infância, porém estudos de seguimento têm demonstrado que os sintomas surgidos na infância persistem durante a vida adulta (MANUZZA et al., 1993; WEISS et al., 1985). Os psicoestimulantes continuam sendo a medicação de primeira escolha, porém em alguns pacientes verificam-se efeitos colaterais como: ansiedade, insônia e anorexia, sendo que por isso necessitam de outra classe medicamentosa (WILENS & SPENCER 2010). Além disso, é muito comum entre os pacientes com TDAH o consumo de cigarros (WILENS et al., 2008). O BUP mostrou-se eficaz no tratamento de TDAH tanto em crianças (CONNERS et al., 1996) como em adultos (WILENS et al., 2001 & WILENS et al., 2005). Mostrou-se igualmente eficaz no tratamento de pacientes adultos com TDAH e que apresentam TBH (WILENS et al., 2003), sendo assim de importante aplicabilidade em pacientes com sintomatologia complexa, abuso de tabaco e transtornos de humor.

Com o avanço da tecnologia novos transtornos psíquicos têm sido relatados, a Associação Americana de Psiquiatria sugeriu que a perda de controle sobre o jogo on-line seja denominada *Internet Gaming Disorder* – IGD, caracterizada por impulsividade e humor deprimido. Sendo incluído na Seção III do Manual de Diagnóstico e Estatística de Distúrbios Mentais (DSM), Quinta Edição (DSM – 5, 2013). Song e seus colaboradores (2016), demonstraram que o BUP é mais eficaz do que o escitalopram na melhoria da atenção e da impulsividade nesses pacientes e acredita-se que essas características sejam importantes no manejo terapêutico da IGD. Han e seus

colaboradores (2010) já haviam reportado num estudo, que o BUP levou à diminuição da atividade cerebral induzida no córtex pré-frontal dorsolateral e isso melhorou o rendimento diário, atenção em sala de aula e diminuiu o desejo e o tempo de jogo total dos pacientes.

O uso não médico de substâncias psicoativas vem aumentando e constituindo um problema de saúde pública (EVANS & SULLIVAN, 2014; SAMHSA, 2015). Nos primeiros ensaios, o BUP causou a manifestações de sintomas comportamentais muito semelhantes aos mecanismos de recompensa induzidos por cocaína e anfetaminas em animais (BERGMAN et al., 1989; KAMIEN & WOOLVERTON, 1989; LAMB & GRIFFITHS, 1990). Em estudos para avaliação do potencial de abuso em humanos concluiu-se que o risco de abuso do BUP era menor que o da anfetamina, cafeína e metilfenidato quando administrado por via oral (MILLER & GRIFFITH, 1983; RUSH et al., 1998; ZERNIG et al., 2004). Porém, diversos trabalhos têm demonstrado que o uso não médico do BUP vem se tornando cada vez mais frequente (MCCORMICK, 2002; WELSH & DOYON, 2002; KHURSHID & DECKER, 2004; HILL et al., 2007; LANGGUTH et al., 2009; BARIBEAU & ARAKI, 2013; STEELE et al., 2015). Evans & Sullivan (2014) concluíram que o BUP é o fármaco mais mal utilizado dentre todos os antidepressivos disponíveis, além disso, é relatado por outros autores como sendo uma droga de abuso (HILLIARD, et al., 2013; OPPEK et al., 2014; ROSTAS & WOLF, 2015; STALL & GODWIN, 2014). A utilização do BUP como estimulante foi comprovada por Anderson e colaboradores (2017), a partir do levantamento de dados disponíveis em *websites* de discussão on-line, além disso, estes autores verificaram que a via de administração escolhida para obtenção deste efeito é a insuflação nasal. É relatado que a euforia causada pelo BUP é mais comum após a insuflação ou injeção intravenosa de comprimidos triturados, porém não se observa o mesmo efeito após a administração oral o que sugere que esta via confere uma cinética de metabolização mais lenta do fármaco (YOO & WESTERMEYER, 2013). Um fato preocupante foi descrito no estudo de Monteith e colaboradores (2015), que investigaram a procura por medicamentos para o tratamento do TBH com e sem prescrição médica, e verificaram que a oferta e procura de BUP em sites farmacêuticos on-line legais e ilegais, é o maior dentre todos os outros medicamentos investigados. Outro fator que contribuiu para o uso abusivo do BUP, é de que hoje em dia, pessoas não obesas encontram-se em constante procura pelo dito: “corpo perfeito”. Os psicoestimulantes estimulam a ativação da via

mesolímbica e aumentam o tempo de ação da dopamina na fenda sináptica do núcleo accumbens (ROWLEY et al., 2000), o que leva à supressão do apetite e à perda considerável de peso. Em pacientes que são dependentes de drogas de abuso é mais comum a ocorrência de mortes não intencionais (por acidente) (KENDLER et al., 2017) em comparação com as mortes por suicídio. No estudo de Kriikku & Ojanperä (2016), 33 727 exames toxicológicos realizados *post mortem* foram analisados, verificou-se que em 65 destes casos, foi possível detetar o BUP no sangue periférico (55 casos) e na urina (10 casos). Dos 65 casos, 30 foram classificados como morte por overdose, sendo que, dentre esses casos, 25 tiveram como causa o suicídio e o restante foi devido a overdose acidental.

Estudos têm demonstrado que, a recomendação do uso de BUP em diversos regimes terapêuticos têm sido crescente, além do seu uso não médico ter-se tornado preocupante. A constante exposição a esse fármaco durante a idade fértil pode causar danos ao sistema reprodutor, sendo por isso necessário conhecer as implicações que esta exposição pode acarretar.

1.3 Cloridrato de Bupropiona e função reprodutiva

Sabe-se que as maiores incidências de efeitos adversos sob a função sexual surgem em pacientes que fazem uso de medicamentos inibidores seletivos da recaptura neuronal de serotonina (ISRSs) (citalopram, fluoxetina, paroxetina, sertralina e fluvoxamina) e inibidores da recaptura de serotonina e noradrenalina (venlafaxina e duloxetina) (BALON, 2006; WERNEKE et al., 2006; WILLIAMS et al., 2010; GARTLEHNER et al., 2011; BALDWIN & FOONG, 2013), sendo que as principais queixas são: ejaculação tardia e anorgasmia (LABBATE et al., 1997), devido ao aumento do tónus serotoninérgico.

Em um estudo comparativo entre BUP e fluoxetina, onde foram avaliados: eficácia, tolerabilidade e os efeitos sobre a função sexual, Coleman e seus colaboradores (2001) concluíram que apesar dos dois fármacos terem sido igualmente eficazes e bem tolerados no tratamento da depressão, a disfunção orgásmica, desordem de desejo sexual e desordem de excitação sexual foram mais frequentes nos pacientes tratados com fluoxetina, sendo que por isso, os autores sugeriram que o BUP seria um fármaco mais adequado para pacientes preocupados com seu desempenho sexual. Abler e

colaboradores (2011) analisaram 18 homens saudáveis, enquanto assistiam a vídeos de conteúdo erótico e não-erótico em condições de estado estacionário, depois de tomar 150mg de BUP ou 20mg de paroxetina, por 7 dias. No estudo verificaram que as áreas do estriado ventral, mesencéfalo e áreas distintas ao longo do giro cingulado foram mais ativadas nos pacientes usuários de BUP do que nos usuários de paroxetina, o que segundo os autores poderia ser um meio de prevenir a disfunção sexual muito comum em pacientes usuários de ISRSs. Taylor e colaboradores (2013) recomendam que o BUP seja usado em monoterapia ou então associado ao antidepressivo que esteja causando prejuízo na função sexual. É cada vez mais comum em homens obesos e diabéticos, o desenvolvimento da síndrome metabólica, o que torna o indivíduo susceptível à disfunção endotelial o que leva à alteração da capacidade de produção de óxido nítrico, podendo iniciar um quadro de disfunção sexual (AMIDU et al., 2013). Nesses casos o BUP parece melhorar a função sexual (SAYUK et al., 2011), sendo também recomendado, pelo fato de que nesses pacientes ser muito comum o surgimento de quadros depressivos.

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, Quarta Edição (DSM-V-TR, 2014), o Transtorno do Desejo Sexual Hipoativo (TDSH) é uma disfunção sexual caracterizada pela deficiência, ausência persistente ou recorrente de desejo ou fantasia sexual conduzindo a acentuado sofrimento e dificuldades interpessoais. Para o tratamento do TDSH, o BUP é considerado uma medicação “off-label” (SEGRAVES et al., 2001; SEGRAVES et al., 2004; STAHL et al., 2004; DOBKIN et al., 2006). O mecanismo pelo qual o BUP atua nesses casos ainda não está totalmente esclarecido, acredita-se que a melhora no desejo sexual esteja ligado à ativação dopaminérgica no núcleo accumbens e da região pré-óptica mediana do hipotálamo (STAHL, 2001). Contudo, Van der Made e colaboradores (2009) relataram que possivelmente o BUP atua melhorando a função sexual mas não a frequência. No estudo de Modell e colaboradores (2000) o BUP foi associado à melhoria da satisfação sexual global e na melhora da intensidade do orgasmo, mostrando-se igualmente eficaz em pacientes depressivos que apresentam TDSH devido ao uso de outras classes de antidepressivos (MOLL & BROWN, 2011). Além disso, no estudo de Safarinejad (2001) verificou-se que o desejo, excitação, lubrificação, orgasmo e satisfação foram significativamente maiores no grupo BUP.

Kravos (2010) reportou o caso de dois pacientes do sexo masculino, com 37 e 39 anos, sem histórico de disfunção sexual, que apresentaram um quadro de ejaculação precoce, após tratamento com BUP para alívio de sintomas residuais da depressão. Casos de ejaculação precoce também já foram reportados por Evrensel & Cleylan (2014). Isso pode ser explicado pelo fato do tônus noradrenérgico induzido pelo BUP estimular a ejaculação, por isso alguns estudos têm sugerido o uso de BUP para o tratamento da ejaculação tardia em homens não depressivos. No estudo de Abdel-Hamid & Saleh (2011) foi demonstrado que em pacientes com quadro de ejaculação tardia crônica e que foram tratados com 150mg/dia de BUP, apresentaram diminuição no tempo desde o início do ato sexual até a primeira ejaculação e melhora na satisfação sexual. Na concentração de 75mg/Kg o BUP mostrou-se efetivo no tratamento de um homem adulto viciado em opiáceos, que apresentava hipogonadismo e que se queixava de ejaculação tardia e diminuição de libido (BIDAKI et al., 2012). Por outro lado, Martínez-Raga e colaboradores (2004) reportaram um caso de anorgasmia e falha ejaculatória em um homem de 36 anos que utilizava BUP na dose de 150mg/kg como tratamento para cessão tabágica, sendo que essa disfunção sexual ocorreu ao longo dos 6 dias desde o início do tratamento e que desapareceram por completo 3 dias após a interrupção do mesmo. Isso poderia ter ocorrido devido ao fato do BUP inibir fracamente os transportadores de noradrenalina (COOPER et al. 1994) e por conseguinte essa inibição não seria suficientemente forte para promover estimulação sexual permanente, sendo assim, pode-se verificar que o papel do BUP na disfunção sexual masculina permanece ainda pouco esclarecido (ABDEL-HAMID et al., 2016).

Estudos vêm demonstrando alguns efeitos do BUP sobre o aparelho reprodutor masculino em modelos experimentais. Quando administrado por infusão diretamente na área pré-óptica medial de ratos adultos, o BUP induziu o aumento de dopamina na área com consequente ereção peniana dos animais (ADACHI et al. 2003). Porém Sukoff-Rizzo e colaboradores (2008), verificaram que o BUP na concentração de 20mg/Kg, administrado por via intraperitoneal tanto de forma subcrônica (7 dias) quanto crônica (14 dias) levaram à diminuição da ereção peniana em ratos adultos. Injeções diárias de 15mg/Kg de BUP durante 7 dias em ratos adultos, causaram interferência no gerador espinhal de ejaculação desses animais (HUELETL-SOTO et al., 2014) e em um estudo de exposição crônica, por via oral, ao BUP por 30 dias verificou-se que a dose de 15mg/Kg levou ao aumento de LH e da contratilidade epididimária mas sem afetar a

qualidade espermática, porém, a dose de 30mg/Kg causou prejuízo na qualidade espermática e na motilidade dos espermatozoides dos ratos expostos (CAVARIANI et al., 2015).

Bellentani e colaboradores (2011) e Borges e colaboradores (2013), demonstraram que a administração oral de sibutramina, um bloqueador da recaptura de noradrenalina por mecanismo muito semelhante ao do BUP, aumentou a disponibilidade desta monoamina na fenda sináptica, influenciando na qualidade espermática, diminuindo a fertilidade e levando à diminuição das reservas de espermatozoides na cauda do epidídimo de ratos machos.

Além disso, estudos têm associado o aumento da disponibilidade de dopamina com o prejuízo na função reprodutiva masculina (SETHI & CHATURVEDI, 2009; URRÁ, et al., 2014; GONZÁLEZ, et al., 2015; JANPHET, et al., 2017). O BUP aumenta a neurotransmissão tanto noradrenérgica quanto dopaminérgica via inibição da recaptação de dopamina e noradrenalina, por isso, torna-se necessário maiores conhecimentos acerca das influências deste fármaco na saúde reprodutiva masculina, visto que a qualidade espermática têm sido apontado como um biomarcador de saúde masculina e estudos tem relacionado isso com o aumento da expectativa de vida do homem (EISENBERG et al., 2015; EISENBERG et al., 2015b; EISENBERG et al., 2016), além do fato da qualidade espermática afetar diretamente a descendência desses indivíduos.

1.4 Cloridrato de Bupropiona e desenvolvimento intrauterino, pós-natal e comportamental

Diversos estudos demonstram os efeitos da exposição neonatal ao BUP sob desenvolvimento intrauterino, inclusive relacionando o uso de BUP durante o segundo trimestre de gestação com aumento da propensão para o desenvolvimento de TDAH nas crianças (BOURKE et al., 2014; FIGUEROA, 2010).

Gentile (2005) realizou uma revisão sistemática acerca do uso de antidepressivos durante a gestação e a lactação e observou que a exposição materna ao fármaco durante o primeiro semestre de gestação não estava associado à ocorrência de malformações, porém recomenda o não uso deste fármaco durante a gestação e nem durante a lactação. Gisslen e colaboradores (2011) reportaram um caso de um recém-nascido de uma

mulher que recebeu BUP na dose de 75mg/Kg como tratamento para depressão e ansiedade durante a gestação, o neonato apresentou hipoglicemia profunda e convulsões no 3º dia pós nascimento e a investigação laboratorial realizada confirmou o hiperinsulinismo. Num relatório final que apresentava os relatos de casos ocorridos de 1 de Setembro de 2007 a 31 de Março de 2008 foram constatadas 24 malformações congênicas relacionadas ao uso de BUP durante o primeiro trimestre de gestação dentre as 675 mulheres inscritas (The Bupropion Pregnancy Registry, 2008). Na análise realizada por Louik e colaboradores (2014) foi constatada uma relação entre o uso de BUP como monoterapia durante a gestação e a ocorrência de alterações no desenvolvimento cardíaco dos neonatos, principalmente defeitos no septo ventricular, sendo que, outras anomalias cardíacas já tinham haviam relatadas (ALWAN et al., 2010; THYAGARAJAN et al., 2012).

Experimentalmente, alguns estudos têm demonstrado as consequências da exposição intrauterina ao BUP. Em doses de 25mg/Kg administrado durante a prenhez de camundongos, foi observado um aumento da susceptibilidade ao estresse e um mecanismo de recompensa semelhante ao induzido pela cocaína na prole desses animais (HSIAO et al., 2005). Nos experimentos de Su e colaboradores (2007) foi constatado que a exposição intrauterina a BUP durante o terceiro trimestre de gestação, a uma dose de 50mg/kg causou aumento na atividade exploratória no teste de campo aberto, além disso, o BUP nas doses de 25 e 50 mg/kg causou diminuição significativa no número de entradas no braço aberto no teste de labirinto em cruz elevado e acelerou o desenvolvimento de sensibilização induzida por cocaína na atividade locomotora. Na análise do desenvolvimento pós-natal da prole de animais expostos durante a gestação ao BUP, verificou-se que houve aceleração da entrada na puberdade na prole de fêmeas desses animais (DE LONG et al., 2013).

Todos esses estudos investigaram os efeitos da exposição materna ao BUP no desenvolvimento intrauterino, pós-natal e comportamental da descendência. Estudos acerca da exposição paterna ao fármaco em delineamentos semelhantes aos anteriormente descritos, não foram encontrados. Nem foram encontrados relatos acerca da possível associação entre a exposição paterna ao BUP e alterações físicas e/ou comportamentais em neonatos. Visto que, muitos homens em idade reprodutiva fazem uso de BUP, estando assim susceptíveis às ações deste fármaco sob a função

reprodutiva, torna-se imprescindível investigar os efeitos desta exposição na descendência desses indivíduos.

2. JUSTIFICATIVA

O BUP é um fármaco muito utilizado atualmente, devido às suas propriedades como antidepressivo e ansiolítico. A inibição central da recaptura de noradrenalina e de dopamina faz com que a sua aplicabilidade terapêutica seja ainda mais abrangente. Além disso, devido a essas mesmas propriedades, o uso não terapêutico têm aumentado, visto que cada vez mais este fármaco tem sido utilizado para auxiliar na perda de peso (em pessoas não obesas) e como estimulante do sistema nervoso central, muitas vezes sem qualquer acompanhamento por parte de um especialista. Esses dados tornam-se ainda mais alarmantes quando pensarmos que a maioria desses usuários se encontram em idade reprodutiva.

Na literatura consultada verificou-se que a segurança do uso do BUP durante a fase reprodutiva masculina ainda não foi estabelecida. Os estudos disponíveis acerca das consequências da exposição ao medicamento sobre o processo da espermatogênese, síntese hormonal e comportamento sexual são ainda pouco esclarecedores, visto que, ainda existe muita controvérsia entre os resultados encontrados na literatura. Tão pouco foram encontrados dados que permitem avaliar os riscos específicos associados à exposição paterna ao BUP no desenvolvimento intrauterino da descendência desses indivíduos, uma vez que, a investigação acerca dos efeitos teratogênicos, alterações no desenvolvimento pós natal e comportamental ainda não foram elucidados.

Considerando-se o elevado número de homens em idade reprodutiva que fazem os uso deste fármaco, o presente estudo tem potencial para fornecer resultados que poderão contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos deste fármaco sobre a função reprodutiva masculina e os possíveis efeitos desta exposição sobre a descendência.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo do estudo foi verificar a toxicidade e as possíveis alterações na função reprodutiva em camundongos machos adultos expostos ao BUP, na dose experimental de 40mg/Kg (essa dose mostrou-se efetiva no aprimoramento da neurotransmissão dopaminérgica e mostrou efeitos antidepressivos em camundongos - Dhir e Kulkarni, 2007), durante a espermatogênese e avaliar a presença de malformações congênitas, acompanhar o desenvolvimento pós-natal e avaliar a ocorrência de alterações comportamentais na prole.

3.2. Específicos

- Investigar a toxicidade em camundongos machos após a administração de BUP;
- Avaliar se a administração de BUP promoveu alterações nos órgãos do sistema reprodutivo dos camundongos machos;
- Verificar os possíveis efeitos do BUP sobre a espermatogênese dos camundongos machos;
- Dosar, por meio de amostras sorológicas dos animais, o hormônio testosterona após exposição de BUP;
- Analisar o desenvolvimento intrauterino da prole dos machos tratados com BUP;
- Avaliar se a exposição paterna ao BUP induziu o aparecimento de alterações externas, esqueléticas e viscerais na prole desses animais;
- Analisar do desenvolvimento pós-natal físico e reflexológico da prole dos machos tratados com BUP;
- Avaliar o padrão comportamental com relação a atividade motora e ansiedade da prole dos camundongos machos tratados com BUP;
- Dosar, por meio de amostras sorológicas da prole dos animais tratados com BUP, o hormônio testosterona e o hormônio estrogênio.

4. ARTIGO I

Bupropion promotes alterations in the spermatogenesis of mice and congenital malformations in the offspring

Artigo será submetido à revista — “Toxicology and Applied Pharmacology”

ISSN: 0041-008X; F.I. 2017: 3.791/ Qualis CAPES 2013-2016 (Medicina II): A2

Bupropion promotes alterations in the spermatogenesis of mice and congenital malformations in the offspring

Eliane Swely Amador Monteiro Sanches^{1,2}, Felipe Tsuzuki¹, Fábio Augusto Joinhas¹, Caio Cezar Nantes Martins¹, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes¹, Maria José Sparça Salles^{1*}

¹Department of Biology, State University of Londrina (UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

²Department of General Pathology, State University of Londrina (UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

*Corresponding author: salmjs00@gmail.com

State University of Londrina

Center of Biological Sciences – CCB

Department of Biology

Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid/Pr 445 Km 380 Caixa Postal: 10.011 - CEP: 86057-970 - Londrina-PR

Abstract

Bupropion Hydrochloride (BUP) is an inhibitor of dopamine and noradrenaline recapture and has been associated with alterations in male sexual function. The aim of this study was to evaluate the effects of BUP on the reproductive function of mice exposed during spermatogenesis and evaluate the intrauterine development and teratogenicity in offspring. Male mice were distributed in: exposed group BUP 40mg/Kg (n = 13) for 45 days and control group saline (n = 13). On the 35th day of treatment, males were placed to mate with females, and submitted to euthanize on 46th day. Vital and sexual organs were analyzed for evaluation of reproductive function. On the 18th day of pregnancy the females were euthanized for evaluation of intrauterine development and the presence of congenital malformations in the offspring. BUP group showed a decrease in Johnsen score (Control: 9.354 ± 0.092 ; BUP: 7.615 ± 0.147), Sertoli cells (Control: 5.623 ± 0.184 ; BUP: 4.215 ± 0.097) and Leydig cell (Control: 11.430 ± 0.817 ; BUP: 7.531 ± 0.213) count, testosterone levels (Control: $783.5 \text{ ng/dL} \pm 154.2$; BUP: $201.4 \text{ ng/dL} \pm 54.8$) morphological alterations of head (Control: 8.134%; BUP: 10.423%) and tail (Control: 4.96%; BUP: 16.211%) of spermatozoa and decrease in production (Control: 2.852 ± 0.211 ; BUP: 1.988 ± 0.116). The congenital malformations observed were: kyphosis (Control: 0.00%; BUP: 5.26%) and retroversive lower limbs (Control: 14.43%; BUP: 53.68%). Incomplete ossification of supra/exocipital (Control: 21.82%; BUP: 86.00%) and bones of the sternum (Control: 25.45%; BUP: 82.00%). BUP had toxic effects on testicular function and teratogenic potential.

Keywords: Bup, paternal toxicity, reproductive performance, teratogenesis.

Introduction

Bupropion Hydrochloride (BUP) is an atypical non-tricyclic antidepressant, belonging to the class of aminoketones (Paul, 2008). It is considered the first line medication for smoking cessation (Beard et al., 2016). However, it has been used effectively in other therapeutic regimens, such as in combination with naltrexone in the treatment of obesity (Bhat and Sharma, 2017) and in the treatment of attention deficit and hyperactivity in adults (Cortese et al. 2017). In addition, recent studies have shown that BUP could be used in the treatment of Internet Gaming Disorder (Song et al., 2016).

Drugs of the same pharmacological class as BUP are commonly prescribed for patients with mental health problems, and despite their efficacy, these drugs present side effects such as erectile dysfunction (Gartlerhner et al., 2011; Zainol et al., 2017) and potentiate changes in sexual intercourse (Abdel-Hamid et al. 20016). Cases of premature ejaculation were associated with the use of BUP in young adults (Kravos, 2010), but this drug has been shown to be relatively effective in the treatment of late-onset long-term ejaculation (Abdel-Hamid and Saleh, 2011). Studies in experimental models have shown that dopamine causes testicular dysfunction, acrosomal and sperm motility (Janphet et al. 2017; Urra et al. 2014).

The therapeutic use of BUP has been increasing over the years, and as well as, in addition, overuse without medical indication has increased among adolescents and young adults (Poulton et al., 2016; Stassinis and Klein-Schwartz, 2016) mainly due to the use of BUP as a stimulant of the central nervous system. Several congenital malformations have been reported in humans, associated with the use of BUP in the first semester of gestation. (Gentile, 2005; Gisslen et al., 2011; Richardson et al., 2017). The

main malformations observed are related to changes in the cardiovascular system in neonates (Alwan et al., 2010, Louik et al., 2014, Thyagarajan et al., 2012).

In view of the above, and due to the scarcity in the literature consulted, this study is justified by the need to elucidate the effects of BUP under the male reproductive function and to evaluate the effects of the paternal exposure to this drug on its offspring. Thus, this study aimed to evaluate the effects of BUP under the reproductive parameters of adult mice exposed during the period of spermatogenesis and evaluate the possible teratogenic effects in the offspring of these animals.

Materials and methods

All the procedures of this experiment were approved by the Ethics Committee on the Use of Experimental Animals of the State University of Londrina, under approval number 1202016.

Animals

Swiss (*Mus musculus*) adult mice, males and females, adults, weighing approximately 35g from the colony of the State University of Londrina. A total of 26 males and 52 females were kept in polypropylene cages with zinc wire cover containing wood shavings. During the execution of this work, the animals were kept under a controlled light regime, a cycle of 12 hours light/dark, at 22 ± 2 °C, with free access to water and food.

Treatment

Male mice were distributed in BUP group and control group, with 13 animals in each group. The exposed group received daily BUP (crystalline powder) at the dose of 40mg/kg (Dhir and Kulkarni, 2007) diluted in 0.9% saline solution for a period of 45 days via gavage. The volume of BUP solution administered was adjusted every 3 days depending on the weight of the animals. The control group received only 0.9% saline solution under the same experimental design. The dose of bupropion used in this study was effective in enhancing dopaminergic neurotransmission and showed antidepressant effects in mice (Dhir and Kulkarni, 2007).

The administration period was based on the duration of spermatogenesis in mice, which is 35 days (Adler, 2000). Thus, after 35 days exposed to BUP, males were placed to mate with females (2 females for each male) that have not been exposed to BUP or any other drug. Exposure to the drug occurred for another 10 days, corresponding to two estrus cycles in the female. On the 46th day males were submitted to euthanasia by decapitation, blood collected for testosterone dosage and organs such as: heart, lung, liver, kidneys, testis and epididymis were removed, analyzed externally and weighed.

During the mating period, the vaginal canal of the females was examined (every 12 hours) to determinate the presence of vaginal plug, which was considered gestational day zero. With the confirmation of pregnancy the females were identified and weighed.

Parental Toxicity

For the analysis of paternal toxicity, the body mass was monitored during the exposure period as well as observation of clinical signs of toxicity such as: occurrence of deaths, piloerection, diarrhea, changes in eye color and in motor coordination.

Sperm morphology in the epididymis

Spermatozoa were classified as: normal morphology, with head alterations (round, amorphous, vacuolated or with protuberance) and tail changes (coiled, cut or double tail) as described by Wyrobek et al. (1983). For this, smears were made using spermatozoa collected from the tail of the epididymis, which were transferred to histological slides, fixed in alcohol-ether and acetone. Subsequently 400 cells per animal were evaluated under a light microscope at 400x magnification.

Sperm production by testis

The left testis was weighed and homogenized as described by Robb et al. (1978), with the adaptations described by Fernandes et al. (2007). After dilution of the homogenate, a sample was transferred to the Neubauer chamber (4 fields per animal) for counting spermatids resistant to homogenization using an optical microscope at 400x magnification.. To calculate the daily sperm production, the concentration of spermatids per testis was divided by 4,84 which is the number of days in which the mature spermatids are present in the seminiferous epithelium.

Spermatogenesis and testicular morphology

For the analysis of spermatogenesis the protocol described by Johnsen (1970) was used. After weighing, the right testis of each animal was fixed in Metacan (Puchtler et al., 1970), submitted to histological treatment, sectioned in semi-serial sections with 5µm and stained with hematoxylin and eosin. Twenty seminiferous tubules were analyzed histological and this evaluation was classified into a score scale, in which 1 and 10 were the minimum and maximum scores, respectively and the count of Sertoli cells was also performed. The tubule classifications ranged from the tubules that did not have seminiferous epithelium, and received a score of 1 to those with all spermatogenic cells present in the epithelium and Sertoli cell, and who received a score of 10. For evaluation of the interstitial tissue, the Leydig cells were counted and evaluated by the number of cells per unit area (mm²), in 20 images per animal. The analysis were performed on the photomicroscopic (Opton) and BELView Software version 6.2.3.0 (BEL Engineering) for Windows.

Testosterone dosage

Serum testosterone levels were measured by chemiluminescence (2nd Generation Testosterone, Architect System, Abbott, Wiesbaden, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Effects of parental exposure to BUP on offspring

On the 18th day of pregnancy, females mated with males exposed to BUP were submitted to euthanasia, and laparotomy and hysterectomy were performed. For

evaluation of intrauterine development, the uterus was removed and evaluated for the presence of resorptions, number of live and dead fetuses, fetal and placental weight and fetal length were measured. With this data reabsorption rate, post-implantation loss rate, fetal viability rate and weight adequacy at the age of pregnancy according to the Calderon (1992) methodology were calculated. The fetuses were systematic analyzed to detect possible external structural malformations using a stereoscopic microscope.

For the evaluation of congenital malformations, half of the fetuses were fixed in bodian mixture for visceral analysis, while the other half was fixed in acetone PA for the skeletal analysis (Staples and Schnell, 1964). The visceral analysis was performed by cuts/microdissection, as proposed by Barrow and Taylor (1969) for the study of the chest and abdomen and by the strategic cuts for head study, according to Wilson (1965). Fetuses submitted to skeletal analysis were evaluated for abnormalities of the skull, sternum, vertebrae, ribs, pelvis, clavicle, phalanges, metacarpal and metatarsal according to the method described by Taylor (1986). All analyzes were performed using a stereoscopic microscope.

Statistical analysis

For variables that presented normal distribution and homogeneity of variance a Student's T test or Fisher's exact test were applied. Data that did not reach normality and/or homogeneity of variance were analyzed through the nonparametric test of Mann-Whitney. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

Results

Paternal toxicity

Data from parental toxicity are present in Table 1. The exposure to BUP did not induce toxicity on vital and reproductive organs, nor did it significantly interfere in the weight loss of the exposed mice. No clinical signs of toxicity were observed during the treatment period.

Histological evaluation of the testis

The exposure to BUP led to a decrease in the Johnsen score (Control: $9,354 \pm 0,092$, BUP: $7,615 \pm 0,147$), Sertoli (Control: $5,623 \pm 0,184$, BUP: $4,215 \pm 0,097$) and Leydig cells (Control: $11,430 \pm 0,817$; BUP: 7.531 ± 0.213) count. Data from evaluation of spermatogenesis, Sertoli and Leydig cells count are shown in table 2.

Testosterone dosage

Table 2 shows the values of the testosterone dosage. There was a significant decrease (Control: $783.5\text{ng/dL} \pm 154.2$; BUP: $201.4\text{ng/dL} \pm 54.8$) in serum hormone levels on the BUP group compared to the control group.

Sperm production and sperm morphology

Data from sperm count and morphological evaluation are shown in table 3. There was a

decrease in the number of spermatozoa present in the testis of animals exposed to BUP and in daily sperm production (Control: $2,852 \pm 0,211$; BUP: 1.988 ± 0.116). The morphological evaluation showed significant alterations in the spermatozoa collected from the tail of the epididymis of the animals exposed to the drug, and the main alterations was head with vacuolization (Control: 9.75%, BUP: 15.03%) and winding tail (Control: 4.96%, BUP: 8.13%).

Effects of parental exposure to BUP on offspring

Parental exposure to BUP did not affect significantly the intrauterine development of the offspring of these animals (Table 4) and also did not alter the fetal weight adjusted to the age of pregnancy (Figure 1). Congenital malformations are present in Table 5. There was significant external alterations in the offspring from the BUP group: kyphosis (Control: 0.00%, BUP: 5.26%) and retroversed lower limbs (Control: 14.43%, BUP: 53.68%). The offspring from BUP group also shows a significant skeletal alterations in the bones of the skull: incomplete ossification of supra/exocipital (Control: 21.82%, BUP: 86.00%) and bones of the sternum: abnormal sternum (Control: 25.45%, BUP: 82.00%). The visceral analysis did not shown significant alterations between the experimental groups.

Discussion

BUP is a non-tricyclic antidepressant used in the treatment of various pathologies. Studies have shown the relationship between antidepressants and male reproductive system dysfunction (Serretti and Chiesa, 2009; Amiaz et al., 2011).

However, no information was found in the literature consulted on the influence of this drug on the reproductive parameters of mice exposed during spermatogenesis and the consequences of this exposure in the offspring.

The decrease of body weight in animals exposed to BUP was not relevant. In monotherapy both humans (Anderson et al., 2002; Gadde and Xiong, 2007) and rodents (Biles and Cowley, 2007), a marked loss of body weight is reported. Cavariane et al. (2015), reported in their study a similarity in the weight of vital organs between the experimental groups. These data, added to the absence of clinical signs of toxicity, suggest an absence of systemic toxicity in the animals (Al-habori et al., 2002; Birmayer et al 2004).

Although the weight of the reproductive organs were similar between the experimental groups, the Sertoli and Leydig cells count, Johnsen score and the serum testosterone dosage in the BUP group were altered.

The decrease in serum testosterone dosage and Leydig cells count were previously reported by Kankash et al. (2014). Increased testicular dopamine availability impairs the process of androgen synthesis by Leydig cells, which compromises the production of testosterone (Dirami and Cooke, 1998). The reduction in the production of this hormone causes apoptosis of Sertoli cells (Kankash et al., 2014) and Leydig cells (O'hara et al., 2015). These findings corroborate with the decrease in the number of Sertoli and Leydig cells observed in this study.

Johnsen score confirms that the spermatogenesis process was altered by exposure to BUP and this was reflected in the low daily sperm production by the testis. Changes in seminiferous tubules may have been a consequence of reduced testosterone production and the number of Sertoli cells. It is known that testosterone plays an important role in the process of spermatogenesis from the stimulation of Sertoli cells

(Walker and Cheng, 2005). The proper number of Sertoli cells is required for the production of factors that are essential for the development of germ cells (De Kretser et al., 1998; Griswold 1998; Sharpe 1994). These results showed that the amount of sperm and the endocrine testicular portion was affected by exposure to BUP and suggested a degenerative testicular process, although the testicular and epididymis weight of the exposed animals were not reduced.

The spermiogenesis process, the final stage of spermatogenesis, was also altered, promoting modifications in the morphology of spermatozoa. Roshdy and Fyiad (2010) reported an increase in the incidence of chromosome aberrations (structural and numerical) in spermatocytes of mice exposed to Wellbutrin (commercial presentation of BUP). Thus, the drug-induced genotoxicity caused alterations in sperm head morphology. Tail alterations suggest that sperm motility may be impaired. This was evidenced by Cavariene et al. (2015), in which adult mice exposed to BUP had decreased sperm motility. However, data obtained from this study showed that the alterations in the spermatozoa tail morphology did not affect the fertilization capacity of the animals, considering that the females, placed to mate with males exposed to BUP, became pregnant.

The intrauterine development of the offspring from both experimental groups was not different from each other, this is in agreement with the study of Cavariani et al. (2014). This demonstrates that, paternal exposure to BUP did not alter the implantation capacity of the blastocyst and did not provide the occurrence of post implantation losses during the embryofetal development phases. The fetal weight adjusted to the age of pregnancy was also not impaired. Although intrauterine development was not altered, a high frequency of malformations was observed in the offspring. Morphological changes of the sperm heads are associated with chromosomal aneuploidies, with indicates that

the necessary information for development of the offspring could be compromised. Some aneuploid embryos implant and evolve with chromosomal abnormalities and others are aborted. (Assche et al., 1996).

Considering that the females were not exposed to any teratogenic agent, the occurrence of congenital malformations was attributed to paternal exposure to the drug. Brambilla et al. (2009) reported that BUP had genotoxic effects in doses similar to those used in this study. It has been described, both experimentally (Dobrzynka et al., 2011, Wyrobek, 1979) and in humans (Evgeni et al., 2014) that modifications in spermatozoa head cause congenital abnormalities in the descendants of this individuals due the alterations in paternal DNA (Aitken and Koppers, 2011, Karydis et al., 2005, Lewis et al., 2008). However, external and skeletal malformations were observed in the offspring.

In conclusion, this study provides evidence that BUP impairs testicular function of adult mice and induces teratogenicity in offspring. These results reinforce the concerns about the impact on fertility of men on reproductive age who are in continuous treatment with BUP. The decrease in Sertoli and Leydig cells count and the decrease in testosterone production resulted in modifications in sperm structure, which in turn were associated with the congenital malformations observed in the offspring. It is recommended, therefore, a careful clinical evaluation before BUP prescription.

References

Assche, V. E., Bonduelle, M., Tournaye, H., et al., 1996. Cytogenetics so infertile men. *Hum. Reprod.* 11, 1-24.

Amiaz, R., Pope, H. G., Mahne, T., et al., 2011. Testosterone gel replacement improves sexual function in depressed men taking serotonergic antidepressants: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Sex Marital Ther.* 37, 243–54.

Serretti, A., Chiesa, A., 2009. Treatment-emergent sexual dysfunction related to antidepressants: a meta-analysis. *J Clin Psychopharmacol.* 29, 259–66.

Abdel-Hamid, I. A., Elsaied, M. A., Mostafa, T., 2016. The drug treatment of delayed ejaculation. *Translational andrology and urology.* 5, 576-91.

Abdel-Hamid, I. A., Saleh, el-S., 2011. Primary lifelong delayed ejaculation: characteristics and response to bupropion. *The journal of sexual medicine.* 8, 1772-9.

Adler, I.D., 2000. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: extrapolation of genetic risk from mouse to man. *Andrologia.* 32, 233-237.

Aitken, R. J., Koppers, A. J., 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl.* 13, 36-42.

Al-Habori, M., Al-Aghabari, A., Al-Mamay, M., et al., 2002. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol.* 83, 209-217.

Alwan, S., Reefhuis, J., Botto, L. D., et al. 2010. National Birth Defects Prevention Study. Maternal use of bupropion and risk for congenital heart defects. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* v. 203, 52.

Anderson, J. W., Greenway, F. L., Fujioka, K., et al., 2002. Bupropion Sr enhances weight loss: a 48-week double-blind, placebo-controlled trial. *Obes Res.* 10, 633-41.

Barrow, M. V., Taylor, W. J., 1969. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *Journal of Morphology.* 127, 291-306.

Beard, E., Shahab, L., Cummings, D. M., et al., 2016. New Pharmacological Agents to Aid Smoking Cessation and Tobacco Harm Reduction: What Has Been Investigated, and What Is in the Pipeline? *CNS Drugs.* 30, 951-83.

Bhat, S. P., Sharma, A., 2017. Current Drug Targets in Obesity Pharmacotherapy - A Review. *Current drug targets. Inflammation and allergy.* doi: 10.2174/1389450118666170227153940.

Billes, S. K., Cowley, M. A., 2007. Inhibition of dopamine and norepinephrine reuptake produces additive effects on energy balance in lean and obese mice. *Neuropsychopharmacology.* 32, 882-34.

- Birmayer, G., Nadlinger, K, F., Hallstrom, S., 2004. On the safety of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology.* 23, 179-94.
- Brambilla, G., Mottioli, F., Marteli, A., 2009. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotic and antidepressants. *Toxicology.* 261, 77-88.
- Calderon, I. M. P., Rudge, M. V. C; Brasil, M. A. M, et al., 1992. Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabete e gravidez. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 4, 136-144.
- Campion, S., Catlin, N., Heger, N., et al. 2012. Male reprotoxicity and endocrine disruption. *EXS.* 101, 315-360. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_11.
- Cavariani, M. M., De Almeida Kiguti, L. R., De Lima Rosa, J., et al., 2015. Bupropion treatment increases epididymal contractility and impairs sperm quality with no effects on the epididymal sperm transit time of male rats. *J Appl Toxicol.* 35, 1007-16.
- Cortese, S., Adamo, N., Mohr-Jensen, C., et al., 2017. European ADHD Guidelines Group (EAGG). Comparative efficacy and tolerability of pharmacological interventions for attention-deficit/hyperactivity disorder in children, adolescents and adults: protocol for a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open.* 7:e013967.
- Damsa, C., Bump, A., Bianchii, F., 2008. Dopamine-dependent" side effects of selective serotonin reuptake inhibitors: a clinical review. *J Clin Psychiatry.* 65, 1064–8.
- De Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., et al., 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod. Suppl* 1, 1-8.
- Dhir, A., Kulkarni, S. K. 2007. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol.* 568, 177-85.
- Dobrzynka, M. M., Tyrkeil, E. J., Pachocki, K. A., 2011. Developmental toxicity in mice following paternal exposure to Di-N-butyl-phthalate (DBP). *Biomed Environ Sci.* 24, 569-78.
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., Asimakopoulos, B., 2014. Human Sperm DNA Fragmentation and its Correlation with Conventional Semen Parameters. *J Reprod Infertil.* 15, 2-14.
- Fernandes, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D., et al. 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology.* 23(1), 106-112.
- Floden, L., Taren, D. L., Muramoto, M. L., et al., 2016. BMI changes in adolescents treated with bupropion SR for smoking cessation. *Obesity (Silver Spring).* 24, 26-9.
- Gadde, K. M., Xiong, G. L., 2007. Bupropion for weight reduction. *Expert Rev. Neurother.* 7, 17-24.
- Gartlehner, G. H., Hansen, R. A., Reichenpfader, U. K., et al., 2011. Drug Class Review: Second-Generation Antidepressants: Final Update 5 Report. Drug Class Reviews. Portland, Oregon Health and Science University.

- Gentile, S., 2005. The safety of newer antidepressants in pregnancy and breastfeeding. *Drug safety*. 28, 137-52.
- Gisslen, T., Nathan. B., Thompson, T., et al., 2011. Hyperinsulinism associated with gestational exposure to bupropion in a newborn infant. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*. 24, 819-22.
- Griswold, M. D., 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 9, 411–16.
- Roshdy, H. M., Fyiad, A. A., 2010. Cytogenetic and Biochemical effects of Antidepression drug (wellbutrin) on Male Mice. *New York Science Journal*. 3, 121-6.
- Janphet, S., Nudmamud-Thanoi, S., Thanoi, S., 2017. Alteration of catecholamine concentrations in rat testis after methamphetamine exposure. *Andrologia*. 49. doi: 10.1111/and.12616.
- Johnsen, S.G., 1970. Testicular biopsy score contra method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal mals. *Hormones*. 303, 2-25.
- Karydis, S., Asimakopoulos, B., Papadopoulos, N., et al., 2005. ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation. *In Vivo*. 19, 921-5.
- Kravos, M., 2010. Bupropion-associated premature ejaculation. *Pharmacopsychiatry*. 43, 156-7.
- Kankash, A., Shariati, M., Khatamsaz, S., 2014. Effects of Bupropion on Physiology of Reproduction in Adult Male Rats. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*. 4, 106-110.
- Lewis, S. E., Agbaje, I., Alvarez, J., 2008. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 54, 111-25.
- Louik, C., Kerr, S., Mitchell, A. A., 2014. First-trimester exposure to bupropion and risk of cardiac malformations. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 23, 1066-75.
- Meyer, J. H., Goulding, V. S., Wolson, A. A., et al., 2013. Bupropion occupancy of the dopamine transporter is low during clinical treatment. *Psychopharmacology*. 163, 102–5.
- Nelson, JC., Spyker, DA. 2017. Morbidity and Mortality Associated With Medications Used in the Treatment of Depression: An Analysis of Cases Reported to U.S. Poison Control Centers, 2000-2014. *Am. J. Psychiatry*. 174, 438-450. doi: 10.1176/appi.ajp.2016.16050523
- O'hara, L., Mcinnes, K., Simitsidellis, I., et al., 2015. Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men. *FASEB J*. 29, 894-910.
- Paul, M., 2008. Bupropion. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Edited by Enna SJ, David BB. New York.

- Poulton, A. S., Hibbert, E. J., Champion, B. L., et al., 2016. Stimulants for the Control of Hedonic Appetite. *Frontiers in pharmacology*. 7, 105.
- Puchtler H., Waldrop F. S., Meloan S. N., et al., 1970. Methacarn (Methanol-Carnoy) Fixation: Practical and Theoretical Considerations. *Histochem Cell Biol*. 21, 97-116.
- Richardon, J. L., Stephens, S., Yates, L. M., et al., 2017. Pregnancy outcomes after maternal varenicline use; analysis of surveillance data collected by the European Network of Teratology Information Services. *Reprod toxicol*. 67, 26-34.
- Roshdy H. M., Fyiad, A. A., 2010. Cytogenetic and biochemical effects of anti depression drug (wellbutrin) on male mice. *New york Sci*. 3, 121-6.
- Roob, G. W., Amann, R. P., Killian, G. J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves o pubertal and adult rats. *J of Reprod & Fertil*. 54, 103-107.
- Sharpe, R M., 1994. Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction*, Eds E Knobil & JD Neil. New York: Raven Press, pp 1363-1434.
- Song, J., Park, J. H., Han, D. H., et al., 2016. Comparative study of the effects of bupropion and escitalopram on Internet gaming disorder. *Psychiatry clin neurosci*. 70, 527-535.
- Staples, R. E., Schnell, V. L., 1964. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technology*. 39, 61-63.
- Stassinis, G. L., Klein-Schwartz, W., 2016. Bupropion "Abuse" Reported to US Poison Centers. *J add med*. 10, 357-62.
- Taylor, P. 1986. Skeletal examination. *Practical Teratology*. 77-100.
- Thyagarajan, V., Robin Clifford, C., Wurst, K. E., et al., 2012. Bupropion therapy in pregnancy and the occurrence of cardiovascular malformations in infants. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. v. 21, 1240.
- Urta, J. A., Villaroel-Espónola, F., Covarrubias, A. A., et al., 2014. Presence and function of dopamine transporter (DAT) in stallion sperm: dopamine modulates sperm motility and acrosomal integrity. *PLoS One*. 9(11):e112834. doi.org/10.1371/journal.pone.0112834
- Wilson, J. G., 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: *Teratology: Principles and Techniques*. Chicago: University of Chicago Press. 262-277.
- Wilson, M. D., A study of male reproductive form and function in a rat model. 2014. *Asian Pac J Reprod*. 3, 258-262.
- Wyrobek, A. J., Gordon, L. A., Burkhart, J. G., et al., 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in non-human mammals: a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*. 115, 1-72. .

Zainol, M. Kumar, J., Das, S., et al., 2017. Co-Morbid Erectile Dysfunction (Ed) and Antidepressant Treatment in a Patient - A Management Challenge? Current drug targets. doi: 10.2174/1389450118666170315110902.

Zirkin, B. R., Chen, H., 2000. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of reproduction*. 63, 977-981.

Table 1. Parameters related to male mice toxicity.

	Control (n=10)	BUP (n=10)
Vital organs (g)		
Weight gain	0.3469 ± 0.5696	-0.2946 ± 0.6653
Heart	0.233 ± 0.0097	0.206 ± 0.0171
Lungs	0.292 ± 0.0161	0.286 ± 0.0173
Liver	1.927 ± 0.0626	1.986 ± 0.0778
Kidneys	0.562 ± 0.0194	0.539 ± 0.0207
Reproductive Organs (g)		
Epididymis	0.213 ± 0.0783	0.145 ± 0.0299
Seminal Vesicle full	0.281 ± 0.0226	0.276 ± 0.0146
Seminal Vesicle empty	0.161 ± 0.0158	0.166 ± 0.0084
Testis	0.297 ± 0.0643	0.222 ± 0.0064

Data represented by Mean ± SEM and were analyzed by Student's T-test. Control: group that received saline solution 0.9% and group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg kg during spermatogenesis.

Table 2. Evaluation of spermatogenesis and serum testosterone concentration in adult mice exposed to BUP (40mg/kg).

	Control	BUP
Johnsen score	9.354 ± 0.092	7.615 ± 0.147**
Sertoli cell count	5.623 ± 0.184	4.215 ± 0.097**
Leydig cell count	11.430 ± 0.817	7.531 ± 0.213***
Testosterone (ng/dL)	783.500 ± 154.200	201.400 ± 54.880**

Data represented by Mean ± SEM and were analyzed by Student's T-test. **p<0.01 and ***p<0.001 compared to control group. Control: group that received saline solution 0.9% and group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis.

Table 3. Sperm count and morphology of adult mice exposed to BUP 40mg/kg.

	Control	BUP
Spermatozoa in testis (10^6) ¹	13.800 ± 1.022	9.623 ± 0.565**
Spermatozoa/g testicle (10^6 /g) ¹	181.200 ± 29.140	115.500 ± 7.131*
DSP (days) ¹	2.852 ± 0.2111	1.988 ± 0,116**
Spermatozoa with head alterations (%) ²	8.134	10.423***
Spermatozoa with tail alterations (%) ²	4.961	16.211***

¹Data represented by Mean ± SEM and were analyzed by Student's T-test. *p<0.05, **p<0.001 compared to control group (n=4). DSP: Daily sperm production. ² Data represented by percentage and were analyzed by Student's T-test. ***p<0.0001 compared to control group (n=10). Control: group that received saline solution 0.9% and group group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis.

Table 4. Parameters related to the intrauterine progeny development.

	Control	BUP
Fertility parameters		
Weight of pregnant uterus (g) ¹	18.31 ± 1.46	17.39 ± 1.72
Live fetuses ¹	10.90 ± 0.60	9.20 ± 1.09
Dead fetuses ¹	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Number of reabsorptions ¹	2.90 ± 0.67	2.90 ± 0.95
Implantation sites ¹	14.00 ± 0.51	13.10 ± 0.76
PILR (%) ²	30.30 [4.16 – 40.21]	20.71 [7.69 – 41.49]
FVR (%) ²	69.70 [59.79 – 95.83]	82.31 [66.07 – 92.56]
RR (%) ²	30.30 [4.16 – 40.21]	10.51 [7.43 – 33.93]
Number of pregnant females analyzed	10	10
Fetal Development		
Fetal weight (g) ¹	1.33 ± 0.063	1.321 ± 0.071
Fetal length (cm) ¹	2.44 ± 0.044	2.360 ± 0.0748
Placental weight (g) ¹	0.07 ± 0.004	0.07055 ± 0.004
Number of fetuses analyzed	97	95

¹Data represented by Mean ± SEM and were analyzed by Student's T-test. ²Data are presented as median (minimum – maximum) and were analyzed by Mann-Whitney Test. Control: group that received saline solution 0.9% and group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis. PILR: Post-implantation loss rate; FVR: Fetal viability rate; RR: Reabsorption rate.

Table 5. Frequency of fetuses which showed congenital malformations.

	Control	BUP
External alterations	%	%
Kyphosis	0.00	5.26*
Retroverses lower limbs	14.43	53.68***
Total fetuses analyzed	97	95
Skeletal alterations	%	%
Incomplete Ossification Supra and Exocipital	21.82	86.00***
Abnormal Sternebio	25.45	82.00***
Absence of proximal phalanges	8.00	10.90
Absence of distal phalanges	8.00	9.09
Total fetuses analyzed	55	50
Visceral alterations	%	%
Unilateral Anophthalmia	7.14	8.89
Salivary gland attached	2.38	12.56
Difference in height and deployment of the renal pelvis	0.00	11.11
Hydroureter	0.00	4.44
Total fetuses analyzed	42	45

Data represented by percentage and were analyzed by Fisher's Exact Test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ compared to control group. Control: group that received saline solution 0.9% and group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis.

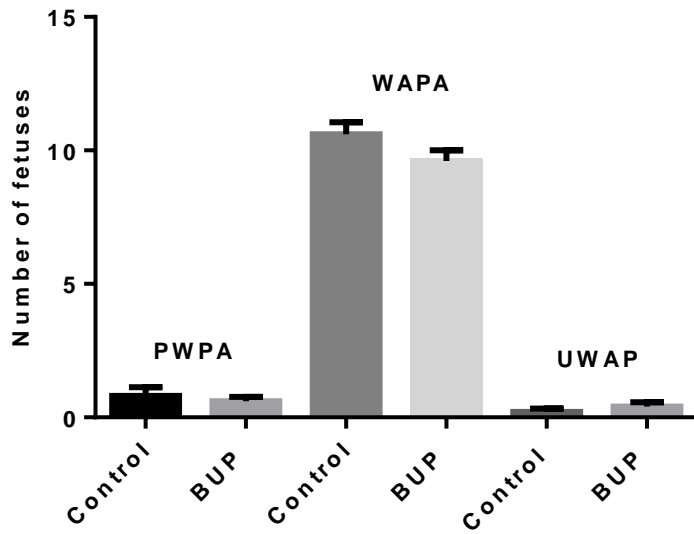


Figure 1. Adequacy of fetal weight to the age of pregnancy of offspring of adult mice exposed to BUP 40mg/kg.

Data represented by Mean \pm SEM and were analyzed by Student's T-test. Control: group that received saline solution 0.9% and group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis. LWPA: Lower weight for pregnancy age. WAPA: Weight appropriate for pregnancy age. UWPA: Upper weight for pregnancy age.

5. ARTIGO II

Paternal exposure to Bupropion causes changes in postnatal and behavioral development of offspring

Artigo será submetido à revista — “Neurotoxicology and Teratology”

ISSN: 0892-0362; F.I. 2017: 2.410/ Qualis CAPES 2013-2016 (Medicina II): B1

Paternal exposure to Bupropion causes changes in postnatal and behavioral development of offspring

Eliane Swely Amador Monteiro Sanches^{1,2}, Felipe Tsuzui¹, Fábio Joinhas¹, Guilherme Bracarense⁴, Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes¹, Estefânia Gastaldello Moreira^{3*}, Maria José Sparça Salles^{1*}

¹Department of Biology, State University of Londrina (UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

²Department of General Pathology, Universidade Estadual de Londrina (UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

³ Department of Physiological Sciences, Universidade Estadual de Londrina (UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

⁴ Department of Psychology and Psychoanalysis, Universidade Estadual de Londrina (UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

*Corresponding author: egmoreira22@hotmail.com

Depto de Ciências Fisiológicas, CCB

UEL - Campus Universitário

86051-980 - Londrina-PR-Brazil

Phone: +55 43 3371 4307

Fax: +55 43 3371 4254

Abstrat

Bupropion Hydrochloride (BUP) is an inhibitor of dopamine and noradrenaline recapture and there are no reports of the effects of paternal exposure on offspring. The aim of this study was to evaluate the effects of the paternal exposure to the BUP on the postnatal and behavioral development of its offspring. Male mice were divided into: treated group (n = 20) BUP 40mg / kg for 45 days and control group (n = 20) saline under the same experimental design. On the 35th day of treatment, they were placed to mate with females that were not submitted to any treatment. For evaluation of postnatal development the offspring of both sexes were evaluated from postnatal day (PND) 1 to PND 60 and for behavioral evaluation in PND25 and PND 60. Measures of physical development (weight and length measurement, anogenital distance, (palmar grasp reflex, surface righting reflex, negative geotaxis and adult gait) and behavioral parameters (locomotor activity and anxiety) were altered in the offspring of the animals exposed to BUP. Together, these results demonstrate that paternal exposure to BUP induced alterations in postnatal development, which were imperceptible at birth but were present throughout the developmental stages of the offspring and persist till adulthood.

Keywords: Bup, neurotoxicity, paternal exposure, reflex ontology

1. Introduction

Bupropion hydrochloride (BUP) is a drug whose mechanism of action consist in the inhibition of α -aminophenone in plasma membrane transporters for dopamine and noradrenaline (Shalabi et al., 2017), thus increasing the time of action of these neurotransmitters in the synaptic cleft. It is widely prescribed as an antidepressant and in smoking cessation therapies (Pandhare et al., 2017). BUP is also indicated for other therapies such as: in the treatment of obesity (Halseth et al., 2017), in the treatment of attention deficit and hyperactivity in adults (Buoli et al., 2016), in the prevention of sexual dysfunction induced by selective inhibitors of recapture of serotonin (Zahiroddin et al., 2015) and in the treatment of bipolar mood disorder (Li et al., 2016).

The non-medical use of psychoactive substances has increased over the years and is a public health problem (Evans and Sullivan, 2014). The main reason for the popularization of this drug among the young and adult population is due to its central nervous system stimulating properties (Poulton et al., 2016). Several studies point to BUP as a drug of abuse as a function of increasing demand and use (Oppek et al., 2014, Rostas and Wolf, 2015, Stall & Godwin, 2014).

The effects of BUP on reproductive function have not yet been fully elucidated. Regarding the male population, studies have suggested that this drug may cause changes in libido and premature ejaculation (Clayton et al., 2010; Kravos, 2010). On the other hand, maternal exposure in experimental models has demonstrated correlation of BUP exposure associated with changes in postnatal and behavioral development of offspring (De Long, et al., 2013, Su, et al. 2007). The adverse effects found in the offspring raised

concerns about BUP safety during pregnancy (Hsiao et al., 2005; Gopalakrishnan et al., 2016).

Paternal exposure to substances potentially harmful to sperm quality has become the subject of many studies because of the large impact on male reproductive function (Stevenson and Mceleny, 2017). Increased BUP-induced dopamine availability reduces the number of receptors for luteinizing hormone (LH) and 125 I-chorionic gonadotrophin (hCG) in Leydig cells, with a consequent decrease in testosterone production (Dirami and Cooke, 1998). Considering these evidences and the paucity of studies related to offspring, it is relevant to investigate the possible effects of paternal exposure to BUP on the development of offspring during postnatal life, including possible behavioral effects.

2. Materials and methods

2.1 Approval of the ethics committee

All the procedures of this study were approved by the Committee of Ethics in Use of Experimental Animals of the State University of Londrina, under approval number 1202016.

2.2 Animals

Swiss mice (*Mus musculus*), adult males and females, weighing approximately 35g, from the colony of the State University of Londrina, were kept in cages of polypropylene with zinced wire cover, containing wood shavings, in a controlled light

regime: 12-hour light/dark cycle at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, the animals had free access to water and food. The offspring resulting from mating between 40 females and 40 males were used in postnatal ($n = 80$) and behavioral ($n = 80$) evaluations.

2.3 Treatment

Male mice were distributed in treated group, which received daily BUP (crystalline powder) at a dose of 40mg/kg (Dhir and Kulkarni, 2007) diluted in 0.9% saline solution for 45 days via gavage and group control that received only 0.9% saline solution under the same design. The dose of bupropion chosen in this study was effective in enhancing dopaminergic neurotransmission and showed antidepressant effects in mice (Dhir and Kulkarni, 2007). After 35 days of treatment, which corresponds to a period of spermatogenesis (Adler, 2000), mating began and lasted up to 45 days of treatment. The males were placed to mate with females that had not undergone any treatment in the proportion of one female for each male, overnight and gestational day zero was determined by the presence of a vaginal plug, at which time the females were identified and weighed. On the 46th day the males were submitted to euthanize by decapitation.

2.4 Post-Natal Development Evaluation

Twenty males were mated with 20 females and the day of birth was considered postnatal day (PND) 0. The litters were reduced to four pups, two males and two females, on the PND1. A mean value of the weight of these pups of each gender was calculated and used for statistical analysis.

2.5 Physical and reflex development of pups

For the evaluation of the physical and reflex development of offspring, (Alder and Zbiden, 1977; Norton, 1989) the pups were observed daily, body weight and length were measured on days PND1, 2, 7, 14, 21 and 60 and the anogenital distance (AGD) were measured in PND1, 21 and 60.

To evaluate the physical development it was observed the occurrence of: pinna detachment (beginning on PND 2), hair growth (beginning on PND 4), incisor eruption (beginning on PND7), ear opening (beginning on PND 10), eye opening (beginning on PND 12). To assess sexual development testes descent (beginning PND16) and opening of the vaginal canal (beginning PND25) was evaluated.

For analysis of the reflex development, the parameters evaluated were: surface righting reflex (beginning on PND 1, the pup rights itself following been placed on its back with a cutoff time of 30s), palmar grasp reflex (beginning on PND 2, the pup grasps a paper clip with the forepaws), negative geotaxis (beginning on PND 4, the pup turns at least 180° after been placed faced down on a platform inclined 45o with a cutoff time of 30s), adult gait (beginning on PND 9, the pup walks without propping its ventral portion on the floor).

2.6 Assessment of hormone levels

In the DPN60 the blood collected by decapitation on one male and one female of each litter was used for the hormone doses of serum testosterone and serum estradiol levels respectively. Hormone levels were assessed by chemiluminescent microparticle immunoassay (2nd Generation Testosterone, Architect System, Abbott, Wiesbaden, Germany and Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

2.7 Behavioral evaluation in the open field test (motor activity and anxiety)

For behavior analysis, 20 males treated with BUP and 20 females were mated and pregnant females gave birth naturally. In PND4, the litter was reduced to 6 pups, 3 males and 3 females. The open field test was performed in the pups at two different ages: PND25 and PND60. For each age one male and one female from each litter were used. Twenty-four hours before the behavioral analysis the animals were placed in the behavioral analysis laboratory for habituation. The apparatus consisted of a circular surface of wood (39 cm diameter) surrounded by a wall. The surface was painted white and divided into similar parts. To perform the open field, the animals were placed in the center of a circular arena of wood and, for 10 minutes, ambulation (count of floor units entered with the four paws), rearing (count of times that the animal stood on its hind legs), grooming (time, in seconds, used for the animal to groom) were quantified. Behavioral sessions were recorded by a video camera, linked to a computer in an

adjacent room. Videos were analyzed blind to treatment. The open field test allows to evaluate the motor activity and anxiety of the animals (Weiss and Greenberg, 1998).

2.8 A Statistical Analysis

For variables that presented normal distribution and homogeneity of variance a two-way ANOVA or Student's t-test were applied. The factors were named treatment (control or BUP) and sex. Data that did not reach normality and/or homogeneity of variance were analyzed through the nonparametric test of Mann-Whitney. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Physical and reflex development of pups

Weight development and body measurements of offspring from adult male mice exposed to BUP are shown in Figures 1 and 2. Paternal BUP exposure leads to a significant decrease in weight and length of female and male offspring from DPN1 to DPN60. Figure 3 shows that AGD was significantly decreased in PND1 in females and in PND60 in males. AGD was normalized from the cubic root of body weight proposed by Gallavan et al. (1999).

Regarding the physical development of the offspring (table 1), in both sexes, there was a significant delay in the day of the occurrence of the pinna detachment and the incisor eruption when compared to the control group. Females pups from BUP group had significant delay on the day of vaginal opening.

Data from the evaluation of the reflex development are represented in table 1. There was a significant delay in all parameters analyzed (palmar grasp reflex, surface righting reflex, negative geotaxis and adult gait) in the offspring of both sex from BUP group.

3.2 Hormone levels

There were no statistically differences in testosterone and estradiol serum levels between pups from control and BUP groups (Figure 4).

3.3 Behavioral evaluation of pups

Data from the open field test applied to the offspring of adult males exposed to BUP are shown in table 2. ANOVA indicated that on the PND25 there was sex interaction on central and total ambulation showing that males were more active than the females. Related to rearing behavior, ANOVA indicated interaction between sex and treatment. The Bonferroni test revealed that females from the control group had a higher frequency of rearing than females exposed to BUP or males from both groups. Finally, ANOVA indicated no effect on the rostral grooming but indicated an effect of treatment on body and total grooming. Regardless of sex, the offspring from males exposed to

BUP showed reduced time spent on body and total grooming.

In the PND60, the only parameter that presented a significant alteration was rostral grooming. ANOVA indicated sex effect, with females having reduced rostral grooming time when compared to males, regardless of treatment.

4. Discussion

The main findings of this study demonstrate that the postnatal development of the offspring from males exposed to BUP was compromised. Considering that none of the females used in mating were exposed to BUP, the changes observed in the study stem from the paternal exposure to the drug.

It has been reported that dopamine-reuptake inhibitors, such as BUP, that increase the availability of this neurotransmitter in the testis of adult mice, have impaired reproductive function (Tethi and Chaturvedi, 2009) and testicular function (Kankash et al., 2014, Cavariani et al, 2015). Structural morphological changes have also been reported in the spermatozoa head, which were attributed to damage in the genetic material (Roshdy and Fyiad, 2010). It is known that sperm DNA fragmentation is associated with changes in intrauterine development and may impact offspring development (Evgeni et al., 2014), thus explaining the effects observed in the present study.

The impairment in the weight and length development of the pups from birth to adulthood indicates alterations on physical development. The International Conference on Harmonization guide (ICH, 2005) considers weight gain as the best indicator of physical development and is directly related to body growth and the occurrence of other developmental milestones, such as pinna detachment and incisor eruption. In fact, in the

present study was observed a delay in the occurrence of these parameters.

The lower weight gain and body growth of offspring suggests that paternal exposure to BUP may have induced genetic changes that have resulted in smaller pups (Jiménez-Chillarón et al., 2015; Stuppia et al., 2015).

In male pups, the similarity between the AGD between the experimental groups at birth indicates that hormonal signaling during intrauterine life and at birth was adequate (Eisenberg et al., 2011; Szenczi et al., 2013). In the other hand, in female offspring from paternal exposure to BUP the AGD on PND1 was lower compared to control group indicating that hormonal signaling was not adequate. In adulthood, AGD was reduced in male offspring from paternal exposure to BUP with did not occur in females offspring from the same group. However, the dosages of testosterone and estradiol were similar between the experimental groups, suggesting that changes in this parameter in adulthood are not related to the production of sex hormones. After complete body growth, the AGD tends to stabilize (Eisenberg et al., 2013), thus, in this study, the reduction on this parameter on male pups was associated with the lower body growth observed on PND60 (Gallavan et al. 1999). In the females pups the delay in the vaginal opening was verified, this suggests a delay in entering puberty (Mayer et al., 2010). Zehr et al. (2001) showed that alterations in AGD in PND1 were associated with prenatal androgens signaling and could affect the puberty entry in females. Besides that, according to Lehrer (2015), the gradual weight gain is necessary for the onset of puberty. In this study, the impairment in the weight and length development of the females puppies from birth to adulthood may be another explanation for the delay in entering puberty observed.

Paternal exposure to BUP impacted the development of the central nervous system of the offspring, as suggested both by changes in reflex ontogeny and

behavioral. These damages may have resulted from 2 possible mechanisms. Initially, neurodevelopment delay may be related to delayed physical development. The lower length and body weight compromise the neurological development since they difficult the interaction and socialization between the pups (Crnic, 1976). Another explanation would be due the alteration in paternal DNA methylation due to oxidative stress generated by testicular dopamine metabolism (González et al., 2015; Tunc and Tremellen, 2009), which availability increased by the exposure to BUP. In fact, the genotoxic potential of BUP has already been described by Brambilla et al. (2009) at doses similar to those used in this study. Genetic modifications in paternal DNA can be transmitted to the cells of the offspring's nervous system and impair the neurological development of the offspring. (Bohacek and Mansuy, 2015, Fox, 1965).

In the present study, the behavioral evaluation in PND25 indicates that the paternal exposure to BUP caused a reduction in rearing in the females and a decrease in time spends in grooming in both sexes. These results were interpreted as a decrease in exploratory behavior and anxiety the offspring (Crawley, 1985; Díaz-Morán et al., 2011). These changes did not remain in adulthood. Although there are no studies in the literature with BUP exposure protocols similar to the one used in this study, dopamine reuptake inhibitors have been described as capable of altering behavioral parameters in the offspring of treated male mice (Killinger et al., 2012). The study by Killinger et al (2012) evaluated the offspring from cocaine-treated males and reported behavior similar to depression in adult pups and decreased weight in pups.

Some changes were observed between males and females, regardless of the treatment. Males presented greater motor activity in PND25 and decrease in time spends in rostral grooming on PND60 than females. Estanislau (2012), Komorowska and Pisula (2003) have shown that, in adulthood, the times spend in rostral grooming are indicative

of anxiety and stress in rodents. Thus, males were less anxious than females. Sex interactions in behavioral responses were already described (Johnston and File, 1991; Marques et al., 2016; Wilson et al., 2000) and a more in-depth discussion of this subject is not an aim of this study.

5. Conclusion

Up until now, this is the first study to describe the alterations in the postnatal development of offspring from male mice exposed to BUP. These results demonstrated that although BUP did not compromise intrauterine development, it was able to alter later stages of the development of these animals. The delay in physical development, reflex ontology and behavioral alterations of the offspring are a warning to the possibility that the paternal exposition to chemical substances causes damages that persists throughout the life of the descendants.

Highlights

- Altered physical development of offspring from male mice exposed to BUP.
- Delay reflex ontogeny in the offspring from male mice exposed to BUP.
- Reduced exploratory behavior in the offspring from male mice exposed to BUP.
- Reduced anxiety in the offspring from male mice exposed to BUP.

Funding

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) as a Masters scholarship.

6. References

- Adler ID. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: extrapolation of genetic risk from mouse to man. *Andrologia* 2000;32:233-237.
- Alder S, Zbinden G. Methods for the evaluation of physical, neuromuscular and behavior development of rats in early postnatal life. In: Neubert D, Merker HJ, Kwaigroch TE. Evaluation of embryotoxic effects in animals. Stuttgart; Geogre Thieme; 1977. p. 175-185.
- Bohacek J, Mansuy IM. Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. *Nature Reviews Genetics* 2015;16:641–652. doi:10.1038/nrg3964.
- Brambilla G, Mottioli F, Marteli A. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotic and antidepressants. *Toxicology* 2009;261:77-88.
- Buoli M, Serati M, Cahn W. Alternative pharmacological strategies for adult ADHD treatment: a systematic review. *Expert Rev Neurother* 2016;16:131-44.
- Cavariani M M, De Almeida Kiguti LR, De Lima Rosa J, et al. Bupropion treatment increases epididymal contractility and impairs sperm quality with no effects on the epididymal sperm transit time of male rats. *J Appl Toxicol* 2015;35:1007-16.
- Clayton AH, Alkis AH, Parikh NB, et al. Sexual Dysfunction Due to Psychotropic Medications. *Psychiatr Clin North Am* 2016;39:427-63.
- Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 1988;9:37-44.
- Crnic LS. Effects of infantile undernutrition on adult learning in rats: methodological and design problems *Psychol Bull* 1976;83:715-28.
- De Long N, Hyslop JR, Nicholson JR, et al. Postnatal metabolic and reproductive consequences of fetal and neonatal exposure to the smoking cessation drug bupropion. *Reprod Sci* 2013;20:1156-61.

Dhir A, Kulkarni SK. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol* 2007;568:177-85.

Díaz-Morán S, Estanislau C, Cañete T, et al. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: Focus on freezing and grooming. *World J Neurosci* 2014;4:1-11. doi: 10.4236/wjns.2014.41001.

Dirami G, Cooke BA. Effect of a dopamine agonist on luteinizing hormone receptors, cyclic AMP production and steroidogenesis in rat Leydig cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;150:393-401.

Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, et al. The Relationship between Anogenital Distance, Fatherhood, and Fertility in Adult Men. *PLoS One* 2011;6. doi: 10.1371/journal.pone.0018973.

Eisenberg ML, Hsieh TC, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and age. *Andrology* 2013;1:90–93.

Estanislau CR. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychol & Neurosci* 2012;1:105-112.

Evans EA, Sullivan MA. Abuse and misuse of antidepressants. *Subst. Abuse Rehabil* 2014;5:107-20.

Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human Sperm DNA Fragmentation and its Correlation with Conventional Semen Parameters. *J Reprod Infertil* 2014;15:2-14.

Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav* 1965;13: 234-41.

Gallavan RH Jr, Holson JF, Stump DG, et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol* 1999;13:383-390.

González CR, González B, Matzkn ME, et al. Psychostimulant-Induced Testicular Toxicity in Mice: Evidence of Cocaine and Caffeine Effects on the Local Dopaminergic System. *PLoS One* 2015;11. doi: 10.1371/journal.pone.0142713.

Gopalakrishnan K, More AS, Hankins GD, et al. Postnatal Cardiovascular Consequences in the Offspring of Pregnant Rats Exposed to Smoking and Smoking Cessation. *Pharmacotherapies. Reprod Sci* 2016;24:919-33.

Halseth A, Shan K, Walsh B, et al. Method-of-use study of naltrexone sustained release (SR)/bupropion SR on body weight in individuals with obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2017;25:338-45.

Hsiao SY, Cherng CF, Yang YK, et al. Prenatal bupropion exposure enhances the cocaine reward and stress susceptibility in adult mice. *Chin J Physiol* 2005;48:223-9.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2) 2005.

Jiménez-Chillarón JC, Nijland MJ, Ascensão AA, et al. Back to the future: transgenerational transmission of xenobiotic-induced epigenetic remodeling. *Epigenetics* 2015;10:259-273. doi:10.1080/15592294.2015.1020267.

Johnston AL, File SE. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav* 1991;49:245-50.

Kankash A, Shariati M, Khatamsaz S. Effects of Bupropion on Physiology of Reproduction in Adult Male Rats. *J Appl Environ Biol Sci* 2014;4:106-10.

Killinger CE, Robinson S, Stanwood GD. Subtle biobehavioral effects produced by paternal cocaine exposure. *Synapse* 2012;66:902-8. doi: 10.1002/syn.21582

Komorowska J, Pisula W. Does changing levels of stress affects the characteristics of grooming behavior in rats? *Int J Comp Psychol* 2003;16:237-46.

Kravos M. Bupropion-associated premature ejaculation. *Pharmacopsychiatry* 2010; 43: 156-7.

Lehrer S. Continuation of Gradual Weight Gain Necessary for the Onset of Puberty May Be Responsible for Obesity Later in Life. *Discovery medicine*. 2015; 20:191-6.

Li DJ, Tseng PT, Chen YW, et al. Significant Treatment Effect of Bupropion in Patients With Bipolar Disorder but Similar Phase-Shifting Rate as Other Antidepressants: A Meta-Analysis Following the PRISMA Guidelines. *Medicine (Baltimore)* 2016;95. doi: 10.1097/MD.00000000000003165.

Marques AA, Bevilaqua MCN, Fonseca AMP, et al. Gender Differences in the Neurobiology of Anxiety: Focus on Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neural Plast* 2016. doi: 10.1155/2016/5026713

Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, et al. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor α -signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:22693-98. doi:10.1073/pnas.1012406108

Norton, S. Methods for behavioral toxicology. In: Hayes A. Principles and methods of toxicology. 2 ed. New York: Raven, p. 553-571,1989.

Oppek K, Koller G, Zwergal A, et al. Intravenous administration and abuse of bupropion: a case report and a review of the literature. *J. Addict. Med* 2014;8:290-3.

Pandhare A, Pappu AS, Wilms H, et al. The antidepressant bupropion is a negative allosteric modulator of serotonin type 3A receptors. *Neuropharmacology*. 2017;113:89-99. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.09.021

Poulton AS, Hibbert EJ, Champion BL, et al. Stimulants for the Control of Hedonic Appetite. *Front Pharmacol* 2016;25. doi: 10.3389/fphar.2016.00105

Roshdy HM, Fyiad AA. Cytogenetic and biochemical effects of anti depression drug (wellbutrin) on male mice. *New york Sci* 2010; 3:121–6.

Rostas A, Wolf U. Bupropion abuse resulting in hypomania in a geriatricamphetamine user: a case report. *Am. J. Addict* 2015;24:765-66.

Shalabi AR, Walther D, Baumann MH, et al. Deconstructed Analogues of Bupropion Reveal Structural Requirements for Transporter Inhibition versus Substrate-Induced Neurotransmitter Release. *ACS chemical neuroscience* 2017; doi: 10.1021/acscemneuro.7b00055

Sethi S, Chaturedi CM. Temporal synergism of neurotransmitters (serotonin and dopamine) affects testicular development in mice. *Zoology: analysis of complex systems* 2009;112:461-70.

Stall N, Godwin J. Bupropion abuse and overdose. *CMAJ* 2014;186:1015.

Stevenson EL, McEleny KR. Male subfertility as a chronic illness: the role of adaptive challenges. *Hum Fertil* 2017;22:1-7.

Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, et al. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clin Epigenetics* 2015;7:120. doi: 10.1186/s13148-015-0155-4.

Su SW, Cheng CF, Lin YC, et al. Prenatal exposure of bupropion may enhance agitation, anxiety responses, and sensitivity to cocaine effects in adult mice. *Chin J Physiol* 2007;50:1-8.

Szenczi P, Bánszegi O, Groó Z, et al. Anogenital distance and condition as predictors of litter sex ratio in two mouse species: a study of the house mouse (*Mus musculus*) and mound-building mouse (*Mus spicilegus*). *PLoS One* 2013;8. doi: 10.1371/journal.pone.0074066..

Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:537–44.

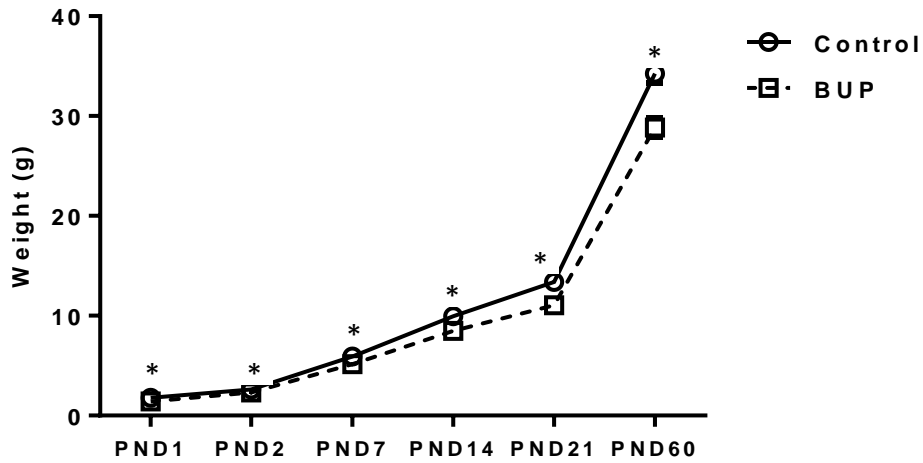
Weiss E, Greenberg G. Open field procedures. In: Greenberg G, Haraway M M. *Comparative psychology: a handbook*, New York: Garland Publishers; 1998. p. 257–63.

Wilson J.H, McKinley SA, Young BL. Prolactin levels in juvenile and adult rats following acute restraint and the open field. *Physiol Behav* 2000;68:383-7.

Zahiroddin A, Faridhoseini F, Zamani A, et al. Comparing the Efficacy of Bupropion and Amantadine on Sexual Dysfunction Induced by a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor. *Iran Red Crescent Med J* 2015;17. doi: 10.5812/ircmj.24998.

Zehr JL, Gans SE, McClintock MK,. Variation in reproductive traits is associated with short anogenital distance in female rats. *Dev Psychobiol* 2001;38:229-38.

Females



Males

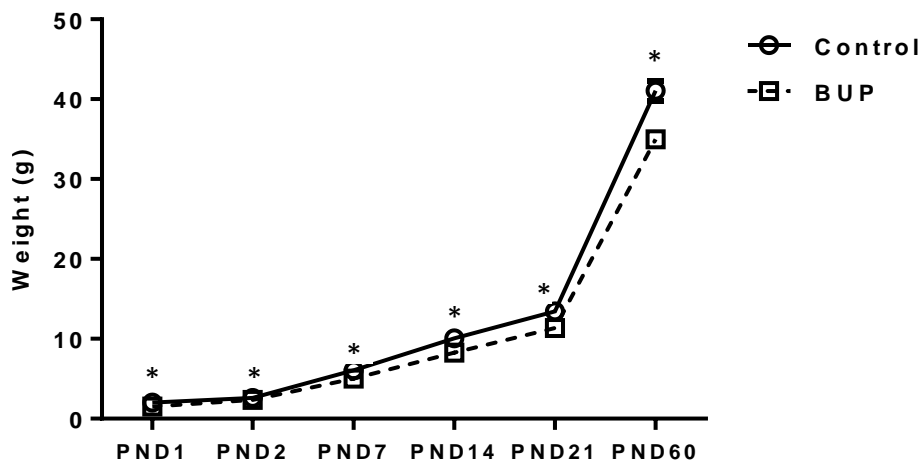
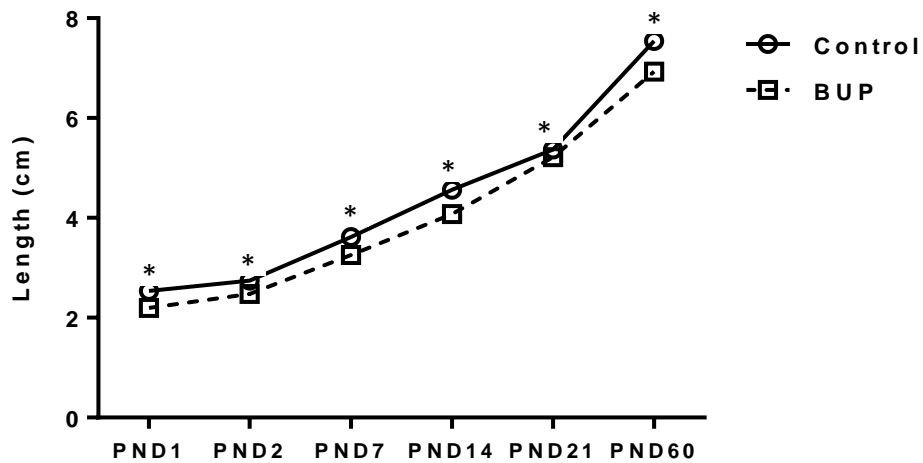


Figure 1. Weight gain of offspring from male mice exposed to BUP (40mg/kg).

Data represented by Mean \pm SEM and were analyzed by two-way ANOVA (within-subject factors: treatment and sex). Independent of sex, weight gain of pups was significantly lower than their concurrent controls from PND1 to PND60. Control: offspring from the group that received saline solution 0.9% and offspring from the group exposed to BUP at a dose of 40mg/kg during spermatogenesis. PND: Postnatal day.

Females



Males

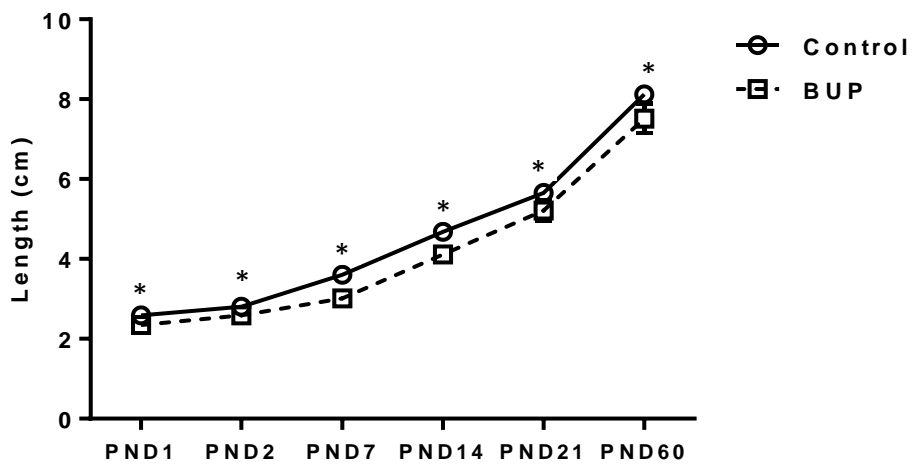
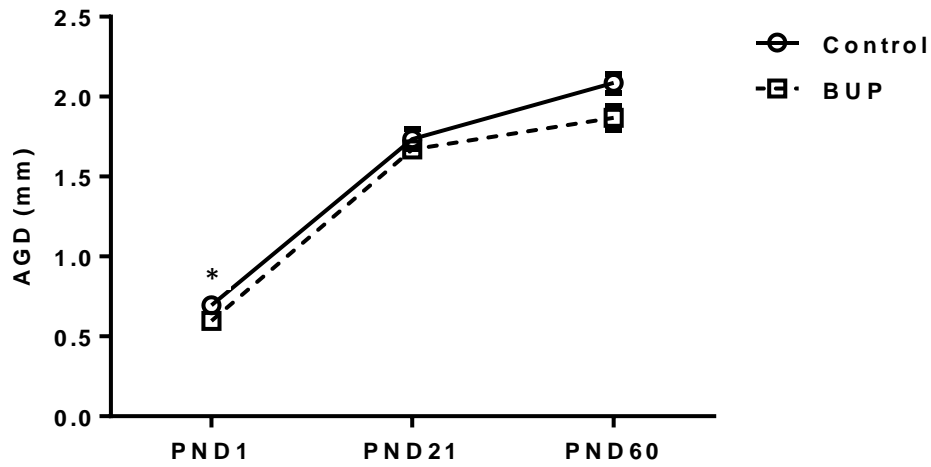


Figure 2. Body length of offspring from male mice exposed to BUP (40 mg/kg).

Data represented by Mean \pm SEM and were analyzed by two-way ANOVA (within-subject factors: treatment and sex). Independent of sex, length gain of pups was significantly lower than their concurrent controls from PND1 to PND60. Control: offspring from the group that received saline solution 0.9% and offspring from the group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis. PND: Postnatal day.

Females



Males

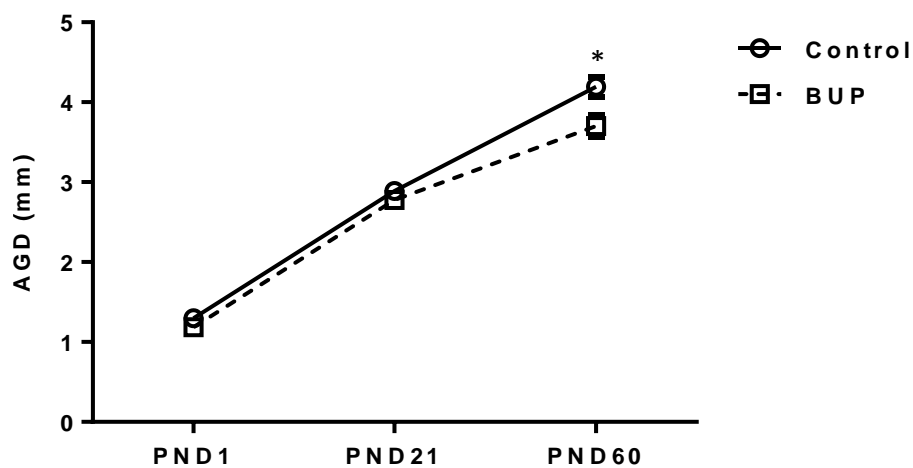
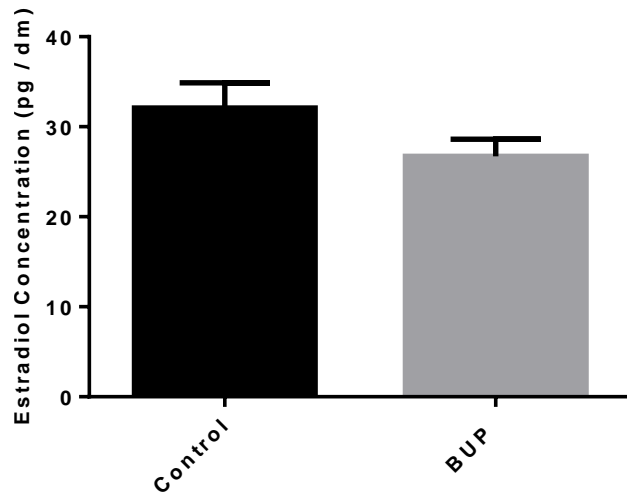


Figure 3. Anogenital distance (AGD) of offspring from male mice exposed to BUP (40mg/kg).

Data are presented means \pm SEM and were analyzed by Mann-Whitney Test. For females, pups of the group receiving BUP had decrease AGD on PND1 compared to their concurrent control animals. For males, pups of the group receiving BUP had decrease AGD on PND60 compared to their concurrent control animals. Control: offspring from the group that received saline solution 0.9% and offspring from the group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis. PND: Postnatal day.

Females



Males

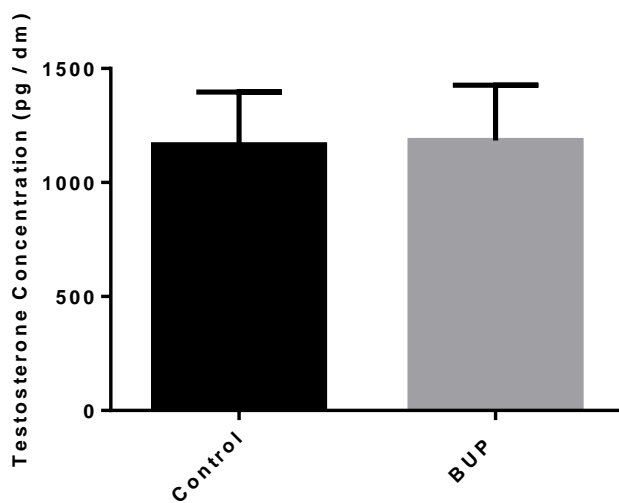


Figure 4. Serum estradiol and testosterone concentration in offspring from male mice exposed to BUP (40mg/kg).

Data are presented means \pm SEM and were analyzed by Mann-Whitney Test. Control: offspring from the group that received saline solution 0.9% and offspring from the group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg spermatogenesis.

Table 1. Physical development and reflex ontology of offspring from male mice exposed to BUP (40mg/kg).

	Males		Females	
	Control	BUP	Control	BUP
Physical development				
Pinna detachment	3,200 ± 0,133	4,400 ± 0,233***	3,200 ± 0,110	4,350 ± 0,224***
Incisor eruption	7,000 ± 0,000	7,550 ± 0,189*	7,000 ± 0,000	7,550 ± 0,189*
Hair growth	4,700 ± 0,152	4,900 ± 0,233	4,650 ± 0,150	4,900 ± 0,233
Eye Opening	13,700 ± 0,133	13,880 ± 0,207	12,550 ± 1,288	14,000 ± 0,149
Ear opening	12,100 ± 0,378	12,700 ± 0,517	11,100 ± 0,971	12,700 ± 0,517
Testes descent	18,230 ± 0,575	18,620 ± 0,363	-	-
Vaginal opening	-	-	28,630 ± 0,281	29,800 ± 0,573*
Reflex ontology				
Palmar grasp reflex	1,000 ± 0,000	1,950 ± 0,157**	1,000 ± 0,000	1,767 ± 0,131**
Surface righting reflex	1,050 ± 0,050	3,200 ± 0,170**	1,050 ± 0,050	2,783 ± 0,089**
Negative geotaxis	4,400 ± 0,145	6,417 ± 0,253**	4,200 ± 0,110	6,350 ± 0,279**
Adult gait	9,000 ± 0,000	10,150 ± 0,076*	9,000 ± 0,000	10,150 ± 0,130*

Data represented by Mean ± SEM of the day of appearance/occurrence and were analyzed by Student's T-test. *p<0.05 compared to control group. Control: offspring from the group that received saline solution 0.9% and offspring from the group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis.

Table 2. General activity of 25-day-old and 60-day-old offspring from male mice exposed to BUP (40mg/kg).

	Male		Female	
	Control	BUP	Control	BUP
Open field (DPN25)				
Ambulation (central area)	54,30±6,05	59,60±5,74	39,90±5,74*	48,60±5,74*
Ambulation (total)	230,61±1,58	200,00±14,50	170,20±14,58*	194,20±1,58*
Rearing	6,10±1,568	7,10±1,68	16,00±1,68*#	7,40±1,68
Rostral grooming	6,55±14,66	15,53±4,06	13,05±4,06	7,98±4,06
Body grooming	160,50±14,66	112,2±14,66♦	150,00±14,66	119,10±14,66♦
Grooming (total)	169,60±11,94	127,70±11,94♦	183,4±12,59	130,10±11,94♦
Open field (DPN60)				
Ambulation (central area)	34,37±5,75	32,30±5,42	25,10±5,42	37,70±5,14
Ambulation (total)	171,20±16,77	203,70±15,81	179,30±15,81	194,10±15,00
Rearing	3,00±0,81	6,10±0,76	4,88±0,81	4,77±0,81
Rostral grooming	2,13±1,68	5,60±1,50	7,74±1,5*	6,79±1,50*
Body grooming	73,74±12,09	91,60±11,47	110,82±12,82	102,1±11,47
Grooming (total)	77,72±12,97	89,29±12,97	108,50±12,97	108,80±12,31

Data represented by Mean ± SEM and were analyzed by two-way ANOVA (within-subject factor: treatment and sex) complemented with Bonferroni. *p <0.05 compared to males. # p<0.05 compared to females offspring from the group exposed to bupropion. ♦p<0.05 compared to control animals. Control: offspring from the group that received saline solution 0.9% and offspring from the group exposed to BUP at a dose of 40 mg/kg during spermatogenesis.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A toxicidade reprodutiva em camundongos machos adultos expostos ao BUP 40mg/Kg foi confirmada em nossos resultados. A diminuição na produção de testosterona somada à diminuição no número de células de Sertoli foram apontados como causa para as alterações na função testicular, que culminaram no prejuízo na produção e morfologia espermática.

- O desenvolvimento intrauterino da prole não foi prejudicado pela exposição paterna ao BUP. Indicando que as alterações espermáticas não interferiram nos processos de implantação, formação de anexos embrionários e ganho de peso ajustado à idade de prenhez.

- As malformações externas e esqueléticas observadas na prole de camundongos expostos ao fármaco foram consideradas consequência das alterações na morfologia da cabeça de espermatozoides devido à genotoxicidade induzida pelo BUP.

- As fases posteriores de desenvolvimento físico e reflexológico da prole dos camundongos expostos ao BUP foram prejudicadas. Porém, o desenvolvimento reflexológico foi o mais comprometido, o que sugere que a genotoxicidade induzida pelo BUP causa alterações no desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso da prole.

- O perfil comportamental observado na prole, de ambos os sexos, dos camundongos expostos ao BUP foram classificadas como indicadores para a diminuição do comportamento similar ao estresse e ansiedade nos animais. Sendo que, as modificações epigenéticas no espermatozoide paterno foram apontadas como causa para as alterações comportamentais observadas.

- O presente estudo fornece uma nova perspectiva acerca da exposição paterna ao BUP, além de demonstrar que, as consequências do prejuízo na função reprodutiva dos animais tratados foram refletidas na sua descendência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ABDEL-HAMID, I. A.; ELSAIED, M. A.; MOSTAFA, T. The drug treatment of delayed ejaculation. **Translational andrology and urology**. v. 5(4), p. 576-91, 2016.

ABDEL-HAMID, I. A.; SALEH, el-S. Primary lifelong delayed ejaculation: characteristics and response to bupropion. **The journal of sexual medicine**. v. 8(6), p. 1772-9, 2011.

ABLER, B.; SEERINGER, A.; HARTMANN, A.; et al. Neural correlates of antidepressant-related sexual dysfunction: a placebo-controlled fMRI study on healthy males under subchronic paroxetine and bupropion. **Neuropsychopharmacology**. v. 36(9), p. 1837-47, 2011.

ADLER, I.D. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: extrapolation of genetic risk from mouse to man. **Andrologia**. n. 32, p. 233-237, 2000.

ALI, S.; STONE M. A.; PETERS, J. L.; et al. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetic Medicine**. v. 23, p. 1165–1173, 2006.

ALWAN, S.; REEFHUIS, J.; BOTTO, L. D.; et al. National Birth Defects Prevention Study. Maternal use of bupropion and risk for congenital heart defects. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 203(1), p. 52, 2010.

AMERICAN PSYCHIATRIC A. Practice guideline for the treatment of patients with bipolar disorder (revision). **The American Journal of Psychiatry**. v. 159(4 Suppl), p. 1–50, 2002.

AMIDU, N.; OWIREDU, W. K.; ALIDU, H.; et al. Association between metabolic syndrome and sexual dysfunction among men with clinically diagnosed diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. v. 5(1), p. 42, 2013.

AMORY, J. K.; BREMNER, W. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 182(2), p. 175-9, 2001.

ASCHER, J. A.; COLE, J. O.; COLIN, J. N. et al. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **The Journal of Clinical Psychiatry**. v. 56(9), p. 395-401, 1995.

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais – DSM. 5 ed. – Texto Revisado. Tradução Maria IMs Corria Nascimento, Paulo Henrique Machado, Regma Machado Garcez, Régis Pizzato e Sandra Maria Mallmann da Rosa. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, 2014.

ASSOCIATION AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®): American Psychiatric Pub; 2013.

AUMÜLLER, G., RIVA, A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. **Andrologia**. v. 24(4), p. 183-96, 1992.

BALON, R. SSRI-Associated Sexual Dysfunction. **American Journal of Psychiatry**. v. 163(9), p. 1504-1509. 2006.

BALDWIN, D. S.; FOONG, T. Antidepressant drugs and sexual dysfunction. **British Journal of Psychiatry**, v. 202, p. 396-397, 2013.

BARIBEAU, D.; ARAKI, K. F. Intravenous bupropion: a previously undocumented method of abuse of a commonly prescribed antidepressant agent. **Journal of Addiction Medicine**. v. 7(3), p. 216-217, 2013.

BASCOM, K. F.; OSTRUD, H. L. Quantitative studies of testicle. II Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. **The Anatomical Record**. v. 31, p. 159-169, 1925.

BELLENTANI, F. F.; FERNANDES, G. S.; PEROBELLI, J. E.; et al. Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. **Journal of andrology**. v. 32(6), p. 718-24, 2011.

BERGAM, J.; MADRAS, B. K.; JOHNSON, S. E.; et al. Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 251(1), p. 150-155, 1989.

BLIER, P.; WARD, H.; TREMBLAY, P.; et al. Combination of antidepressant medications from treatment initiation for major depressive disorder: A double-blind randomized study. **The American Journal of Psychiatry**. v. 167, p. 281 – 288, 2010.

BONDAREV, M. L.; BONDAREVA, T. S.; YOUNG, R.; et al. Behavioral and biochemical investigations of bupropion metabolites. **European Journal of Pharmacology**. v. 474 (1), p. 85–93, 2003.

BORGES, C. S.; MISSASSI, G.; PACINI, E. S.; et al. Slimmer or fertile? Pharmacological mechanisms involved in reduced sperm quality and fertility in rats exposed to the anorexigen sibutramine. **Public Library of Science one**. v. 12(8), p. 6, 2013.

BOHACEK, J.; MANSURY, I. M. Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. **Nature Reviews Genetics**. v. 16, p. 641–652, 2015.

BOURKE, C. H.; STOWE, Z. N.; OWENS, M. J. Prenatal antidepressant exposure: clinical and preclinical findings. **Pharmacological Reviews**. v. 66(2), p. 435-65, 2014.

BRUSCHINI, H.; SCHMIDT, R. A.; TANAGHO, E. A. Studies on the neurophysiology of the vas deferens. **Investigative Urology**. v. 15(2), p. 112-6, 1977.

CAVARIANI, M. M.; DE ALMEIDA KIGUTI, L. R.; DE LIMA ROSA, J.; et al. Bupropion treatment increases epididymal contractility and impairs sperm quality with no effects on the epididymal sperm transit time of male rats. **Journal of Applied Toxicology**. v. 35(9), p. 1007-16, 2015.

CAMPOS, S. G. P.; ZANETONI, C.; SCARANO, W. R.; et al. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **International journal of experimental pathology**. v. 89(1), p. 13-24, 2008.

CARDOSO, T. A. O. Biossegurança no manejo de animais em experimentação. In: Oda LM, Ávila S. Biossegurança em laboratórios de saúde pública. p. 11-4, 1998.

CHORRILI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**. v. 28(1), p. 11-23, 2007.

CHIASSON, R.B. **Laboratory anatomy of the white rat**. In: Brown C. Arizona: Wm, v. 2, p. 81, 1969.

COOKE, H. J.; SAUNDERS, P. T. K. Mouse models of male infertility. **Nature Reviews Genetics**. v. 3(10), p. 790-801, 2002.

COLEMAN, C.; CUNNINGHAM, L.; FOSTER, V.; et al. Sexual dysfunction associated with the treatment of depression: a placebo-controlled comparison of bupropion sustained release and sertraline treatment. **Annals of Clinical Psychiatry**. v. 11, p. 205–215, 1999.

COLES, R.; KHARASCH, E. D. Stereoselective analysis of bupropion and hydroxybupropion in human plasma and urine by LC/MS/MS. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences..** v. 857(1), p. 67–75, 2007.

COLEMAN, C.; KING, B.; BOLDEN-WATSON, C.; et al. A placebo-controlled comparison of the effects on sexual functioning of bupropion sustained release and fluoxetine. **Clinical Therapeutics**. v. 23, p. 1040–1058, 2001.

CONNARN, J. N.; ZHANG, X.; BABISKIN, A.; et al. Metabolism of bupropion by carbonyl reductases in liver and intestine. **Drug Metabolism & Disposition**. v. 43(7), p. 1019–1027, 2015.

CONNERS, C. K.; CASAT, C. D.; GUALTIERI, C. T.; et al. Bupropion hydrochloride in attention deficit disorder with hyperactivity. **Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. v. 35(10), p. 1314–1321, 1996.

CONNARN, J. N.; LUO, R.; WINDAK, J.; et al. Identification of non-reported bupropion metabolites in human plasma. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**. v. 37(9), p.550-560, 2016.

COOPER, B. R.; WANG, C. M.; COX, R. F.; et al. Evidence that the acute behavioral and electrophysiological effects of bupropion (Wellbutrin) are mediated by a noradrenergic mechanism. **Neuropsychopharmacology**. v. 11, p. 133-41, 1994.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**. v. 15(2), p. 213-27, 2009.

CLAVERT, A.; CRANZ, C.; BOLLACK, C. Functions of the seminal vesicle. **Andrologia**. v. 22, Suppl 1, p. 185-92, 1990.

CLAYTON, A.; BAKER, R.; SHEEHAN, J.; et al. Comparison of adjunctive use of aripiprazole with bupropion or selective serotonin reuptake inhibitors/serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors: analysis of patients beginning adjunctive treatment in a 52-week, open-label study. **BMC Research Notes**. v. 7, p. 459, 2014.

CLAYTON, A.; CROFT, H.; HERRIGAN, J.; et al. Bupropion extended release compared with escitalopram: Effects on sexual functioning and antidepressant efficacy in 2 randomized, double-blind, placebo-controlled studies. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 67, p. 736–746, 2006.

CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. **American Journal of Anatomy**. v. 112(1), p. 35-51, 1963.

CROFT, H.; HOUSER, T.; JAMERSON, B.; et al. Effect on body weight of bupropion sustained-release in patients with major depression treated for 52 weeks. **Clinical Therapeutics**. v. 24, p. 662–672, 2002.

CROFT, H.; SETTLE, E.; HOUSER, T.; et al. A placebo-controlled comparison of the antidepressant efficacy and effects on sexual functioning of sustained-release bupropion and sertraline. **Clinical Therapeutics**. v. 21, p. 643–658, 1999.

DACHEUX, J-L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**. v. 147(2), p. R27-R42, 2014.

DAMAJ, M. I.; CARROLL, F. I.; EATON, J. B.; et al. Enantioselective effects of hydroxy metabolites of bupropion on behavior and on function of monoamine transporters and nicotinic receptors. **Molecular Pharmacology**. v. 66(3), p. 675–682, 2004.

DE LONG, N.; HYSLOP, J. R.; NICHOLSON, C. J.; et al. Postnatal metabolic and reproductive consequences of fetal and neonatal exposure to the smoking cessation drug bupropion. **Reproductive Sciences**. v. 20(10), p. 1156-61, 2013.

DERVAUX, A.; LAQUEILLE, X. Smokers and psychiatric comorbidities. **La Presse Médicale**. v. 45(12 Pt 1), p.1133-1140, 2016.

DRABOVICH, A. P.; SARAON, P.; JARVI, K.; et al. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. **Nature Reviews Urology**. v. 11(5), p. 278-88, 2014.

EISENBERG, M. L.; LI, S.; BEHR, B.; et al. Relationship between semen production and medical comorbidity. **Fertility and Sterility**. v.103, p. 66 –71, 2015.

EISENBERG, M. L.; LI, S.; BROOKS, J. D.; et al. Increased risk of cancer in infertile men: analysis of U.S. claims data. **Journal of Urology**. v. 193, p. 1596–1601, 2015.

EISENBERG, M. L.; LI S.; CULLEN, M. R.; et al. Increased risk of incident chronic medical conditions in infertile men: analysis of United States claims data. **Fertility and Sterility**. v. 105, p. 629–636, 2016.

EVANS, E. A.; SULLIVAN, M. A. Abuse and misuse of antidepressants. **Substance Abuse and Rehabilitation**. v. 5, p. 107–120, 2014.

EVINS, A. E.; CATHER, C. Effective cessation strategies for smokers with schizophrenia. **International Review of Neurobiology**. v.124, p.133–47, 2015.

EVRENSEL, A.; CEYLAN, M. E. Bupropion associated premature ejaculation. **Turkish Journal of Psychiatry**. v.25, p. 290, 2014.

FAVA, M.; RUSH, A. J.; THASE, M. E.; et al. 15 years of clinical experience with bupropion HCl: from bupropion to bupropion SR to bupropion XL. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**. v. 7, p.106–113, 2005.

FIGUEROA, R. Use of antidepressants during pregnancy and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**. v. 31(8), p. 641-8, 2010.

FINDLAY, J W.; VAN WYCK FLEET, J.; SMITH, P. G.; et al. Pharmacokinetics of bupropion, a novel antidepressant agent, following oral administration to healthy subjects. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 21(2), p. 127–135, 1981.

FLODEN, L.; TAREN, D. L.; MURAMOTO, M. L.; et al. BMI changes in adolescents treated with bupropion SR for smoking cessation. **Obesity (Silver Spring)**. v. 24(1), n. 26-9, 2016.

FOLEY, G. L. Overview of Male Reproductive Pathology. **Toxicologic Pathology**. v. 29(1), p. 49-63, 2001.

FRANÇA, L. R.; HESS, R A.; DUFOUR, J. M; et al. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**. v. 4(2), p. 189-212, 2016.

GADDE, K. M.; PARKER, C. B.; MANER, L. G.; et al. Bupropion for weight loss: An investigation of efficacy and tolerability in overweight and obese women. **Obesity Research & Clinical Practice**. v. 9, p. 544–551, 2001.

GARTLEHNER, G.; HANSEN, R. A.; MORGAN, L. C.; et al. Comparative Benefits and Harms of Second-Generation Antidepressants for Treating Major Depressive Disorder. **Annals of Internal Medicine**. v. 155(11), p. 772-785, 2011.

GENTILE, S. The safety of newer antidepressants in pregnancy and breastfeeding. **Drug safety**. v. 28(2), p.137-52, 2005.

GISSLEN, T.; NATHAN. B.; THOMPSON, T.; et al. Hyperinsulinism associated with gestational exposure to bupropion in a newborn infant. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism**. v. 24(9-10), p.819-22, 2011.

GONZÁLEZ, C. R.; GONZÁLEZ, B.; MATZKN, M. E.; et al. Psychostimulant-Induced Testicular Toxicity in Mice: Evidence of Cocaine and Caffeine Effects on the Local Dopaminergic System. **PLoS One**. v. 11;10(11): e0142713. 2015.

GONZALES, G. F. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. **Asian journal of andrology**. v. 3(4), p. 251-58, 2001.

GREENWAY, F. L.; FUJIOKA, K.; PLODKOWSKI, R. A.; et al. Cor-I Study Group. Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-I): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**. v. 376(9741), p. 595-605, 2010.

GREENWAY, F. L.; WHITEHOUSE, M. J.; GUTTADAURIA, M.; et al. Rational design of a combination medication for the treatment of obesity. **Obesity (Silver Spring)**. v. 17(1), p. 30-9, 2009.

GRISWOLD, M. D. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. **Physiological Reviews**. v. 96(1). P. 1-17, 2016.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. v. 9, p. 371-380, 1999.

HAN, D. H.; HWANG, J. W.; RENSHAW, P. F. Bupropion sustained release treatment decreases craving for video games and cue-induced brain activity in patients with Internet video game addiction. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**. v. 18(4), p. 297, 2010.

HALPERN, B.; HALPERN, A. Why are anti-obesity drugs stigmatized? **Expert Opin Drug Safety**. v. 14(2), p.185-9, 2015.

HALPERN, B.; MANCINI, M. C. Safety assessment of combination therapies in the treatment of obesity: focus on naltrexone/bupropion extended release and phentermine-topiramate extended release. **Expert Opinion on Drug Safety**. v. 16(1), p. 27-39, 2017.

HASNAIN, M.; VIEWEG, W. V. Weight considerations in psychotropic drug prescribing and switching. **Postgraduate Medical Journal**. v. 125(5), p. 117-29, 2013.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. **Anatomy of the laboratory rat**, Hardcover, v. 1, 1976.

HELLER, C. G.; CLERMONT, Y. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration.

Science. v. 140(3563), p. 184-6. 1963.

HESSE, L. M.; HE, P.; KRISHNASWAMY, S.; et al. Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. **Pharmacogenetics.** v. 14(4), p. 225–238, 2004.

HESS, R. A.; BUNICK, D.; LEE, K. H.; et al. A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature.** v. 390(6659), p. 509-12, 1997.

HEWETT, K.; CHRZANOWKI, W.; SCHMITX, M.; et al. Eight-week, placebo-controlled, double-blind comparison of the antidepressant efficacy and tolerability of bupropion XR and venlafaxine XR. **Journal of Psychopharmacology.** v. 23, p. 531–538, 2009.

HEWETT, K.; GEE, M.; KRISHEN, A.; et al. Double-blind, placebo-controlled comparison of the antidepressant efficacy and tolerability of bupropion XR and venlafaxine XR. **Journal of Psychopharmacology.** v. 24, p. 1209–1216, 2010.

HILL, S.; SIKAND, H.; LEE, J. A case report of seizure induced by bupropion nasal insufflation. *Prim Care Companion* **Journal of Clinical Psychiatry.** v. 9(1), p. 67-69, 2007.

HODGSON, Y.; HUDSON, B. Leydig Cell Function. V. 25 of the series Monographs on Endocrinology. pp 107-132, 1983.

HOGARTH, C. A.; GRISWOLD, M. D. The key role of vitamin A in spermatogenesis. **The Journal of clinical investigation.** v. 120(4), p. 956-962, 2010.

HOLM, K. J.; SPENCER C. M. Bupropion: a review of its use in the management of smoking cessation. **Drugs.** v. 59(4), p. 1007-24, 2000.

HSIAO, S. Y.; CHERNG, C. F.; YANG, Y. K.; et al. Prenatal bupropion exposure enhances the cocaine reward and stress susceptibility in adult mice. **The Chinese journal of physiology.** v. 48(4), n. 223-9, 2005.

HUELETL-SOTO, M. E.; CARRO-JUÁREZ, M.; RODRIGUEZ-MANZO, G. Effects of bupropion on the ejaculatory response of male rats. **International journal of impotence research**. v. 26(6), n. 205-12, 2014.

JAIN, A. Treating nicotine addiction. **British medical journal**. v. 327, p. 1394-5, 2003.

JANPHET, S.; NUDMAMUD-THANOI, S.; THANOI, S. Alteration of catecholamine concentrations in rat testis after methamphetamine exposure. **Andrologia**. v. 49(2), 2017. doi: 10.1111/and.12616.

JEFFERSON, J. W.; PRADKO, J. F.; MUIR, K. T. Bupropion for major depressive disorder: pharmacokinetic and formulation considerations. **Clinical Therapeutics**. v. 27(11), p. 1685–1695, 2005.

JEFFERSON, J.; RUSH, A.; NELSON, J.; et al. Extended-release bupropion for patients with major depressive disorder presenting with symptoms of reduced energy, pleasure and interest: Findings from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 67, p. 865–873, 2006.

JOENBY, D. Clinical efficacy of bupropion in the management of smoking cessation. **Drugs**. v. 62(Suppl 2), p. 25-35, 2002.

KAMIEN, J. B.; WOOLVERTON, W. L. A pharmacological analysis of the discriminative stimulus properties of d-amphetamine in rhesus monkeys. **J Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 248(3), p. 938-946, 1989.

KENDLER, K. S.; OHLSSON, H.; SUNDQUIST, K.; et al. Drug abuse-associated mortality across the lifespan: a population-based longitudinal cohort and co-relative analysis. **Social Psychiatry Psychiatr Epidemiology**. 2017 May 26. doi: 10.1007/s00127-017-1398-5.

KENT, T.; GRISWOLD, M. D. Checking the pulse of vitamin A metabolism and signaling during mammalian spermatogenesis. **Journal of Developmental Biology**, v. 2(1), p. 34-49, 2014.

KHURSHID, K. A.; DECKER, D. H. Bupropion insufflation in a teenager. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**. v. 14(1), p. 157-158, 2004.

KOSHINO, Y.; BAHK, W.; SAKAI, H.; et al. The efficacy and safety of bupropion sustained-release formulation for the treatment of major depressive disorder: A multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study in Asian patients. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**. v. 9, p. 1273 – 1280, 2013.

KOSLOV, D. S.; ANDERSSON, K-E. Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens—an update. **Frontiers in Pharmacology**. v. 4, p. 101, 2013.

KOTLYAR, M.; BRAUER, L. H.; TRACY, T. S.; et al. Inhibition of CYP2D6 activity by bupropion. **J Clin Psychopharmacol**. v. 25, n.3, p. 226-9, 2005.

KOTZ, D.; VIECHTBAUER, W.; SIMPSON, C. R.; et al. Cardiovascular and neuropsychiatric risks of varenicline and bupropion in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**. 2017 May 4. pii: thoraxjnl-2017-210067. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210067.

KRAVOS, M. Bupropion-Associated Premature Ejaculation. **Pharmacopsychiatry**. v. 43(4), p.156-157, 2010.

KRAWETZ, S. A. Paternal contribution: new insights and future challenges. **Nature Reviews Genetics**. v. 6(8), p. 633-642, 2005.

LABBATE, L. A.; GRIMES, J. B.; HINES, A.; et al. Bupropion treatment of serotonin reuptake antidepressant-associated sexual dysfunction. **Annals of Clinical Psychiatry**. v. 9(4), p. 241-5, 1997.

LAIZURE, S. C.; DEVANE, C. L.; STEWART, J. T.; et al. Pharmacokinetics of bupropion and its major basic metabolites in normal subjects after a single dose. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v.38(5), p. 586–589, 1985.

LAMB, R. J.; GRIFFITHS, R. R. Self-administration in baboons and the discriminative stimulus effects in rats of bupropion, nomifensine, diclofensine and imipramine. **Psychopharmacology**. v. 102(2), p. 183-190, 1990

LANGUTH, B.; HAJAK, G.; LANDGREBE, M.; et al. Abuse potential of bupropion nasal insufflation: a case report. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. v. 29(6), p. 618-619, 2009.

LEVERICH, G. S.; ALTSHULER, L. L.; FRYE, M. A.; et al. Risk of switch in mood polarity to hypomania or mania in patients with bipolar depression during acute and continuation trials of venlafaxine, sertraline, and bupropion as adjuncts to mood stabilizers. **The American Journal of Psychiatry**. v. 163, p.232–239, 2006.

LI, D. J.; TSENG, P. T.; CHEN, Y. W.; et al. Significant Treatment Effect of Bupropion in Patients With Bipolar Disorder but Similar Phase-Shifting Rate as Other Antidepressants: A Meta-Analysis Following the PRISMA Guidelines. **Medicine (Baltimore)**. v. 95(13), 2016.

LOUIK, C.; KERR, S.; MITCHELL, A. A. First-trimester exposure to bupropion and risk of cardiac malformations. **Pharmacoepidemiology and drug safety**. v. 23(10), p. 1066-75, 2014.

MANSVELDER, H. D.; FAGEN, Z. M.; CHANG, B.; et al. Bupropion inhibits the cellular effects of nicotine in the ventral tegmental area. **Biochemical pharmacology**. v. 74, n. 8, p. 1283-1291, 2007.

MANUZZA, S.; KLEIN, R. G.; BESSLER, A.; et al. Adult outcome of hyperactive boys. Educational achievement, occupational rank, and psychiatric status. **Archives of general psychiatry**. v. 50(7), p. 565-76, 1993.

MARQUES, A. C. P. R.; CAMPANA, A.; GIGLIOTTI, A P.; et al. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. **Revista Brasileira Psiquiatria**. v. 23, p. 200-14, 2001.

MARTÍNEZ-RAGA, J.; SABATER, A.; CERVERA, G. Anorgasmia in a patient treated with bupropion SR for smoking cessation. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. v. 24, p. 460-1, 2004.

MCCORMICK, J. Recreational bupropion abuse in a teenager. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 53(2), p. 214, 2002.

MILLER, L.; GRIFFITH, J. A comparison of bupropion, dextroamphetamine, and placebo in mixed-substance abusers. **Psychopharmacology**. v. 80(3), p. 199-205, 1983.

MODELL, J. G.; MAY, R. S.; KATHOLI, C. R. Effect of bupropion-SR on orgasmic dysfunction in nondepressed subjects: a pilot study. **Journal of Sex & Marital Therapy**. v. 26(3), p. 231–40, 2000.

MOLL, J. L.; BROWN, C. S. The use of monoamine pharmacological agents in the treatment of sexual dysfunction: evidence in the literature. **The Journal of Sexual Medicine**. v. 8(4), p. 956–70, 2011.

MONTEITH, S.; GLENN, T.; BAUER, R.; et al. Availability of prescription drugs for bipolar disorder at online pharmacies. **Journal of Affective Disorders**. v. 193, p. 59-65, 2016.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in normal rats testis. **The Journal of Cell Biology**. v. 84(2), p. 340-354, 1980.

MRUK D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**. v. 25, p. 747–806, 2004.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. **Endocrine Reviews**. v. 36(5), p. 564-591, 2015.

MURAKAMI, R.; MIZUNO, T. Proximal-distal sequence of development of the skeletal tissue in the penis of rat and the inductive effect of epithelium. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**. v. 92, p. 133-43, 1986.

OPPEK, K.; KOLLER, G.; ZWERGAL, A.; et al. Intravenous administration and abuse of bupropion: a case report and a review of the literature. **Journal of Addiction Medicine**. v. 8(4), p. 290–3. 201, 2014.

PATEL, K.; ALLEN, S.; HAQUE, M. N.; et al. Bupropion: a systematic review and meta-analysis of effectiveness as an antidepressant. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**. v. 6(2), p. 99-144, 2016.

PINEAU, C.; DUPAIX, A.; JEGOU, B. The co-culture of Sertoli cells and germ cells: applications in toxicology. **Toxicology in vitro**. v. 13(4), p. 513-20, 1999.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 60(3), p. 289-310, 2006.

RATO, L.; ALVES, M. G.; SOCORRO, S.; et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**. v. 9(6), p. 330-338, 2012.

RICHMOND, E. J.; ROGOL, A. D. Male pubertal development and the role of androgen therapy. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**. v. 3(4), p. 338-44, 2007.

ROBERTS, E.; EVINS, A. E.; MCNEILL, A.; et al. Efficacy and acceptability of pharmacotherapy for smoking cessation in adults with serious mental illness: a systematic review and network meta-analysis. **Addiction**. v. 111, p. 599–612, 2016.

ROOPAN, S.; LARSEN, E. R. Use of antidepressants in patients with depression and comorbid diabetes mellitus: a systematic review. **Acta Neuropsychiatrica**. v. 29(3), p.127-139, 2017.

ROSTAS, A.; WOLF, U. Bupropion abuse resulting in hypomania in a geriatricamphetamine user: a case report. **The American Journal on Addictions**. v.24, p. 765–766, 2015.

ROWLEY, H. L; BUTLER, S. A.; PROW, M. R.; et al. Comparison of the effects of sibutramine and other weight-modifying drugs on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Synapse**. v. 38(2), p. 167–176, 2000.

RUSH, C. R.; KOLLINS, S. H.; PAZZAGLIA, P. J. Discriminative-stimulus and participant-rated effects of methylphenidate, bupropion, and triazolam in d-amphetamine-trained humans. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**. v. 6(1), p.32-44, 1998.

RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKIM, A. P.; et al. 1990. Mammalian spermatogenesis in: RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKIM, A. P.; et al. *Histological and Histopathology Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater , p. 1-40.

SAMHSA. 2015. Behavioral health trends in the United States: Results from the 2014 National Survey on Drug Use and Health (HHS Publication No SMA 15-4927, NSDUH Series H-50) URL: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/>

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. P. 115-8. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

SAYUK, G. S.; BRITT, M. G.; BILLY, D. N.; et al. Improvement in Sexual Functioning in Patients With Type 2 Diabetes and Depression Treated With Bupropion. **Diabetes Care**, v. 43, p. 332-334, 2011.

SCHLATT, S.; MEINHARTDT, A.; NEISCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **European Journal of Endocrinology**. v. 137, p. 107-117, 1997.

SCHROEER, D. H. Metabolism and kinetics of bupropion. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 44(5 Pt 2), p. 79–81, 1983.

SEGENREICH, D.; MATTOS, P. Eficácia da bupropiona no tratamento do TDAH. Uma revisão sistemática e análise crítica de evidências. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v. 31(3) p. 117-123, 2004.

SEGRAVES, R. T.; CROFT, H.; KAVOUSSI, R.; et al. Bupropion sustained release (SR) for the treatment of hypoactive sexual desire disorder (HSDD) in non-depressed women. **Journal of Sex & Marital Therapy**. v. 27(3), p. 303-316, 2001.

SEGRAVES, R. T.; CLAYTON, A.; CROFT, H.; et al. Bupropion sustained release for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in premenopausal women. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. v. 24(3), p. 339-342, 2004.

SETHI, S.; CHATURVEDI, C. M. Temporal synergism of neurotransmitters (serotonin and dopamine) affects testicular development in mice. **Zoology: analysis of complex systems**. v. 112(6), p.461-70, 2009.

SETTLE, E.; STAHL, S.; BATEY, S.; et al. Safety profile of sustained-release bupropion in depression: Results of three clinical trials. **Clinical Therapeutics**. v. 21, p. 454–463, 1999.

SHALABI, A. R.; WALTHER, D.; BAUMANN, M. H.; et al. Deconstructed Analogues of Bupropion Reveal Structural Requirements for Transporter Inhibition

versus Substrate-Induced Neurotransmitter Release. **ACS Chemical Neuroscience**. v. 8(6), p. 1397-1403, 2017.

SHALET, S. M. Normal testicular function and spermatogenesis. **Pediatric Blood & Cancer**. v. 53(2), p. 285-8, 2009.

SHOPSIN, B. Bupropion's prophylactic efficacy in bipolar affective illness. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 44 (5 Pt 2), p. 163–169, 1983.

SKARYDOVA, L.; TOMANOVA, R.; HAVLIKOVA, L.; et al. Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. v. 29(2), p. 177–184, 2014.

SKINER, M. K. Sertoli cell secreted regulatory factors. In *Sertoli Cell Biology*, pp 107–120. Eds MK Skinner & MD Griswold. San Diego: Elsevier Science. 2005.

SONG, J.; PARK, J. H.; HAN, D. H.; et al. Comparative study of the effects of bupropion and escitalopram on Internet gaming disorder. **Psychiatry and clinical neurosciences**. v. 70(11), p. 527-535, 2016.

STAHL, S. M. The psychopharmacology of sex, Part 1: Neurotransmitters and the 3 phases of the human sexual response. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 62(2), p. 80-1, 2001.

STAHL, S.; PRADKO, J.; HAIGHT, B.; et al.. A review of the neuropharmacology of bupropion, a dual norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor. **The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry**. v. 6, p. 159–166, 2004.

STALL, N.; GODWIN, J. Bupropion abuse and overdose. **CMAJ**. v. 186(13), p. 1015, 2014.

STEELE, L S.; MACDONALD, E. M.; GOMES, T.; et al. Canadian Drug SafetyEffectiveness Research Network. Rates of anomalous bupropion prescriptions in Ontario, Canada. **The Annals of Family Medicine**. v. 13(4), p. 343-346, 2015.

STEERS, W. D. Physiology of the vas deferens. **World Journal of Urology**. v. 12(5), p. 281-5, 1994.

SUKOFF RIZZO, S. J.; SCHECHTER, L. E.; ROSENZWEIG-LIPSON, S. A novel approach for predicting antidepressant-induced sexual dysfunction in rats. **Psychopharmacology**. v. 195(4), n. 459-67, 2008.

SU, S. W.; CHENG, C. F.; LIN, Y. C.; et al. Prenatal exposure of bupropion may enhance agitation, anxiety responses, and sensitivity to cocaine effects in adult mice. **The Chinese journal of physiology**. v. 50(1), p. 1-8, 2007.

TAYLOR, M. J.; RUDKIN, L.; BULLEMOR-DAY, P.; et al. Strategies for managing sexual dysfunction induced by antidepressant medication. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 31(5), 2013.

THASE, M.; CLAYTON, A.; HAIGHT, B.; et al. A double-blind comparison between bupropion XL and venlafaxine XR: Sexual functioning, antidepressant efficacy and tolerability. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. v. 26, p. 482–488, 2006.

The Bupropion Pregnancy Registry. Final report: 1 September 2007 through 31 March 2008, Wilmington, NC, 2008.

THYAGARAJAN, V.; ROBIN CLIFFORD, C.; WURST, K. E.; et al. Bupropion therapy in pregnancy and the occurrence of cardiovascular malformations in infants. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**. v. 21(11), p. 1240-2, 2012.

URRA, J. A.; VILLAROEL-ESPÍNDOLA, F.; COVARRUBIAS, A. A.; et al. Presence and function of dopamine transporter (DAT) in stallion sperm: dopamine modulates sperm motility and acrosomal integrity. **PLoS One**. v. 9(11):e112834, 2014.

VAN DER MADE, F.; BLEMERS, J.; YASSEM, W. E.; et al. The influence of testosterone combined with a PDE5-inhibitor on cognitive, affective, and physiological sexual functioning in women suffering from sexual dysfunction. **The Journal of Sexual Medicine**. v. 6, p.777–90, 2009.

VITALE, R.; FAWCETT, D. W.; DYM, M. The normal development of the blood–testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. **The Anatomical Record**. v.176, p. 331–344, 1973.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**. v. 130(1), p. 15-28, 2005.

WEIHS, K.; HOUSER, T.; BATEY, S.; et al.. Continuation phase treatment with bupropion SR effectively decreases the risk for relapse of depression. **Biological Psychiatry**. v. 51, p. 753–761, 2002.

WEINBAUER, G. F.; LUETJENS, C. M.; SIMONI, M.; et al. Physiology of Testicular Function. **Andrology**. p. 11-59. 2010.

WEISS, G.; HECHTMAN, L.; MILROY, T.; et al. Psychiatric status of hyperactives as adults: a controlled prospective 15-year follow-up of 63 hyperactive children. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. v. 24(2), p. 211-20, 1998.

WELSH, C. J.; DOYON, S. Seizure induced by insufflation of bupropion. **The New England Journal of Medicine**. v. 347(12), p. 951, 2002.

WERNEKE, U.; NORTHEY, S.; BHUGRA, D. Antidepressants and sexual dysfunction. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 114(6), p. 384-397, 2006.

WILENS, T.; HAIGHT, B. R.; HERRIGAN, J. P.; et al. Bupropion XL in Adults with ADHD: A Randomized, Placebo-Controlled Study. **Biological Psychiatry**. v. 57(7), p. 793–801, 2005.

WILENS, T.; PRINCE, J.; SPENCER, T.; et al. An Open Trial of Bupropion for the Treatment of Adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Bipolar Disorder. **Biological Psychiatry**. v. 54(1), p. 9–16, 2003.

WILENS, T. E.; SPENCER, T. J.; BIEDERMAN, J.; et al. A controlled clinical trial of bupropion for attention deficit hyperactivity disorder in adults. **American Journal of Psychiatry**. v. 158(2), p. 282–288, 2001.

WILENS, T. E.; SPENCER, T. J. Understanding attention-deficit/hyperactivity disorder from childhood to adulthood. **Postgraduate Medical Journal**. v. 122(5), p. 97-109, 2010.

WILENS, T. E.; VITULANO, M.; UPADHYAYA, H.; et al. Cigarette smoking associated with attention deficit hyperactivity disorder. **Journal of Pediatrics**. v. 153(3), p.414–419, 2008.

WILLIAMS, V. S.; EDIN, H. M.; HOGUE, S. L.; FEHNEL, S. E.; et al. Prevalence and impact of antidepressant-associated sexual dysfunction in three European countries: replication in across-sectional patient survey. **Journal of Psychopharmacology**. v. 24(4), p. 489-496, 2010.

WRIGHT, G.; GALLOWAY, L.; KIM, J.; et al. Bupropion in the long-term treatment of cyclic mood disorders: mood stabilizing effects. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 46, p. 22–25, 1985.

WOODWARD, P. J.; SOHAEY, R.; O'DONOGHUE, M. J.; et al. From the Archives of the AFIP: Tumors and Tumorlike Lesions of the Testis: Radiologic-Pathologic Correlation 1. **Radiographics**, v. 22(1), p. 189-216, 2002.

YATHAM, L. N.; KENNEDY, S. H.; PARIKH, S. V.; et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. **Bipolar Disorders**. v.15, p. 1–44, 2013.

YOON, G.; WESTERMEYER, J. Intranasal bupropion abuse case report. **The American Journal on Addictions**. v. 22, p. 180, 2013.

ZERNING, G.; DE WIT, H.; TELSER, S.; et al. Subjective effects of slow-release bupropion versus caffeine as determined in a quasi-naturalistic setting. **Pharmacology**. v. 70(4), p. 206-215, 2004.

ZIRKIN, B. R.; CHEN, H. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. **Biology of reproduction**, v. 63(4), p. 977-981, 2000.

8. ANEXO – Parecer do Comitê de  tica no Uso de Animais



OF. CIRC. CEUA Nº 120/2016

Londrina, 17 de Junho de 2016.

Prezada Pesquisadora,


Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da performance reprodutiva de camundongos expostos ao Cloridrato de Bupropiona durante a espermatogênese e dos possíveis efeitos teratogênicos e comportamentais na prole", protocolo CEUA nº 8722.2016.33, sob a responsabilidade de Maria José Sparça Salles, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em reunião realizada em **14/06/2016**.

O objetivo do projeto é verificar a toxicidade e as possíveis alterações na performance reprodutiva em camundongos machos expostos ao cloridrato de bupropiona, nas doses experimentais de 10, 20 e 40mg/Kg, durante a espermatogênese e avaliar a presença de malformações congênitas, o desenvolvimento pós natal e as alterações comportamentais na prole. Os machos serão distribuídos em 4 grupos experimentais sendo 3 grupos tratados e 1 grupo controle. Os grupos tratados receberão diariamente cloridrato de bupropiona nas doses de 10, 20 e 40mg/Kg, diluídos em salina estéril, por um período de 45 dias. Tanto os animais do grupo controle quanto os dos grupos tratados serão tratados por gavagem e pesados a cada 3 dias. O volume de solução de cloridrato de bupropiona administrada será ajustada a cada 3 dias de acordo com o peso dos animais. O grupo controle receberá apenas salina estéril sob o mesmo delineamento experimental. Após a eutanásia das fêmeas, as mesmas serão submetidas a laparotomia para remoção do útero e retirada de fetos e placentas. Os machos após a eutanásia serão submetidas à laparotomia e remoção e pesagem dos órgãos como coração, pulmão, fígado, rins, testículos e epidídimos. GI 1.

Vigência do Projeto	01/06/2016 a 31/06/2017
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	339 (113 Machos e 226 Fêmeas)
Peso/Idade	35g / Adulto
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Machos: Coração, pulmão, fígado, rins, testículos, epidídimo, sangue Fêmeas: Fetos, placenta e útero

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

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


Prof. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilma. Sra.

Prof. Dra. Maria José Sparça Salles

Coordenadora do Projeto

Departamento de Biologia Geral / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Biologia Geral e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas