Leonardo Wensing Fischer

EFEITO TARDIO DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO, INDUZIDO A PARTIR DA PERIPUBERDADE, SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS MACHOS ADULTOS, TRATADOS OU NÃO COM O ESCITALOPRAM, E O DESENVOLVIMENTO DA PROGÊNIE

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2023

Leonardo Wensing Fischer

EFEITO TARDIO DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO, INDUZIDO A PARTIR DA PERIPUBERDADE, SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS MACHOS ADULTOS, TRATADOS OU NÃO COM O ESCITALOPRAM, E O DESENVOLVIMENTO DA PROGÊNIE

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora:
Profa. Dra. Sandra Maria Miraglia Valdeolivas

Co-orientadora:
Profa. Dra. Samara Urban de Oliva

São Paulo
2023

Efeito tardio do estresse crônico moderado, induzido a partir da peripuberdade, sobre os parâmetros reprodutivos de ratos machos adultos, tratados ou não com escitalopram, e o desenvolvimento da progênie**.**

Leonardo Wensing Fischer. – São Paulo, 2023.

xxviii, 190 f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional

Título em inglês: Late effect of chronic mild stress, induced from peripuberty, on reproductive parameters of adult male rats, treated or not with escitalopram and the offspring development.

1. Estresse. 2. Escitalopram. 3. Espermatozoide. 4. Comportamento sexual. 5. Desenvolvimento fetal. 6. Estresse oxidativo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E GENÉTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

DISCIPLINA DE BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

Vice-Chefe do Departamento: Profa Dra Samara Urban de Oliva

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação: Profa Dra Isabel Cristina Céspedes

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação: Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

Chefe da Disciplina: Profa Dra Samara Urban de Oliva

Vice-Chefe da Disciplina: Profa Dra Sandra Maria Miraglia Valdeolivas

Leonardo Wensing Fischer

EFEITO TARDIO DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO, INDUZIDO A PARTIR DA PERIPUBERDADE, SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS MACHOS ADULTOS, TRATADOS OU NÃO COM O ESCITALOPRAM, E O DESENVOLVIMENTO DA PROGÊNIE

Banca Examinadora:

Presidente da Banca: Profa Dra Sandra Maria Miraglia Valdeolivas

---

Membro Titular interno e memória da qualificação: Profa Dra Estela Sasso Cerri

---

Membro Titular interno: Profa Dra Maria Christina Werneck de Avellar

---

Membro Titular externo: Prof Dr Wellerson Rodrigo Scarano

Membro Titular externo: Prof Dr Renato Borges Tesser

Membro Suplente interno e memória da qualificação: Profa Dra Fatima Kazue Okada

---

Membro Suplente externo: Prof Dr Sebastião Roberto Taboga

01/02/2023

A TRAJETÓRIA EM FORMA DE POEMAS

Poema 1: No meio do caminho

No meio do caminho tinha uma pedra
Tinha uma pedra no meio do caminho
Tinha uma pedra
No meio do caminho tinha uma pedra

Nunca me esquecerei desse acontecimento
Na vida de minhas retinas tão fatigadas
Nunca me esquecerei que no meio do caminho
Tinha uma pedra
Tinha uma pedra no meio do caminho
No meio do caminho tinha uma pedra.

Carlos Drummond de Andrade

Poema 2: Tem os que passam

Tem os que passam
e tudo se passa
com passos já passados
tem os que partem
da pedra ao vidro
deixam tudo partido

e tem, ainda bem,
os que deixam
a vaga impressão
de ter ficado

Alice Ruiz

Poema 3: Biografia do orvalho

A maior riqueza do homem é a sua incompletude.
Nesse ponto sou abastado.
Palavras que me aceitam como sou — eu não
aceito.
Não aguento ser apenas um sujeito que abre
portas, que puxa válvulas, que olha o relógio, que
compra pão às 6 horas da tarde, que vai lá fora,
que aponta lápis, que vê a uva etc. etc.
Perdoai.
Mas eu preciso ser Outros.
Eu penso renovar o homem usando borboletas.

Manoel de Barros

Poema 4: Incenso fosse música

Isso de querer
ser exatamente aquilo
que a gente é
ainda vai
nos levar além.

Paulo Leminski

DEDICATÓRIAS

Para minha mãe, **Hilda Regina Defrein Wensing Fischer**

15.04.1964 – 25.11.2014 (*in memoriam*)

"A ti, o eterno, sincero e inabalável amor que me motivou a continuar sem tua saudosa presença".

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meus pais, Clóvis e Hilda, por todo o suporte e amor que me proporcionaram desde sempre. Obrigado por terem me ensinado tanto com relação à ética, caráter, carinho, dedicação, esforço e amor. Muito obrigado por todo o investimento e incentivo que vocês depositaram em mim desde sempre: Sei que abriram mão de muitas coisas para proporcionarem o melhor; a minha eterna gratidão. Minha eterna "estrelinha", não ter você aqui em mais este grande momento é **muito** difícil, mas as nossas lembranças e o nosso amor me dão forças para seguir em frente e buscar os meus sonhos e objetivos.

Agradeço aos meus familiares que sempre estão me dando todo o apoio, suporte, carinho e amor; mesmo diante da distância física que tivemos ao longo destes últimos anos. Sou imensamente grato e feliz por tê-los em minha vida! Fico muito feliz em ver o quão unidos somos como família. Agradeço em especial aos meus avós, pois sempre foram inspirações maravilhosas na minha vida e no meu desenvolvimento como ser humano. A minha eterna gratidão a todos vocês.

Agradeço ao meu parceiro de vida, Rafael, que foi um dos grandes responsáveis por eu ter iniciado e finalizado esta trajetória. Sempre me dando suporte, conselhos, carinho e amor. Obrigado por toda a paciência e aprendizados, e por tornar tudo mais leve.

Agradecimento mais que especial, à minha querida orientadora Profa. Dra. Sandra Maria Miraglia Valdeolivas; que primeiramente, me aceitou como seu aluno dez dias antes da realização da prova de seleção da Pós-graduação, acreditando em mim sem nem me conhecer. Por todos os ensinamentos que obtive ao longo destes últimos anos; sempre me incentivando a ir além e a nunca ~~desistir~~. Por me proporcionar diferentes experiências no âmbito acadêmico e por sempre me orientar qual a melhor forma de seguir e tomar decisões. Por todas as nossas conversas, risadas, tangos, cantorias e diversões. O meu grande obrigado por todo seu respeito, sua paciência, seus conselhos, sua disponibilidade, seu suporte e carinho. Obrigado por manter o meu brilho nos olhos e a chama viva pela ciência e pesquisa mesmo em cenários não tão favoráveis, e por ser este exemplo de pessoa e profissional. Sandra, minha eterna gratidão por tudo!

À coorientadora Profa. Dra. Samara Urban de Oliva, pelos ensinamentos, por sua disponibilidade nos trabalhos experimentais, pelo seu incentivo, colaboração e apoio na elaboração deste trabalho.

Aos colegas que dividiram espaço comigo no laboratório durante o período de doutorado, em especial ao nosso grupo de pesquisa; por todos os ensinamentos, pelo suporte, pela paciência, parceria, pelas boas risadas e pela força que me forneceram nos meus

momentos de angústia e dificuldades. Agradecimento especial às colegas que se tornaram amigas: Joana, Marina, Talita e Aldilene.

À Profa Dra Camila Paccolla, que se tornou uma grande amiga e sempre compartilhando alegrias e angústias, dando suporte e, também pelos ótimos momentos. Obrigado por me mostrar cantinhos incríveis em São Paulo, por todas as risadas, pela parceria, pelas nossas gordices e pelo suporte na análise de imunohistoquímica. Um super obrigado por ter fornecido um espaço na sua casa no momento em que precisei, sou eternamente grato!

Aos meus amigos que me acompanharam nesta jornada, sempre me dando suporte, conselhos, força e carinho. É muito bom e importante ter vocês ao meu lado! Seria muito extenso escrever nome a nome aqui, mas saibam que eu guardo cada um no coração.

A todos os membros da Banca Examinadora da Qualificação e desta Banca de Defesa. Agradeço novamente pelo aceite em participarem e pelas contribuições nesta etapa acadêmica tão importante.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional e, também, a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que possibilitaram o meu desenvolvimento e crescimento como cientista e, também, como pessoa nestes últimos anos, os meus agradecimentos. Especialmente, eu agradeço à coordenadora do Programa, Profa. Dra. Isabel Céspedes, por todo seu apoio e sua compreensão, durante minha trajetória como aluno deste programa de pós-graduação. Agradeço à ex-coordenadora do Programa, Profa Dra Sintia Belangero, por todo o suporte fornecido durante o período da sua gestão, em especial, na transição do mestrado para o doutorado direto.

Ao Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME/São Paulo) pelo fornecimento dos animais os quais foram necessários para a realização desta pesquisa. Além disso, à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFESP (CEUA), que me trouxe muitos ensinamentos e aprendizados relativos à utilização de modelos animais na pesquisa com parcimônia e zelo.

À médica veterinária Márcia Olivato por todo o cuidado e monitoramento dos animais durante todo o período experimental.

Aos funcionários da Disciplina de Biologia do Desenvolvimento por todo o suporte fornecido durante o período, em especial à Zita Maria pela limpeza e manutenção do biotério e todo o carinho, bolos, pães e boas risadas.

À Profa Dra Vanessa Vendramini, que me auxiliou na avaliação do teste de fragmentação do DNA, por todo seu suporte e disponibilidade durante o uso do citômetro de fluxo.

À Profa Dra Maria Martha Bernardi por ter disponibilizado o espaço da Universidade Paulista (UNIP) para realização dos testes de comportamento sexual.

Agradeço ao Laboratório de Reprodução Humana da UNIFESP pelo suporte com o uso do microscópio de contraste de fase; ao Laboratório de Genética da UNIFESP pelo suporte com o uso do microscópio de fluorescência e, também, à Disciplina de Imunologia pelo fornecimento do citômetro de fluxo (FACSCanto II).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa (auxilio regular à pesquisa - processo nº 2019/08785-3), e pelo financiamento através de bolsa - categoria doutorado direto (processo nº 2019/11220-8).

A todos que me ajudaram nesta linda e nada fácil trajetória, a minha eterna gratidão! Afinal, não se faz ciência sozinho: "*Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes*" (Isaac Newton) e, também, exige muita perseverança: "O caminho do progresso não é rápido nem fácil" (Marie Curie).

Resumo

Introdução: A prevalência de depressão em adolescentes tem aumentado significativamente em todo o mundo. Escitalopram é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina aprovado para tratamento de transtornos psiquiátricos em crianças e adolescentes pela Food and Drugs Administration. **Objetivos:** Investigar os parâmetros espermáticos, o comportamento sexual e o desenvolvimento fetal de ratos adultos expostos ao estresse crônico moderado imprevisível (ECMI), desde a peripuberdade até a fase adulta, tratados ou não com escitalopram. **Materiais e métodos:** Cento e oito ratos machos foram distribuídos em quatro grupos: GE - submetidos a ECMI; Ge - Escitalopram (10 mg/kg, via gavagem); GEe - ECMI + ES; GC - Controle Sham. O protocolo para indução da depressão consistiu na exposição dos animais a nove estressores diferentes (um estressor/dia), aleatoriamente durante 8 semanas, desde a peripuberdade (41 dias pós-parto, dpp) até a idade adulta (97 dpp). O período de tratamento com escitalopram começou em 70 dpp e durou 4 semanas. A eutanásia foi realizada para coleta de material biológico aos 114 dpp. Foram avaliados parâmetros morfométricos e biométricos dos órgãos reprodutivos, parâmetros espermáticos qualitativos e quantitativos, análises de estresse oxidativo, dosagens hormonais, comportamento sexual, capacidade reprodutiva, malformações fetais e imunoexpressão de SIRT1 nos testículos, além da histopatologia testicular. **Resultados:** Foram observadas reduções da produção diária e da concentração de espermatozoides no epidídimo de ratos tratados e/ou submetidos ao ECMI. Esses grupos (Ge, GE, GEe) também apresentaram redução da: atividade mitocondrial; integridade acrossômica; compactação da cromatina espermática; motilidade e vitalidade dos espermatozoides, além de aumento da frequência de espermatozoides morfologicamente anormais. O tempo de trânsito espermático através do epidídimo foi significativamente maior nos ratos tratados com escitalopram (Ge, GEe). Não foram observadas diferenças quanto à fragmentação do DNA espermático. A peroxidação lipídica aumentou significativamente nos níveis epididimário (Ge, GE e GEe) e testicular (grupo GE). Animais estressados, tratados ou não com escitalopram, apresentaram redução na motivação sexual e nos níveis de testosterona. Os grupos Ge, GE e GEe apresentaram maior percentual de túbulos seminíferos com alterações na histoarquitetura de seu epitélio e redução na imunoexpressão de SIRT1. Aumento de alterações esqueléticas na progênie também ocorreram nestes grupos. Animais estressados (GE) apresentaram queda nos parâmetros de fertilidade. **Conclusão:** ECMI, com ou sem o tratamento com escitalopram, causa: i) alterações do estado oxidativo no

espermatozoide e órgãos reprodutivos masculinos, piorando os parâmetros espermáticos qualitativos e quantitativos; ii) redução da motivação sexual e dos níveis de testosterona e iii) aumento na frequência das alterações esqueléticas fetais. O protocolo ECMI afeta a fertilidade masculina.

Palavras-chave: 1. Estresse. 2. Escitalopram. 3. Espermatozoide. 4. Comportamento sexual. 5. Desenvolvimento fetal. 6. Estresse oxidativo

Abstract

Background: The prevalence of depression in adolescents has significantly increased worldwide. Escitalopram is a selective serotonin reuptake inhibitor approved for treatment of psychiatric disorders in children and adolescents by the Food and Drugs Administration. **Aims:** To investigate the sperm parameters, sexual behavior and development of the fetuses from the adult rats exposed to chronic mild stress (CMS), from peripuberty to adulthood, treated or not with escitalopram**. Materials and methods:** Hundred-eight male rats were distributed into four groups: GE - submitted to CMS; Ge - Escitalopram (10 mg / kg, via gavage); GEe - CMS + ES; GC - Sham Control. The induced depression protocol consisted of the exposure of the animals to nine different stressors (one stressor/day), randomly for 8 weeks, from peripuberty (41 days postpartum, dpp) to adulthood (97 dpp). Escitalopram treatment period started at 70 dpp and lasted 4 weeks. The euthanasia was performed for biological material collection at 114 dpp. Morphometric and biometric parameters of the reproductive organs, qualitative and quantitative sperm parameters, analyzes of oxidative stress, hormonal dosages, sexual behavior, reproductive capacity, fetal malformations and expression of SIRT1 in the testes were carried out. **Results:** A reduction of the sperm daily production and sperm concentration in the epididymis of rats treated and/or submitted to CMS were observed. These groups (Ge, GE, GEe) also showed reduction of the mitochondrial activity; acrosome integrity; sperm chromatin compaction; sperm motility and vitality, besides an increased frequency of morphologically abnormal sperm. Sperm transit time through the epididymis was significantly higher in the escitalopram-treated rats (Ge, GEe). No differences were observed regarding the sperm DNA fragmentation. Lipid peroxidation increased significantly at epididymal (Ge, GE, and GEe) and testicular levels (GE group). Stressed animals, treated or not with escitalopram, presented a reduction in the sexual motivation and testosterone levels. The Ge, GE and GEe groups showed a higher percentage of seminiferous tubule sections showing histoarchiteture alterations in their epithelium and reduction in SIRT1 expression, besides an increase of the skeleton alterations in the fetuses. Stressed animals (GE) showed a decrease in the fertility parameters. **Conclusion:** CMS, with or without escitalopram treatment, caused: i) changes in the oxidative status of the sperm and male reproductive organs, worsening qualitative and quantitative sperm parameters, ii) reduced sexual motivation and testosterone levels and iii) increased the frequency of fetal skeletal changes. The CMS protocol affects male fertility.

Key words: 1. Stress, 2. Escitalopram 3. Sperm 4. Sexual behavior 5. Fetuses development. 6. Oxidative stress

SUMÁRIO

A TRAJETÓRIA EM FORMA DE POEMAS.....vi
DEDICATÓRIAS.....ix
AGRADECIMENTOS.....xi
1 INTRODUÇÃO..... 1
1.1. Enunciado do problema..... 2
1.2. Justificativa..... 6
2 OBJETIVOS..... 8
2.1. Objetivos gerais..... 9
2.2. Objetivos específicos..... 9
3 MATERIAL & MÉTODOS..... 10
3.1. Comitê de Ética..... 11
3.2. Animais e Grupos..... 11
3.2.3. Modelo de depressão induzida por estresse crônico moderado imprevisível (ECMI)..... 13
3.2.4. Testes do nado Forçado (TNF) e avaliação do consumo de solução de sacarose 1%..... 14
3.3. Coleta e análise dos órgãos reprodutivos e das glândulas adrenais..... 16
3.4. Processamento de material testicular para análise em microscopia de luz..... 17
3.4.1. Análise histopatológica..... 17
3.4.2. Imunohistoquímica: imunomarcação da proteína SIRT1 no epitélio seminífero..... 18
3.4.3. Análise da imunomarcação de SIRT1 no epitélio seminífero..... 18
3.5. Avaliação Espermática Quantitativa..... 19
3.5.1. Contagem de espermátides no testículo e produção diária de espermatozoides 19
3.5.2. Contagem do número de espermatozoides e cálculo do trânsito dos espermatozoides no epidídimo..... 20
3.6. Análise espermática qualitativa..... 20
3.6.1. Avaliação da atividade mitocondrial de espermatozoides..... 20
3.6.2. Integridade do Acrossoma..... 21
3.6.3. Análise morfológica dos espermatozoides..... 21
3.6.4. Vitalidade espermática..... 22
3.6.5. Análise dos parâmetros de motilidade dos espermatozoides..... 22
3.6.6. Análise da estrutura da cromatina dos espermatozoides..... 23
a) Análise da fragmentação do DNA (Laranja de Acridina)..... 23
b) Análise da fragmentação do DNA (Ensaio Cometa)..... 24

c) Avaliação da protaminação da cromatina dos espermatozoides (Chromomycin A3 Assay) 24

d) Análise de compactação da cromatina do espermatozoide, pelo método Azul de Toluidina 25

e) Análise da fragmentação do DNA espermático (Kit Halomax) 26

4.0. Dosagem plasmática de testosterona e corticosterona 27

5.0. Análise de estresse oxidativo 28

5.0.1. Dosagem de peroxidação lipídica 28

5.0.2. Análise do nível de peroxidação lipídica em espermatozoides utilizando-se o marcador BODIPY 28

6.0. Acasalamentos, avaliação do comportamento sexual e da capacidade reprodutiva 29

6.0.1. Avaliação do comportamento sexual 29

6.0.2. Fertilidade e capacidade reprodutiva 32

7.0. Eutanásia, coleta e análise de fetos 33

7.1. Análise visceral dos fetos 34

7.2. Análise esquelética fetal 35

8.0. Análise estatística 36

9.0. Descarte de resíduos 36

4 RESULTADOS 37

4.1 Teste do Nado Forçado 38

4.2 Análise do consumo de solução de sacarose a 1% 39

4.3. Análise biométrica dos órgãos reprodutivos 39

4.4. Ganho de peso corpóreo 42

4.5. Peso das adrenais 43

4.6. Análise histopatológica testicular 44

4.7. Imunomarcação de SIRT1 no epitélio seminífero 47

4.8. Avaliação espermática quantitativa 49

4.9. Avaliação da atividade mitocondrial 51

4.10. Avaliação da integridade do acrossoma 53

4.11. Avaliação da morfologia espermática 54

4.12. Avaliação da vitalidade espermática 55

4.13. Avaliação da motilidade espermática 56

4.14. Análise da fragmentação do DNA espermático (Ensaio Laranja de Acridina - Citometria) 57

4.15. Análise da fragmentação do DNA espermático (Ensaio Laranja de Acridina - Fluorescência) 58

4.16. Análise da fragmentação do DNA espermático (Kit Halomax) 59

4.17. Avaliação da fragmentação do DNA espermático (Ensaio COMETA) 60

4.18. Avaliação da compactação da cromatina dos espermatozoides (Azul de Toluidina) 61

4.19. Avaliação da protaminação da cromatina dos espermatozoides (*Chromomycin A3*) 62

4.19. Dosagens plasmáticas hormonais: corticosterona e testosterona 63

4.20. Análise do nível de peroxidação lipídica em espermatozoides (BODIPY) 64

4.21. Dosagem de peroxidação lipídica (estresse oxidativo) no testículo e epidídimo 65

4.22. Avaliação do Comportamento Sexual 66

4.23. Avaliação da fertilidade e da capacidade reprodutiva 69

4.24. Avaliação de malformações fetais 72

5 DISCUSSÃO 80

6 CONCLUSÕES E COMENTÁRIO FINAL 102

7 REFERÊNCIAS 104

7.1 Lista de referências (ordem alfabética) 105

ANEXOS 133

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da EPM/UNIFESP 134

ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da EPM/UNIFESP (Prorrogação do prazo em decorrência do *upgrade* de mestrado para doutorado direto) 135

ANEXO 3 – Aprovação na proficiência em inglês (Cultura Inglesa) – Exame realizado 21/08/2019 136

ANEXO 4 – Manuscrito publicado dentro da área de atuação do orientador em revista indexada (o aluno como 1º autor e o orientador como último) 137

ANEXO 6 – Prêmio José Carlos Prates – Melhor apresentação oral na categoria Doutorado no XXI Congresso do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da UNIFESP/EPM (Referente à Tese de doutorado do aluno) 157

ANEXO 7 – Manuscritos publicados dentro da área de atuação do orientador em revista indexada (o aluno como coautor e a orientadora como última) 158

ANEXO 8 – Manuscrito publicado dentro da área onde o aluno e a orientadora encontram-se como coautores 161

ANEXO 9 – Certificado de participação como membro da Comissão de Mídias Sociais do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) 162

Lista de figuras

Figura 1. Esquema do desenho experimental realizado neste estudo.....12
Figura 2. Esquema mostrando os três tipos de movimentos analisados durante a realização do Teste de Nado Forçado (modificado de Cryan et al., 2002).....15
Figura 3. Esquema de cortes na análise visceral de fetos.....35
Figura 4 - Esquema ilustrando a ossificação de fetos de ratos.....36
Figura 5. Histogramas representando o tempo de imobilidade dos animais e fotografias representando o teste de nado forçado em diferentes idades.....38
Figura 6. Gráfico representando o consumo de sacarose.....39
Figura 7. Gráfico representando o ganho de peso corporal ao longo do experimento.....42
Figura 8. Histograma representando o peso das adrenais 43
Figura 9. Histograma representando a percentagem de seções de túbulos seminíferos com histoarquitetura normal.....44
Figura 10. Fotomicrografias representando as seções de túbulos seminíferos de ratos.....46
Figura 11. Fotomicrografias de seções testiculares submetidas à imunomarcação para proteína SIRT1 e de controle negativo.....48
Figura 12. Fotomicrografia de espermatozoides corados com DAB para análise da atividade mitocondrial 52
Figura 13. Histograma representando a porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro e fotomicrografias dos espermatozoides corados com PNA.....53
Figura 14. Box plot representando a porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas e fotomicrografias de alterações morfológicas encontradas.....54
Figura 15. Histograma representando a porcentagem de espermatozoides vivos.....55
Figura 16. Histogramas representando a fragmentação do DNA de espermatozoides em citômetro de fluxo utilizando-se a técnica de Laranja de Acridina.....57
Figura 17. Histogramas representando a fragmentação do DNA de espermatozoides em microscopia de epifluorescência utilizando-se a técnica de Laranja de Acridina.....58
Figura 18. Histograma representando a porcentagem de espermatozoides mostrando fragmentação do DNA e fotomicrografias de espermatozoides corados com Kit Halomax.....59

Figura 19. Fotomicrografias de espermatozoides corados com solução de brometo de etídeo após a realização do ensaio COMETA 60
Figura 20. Histograma representando a porcentagem de espermatozoides com cromatina alterada pelo método Azul de Toluidina.....61
Figura 21. Análise da protaminação de espermatozoides nos grupos GC, Ge, GE e GEe. Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de múltipla.....62
Figura 22. Histogramas representando os níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona.....63
Figura 23. Box plot representando a peroxidação lipídica de espermatozoides.....64
Figura 24. Histogramas representando a concentração de malondialdeído (MDA) no testículo e nas regiões da cabeça+corpo e cauda epididimárias.....65
Figura 25. Fotografias mostrando alterações encontradas na avaliação da capacidade reprodutiva com 20 dias gestacionais.....70
Figura 26. Fotografias mostrando as alterações externas, viscerais e esqueléticas encontradas durante as avaliações fetais.....77-79

Lista de quadros

Quadro 1- Um exemplo de estressores aplicados no período de nove dias para indução de estresse crônico moderado e imprevisível 14

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros biométricos dos órgãos reprodutivos masculinos.....41
Tabela 2. Porcentagem de seções de túbulos seminíferos com descamação de células germinativas para o interior do lúmen e vacuolização intraepitelial.....45
Tabela 3. Densidade de volume da imunomarcação positiva para SIRT1 no epitélio seminífero.....47
Tabela 4. Parâmetros espermáticos quantitativos.....50
Tabela 5. Dados da atividade mitocondrial.....51
Tabela 6. Dados da motilidade dos espermatozoides.....56
Tabela 7. Dados da fragmentação do DNA espermático pelo ensaio Cometa.....60
Tabela 8. Percentagem de animais que apresentaram comportamento sexual.....67
Tabela 9. Dados do acasalamento e comportamento sexual.....68
Tabela 10. Dados dos parâmetros reprodutivos em fêmeas controles, com 20 dias de gestação.....71
Tabela 11. Dados da análise externa dos fetos.....74
Tabela 12. Dados da análise esquelética dos fetos.....75
Tabela 13. Dados da análise visceral dos fetos.....76

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

5-HT - serotonina (5- hidroxitriptamina)

µm – Micrômetro

ANOVA - *One Way Analisys of Variance* (do inglês)

ATP – Adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*, do inglês)

CDC/NCHS - Centro de Controle e Prevenção de Doenças e o Centro Nacional de Estatísticas de Saúde dos EUA

CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia

CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP

CCO - Enzima citocromo C-oxidase

cm - Centímetros

CMA3 - Cromomicina A3

DAB - 3,3'-diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, do inglês)

DPP - Dias pós-parto

ECMI – Estresse crônico moderado imprevisível

ELISA – *Enzime-linked Immunosorbent Assay* (do inglês)

EROS - Espécies reativas de oxigênio

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration* (do inglês)

FSH – Hormônio folículo estimulante (*follicle-stimulanting hormone*, do inglês)

GC – Grupo controle *sham*

Ge – Grupo escitalopram

GE – Grupo estresse

GEe – Grupo estresse + escitalopram

GSH - Enzima glutationa redutase

HBSS – *Hank´s balanced salt solution* (do inglês)

HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HPG - Eixo hipotálamo-hipófise-gônada

HPS - Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal

IFD - Índice de fragmentação do DNA

ISRS - Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

kg – Quilograma

l - Litro

LH – Hormônio luteinizante (*luteinizing hormone*, do inglês)

MDA – Malondialdeído

mg - Miligramas

mm – Milímetros

Mmol – Milimol

miRNAs – MicroRNAs (*small single-stranded non-coding RNA molecule*, do inglês)

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

ng - Nanogramas

nm – Nanômetros

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAS - Ácido periódico-reativo de Shiff

PAS + H - Ácido periódico-reativo de Shiff com contracoloração pela Hematoxilina de Harris

PBS - *Phosphate-buffered saline* (do inglês)

PDE - Produção diária de espermatozoides

pg - Picogramas

PNA - *Peanut agglutinin* (do inglês)

PUFAs - Ácidos graxos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*, do inglês)

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, do inglês)

RPM - Rotações por minuto

SIRT1 – Sirtuína 1

SNC - Sistema Nervoso Central

SNK - *Student-Newman-Keuls* (do inglês)

TAG - Transtorno de ansiedade generalizada

TB - Azul de toluidina (*toluidine blue*, do inglês)

TBARS - Reação com ácido tiobarbitúrico

TDAH - Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade

TDM - Transtorno depressivo maior

TNF – Teste do nado forçado

TOC - Transtorno obsessivo-compulsivo

UI - Unidades internacionais

Vv - Densidade de volume

1 INTRODUÇÃO

1.1. Enunciado do problema

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), depressão é atualmente um dos principais problemas de saúde no mundo afetando cerca de 280 milhões de pessoas (ZEGERS-HOCHSCHILD, 2009; OMS, 2021). Na América Latina, o Brasil lidera o ranking de prevalência de depressão, sendo, também, o segundo país com mais casos das Américas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A depressão, também, pode estar associada com comportamentos suicidas, representando a quarta maior causa de morte entre pessoas de 15 a 29 anos de idade (OMS, 2021). Além disso, após a pandemia de COVID-19, transtornos psiquiátricos como a depressão se tornaram mais evidentes, trazendo, então, maior preocupação em relação ao uso de medicamentos antidepressivos especialmente em jovens adultos (CHEN et al., 2020).

Tratamentos com antidepressivos e antipsicóticos são amplamente utilizados, em curto e longo prazo, para controle de depressão, de transtornos causados pelo autismo, como também na terapia de crianças e adultos que apresentem atraso no desenvolvimento neurológico (ERDEMIR *et al*., 2014). Dentre os agentes mais utilizados na prática psiquiátrica estão os inibidores da monoamina oxidase, os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), os inibidores de captação de serotonina e noradrenalina, os inibidores seletivos de captação de noradrenalina e dopamina, os noradrenérgicos bem como os antidepressivos serotoninérgicos e benzodiazepínicos. Todos constituem conjuntos de drogas, as quais podem ser prescritas quer de forma isolada quer de forma combinada (SHEEHAN & MAO, 2003).

Em crianças e adolescentes, o transtorno depressivo maior (TDM) é um problema de saúde pública que requer gerenciamento baseado em evidências (FARLEY, 2005). Em adolescentes, as significativas morbidade e mortalidade, associadas à depressão têm sido motivo de preocupação, há algum tempo, já que o suicídio representa 12% da mortalidade neste grupo, tornando-se uma das principais causas de morte nesta faixa etária. De fato, adolescentes deprimidos têm apresentado uma taxa 14 vezes maior em tentativas de suicídio, ao longo da vida, quando comparados ao grupo de adolescentes não deprimidos (BIRMAHER *et al*., 1996). Além disto, a taxa de recorrência para transtorno depressivo maior (TDM) neste grupo, dentro de um período de 5 anos, tem sido mencionada estar em torno de 70% (WEISSMAN *et al*., 1999)

Estudos epidemiológicos mostram que, muitas vezes, depressão e ansiedade ocorrem durante os anos reprodutivos, a partir dos 20 anos (WIEGNER *et al*., 2015). Em se

tratando de pacientes adolescentes com depressão, diferentes opções de tratamento clínico estão disponíveis as quais incluem várias formas de psicoterapia, gerenciamento médico isolado ou uma combinação de ambas as abordagens. Apesar do sucesso da psicoterapia na população de pacientes com depressão ou com transtornos psiquiátricos que incluam sintomas depressivos (CURRY, 2001), ênfase substancial tem sido dada à pesquisa relacionada ao tratamento farmacológico, com base em resultados bem-sucedidos, mas que foram obtidos a partir de pacientes adultos. O uso de antidepressivos em crianças e adolescentes foi aprovado pelo órgão regulador dos Estado Unidos da América (EUA), *Food and Drug Administration – FDA*, para tratar transtornos depressivos maiores (TDM), transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e enurese. Quatro inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs) dentre eles o escitalopram que é usado para tratamento em Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC) e Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) em adolescentes, possuem indicações aprovadas pelo FDA na população pediátrica. Em 2009, o escitalopram foi aprovado para tratamento agudo e de manutenção de TDM em pacientes adolescentes com idades entre 12 e 17 anos (EMSLIE *et al*., 2009).

As drogas do tipo ISRSs, dentre as quais se classifica o escitalopram, são frequentemente prescritas e seu uso está diretamente ligado à frequência da desordem mental, observada em 6-18% da população (PIRRAGLIA *et al*., 2003; CARRASCO & SANDNER, 2005; CHON *et al*., 2017). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças e o Centro Nacional de Estatísticas de Saúde dos EUA (CDC / NCHS) relataram que, de acordo com dados de 2007-2008, 4,8% dos adolescentes receberam tratamento com antidepressivos neste mesmo país (GU *et al*., 2010).

O papel da serotonina na etiologia de uma série de distúrbios psiquiátricos, como ansiedade e depressão é bem conhecido. Ela está presente em quantidades significativas em muitas estruturas do Sistema Nervoso Central (SNC) e tem papel na regulação de uma ampla variedade de funções fisiológicas e na secreção de hormônios, inclusive aqueles relacionados à reprodução (AYALA, 2009). Os ISRSs aumentam a quantidade de serotonina nas fendas sinápticas por inibição das bombas de recaptação de serotonina (HAY & WADSWORTH, 1982). Pesquisas apontam que a serotonina pode ter papel tanto inibitório como facilitador na modulação da secreção de gonadotrofinas (MOGUILEVSKY *et al*., 1985; JUSTO *et al*., 1989; SHISHKINA & DYGALO, 2000; ARAGÓN *et al*., 2005). Alterações nos neurônios serotonérgicos, causados por medicamentos, são bem caracterizadas. No entanto, pouco se sabe, a partir de modelos experimentais que utilizam animais, a respeito das consequências reprodutivas de tais

alterações e sobre as relações dos efeitos destes medicamentos na transmissão serotoninérgica cerebral com os mecanismos neuroendócrinos, os quais modulam eventos reprodutivos, tais como a secreção de gonadotrofinas, espermatogênese e o comportamento sexual (AYALA, 2009). De acordo com Gonzales *et al*. (1992) e Parisi *et al*. (1984), a perda ou excesso de serotonina pode levar a deterioração dos parâmetros espermáticos. Serotonina desempenha um importante papel na modulação da secreção de gonadotrofinas como também na maturação sexual em ratos machos (MOGUILEVSKY *et al*., 1985; JUSTO *et al*. 1989; SHISKINA & DYGALO, 2000).

Conforme já mencionado, depressão e ansiedade muitas vezes ocorrem durante os anos reprodutivos (WIEGNER *et al*., 2015). Assim, embora os tratamentos medicamentosos para a depressão em geral melhorem sintomas depressivos, efeitos adversos desses medicamentos podem ocorrer, incluindo alterações dos órgãos reprodutivos e da função sexual (CASPAR *et al*.,1985; ROSEN *et al*., 1999; NUSIER, 2007; SAFARINEJAD, 2008; TANRIKUT *et al*., 2010; RELWANI *et al*., 2011; ILGIN *et al*., 2017; ROBOON *et al*., 2017). ISRSs são também indicados para tratamento de ejaculação precoce (HATZIMOURATIDIS *et al*., 2010), como é o caso da sertralina, paroxetina, fluoxetina e do escitalopram sendo utilizados na prática urológica (HELLSTROM, 2011). Koyuncu e colaboradores (2011) observaram alterações seminais em pacientes com ejaculação precoce, os quais foram tratados com escitalopram. Em estudo experimental *in vitro* em que se diluiu separadamente paroxetina, sertralina e citalopram, em diferentes amostras de sêmen humano, para subsequente análise sob um microscópio de luz, observou-se redução de motilidade e de viabilidade dessas células, sugerindo uma ação espermicida, a qual poderia ser atribuída à possível interação de drogas deste grupo com a membrana celular do espermatozoide e também a uma possível ação destas sobre a membrana interna mitocondrial, o que provocaria a inibição da síntese de ATP (KUMAR *et al*., 2006).

Resultado semelhante foi observado em outro estudo *in vitro* (TANRIKUT & SCHLEGEL, 2007). Tanrikut e Schlegel (2007), por sua vez, observaram casos de oligoastenospermia transitória em dois pacientes depressivos que haviam tomado citalopram e sertralina por mais de 6 meses, mas que, entretanto, demonstraram melhora significativa nos parâmetros seminais dentro de algumas semanas após a descontinuidade do uso dos ISRSs. No que se refere à integridade do DNA, Safarinejad e colaboradores (2008) observaram um aumento do dano ao DNA do espermatozoide em pacientes depressivos que já estavam recebendo diferentes tipos de ISRSs. Damberg *et al*. (2000) também observaram, em ratos, danos e fragmentação no DNA, porém em neurônios

cerebrais, os quais foram desencadeados por aumento do estresse oxidativo, após o uso crônico de citalopram.

Há poucos trabalhos a respeito do impacto de drogas antidepressivas, em particular dos ISRSs, sobre a reprodução masculina, utilizando modelo animal de estresse crônico moderado imprevisível (RODGERS *et al.*, 2013; SAKR *et al.*, 2015; ROBOON *et al.*, 2017). Além disto, dados existentes sobre parâmetros espermáticos de pacientes deprimidos são em geral fragmentados (SAFANIREJAD *et al*., 2008; TANRIKUT *et al*., 2010; ELNAZER & BALDWIN, 2014). São ainda mais escassas, informações a respeito do impacto destes tratamentos medicamentosos sobre a reprodução masculina, em longo prazo, com ênfase na produção e na qualidade espermática, quando aplicados a partir da infância e da adolescência. Estudos experimentais concernentes à extensão dos efeitos negativos do tratamento crônico com escitalopram sobre a integridade do DNA e a estrutura da cromatina de espermatozoides, são praticamente inexistentes. Também não há dados sobre as repercussões finais de tratamentos com ISRSs, em particular com o escitalopram, sobre a fertilidade e a capacidade reprodutiva (taxas de implantação e perdas embrionárias), como também sobre a viabilidade e o desenvolvimento da progênie de pacientes ou animais de experimentação, que receberam estes tratamentos respectivamente desde a pré-puberdade ou a partir da adolescência ou peripuberdade.

Por outro lado, tanto estresse como depressão; estão associados a alterações do sistema reprodutivo via interação com os eixos hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HPS) e hipotálamo-hipófise-gônada (HPG) (SWAAB *et al*., 2005). O estresse psicológico pode reduzir principalmente o nível sérico de testosterona total, resultando em secundário aumento dos níveis séricos de LH e FSH e alteração da qualidade seminal (BHONGADE *et al.,* 2015). Outro aspecto importante é que modelos experimentais utilizando roedores indicam a ocorrência da transmissão de experiências paternas à prole através de “marcas” epigenéticas do espermatozoide (CARONE *et al*., 2010; GUERRERO-BOSAGNA *et al*., 2010; NG *et al*., 2010; DIETZ *et al*., 2011; VASSOLER *et al*., 2013). Em outras palavras, o estilo de vida e a exposição paterna a diferentes fatores, ao longo da vida, pode induzir à reprogramação epigenética das células germinativas e causar, na prole, um impacto na regulação do eixo de estresse Hipotálamo-Pituitária-Adrenal - HPA (RODGERS *et al*., 2013). Ainda que espermatozoides não apresentem o maquinário necessário para a remodelação da cromatina, as alterações de histonas como também dos padrões de metilação e de algumas populações de RNA dos espermatozoides podem indicar que respostas hereditárias estariam ocorrendo durante a espermatogênese frente à exposição

a fatores ambientais e à experiência de vida paterna (GODMANN *et al.*, 2009; SKINNER & GUERRERO-BOSAGNA, 2009; RODGERS *et al*., 2013).

As sirtuínas são proteínas altamente expressas em diferentes tipos de células germinativas, atuando positivamente sobre a reprodução masculina, uma vez que provavelmente funcionam como facilitadores no acondicionamento normal da cromatina e no desenvolvimento dos espermatozoides morfologicamente normais (BELL *et al*., 2014). A perda da expressão de SIRT1 interrompe a transição de histona para protamina (protaminação), a qual ocorre durante a espermiogênese. Como o estresse crônico pode alterar mecanismos epigenéticos e, também, levar marcas epigenéticas para a prole, resolveu-se investigar a expressão desta proteína nos testículos. Desta forma, propomos uma análise de parâmetros reprodutivos de animais adultos expostos ao ECMI a partir da peripuberdade, os quais foram tratados ou não com o escitalopram, um ISRS amplamente utilizado em distúrbios neuropsiquiátricos, não somente em indivíduos adultos, mas também em crianças e adolescentes.

Com base no exposto, este trabalho investigou os efeitos do estresse moderado crônico sobre os parâmetros reprodutivos de ratos adultos sexualmente maduros, os quais foram submetidos aos protocolos de estresse a partir da peripuberdade e tratados com escitalopram a partir da fase adulta jovem. Além disto, também foram investigados, em longo prazo, o impacto da exposição ao ECMI, aliado ou não ao tratamento com escitalopram, sobre a estrutura da cromatina, a fragmentação do DNA bem como sobre a fertilidade, o comportamento sexual, a capacidade reprodutiva e a progênie.

1.2. Justificativa

Na sociedade moderna, o estresse está intimamente relacionado às disfunções mentais e pode induzir depressão e ansiedade. O rato é um modelo reconhecido e largamente utilizado em estudos que versam sobre toxicologia reprodutiva (RUSSEL, 1990). O uso do modelo de indução de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), em ratos, como uma abordagem pré-clínica de depressão, tem sido também amplamente explorado para investigação das psicopatologias induzidas pelo meio ambiente (KAFFMAN & KRYSTAL, 2012; YANG *et al*., 2015; HUI *et al*., 2016).

A serotonina é necessária para a espermatogênese normal em ratos sexualmente imaturos e tem papel modulador na secreção de gonadotrofinas (MOGUILEVSKY *et al.,* 1985; JUSTO *et al*., 1989; SHISHKINA, DYGALO, 2000). Tratamentos com ISRSs podem ocorrer durante a fase de adolescência e puberdade dos pacientes e pouco se sabe

sobre possíveis danos espermáticos quantitativos e qualitativos nestes pacientes, quando adultos, bem como sobre suas consequências futuras para a fertilidade e a viabilidade de suas proles. Dados obtidos a partir de triagens clínicas têm apontado para o papel dos ISRSs em anormalidades do sêmen. Contudo ainda não foi possível obter dados oriundos de triagens clínicas mais amplas que tenham estabelecido uma ligação definitiva entre ISRS e infertilidade masculina no que concerne não só à capacidade fertilizante do espermatozoide, mas também ao índice de sucesso no desenvolvimento de gestações (BREZINA *et al*., 2012). Embora alguns poucos dados, tanto experimentais (NUSIER *et al*., 2007) como também em humanos (SAFARINEJAD, 2008; TANRIKUT *et al*., 2010; KOYUNCU *et al*., 2012), apontem para ação danosa de ISRSs sobre parâmetros reprodutivos, há escassez ainda maior de dados, nestes casos, informando sobre sucesso de fecundação, da implantação e da viabilidade fetal, de modo que esta pode ser uma área de amplo interesse (RIGGIN & KOREN, 2015), considerando o aumento do número de pacientes jovens em idade reprodutiva, e até mesmo adolescentes, que fazem uso destes medicamentos.

Outro aspecto não menos importante; é o estresse psicológico, que pode desencadear alteração da qualidade seminal (BHONGADE *et al*., 2015) e o fato de que exposição masculina ao estresse, tanto durante a puberdade quanto na fase adulta, pode causar reprogramação de células germinativas, resultando na transmissão, para a prole, de fenótipo de desregulação do eixo de estresse hipotálamo-hipófise-adrenal (RODGERS *et al*., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Utilizando o rato Wistar como modelo experimental, esta pesquisa teve por objetivo principal avaliar os parâmetros espermáticos quantitativos e qualitativos, o desempenho e comportamento sexual, a fertilidade e a capacidade reprodutiva (na fase adulta) dos animais expostos ao ECMI, a partir da peripuberdade e durante um período completo de espermatogênese, os quais foram ou não tratados com o escitalopram a partir da fase adulta jovem.

2.2. Objetivos específicos

Com o intuito de aprofundar os estudos sobre os efeitos do estresse e/ou do escitalopram sobre a reprodução de ratos adultos, propôs-se:

1- Realizar uma avaliação histopatológica dos testículos;
2- Realizar a contagem do número de espermátides na etapa 19 no testículo e calcular a produção diária de espermatozoides;
3- Calcular a concentração dos espermatozoides no segmento da cauda epididimária e o tempo de trânsito espermático;
4- Avaliar os níveis hormonais plasmáticos de testosterona e corticosterona;
5- Avaliar os níveis de fragmentação do DNA espermático bem como a estrutura e a protaminação da cromatina dos espermatozoides;
6- Avaliar a integridade do acrossoma e funcionalidade das mitocôndrias dos espermatozoides;
7- Avaliar a viabilidade, motilidade e morfologia dos espermatozoides;
8- Avaliar a peroxidação lipídica em nível testicular e epididimário;
9- Avaliar a capacidade reprodutiva dos animais na fase adulta e o comportamento sexual dos mesmos;
10- Avaliar o efeito paterno sobre malformações fetais externas e internas.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP (CEUA) em 2018, protocolado sob o nº 6763010218. Todos as normas exigidas pelo Comitê de Ética foram seguidas, incluindo o monitoramento periódico dos animais por uma veterinária responsável, Marcia Carolina Millán Olivato.

3.2. Animais e Grupos

Para este estudo foram utilizados 108 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) em peripuberdade (40 dias de idade) pertencentes à linhagem *Wistar*. Estes animais foram obtidos através do acasalamento de matrizes, sendo 15 machos e 30 fêmeas, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O acasalamento ocorreu sempre ao anoitecer. Na manhã seguinte, foi realizado o teste de prenhez (até as 8:00 horas da manhã), através da verificação da presença de espermatozoides no esfregaço de epitélio vaginal. Uma vez constatada a positividade do teste, o dia da realização do mesmo correspondeu ao primeiro dia de gestação (WITSCHI, 1962). As proles obtidas foram acondicionadas no biotério setorial da Disciplina da Biologia do Desenvolvimento, em gaiolas plásticas (40 x 30 x 15 cm), sob maravalha e em condições padronizadas de temperatura (22-23ºC), higiene, alimentação e luminosidade (12 horas de luminosidade /12 horas de escuridão). Água e ração (Nuvilab CR-1 irradiada, Empresa Nuvital) foram livremente ofertadas, excetuando-se em dias específicos de acordo com a descrição do item 2 (**Tabela 1**). O desmame dos filhotes ocorreu aos 22 dias de idade.

Para a realização da análise da capacidade reprodutiva e do comportamento sexual dos ratos machos, foram utilizadas 80 fêmeas adultas (em média, 2 fêmeas para cada macho), também fornecidas pelo CEDEME e acondicionadas no biotério setorial da Disciplina da Biologia do Desenvolvimento sob as mesmas condições padronizadas de temperatura, higiene, alimentação e luminosidade.

Aos 41 dias pós-parto (DPP), na peripuberdade, os animais foram divididos em 4 grupos:

a) Grupo **GE**, submetido ao estresse crônico moderado imprevisível (ECMI). Para este grupo, os procedimentos foram realizados de acordo com a descrição do item **3.2.3**.

b) Grupo **Ge,** tratado com o escitalopram (Oxalato de Escitalopram, Medley), um ISRS, na dose adaptada para ratos de 10 mg/kg/dia (KOYUNCU *et al.*, 2011; YANG *et al.*,

2015); o medicamento foi administrado por gavagem, utilizando-se, para tanto, agulha apropriada de aço inox BD-12 (cânula com diâmetro 1,2mm, com esfera 2,3mm, raio de 40mm, comprimento de 54mm). Desta forma, a dose de 10mg/kg de escitalopram foi administrada, por 4 semanas (28 dias), no horário entre 9 e 10 horas da manhã. Na semana subsequente (quinta semana a partir do início da indução do ECMI), os animais receberam metade da dose (5 mg/kg), por 3 dias consecutivos e 2,5 mg por mais dois dias, com o objetivo de retirar o medicamento de forma não abrupta, mas gradual, de acordo com o recomendado pelo fabricante, evitando possíveis sintomas indesejáveis ocorridos devido à descontinuação abrupta. Desta forma, o tratamento com escitalopram prolongou-se por 33 dias consecutivos, conforme explicado no item 2.3 subsequente.

c) Grupo **GEe,** submetido ao ECMI e ao tratamento com o escitalopram, um ISRS, de acordo com os procedimentos mencionados previamente.

d) Grupo Controle (**GC**): O procedimento de gavagem também foi realizado neste grupo, por 33 dias, porém utilizando-se água filtrada.

Antes do início dos experimentos, aos 40 dias de idade (antes do início da submissão dos ratos machos aos estressores), todos os animais foram submetidos aos testes de nado forçado (TNF) e de consumo de solução de sacarose 1%, conforme descrito no item 2.4. O teste do nado forçado também foi realizado aos 69 dias (24 horas antes do início do tratamento com escitalopram), e aos 99 dias de idade (24 horas após o fim da submissão dos animais aos estressores). Além disso, o teste de consumo de sacarose 1% foi realizado nas idades de 39, 55, 69, 83 e 97 dias. O esquema resumindo o desenho experimental está apresentado na **Figura 1**.

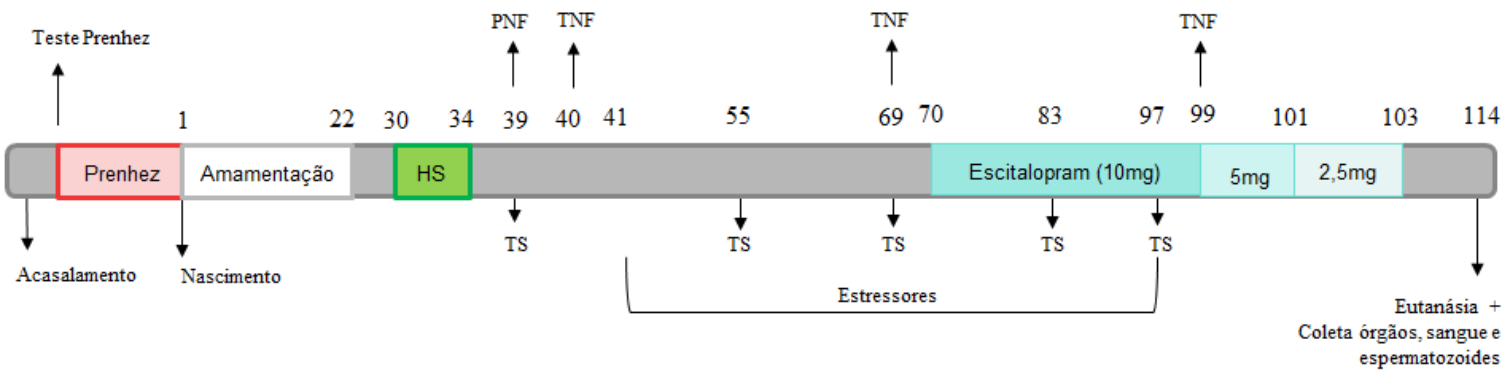


Figura 1. Esquema do desenho experimental realizado neste estudo, exibindo a idade em que cada animal foi submetido aos testes de validação do estresse, ao estresse crônico e/ou ao tratamento com escitalopram até o momento da eutanásia e a idade das coletas. **Legenda:** HS: Habituação de sacarose 1,5% (5 dias); PNF: Pré-teste de Nado Forçado (10 min); TNF: Teste do Nado Forçado (5 min); TS: Teste de consumo de sacarose 1% (24 hrs)

3.2.3. Modelo de depressão induzida por estresse crônico moderado imprevisível (ECMI)

O ECMI, em roedores, é um modelo utilizado para simulação da depressão clínica induzida pelo estresse crônico ambiental. No modelo de depressão induzida por estresse crônico moderado imprevisível, a exposição dos animais a diversos tipos de agentes estressores induz o desenvolvimento de comportamentos similares ao depressivo, similar ao de pacientes com transtornos psiquiátricos, tais como anedonia, alterações no sono, diminuição dos comportamentos sexuais e da atividade locomotora (MONTGOMERY *et al*., 2001; MCARTHUR & BORSINI, 2006; CHRISTENSEN *et al*., 2011; YILMAZ *et al*., 2011; ABELAIRA *et al*., 2013). Os animais submetidos ao protocolo de ECMI exibem aumento nos níveis de corticosterona e no peso da glândula suprarrenal, alterações em concentrações plasmáticas de lipídeos e proteínas, diminuição na atividade de enzimas antioxidantes e aumento de citocinas pró-inflamatórias (LUCCA *et al*., 2009). Além disso, o modelo vem se mostrando efetivo em estudos que avaliam o efeito antidepressivo do escitalopram (MONTGOMERY *et al*., 2001; CHRISTENSEN *et al*., 2011; YILMAZ *et al*., 2011).

Os procedimentos de indução de ECMI duraram 8 semanas para cada animal. Desta forma, a indução ECMI foi iniciada nos grupos (GE, GEe) no 41º DPP e realizada por 56 dias consecutivos, garantindo um período de 53 dias, tempo de duração da espermatogênese no rato (HUCKINS, 1965). A validação da indução do estresse foi realizada em 3 momentos, por meio do teste do nado forçado, a primeira aos 40 dias de idade (um dia antes do início da submissão dos ratos machos aos estressores), a segunda aos 69 dias (24 horas antes do início do tratamento com escitalopram), e a última aos 99 dias de idade (24 horas após o fim da submissão dos animais aos estressores) de acordo com os testes descritos no item **3.2.4**. Após 4 semanas (28 dias completos e consecutivos de indução de ECMI), teve início, aos 70º DPP, o tratamento com escitalopram que foi mantido por 33 dias, portanto, concluído no 103º DPP. A eutanásia dos animais de todos os grupos ocorreu no 114º DPP, ou seja, 17 dias após o término do experimento referente à indução do ECMI (97º DPP) e 11 dias após o término do tratamento com o escitalopram (103º DPP). O período entre o fim dos tratamentos e a realização da eutanásia (17 dias) foi assim considerado com o intuito de melhor avaliar o efeito crônico do estresse, eliminando-se, neste caso, uma possível influência direta de um único estressor sobre os parâmetros avaliados, em especial, sobre aqueles referentes ao comportamento sexual dos animais. O protocolo experimental para indução do ECMI que foi utilizado, baseou-se

nos trabalhos de Katz *et al*. (1981); Gamaro *et al*. (2003); Jayatissa *et al*. (2006); Hamani *et al*., 2012; Rodgers *et al*., (2013); Wilner (2017). Nove diferentes estressores (de acordo com o **Quadro 1**) foram administrados de maneira randomizada, um por dia, consecutivamente por 8 semanas. A ordem dos nove estressores variou durante cada semana, sem que houvesse a mesma sequência de estressores em cada semana. A duração de 56 dias para indução do estresse, por abranger um período completo de espermatogênese no rato (53 dias, segundo HUCKINS, 1965) tem, por objetivo, possibilitar a exposição das células da linhagem germinativa ao estresse, em todas as fases de maturação. Os estressores foram selecionados de modo aos animais não se habituarem com eles e, também, de maneira a não induzir dor ou influenciar diretamente, no ganho de peso.

Quadro 1- Protocolo para indução de estresse crônico moderado e imprevisível

	ESTRESSOR	**DURAÇÃO**
1	Confinamento em tubo cilíndrico com tamanho e largura de acordo com tamanho do animal	60 min
2	Novo objeto (8 bolinhas de gude com tamanho e cores semelhantes)	Durante a noite
3	Isolamento social	24hrs
4	Maravalha molhada	Durante a noite (200 mL água/100g maravalha)
5	Cheiro de predador (1:5,000 - 2,4,5-trimethylthiazole; Acros Organics)	60 min
6	Mudanças múltiplas de caixas	3x/dia
7	Privação de comida	13 hrs- Semanas alternadas com privação de água
8	Privação de água	13 hrs - Semanas alternadas com privação de comida
9	Privação de sono (um período de contínua escuridão na fase clara)	24 hrs

3.2.4. Testes do nado Forçado (TNF) e avaliação do consumo de solução de sacarose 1%

Os ratos foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF), antes do início dos experimentos (aos 40º DDP), antes do início do tratamento com o medicamento escitalopram (aos 69º DDP) e aos 99º DPP (após vinte e quatro horas de descanso decorrentes da exposição ao último agente estressor). O TNF é o modelo mais usado para a avaliação do efeito antidepressivo de drogas, podendo também ser usado para verificar a presença do comportamento similar à depressão, em ratos (SLATTERY & CRYAN,

2012). Ele foi proposto inicialmente por Porsolt e colaboradores (1977), e é extensivamente utilizado para avaliação do *status* depressivo do animal, quantificado pelo período de imobilidade, sendo diretamente proporcional à sua intensidade de anedonia (SLATTERY & CRYAN, 2012). Os ratos foram inseridos individualmente dentro de um cilindro de acrílico com uma profundidade de 30 cm contendo água a 25±1°C, sendo incapazes de escapar ou tocar no fundo do recipiente (SLATTERY & CRYAN, 2012; YANKELEVITCH-YAHAV *et al*., 2015). Vinte e quatro horas antes do teste, os animais foram submetidos ao pré-teste de nado forçado para reconhecimento e adaptação, houve uma modificação no tempo do pré-teste que, originalmente, consistia em 15 minutos. No entanto, os animais eram muito jovens e pequenos e não conseguiram completar o tempo de 15 minutos. Portanto, padronizou-se o tempo de pré-teste para um total de 10 minutos; tendo em vista que não foram encontrados dados na literatura sobre este teste nesta faixa etária (40 DPP). No dia seguinte, os ratos foram submetidos ao teste individualmente, por um período de 5 minutos o qual foi registrado com o auxílio de uma câmera de filmagem. Após o teste, cada animal foi seco e colocado na sua respectiva gaiola.

Os comportamentos dos animais foram registrados na forma de vídeos e posteriormente analisados, classificados e quantificados (**Figura 2**) durante os 300 segundos de teste, de acordo com Cryan e colaboradores (2002), através do Software X-PloRat Versão 2005 em:

a) Imobilidade: o animal permanece imóvel ou apresenta somente movimentos suficientes para manter a cabeça fora da água;

b) Escalada: o animal movimenta rapidamente as patas dianteiras verticalmente, geralmente ao longo das paredes do recipiente;

c) Nado: o animal movimenta rapidamente as patas dianteiras horizontalmente (com ou sem deslocamento pela água)

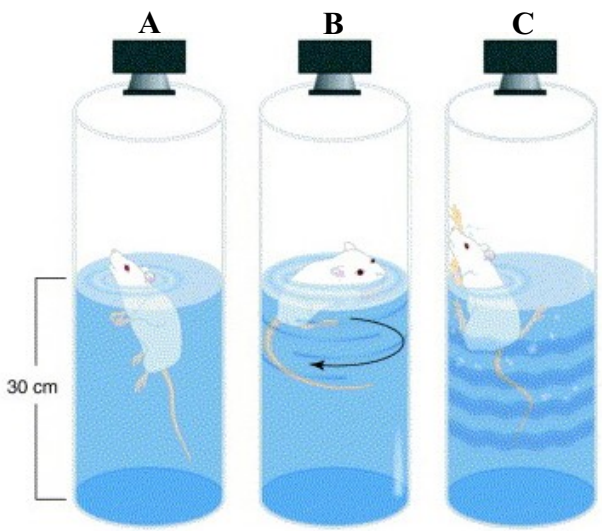


Figura 2 – Esquema mostrando os três tipos de movimentos analisados durante a realização do Teste de Nado Forçado. Sendo A: imobilidade, B: nado e C: escalada. Fonte: Imagem retirada e modificada de Cryan et al., 2002.

Um teste adicional também foi utilizado para avaliação do ECMI, para investigação de anedonia, através da medida do consumo de solução de sacarose 1% (STREKALOVA *et al*., 2004; HENNINGCEN *et al*., 2009; SAKR *et al*., 2015). Antes da realização do teste de sacarose e do início dos experimentos, os animais de todos os grupos foram habituados, do ponto de vista do paladar, ao consumo da solução de sacarose a partir do 30º DPP até o 34º DPP, ou seja, por 5 dias. O teste de ingestão de sacarose foi realizado aos 39º DDP (48 horas antes do início do experimento), 55º DDP, 69º DDP, 83º DDP e aos 97º DDP (modificado de STREKALOVA *et al*. 2004; SAKR *et al*., 2015). Durante este teste, foram ofertadas por 24 hrs, para livre escolha, duas garrafas: uma delas com solução de sacarose 1% e outra apenas contendo água filtrada, colocadas em lados distintos da gaiola. Para evitar possíveis efeitos da preferência lateral no comportamento de beber, a posição das garrafas foi trocada após 12 horas. Privações de água e comida não foram aplicadas antes do teste. O consumo de água e solução de sacarose foram avaliados simultaneamente em grupos controles e experimentais através da pesagem das garrafas (STREKALOVA *et al*., 2004) antes e após o teste. A ingestão de sacarose foi calculada como uma quantidade de sacarose consumida em ml. Ratos do grupo Controle também foram igualmente submetidos ao teste. Os pesos corporais de todos os animais foram acompanhados regularmente ao longo dos experimentos para avaliação de ganho de peso corpóreo.

3.3. Coleta e análise dos órgãos reprodutivos e das glândulas adrenais

Os ratos machos foram submetidos à eutanásia, de acordo com os procedimentos experimentais e com a finalidade a que se destinam, incluindo as matrizes (ratos machos e fêmeas) que, após serem disponibilizadas para outros acasalamentos e formação dos grupos experimentais, também sofreram eutanásia. Os animais destinados aos grupos experimentais foram submetidos à eutanásia aos 114 DPP, na fase adulta, para análises espermáticas e dos órgãos reprodutores. Nesta idade já há a produção diária máxima de espermatozoides no testículo, bem como há máxima concentração de espermatozoides na cauda do epidídimo (ROBB *et al*., 1978). No dia da eutanásia, os animais receberam uma

injeção intraperitoneal de heparina (Clexane ®, 100UI/Kg de peso corpóreo) para realização da coleta sanguínea. Transcorridos 15 minutos, os animais receberam injeção intraperitonial de cetamina (na dose de 240 mg/Kg de peso corpóreo) a qual foi associada ao Cloridato de xilazina (miorrelaxante de ação central, na dose de 24 mg/Kg, via intraperitoneal). Esta é a dose letal indicada que deve ser 3 vezes maior que a dose anestésica: 80 mg/Kg de cetamina + 8 mg/Kg de xilazina. Foi coletado o sangue de cada animal através da incisão transversal na veia cava inferior (OLIVA & MIRAGLIA, 2009). Os testículos e epidídimos foram rapidamente coletados, pesados em balança semi-analítica (Marte - Modelo AS 1000) e reservados para as análises subsequentes. Além dos testículos e epidídimos, foram coletadas as próstatas, as vesículas seminais e as glândulas adrenais, para obtenção dos pesos.

3.4. Processamento de material testicular para análise em microscopia de luz

3.4.1. Análise histopatológica

Fragmentos dos testículos direitos foram fixados por imersão, em solução fixadora de Bouin, por 24 a 48 horas. Ao término deste período, os fragmentos foram lavados inicialmente em água destilada, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Dois cortes transversais não consecutivos (10 cortes transversais de mesma espessura separando cada um) de fragmentos testiculares (por animal), com espessura de 4μm, foram processados para avaliação histopatológica de acordo com os procedimentos de Oliva e Miraglia (2009). Para tanto, foram submetidos ao método histoquímico do ácido periódico-reativo de Shiff (PAS) com contracoloração pela Hematoxilina de Harris.

Assim, duzentos cortes de túbulos seminíferos, tratados pelo método do PAS + H, foram analisados por animal (100 em cada seção testicular) de maneira aleatória e documentadas através de um sistema de análise de imagem computadorizado (Leica Qwin-V3; Leica-Cambridge, Reino Unido), acoplado a um microscópio de luz (Olympus Bx50). A análise foi realizada sob lente objetiva com ampliação de 20x e as imagens capturadas por meio de uma câmera digital conectada ao equipamento.

As seguintes alterações foram avaliadas: 1- presença de restos celulares no interior do lúmen e descamação de células da linhagem germinativa para o lúmen tubular; 2- vacuolização intraepitelial.

3.4.2. Imunohistoquímica: imunomarcação da proteína SIRT1 no epitélio seminífero

Para a análise imunohistoquímica, os testículos direitos foram fixados, por 24 horas, em solução de Bouin. Duas seções testiculares não consecutivas dos testículos incluídos em parafina, com espessura de 4 micrômetros e obtidas com intervalo de dez seções por animal (de mesma espessura entre cada uma) foram desparafinizadas e hidratadas. Os cortes foram imersos em tampão citrato (pH 6,0), submetidos à recuperação do antígeno em micro-ondas (500w) e lavados em tampão fosfato (PBS, pH= 7,4). Em seguida, para a inativação da peroxidase endógena, as lâminas contendo os cortes foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (3%) por 15 min e, em seguida, enxaguadas em PBS. Além disso, a fim de inibir coloração de fundo e bloquear ligação não específica, eles foram tratados com albumina de soro bovino (BSA) a 10%, durante 45 minutos. Assim, as seções foram incubadas com anticorpo primário anti-Sirtuin1 (SIRT1) (coelho anti-camundongo, Abcam, ab189494, número de lote GR3250046-134, Cambridge, EUA, 1: 4500), durante a noite e em câmara úmida, a 4º C (geladeira), com exceção do controle negativo. Após 3 lavagens em PBS, os cortes foram inicialmente incubados com o anticorpo secundário biotinilado (anti-coelho e anti-camundongo) e, sequencialmente, com estreptavidina-peroxidase (kit LSABK0690, DAKO - Carointeria, CA, EUA), por 10 min cada e enxaguados em PBS após cada etapa. Na sequência, foram tratados com 3,3- tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB-K3468, DAKO), em temperatura ambiente, por 1 min. A hematoxilina de Carraris foi usada para contracoloração.

Assim, 20 cortes de túbulos seminíferos foram analisados por animal de maneira aleatória e as imagens documentadas através de um sistema de análise de imagem computadorizado (Leica Qwin-V3; Leica-Cambridge, UK), acoplado a um microscópio de luz (Olympus Bx50). As células que apresentaram coloração marrom-clara e marrom-escura foram consideradas positivas.

3.4.3. Análise da imunomarcação de SIRT1 no epitélio seminífero

A avaliação da imunomarcação de SIRT1 no epitélio seminífero foi realizada de acordo com as seguintes análises: 1- quantitativa e 2- qualitativa. Para a análise quantitativa, obteve-se a densidade de volume do epitélio seminífero. A densidade de volume (Vv) é um parâmetro estereológico que caracteriza a ocupação relativa de

componentes específicos em um tecido ou órgão. De acordo com os princípios básicos da estereologia, a densidade de área dos perfis analisados (AA) é comparável à sua densidade de volume (Vv) e, portanto, apresenta uma interpretação equivalente (GUNDERSEN et al., 1988). Desta forma, dados sobre os volumes relativos de determinados tecidos analisados podem ser inferidos a partir das medições das suas áreas calculadas. Assim, para obter o Vv para a proteína SIRT1 no epitélio seminífero, foram delineadas as áreas imunomarcadas cujas imagens foram capturadas, utilizando-se um sistema de análise de imagem (Leica Qwin-V3, Leica), acoplado a um microscópio de luz (Olympus BX-50). Como resultado, o Vv foi calculado pela razão entre a área total, no epitélio seminífero, a qual era imuno-positiva (Ae+) para a expressão de SIRT1 e a área total do epitélio seminífero (At) que foi analisada (Ae+/At) (STUMPP et al., 2006; PACCOLA e MIRAGLIA, 2016; VAZ et al., 2020). Foram examinadas duas seções testiculares distintas por animal e vinte campos, por seção, para cada animal. A imunoexpressão de SIRT1, referente à análise estereológica, foi avaliada apenas na área do epitélio seminífero. Para a análise qualitativa, a imunoexpressão de SIRT1 foi avaliada em relação à presença e intensidade da imunomarcação em todos os tipos de células do epitélio seminífero, ou seja, em células da linhagem germinativa e células de Sertoli, como também no tecido intersticial.

3.5. Avaliação Espermática Quantitativa

Os testículos e os epidídimos esquerdos dos animais foram destinados para análise espermática quantitativa, e congelados a -20°C, quando coletados, no dia da eutanásia.

3.5.1. Contagem de espermátides no testículo e produção diária de espermatozoides

Os testículos esquerdos, previamente pesados e congelados imediatamente após a coleta a -20ºC, foram descongelados, descapsulados e homogeneizados, segundo o método descrito por Robb e colaboradores (1978). Após o descongelamento do testículo, foi retirada sua túnica albugínea, de modo que o tecido testicular possa ser colocado em um tubo plástico, ao qual foram acrescidos 5 ml de uma mistura de 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton X100 para, em seguida, proceder-se à homogeneização com o auxílio do homogeneizador Quimis Q-252K-28, em velocidade de 12.000 rpm. Após diluir-se 10 vezes uma pequena amostra desta mistura contendo Triton X100, esta foi transferida para

câmaras de Neubauer (5 campos por animal), procedendo-se à contagem das espermátides em etapa 19 da espermiogênese, as quais são resistentes a homogeneização. Para o cálculo da produção diária de espermatozoides (PDE), a concentração de espermatozoides por testículo é dividida por 6.1, que é o número de dias em que as espermátides em etapa 19 permanecem presentes no epitélio seminífero destes animais (ROBB *et al*., 1978).

3.5.2. Contagem do número de espermatozoides e cálculo do trânsito dos espermatozoides no epidídimo

As porções epididimárias esquerdas, ou seja, cabeça+corpo e cauda foram separadas logo após a coleta e congeladas até o momento da homogeneização, conforme descrito para o testículo. Após diluir-se 20 vezes uma amostra destes homogeneizados, foi realizada a contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer para cada um destes segmentos. A média aritmética dos campos contados (OLIVA, MIRAGLIA, 2009) resulta no número de espermatozoides/órgão; este número é dividido pela PDE para obtenção do tempo de trânsito dos espermatozoides em dias, ou seja, o número de dias requeridos para que eles atravessem as diferentes porções epididimárias (ROBB *et al*., 1978). Os valores foram calculados em relação ao órgão e grama de órgão, os quais são respectivamente: valor absoluto e relativo.

3.6. Análise espermática qualitativa

Na época da eutanásia, conforme descrito no item 2.5, os animais tiveram os órgãos reprodutivos coletados. A cauda de cada epidídimo direito de parte dos animais foi colocada em PBS (*Phosphate-buffered saline*) e foram realizadas incisões suficientes para a liberação do conteúdo com os espermatozoides, deixando-se extravasar o fluido epididimário, por alguns minutos. Parte do fluido epididimário foi coletado e congelado a -80° C, ao passo que a outra parte foi usada nas análises a fresco.

3.6.1. Avaliação da atividade mitocondrial de espermatozoides

A atividade mitocondrial dos espermatozoides, colhidos da cauda dos epidídimos direitos de parte dos animais, foi avaliada pelo método descrito por Hrudka (1987), o qual demonstra a ação da enzima citocromo C-oxidase (CCO), uma das responsáveis pela respiração celular e pelo metabolismo energético das células. Este método baseia-se na

oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo C, que inclui a CCO. As amostras de fluido epididimário colhidas foram imediatamente incubadas com DAB, a 37º C, durante 60 minutos. A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada sob microscópio de contraste de fase – PH3 (Olympus BX-51TF); foram analisados para este escopo 200 espermatozoides para cada animal. A classificação da atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides obedece a escala de quatro classes (I a IV), proposta por Hrudka (1987): classe I (100% da peça intermediária corada – ativo; a bainha mitocondrial tem a aparência de um cilindro compacto e quase todas as mitocôndrias são ativas); classe II (mais de 50% da peça intermediária corada; bainha mitocondrial aparece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos); classe III (menos de 50% da peça intermediária corada; espermatozoides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas) e classe IV (ausência de coloração na bainha mitocondrial; espermatozoides completamente inativos) (CAVALCANTE *et al*., 2005; BLUMER *et al*., 2008).

3.6.2. Integridade do Acrossoma

A integridade do acrossoma foi avaliada através do método de coloração com *Peanut agglutinin* (PNA), de acordo com a técnica empregada por Varisli *et al*. (2009) com modificações. O PNA é uma proteína tetramérica com especificidade para resíduos do terminal β-galactose de glicoproteínas. Logo após a retirada dos epidídimos direitos, a porção caudal do órgão é isolada. Então, as caudas dos epidídimos direitos são colocadas em PBS (*Phosphate-buffered saline*), e são realizadas incisões suficientes para a liberação do conteúdo de espermatozoides, deixando-se extravasar o fluido epididimário, por alguns minutos. Foram quantificados e analisados, em microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse CI (Nikon) e com filtro apropriado, 200 espermatozoides por animal, classificados em: a) íntegros (espermatozoides exibindo fluorescência intensa e moderadamente brilhante na região do acrossoma) e b) não íntegros (espermatozoides apresentando fluorescência fraca, irregular ou ausente na região do acrossoma), de acordo com Varisli *et al*. (2009).

3.6.3. Análise morfológica dos espermatozoides

A avaliação morfológica dos espermatozoides constitui um importante parâmetro da análise espermática. Para este fim, foram realizados esfregaços utilizando espermatozoides colhidos da cauda dos epidídimos direitos no dia da eutanásia. Os esfregaços foram corados pelo método de Shorr (1941) e então, analisados através do microscópio de luz sob aumento de objetiva de 50 vezes; 200 espermatozoides são observados por animal. Os espermatozoides foram então classificados em normais e anormais e a frequência de anormalidades da cabeça, peça intermediária e da cauda, foram computadas de acordo com dados de Filler (1993) e Miranda-Spooner *et al*. (2016), quais sejam:

- Espermatozoides sem curvatura característica da cabeça;
- Espermatozoides sem cauda, ou seja, cabeças isoladas de espermatozoides;
- Espermatozoides com implantações angulares da peça intermediária;
- Espermatozoides com anormalidades da cauda: enrolada, encurvada, quebrada, isolada e com implantação irregular;

3.6.4. Vitalidade espermática

A vitalidade espermática foi avaliada por meio da utilização do corante eosina. Esta técnica baseia-se no fato de que células mortas apresentam membranas lesadas que permitem a penetração de corantes. Para a preparação dos esfregaços em lâminas histológicas, foram utilizados 10ul do corante (eosina 5%, diluída em solução fisiológica 0,9%) e amostras de 20ul de espermatozoides coletadas a partir da cauda epididimária direita de cada animal, conforme anteriormente descrito. Após a secagem dos esfregaços, foram analisados 200 espermatozoides, sob microscópio de luz, em aumento de objetiva de 50x (ASADI *et al*., 2013), computando-se os espermatozoides corados (mortos) e não corados (vivos).

3.6.5. Análise dos parâmetros de motilidade dos espermatozoides

Para a realização do estudo da motilidade, foi utilizada uma amostra de um microlitro do conteúdo espermático, retirada da cauda de epidídimos direitos, através de pequenas incisões feitas com bisturi (lâmina n°22) que permitiram o extravasamento do seu conteúdo. A amostra foi diluída em 40 microlitros de meio HBSS (diluição 1:40) e depositada em câmaras de Neubauer. Esta análise foi feita em tempo máximo de 60 minutos após a coleta. Foram determinados a quantidade de espermatozoides móveis

(progressivos e não progressivos) e imóveis. Foram contabilizados apenas os espermatozoides dispostos nos dois quadrantes externos da câmara de Neubauer, utilizando-se uma fórmula para obtenção da concentração final, em mililitros, de acordo com Keel & Karow (1980).

3.6.6. Análise da estrutura da cromatina dos espermatozoides

Para as análises da estrutura da cromatina dos espermatozoides a porção caudal do epidídimo foi isolada e limpa, retirando-se toda a camada de tecido adiposo ali presente. Então, a cauda do epidídimo foi colocada em solução de PBS e incisões suficientes foram realizadas, nesta porção do epidídimo, com a finalidade de liberação do conteúdo de espermatozoides. Em seguida, a solução de PBS contendo os espermatozoides foi filtrada (filtros de 100μm), lavada em solução hipotônica (0,45% NaCl) e, então, os espermatozoides foram ressuspendidos em PBS e imediatamente congelados a – 80ºC até o momento das análises, descritas a seguir:

a) Análise da fragmentação do DNA (Laranja de Acridina)

Com o intuito de avaliar a integridade da estrutura da cromatina dos espermatozoides, utilizou-se o método de análise de fragmentação de DNA conhecido como ensaio de Laranja de Acridina (Acridine Orange Assay) (VENDRAMINI et al., 2012), cuja metodologia, descrita por Evenson e colaboradores (1991; 1999; 2002; 2005), consiste na susceptibilidade, que o DNA de espermatozoides, apresenta para sofrer desnaturação em pH extremamente baixo, com subsequente exposição a uma solução de coloração contendo o corante laranja de acridina (Acridine Orange – AO) o que foi aquilatado através de leitura, em tempo real, em um citômetro de fluxo. Os citogramas e histogramas foram analisados por meio de um sistema computadorizado específico. Ao final, os dados gerados pela leitura por citometria de fluxo foram lançados no programa Winlist 7.0 (Verity software House – Verity Software, Topsham, Me) para definir: (1) o Índice de fragmentação do DNA (IFD); (2): o desvio padrão do IFD e (3): a porcentagem de células fora da distribuição normal.

No dia da análise, as amostras foram devidamente descongeladas em banho-maria por 2 minutos, a 37ºC. Para o controle positivo do ensaio, uma amostra contendo espermatozoides de animal controle foi diluída em solução de peróxido de hidrogênio (7%), em temperatura ambiente por 10 min. Todas as amostras foram sonicadas, com um

sonicador ultrassônico, em dois ciclos de 30 segundos, com intervalo de 30 segundos entre os ciclos para, desta forma, separar-se a cabeça dos espermatozoides da porção correspondente à cauda dos mesmos. Visando preservar as amostras durante o processo de sonicação, as mesmas ficaram imersas em gelo para evitar o calor excessivo proveniente do equipamento. Na sequência, foram diluídos 200µL das amostras, contendo as cabeças e as caudas dos espermatozoides ($4x10^6$ cabeças/ml de PBS), em 400µL de solução de desnaturação (0,08N de HCL, 0,15m de NaCl, e 0,1% de Triton X-100, pH 1,4) contidas em tubos de 12x75mm, os quais foram incubados durante 30 segundos. Após a incubação, foram acrescentados 1,2 mL da solução de coloração de laranja de acridina (0,126M de Na2HPO4, 0,037M de tampão de ácido cítrico, 1mM de EDTA dissódico), acrescidos de 0,15 M de NaCl em pH 6,0 e contendo 6µg/mL de laranja de acridina (Merck/ Calbiochem-USA, Cotia, Brasil). Após o período de repouso desta solução, por 3 minutos e a 4°C, os espermatozoides, nela contidos foram analisados. Para cada amostra contendo os espermatozoides dos animais de cada grupo, foram analisados, no mínimo, 5.000 eventos (cabeças de espermatozoides).

b) Análise da fragmentação do DNA (Ensaio Cometa)

O ensaio cometa consiste na análise de células isoladas, diluídas em gel de agarose, expostas a pH alcalino, e submetidas à eletroforese horizontal. Este ensaio permite a observação da integridade das fitas de DNA álcali-lábeis, de maneira que fragmentações de fitas se deslocam do gel de agarose, formando um rastro de fragmentos que se assemelha a um cometa (SINGH *et al*., 1988). O ensaio foi realizado conforme protocolos previamente descritos para este tipo de análise em espermatozoides de roedores (HAINES *et al*., 2002; CODRIGNTON *et al*., 2004; VENDRAMINI *et al*., 2012). As análises foram realizadas sob microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse CI, acoplado ao sistema de análise de imagem específico para Ensaio Cometa (LUCIA Comet Assay, v.7.02.00, República Tcheca). Um total de 100 espermatozoides por lâmina (uma lâmina por animal) foram analisados, validando-se parâmetros de fragmentação do DNA (VENDRAMINI *et al*., 2012).

c) Avaliação da protaminação da cromatina dos espermatozoides (Chromomycin A3 Assay)

O protocolo utilizado para detecção da deficiência de protamina na cromatina dos espermatozoides foi baseado nos trabalhos de Bianchi *et al*., 1993 e Maselli *et al*., 2012

utilizando-se o corante Cromomicina A3 (CMA3). O CMA3 liga-se ao DNA nas regiões onde há deficiência de protaminas; assim, pode-se determinar os espermatozoides imaturos funcionalmente e com anomalias na estrutura da cromatina através da redução da protaminação, pela ligação do CMA3 ao DNA espermático (BIANCHI *et al*., 1993).

As amostras contendo espermatozoides foram descongeladas (em ambiente com gelo) e diluídas em PBS para uma concentração 10^5 células/mL. O corante Cromomicina A3 (CMA3) foi dissolvido em solução tampão McIlvaine (17ml de 0,1 mol/L ácido cítrico misturado com 83ml de 0,2 mol/L de Na2HPO4 e 10mmol/ L de MgCl2, pH 7,0) em uma concentração de 25mg/mL. As amostras com espermatozoides foram então incubadas com o CMA3 (230752; Calbiochem), no escuro, por 20 minutos a 25ºC, posteriormente lavadas duas vezes em PBS, sonicadas no gelo e armazenadas no escuro a 4ºC até o momento da análise. O controle positivo foi obtido com a pré-incubação dos espermatozoides em 200 mmol de ditiotreitol a 37ºC por 10 minutos (MASELLI *et al*., 2012). A análise do material foi realizada em citômetro de fluxo FACSCANTO II (BD Biosciences, São Paulo, Brasil). Um total de pelo menos 10.000 espermatozoides por amostra foi avaliado.

d) <u>Análise de compactação da cromatina do espermatozoide, pelo método Azul de Toluidina</u>

O método Azul de Toluidina (TB), também conhecido como "método de metacromasia induzida", baseia-se no tratamento ácido, com posterior coloração com TB, resultando em grande variedade de tonalidades nas cabeças dos espermatozoides, de acordo com a disponibilidade de grupos fosfato no DNA, não ligados à cromatina; assim, eles estariam acessíveis para se ligarem às moléculas desse corante (BELETTI, 1992). Portanto, esse teste é baseado na afinidade da TB com os grupos fosfato livres do DNA de espermatozoides, com baixa compactação e protaminação. O teste de TB é amplamente utilizado para análise da compactação da cromatina espermática devido à sua coloração de execução simples e por ser replicável (SHAMSI et al., 2011). Portanto, é um bom marcador para avaliar a compactação da cromatina.

Esfregaços de espermatozoides foram fixados em etanol / acetona (1: 1) a 4ºC, por 30 min, e posteriormente secos em temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram expostas à hidrólise ácida (HCl 0,1N) a 4ºC, por 10 min. Em seguida, elas foram lavadas em água destilada (3x 1 min / cada) e imersas em solução de TB 0,05%, por 20

min. Em seguida, as lâminas foram rapidamente lavadas em água destilada e as lamínulas rapidamente colocadas posteriormente.

A análise dos espermatozoides foi realizada em microscópio de luz (Olympus BX-50) e foram analisados 200 espermatozoides por animal, os quais foram classificados de acordo com a coloração em: espermatozoides com cromatina intacta (coloração azul claro) e espermatozoides com cromatina não compactada (coloração azul escuro ou púrpura) (REZAKHANIHA et al., 2018).

e) <u>Análise da fragmentação do DNA espermático (Kit Halomax)</u>

As amostras congeladas contendo espermatozoides foram descongeladas e diluídas em PBS para obter uma concentração de $6x10^6$ células/mL. A análise da fragmentação do DNA espermático foi realizada utilizando-se o kit comercial Halomax, desenvolvido para rato (Rattus Norvegicus - kit Halomax® - HALOTECH DNA, SL. PCM-CLAID - Madri/Espanha). Na primeira etapa do procedimento, as alíquotas de espermatozoides foram processadas utilizando-se as lâminas fornecidas pelo kit, de acordo com as instruções do fabricante. Este teste baseia-se na dispersão da cromatina após exposição a uma solução de lise, conforme evidenciado pela formação de halos de cromatina. Assim, numa segunda fase, com o objetivo de evidenciar estes halos, as amostras foram coradas com o kit comercial para fluorescência verde (Halotech DNA SL). Em sequência, foram analisadas em microscópio de epifluorescência para determinar a percentagem de células com DNA intacto e danificado. Cem células foram avaliadas por animal, onde espermatozoides com DNA fragmentado mostraram halos largos enquanto aqueles sem DNA fragmentado mostraram halos pequenos e condensados. A porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado foi obtida por animal.

f) <u>Avaliação da estrutura da cromatina e integridade do DNA dos espermatozoides (Ensaio Laranja de Acridina)</u>

O fluido da cauda do epidídimo foi coletado e centrifugado (3000x g por 5 min), o sobrenadante removido e a amostra foi ressuspensa em PBS para obter uma concentração final de $5x10^6$ espermatozoides/mL. Alíquotas de 7µL foram utilizadas para a obtenção de esfregaços, os quais foram secos em temperatura ambiente, por 60 min e, em sequência, submersos por 12 h em solução de Carnoy (três partes de metanol para uma parte de ácido acético glacial), a 4°C, para fixação. Em seguida, foram secos em

temperatura ambiente e, em sequência, cobertos com 3 mL de solução de Laranja de Acridina. Esta solução foi obtida usando-se 10 mL (1g / mL) de Laranja de Acridina, 40 mL (0,1 M) de ácido cítrico e 2,5 mL (0,3 M) de fosfato dissódico (pH 2-3). Os esfregaços de espermatozoides foram mantidos no escuro por 15 min e depois cuidadosamente lavados em água destilada e cobertos com uma lamínula, antes da secagem. As lâminas obtidas foram analisadas utilizando-se microscopia de fluorescência com filtro azul de 460 nm. Duzentos espermatozoides foram contados por esfregaço/animal. As cabeças dos espermatozoides com fluorescência verde foram consideradas normais (cromatina íntegra), enquanto aquelas com fluorescência vermelha ou laranja foram consideradas anormais, com cromatina alterada (CELEGHINI et al., 2008).

4.0. Dosagem plasmática de testosterona e corticosterona

Aos 114º DDP, os animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais (n=10) receberam uma injeção intraperitoneal de heparina (Clexane ®, 0,1mg/100g de peso corpóreo) para realização da coleta sanguínea. Transcorridos 15 minutos, os animais receberam injeção intraperitonial de cetamina (na dose de 240 mg/Kg de peso corpóreo) a qual foi associada ao Cloridato de xilazina (miorrelaxante de ação central, na dose de 24 mg/Kg, via intraperitoneal). Esta é a dose letal indicada que deve ser 3 vezes maior que a dose anestésica: 80 mg/Kg de cetamina + 8 mg/Kg de xilazina, de acordo com a descrição do item 2.5; em seguida, o sangue foi coletado da veia cava inferior (OLIVA, MIRAGLIA, 2009). As amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos (Centrífuga refrigerada - Eppendorf, Centrifuge 5430 R); o plasma foi separado, congelado e armazenado a temperatura de – 20º C, para posterior análises das dosagens plasmáticas de corticosterona e testosterona, pelo método ELISA (DHANABALAN *et al*., 2010).

Os procedimentos para determinação dos níveis de corticosterona, no plasma, foram realizados utilizando-se Kit específico de ensaio imunoenzimático pelo método ELISA (Kit ELISA – *Enzime-linked Immunosorbent Assay*) (MARCON *et al*., 2008). Estes Kits empregam a técnica de inibição competitiva ensaio imunoenzimático (ELISA), a qual se baseia na correlação inversa entre o hormônio dosado e a concentração na amostra, por verificação da intensidade colorimétrica do ensaio (SARKAKI *et al*., 2009; DHANABALAN *et al*., 2010). Foi utilizado o Kit específico para corticosterona de rato (sensibilidade: 4,74 ng/ml) da marca *Uscn Life Science Inc*.

Os procedimentos para determinação dos níveis de testosterona, no plasma, foram realizados utilizando-se Kits específicos de ensaio imunoenzimático também pelo método ELISA (Kit ELISA – *Enzime-linked Immunosorbent Assay*) (MARCON *et al*., 2008). Foram utilizados os Kits específicos para testosterona de rato (sensibilidade: 159,5 pg/ml) da marca *Uscn Life Science Inc*.

5.0. Análise de estresse oxidativo

Para análise do estresse oxidativo, no dia da eutanásia, os testículos (descapsulados) e os epidídimos foram retirados; amostras de 0,1g destes órgãos foram congeladas em Freezer a -80°C. Posteriormente, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas em solução de KCl 1,15% para determinação de peroxidação lipídica (MDA – Malondialdeído).

5.0.1. Dosagem de peroxidação lipídica

Um dos produtos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), considerado um importante marcador do estresse oxidativo, de fácil mensuração através de uma reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) (MARNETT, 1999; BENEDETTI *et al.,* 2012). Para realização desta análise, foi utilizado o método descrito por Abd-Allah *et al*. (2009). Após o descongelamento do tecido testicular, o mesmo foi homogeneizado como anteriormente descrito e, em seguida, adicionados os seguintes reagentes ao homogeneizado testicular: 1,5 mL ácido acético (20%, pH 3.5), 0,2ml de dodecilsulfato de sódio (8,1%), 1,5ml de TBA (0,8%) e 0,7ml de água. Os tubos foram então agitados e incubados em banho-maria a 95°C, por 60 minutos. A medida de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax Plus384, Sunnyvale, CA, USA) a 523nm. As concentrações foram expressas em nmolar de malondialdeído/g de tecido.

5.0.2. Análise do nível de peroxidação lipídica em espermatozoides utilizando-se o marcador BODIPY

Métodos para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) consistem na mensuração indireta das mesmas, através da qual se quantifica a concentração de produtos resultantes da peroxidação lipídica, tais como o MDA (AYOUB,YOUSIF, AZIZ, 2000) e, mais recentemente, na marcação por sondas, como o

boron dipyrromethene difluoride (C11 BODIPY) (AITKEN *et al*., 2008). O BODIPY pode apresentar colorações fluorescentes diferentes as quais são caracterizadas nas faixas vermelhas e verdes, dependendo do nível de peroxidação lipídica. Desta forma, uma vez que se tenha a produção de EROS aumentada, a fluorescência passa da cor vermelha para a verde. As amostras previamente obtidas do fluido epididimário foram ajustadas para a concentração de 10^7 espermatozoides⁄mL em PBS. Para a avaliação fluorimétrica as amostras foram tratadas com C11 BODIPY 665/676 (B3932; Molecular Probe), a uma concentração final de 2 μM (a partir de alíquotas de 0,2 mM em DMSO) (DOMINGUEZ-REBOLLEDO *et al*., 2010). Transcorridos 30 minutos, os espermatozoides foram centrifugados a 300x g, por 10 minutos, em solução de PBS para retirar o excesso da sonda (BROUWERS & GADELLA, 2003). A avaliação da peroxidação lipídica nas membranas de espermatozoides foi realizada em citômetro de fluxo FACSCANTO II (BD Biosciences, São Paulo, Brasil) (NEILD *et al*., 2005; DOMINGUEZ-REBOLLEDO *et al*., 2010).

6.0. Acasalamentos, avaliação do comportamento sexual e da capacidade reprodutiva

Após o término dos tratamentos respectivos, aos 114º DPP, um mínimo de dez animais de cada grupo foi avaliado quanto ao comportamento sexual, em sala escura, com o auxílio de lâmpadas vermelhas de 40 watts e de sistema de filmagem, segundo protocolo adaptado de acordo com Agmo (1997). Convém salientar que os animais utilizados para os acasalamentos (destinados aos estudos do desempenho sexual, fertilidade e capacidade reprodutiva) também foram submetidos à eutanásia para coleta dos órgãos reprodutivos.

6.0.1. Avaliação do comportamento sexual

Cerca de 20 minutos antes do início da avaliação do comportamento sexual, as fêmeas que estavam em proestro/estro foram pareadas com machos vasectomizados (KLINEFELTER *et al.*, 1994; KEMPINAS *et al.*, 1998; SCARANO, 1999) para análise da receptividade, sendo permitidas a realização de algumas montas e observada a presença de postura de lordose nas ratas, indicando a receptividade sexual efetiva. Aquelas que apresentaram receptividade (com lordose) foram selecionadas para a avaliação do comportamento sexual dos ratos machos experimentais, enquanto as demais

foram novamente testadas e utilizadas nos dias subsequentes para a avaliação do comportamento sexual.

A vasectomia foi realizada em 5 ratos machos adultos, da linhagem Wistar, que foram anestesiados com xilazina (8 mg/Kg) e cetamina (80 mg/Kg), via intraperitoneal, por um período aproximado de 1 hora. A cirurgia foi realizada sob condições assépticas e com o auxílio de um *heat-pad*, permitindo a manutenção da temperatura corpórea dos animais durante e após a cirurgia. A área operada foi previamente submetida à tricotomia e, em sequência, desinfetada com solução de clorexidina degermante (Riohex 2%®). Os ductos deferentes de cada lado foram expostos, um de cada vez, através de uma incisão longitudinal (aproximadamente 8 a 10 mm de comprimento) na região inguinal correspondente. Os ductos deferentes direito e esquerdo foram ligados em duas regiões distintas. Assim, cada ducto foi duplamente ligado (não cortado) de modo que as ligaduras se posicionem a aproximadamente 5 mm de distância, uma da outra. Considerando que o diâmetro médio do deferente de um rato é de 1,2 mm e o lúmen é raramente superior a 0,4 mm, foram aplicados os princípios e os instrumentos de microcirurgia na realização da operação, utilizando-se lupa estereoscópica e fio de algodão 2-0 para realização das ligaduras. O primeiro ponto de ligadura foi fixado a cerca de 1,5 cm da extremidade do ducto na base da bexiga urinária, enquanto o segundo ponto foi fixado 0,5 cm a partir do primeiro. Após a realização das ligaduras, cada ducto foi seccionado, ou seja, dividido, por meio de uma incisão, entre os pontos ligados havendo, então, interrupção na via condutora de espermatozoides. Deste modo, o pequeno fragmento do ducto deferente entre as ligaduras foi removido. O fechamento da incisão foi realizado em dois planos, com sutura contínua, utilizando-se fios de "vicryl" 3-0 para a aponeurose e de "mononylon" 4-0 para pele. O cuidado pós-operatório foi realizado por meio do uso do analgésico cetoprofeno, não opioide, na dose de 5mg/Kg, administrado 2 vezes ao dia, durante 3 dias, através de via subcutânea. Os animais recém vasectomizados foram mantidos, por uma semana (7 dias), em gaiolas individuais de polipropileno catalogadas (30x20x19 cm). Após 3-4 semanas, os ratos vasectomizados foram liberados para o uso nos acasalamentos para seleção de fêmeas receptivas destinadas aos procedimentos de análise do comportamento sexual. Após o teste de receptividade de todas as fêmeas, os machos vasectomizados foram submetidos à eutanásia.

Para avaliação do comportamento sexual, os ratos foram individualmente colocados em caixa medindo 56x35x31 cm, desprovida de tampa para que ocorra a circulação de ar e com parede frontal de vidro, idealizada especialmente para a observação do comportamento sexual de ratos. Antes do início da avaliação, cada macho

foi introduzido na referida caixa por 5 minutos, para se adaptar ao novo ambiente. Logo em seguida, foi introduzida, na mesma caixa, uma fêmea primípara, em fase de pró-estro/ estro e apresentando receptividade. Os seguintes parâmetros comportamentais foram registrados:

a) presença ou não de monta nos primeiros 10 minutos iniciais do teste;

b) presença ou não de ejaculação subsequentes à observação da primeira monta;

c) latência para a primeira monta: tempo transcorrido até a primeira monta do macho sobre a fêmea a partir da introdução da fêmea na caixa de observação;

d) latência para a primeira intromissão: tempo decorrido até a primeira monta com intromissão vaginal computado a partir da introdução da fêmea na caixa de observação. A ocorrência da intromissão peniana será inferida pela presença conjunta dos seguintes sinais: monta com duração superior a 2 segundos, lordose (encurvamento característico do dorso) da fêmea, e limpeza da área genital do macho após a monta (*licking*).

e) latência para a primeira ejaculação: tempo decorrido até a primeira ejaculação computado desde a introdução da fêmea na caixa de observação. A ejaculação foi evidenciada pela observação de monta e intromissão, seguidas pelo levantar do tronco do macho e parada por alguns segundos, seguida do período refratário, ou seja, ausência de interesse sexual do macho nos minutos seguintes.

f) número de intromissões até a primeira ejaculação;

g) número de montas até a primeira ejaculação;

h) latência para a primeira monta pós-ejaculação: tempo computado entre a primeira ejaculação até a primeira monta pós-ejaculatória;

i) latência para a primeira intromissão pós-ejaculação: tempo decorrido desde a primeira ejaculação até a primeira intromissão pós-ejaculatória;

j) número de ejaculações após a primeira intromissão, observado por um período de 30 minutos;

k) número de montas pós-ejaculação: número de montas desde a primeira ejaculação até o final do tempo de observação;

l) número de intromissões pós-ejaculação: número de intromissões desde a primeira ejaculação até o final do tempo de observação.

As latências foram registradas com auxílio de cronômetros manuais e expressas em segundos. Os animais que não apresentaram monta nos 10 minutos iniciais de observação foram devolvidos às caixas originais e não foram testados novamente; porém eles foram mantidos com as respectivas fêmeas para garantir o acasalamento,

procedimento necessário para avaliação da capacidade reprodutiva e da fertilidade dos ratos machos.

Na manhã seguinte ao acasalamento, foram obtidos esfregaços de células do epitélio vaginal para a detecção da presença de espermatozoides. O dia em que o teste se apresentou positivo (presença de espermatozoides) foi considerado o primeiro dia do desenvolvimento embrionário (dia 1) (WITSCHI, 1962). As fêmeas prenhes foram separadas dos machos e a evolução da prenhez acompanhada. A partir da obtenção destes dados, os seguintes índices são calculados:

a) número total de montas durante o período total de observação:

b) frequência de montas por minuto: razão entre o número de montas e o tempo transcorrido entre a primeira monta e a primeira ejaculação;

c) Frequência de intromissões por minuto: a razão entre o número de intromissões e a latência para a primeira ejaculação;

d) Intervalo inter-intromissões: latência para a primeira ejaculação dividida pelo número de intromissões até a primeira ejaculação;

e) Eficiência copulatória (em %): número de intromissões dividido pelo número total de montas até a primeira ejaculação multiplicado por 100;

f) Índice de atividade sexual (IAS): será calculado para todos os animais avaliados, da seguinte forma:

IAS = {[Log (1/LPM) x t] + [Log(1/LPI) x t] + [Log (1/LE) x t] + √TM + e} 50

Onde: LPM = Latência para primeira monta; LPI = Latência para primeira intromissão; LPE = Latência para primeira ejaculação; √TM40 = Raiz quadrada do número total de montas e intromissões no tempo total de observação; t = tempo total de observação; e - "0" se o animal não ejacular e "4" se o animal ejacular`).

6.0.2. Fertilidade e capacidade reprodutiva

No 20º dia de gestação, as ratas prenhes (resultantes dos acasalamentos com os animais para avaliação do comportamento sexual) foram submetidas à eutanásia (cetamina na dose de 240 mg/Kg de peso corpóreo associada ao cloridrato de xilazina, miorrelaxante de ação central, na dose de 24 mg/Kg, via intraperitoneal), para a coleta do útero e dos ovários e para o registro do peso do útero com os fetos, do peso e análise macroscópica das placentas, do número de corpos lúteos, do número de sítios de implantação, da presença de reabsorções (precoces ou tardias), do número de fetos vivos ou mortos e do peso dos fetos para posterior determinação dos parâmetros relativos à

fertilidade, prenhez e sítios de implantação (COSTA-SILVA *et al*., 2007; VENDRAMINI *et al*., 2012), tais como:

a) Taxa de implantação = (Sítios de implantação/ nº de corpos lúteos) x 100;

b) Taxa de perdas pré-implantacionais = (nº de corpos lúteos – nº de implantações) / (nº de corpos lúteos) x 100;

c) Taxa de reabsorção = (nº de reabsorções / nº de implantações) x 100;

d) Taxa de perdas pós-implantacionais = (nº de implantações – nº de fetos vivos) / (nº de implantações) x 100;

e) Razão sexual = nº de fetos machos/ nº de fetos fêmeas;

f) Índice de fertilidade: nº de fetos vivos / total de fetos.

g) Índice placentário = (média peso placentário / média peso fetal);

Além disso, as placentas foram pesadas individualmente e, em seguida, foram obtidos os valores biométricos dos seguintes eixos: diâmetro maior, diâmetro menor e espessura (LEMOS et al., 2014; CHAREST et al., 2018; FURUKAWA et al., 2019).

7.0. Eutanásia, coleta e análise de fetos

No 20º dia de gestação, as ratas prenhes que foram acasaladas com os animais tratados, foram submetidas à eutanásia por superdosagem dos seguintes anestésicos associados: (Cetamina, 240 mg/Kg + Cloridrato de Xilazina, 24 mg/Kg, por via intraperitoneal). Embora o método de eutanásia utilizado nas fêmeas prenhes seja suficiente para promover o óbito dos fetos, por haver interrupção do suprimento sanguíneo para os mesmos, os fetos foram também submetidos à eutanásia, pois tivemos de exteriorizá-los individualmente. Desta forma, a consciência dos fetos (inconscientes antes do nascimento) seria desencadeada em razão do início da respiração (Guia_ Eutanásia – CEUA_UNIFESP, 2019). Portanto, os fetos exteriorizados individualmente foram rapidamente submetidos à eutanásia por meio da administração de sobredoses de Cetamina (240 mg/Kg) + Cloridrato e de Xilazina, (40 mg/Kg,) por via intraperitoneal, as mesmas aplicadas às fêmeas. Foi escolhido este tipo de eutanásia em vista da necessidade de obter-se fetos com o corpo íntegro para a análise das malformações externas e internas.

Em sequência, os fetos foram analisados externamente verificando a presença de malformações, isto é, analisando-se a forma, o tamanho, o número e a posição de estruturas craniofaciais, dos membros anteriores e posteriores, das regiões torácica, abdominal, pélvica, dorsal, ventral e caudal. Após a análise, os fetos de cada ninhada

foram separados aleatoriamente em dois grupos. Os fetos do primeiro grupo foram fixados em solução de Bodian e destinados à análise visceral, de acordo com a técnica de microdissecção, proposta por BARROW & TAYLOR (1969), com finalidade de estudar as regiões torácicas, abdominais e pélvicas; também foi utilizada uma adaptação dos cortes estratégicos propostos por WILSON (1965), com a finalidade de estudar-se a região da cabeça. O segundo grupo de fetos foi direcionado para a análise esquelética empregando-se a técnica descrita por STAPLES & SCHNELL (1964); as malformações foram denominadas e classificadas de acordo com SOLECKI *et al.* (2003) e PAUMGARTTEN *et al*. (2009).

7.1. Análise visceral dos fetos

Para a análise visceral das malformações fetais foram consideradas 3 grandes regiões: 1- cabeça, 2- tronco superior e 3- tronco inferior (**Figura 3).** A cabeça do feto foi analisada através da técnica de cortes proposta por WILSON (1965), com adaptações. O primeiro corte foi feito transversalmente na região da cavidade oral; a outra parte do crânio, a qual foi retirada, foi utilizada para o segundo, terceiro e quarto cortes frontais nas regiões pré-glabelar, orbital e vértex, respectivamente. Por meio destes cortes foi possível a análise do pólo cefálico, em seu terço superior onde foram observadas as órbitas e globos oculares, além do córtex e os hemisférios cerebrais; enquanto no pólo cefálico, em seu terço médio, foram avaliados o palato e as narinas.

A análise do pescoço e das regiões torácica, abdominal e pélvica foi realizada de acordo com a técnica de microdissecção proposta por BARROW & TAYLOR (1969). Inicialmente foi realizado um corte na região do pescoço onde foi possível analisar o posicionamento e a morfologia da traqueia, do esôfago e da medula espinal. Em seguida, foi feito um corte transversal no abdome superior, logo abaixo do diafragma, para retirada da porção superior do fígado com o fim de analisar-se a integridade da superfície inferior da cúpula diafragmática, os vasos supra-hepáticos, a passagem da aorta e da veia cava inferior. Após a remoção do diafragma, foi possível também visualizar sua superfície superior.

Posteriormente, foi realizada a toracotomia anterior que permitiu a análise do timo, dos pulmões e a disposição do coração. Subsequente à retirada do timo, dos lobos pulmonares e das aurículas do coração, foram avaliadas as dimensões e a disposição do coração e dos grandes vasos. Logo após, foi feita uma dissecção do coração através da realização de 02 cortes, separando ventrículo e átrio direitos, septo interventricular e

ventrículo e átrio esquerdos; desta forma, foi possível analisar a integridade das cavidades cardíacas e do septo interventricular, como também observar os grandes vasos e as valvas cardíacas.

Na cavidade abdominal foram observados os lobos hepáticos que, em sequência, foram retirados para melhor observação do estômago, das alças intestinais e do baço. Posteriormente foram retiradas as alças intestinais, juntamente com o estômago e o baço, para que se procedesse a análise das gônadas e das vias genitais internas. Foram também avaliados os rins, as glândulas suprarrenais e os ureteres. Em sequência, os rins foram retirados para realização de um corte transversal na região do hilo, com o intuito de avaliar-se a região da papila renal.

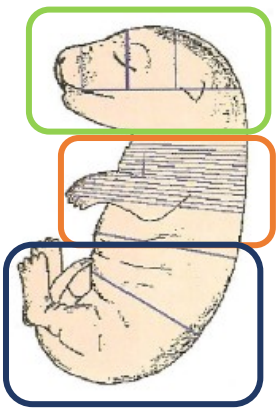


Figura 3 – Esquema de cortes propostos por Wilson (1965). Observam-se as regiões de análise: cabeça (verde), tronco superior (laranja) e tronco inferior (azul marinho).

7.2. Análise esquelética fetal

A análise esquelética dos fetos foi realizada segundo a técnica proposta por STAPLES & SCHNELL (1964), que se refere a, inicialmente, realizar a evisceração dos fetos e a retirada do tecido adiposo marrom, presente no dorso do feto. Posteriormente foi feita a diafanização dos tecidos moles utilizando solução de KOH 1%, durante 3 dias; em seguida, os fetos foram corados em uma nova solução de KOH 1% onde foi adicionado o corante alizarina red a partir da solução estoque (5mg/mL), onde os fetos permaneceram imersos por 2 a 3 dias. Finalizado este processo, os fetos foram armazenados em glicerina até o dia da análise.

Os fetos foram analisados utilizando-se um estereomicroscópio (LEICA modelo 125). Procedeu-se a avaliação dos mesmos no sentido crânio-caudal. Os ossos foram observados quanto à sua posição, forma, presença e ausência, como também quanto ao tamanho e o nível de calcificação (**Figura 4**). Foram, desta forma, avaliados: os ossos faciais e palatinos; os ossos dos membros anteriores (clavícula, escápula, úmero, ulna e

radio); as vértebras e costelas; e os ossos dos membros posteriores (ílio, ísquio, púbis, fêmur, fíbula e tíbia).

Em razão da idade gestacional em que os fetos foram coletados (20 dias) e, desta forma, considerando o estágio do desenvolvimento em que eles se encontravam, as falanges dos membros superiores e inferiores não puderam ser avaliadas, já que ainda não apresentavam calcificação.

Figura 4 - Esquema ilustrando a ossificação de fetos de ratos.

8.0. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico *SigmaPlot 12.0*. Para a comparação dos resultados obtidos dos diferentes grupos experimentais, utiliza-se o teste paramétrico de análise de variância (*One Way Analisys of Variance* -ANOVA). Quando as diferenças se mostraram significantes, foi empregado o teste "*a posteriori*" de comparações múltiplas de *Student-Newman-Keuls* (SNK). Por outro lado, os resultados que não apresentaram distribuição normal e similaridade de variância foram submetidos ao teste não-paramétrico de análise de variância de *Kruskal-Wallis*, com teste de *Dunn* "*a posteriori*". A análise estatística dos fetos foi realizada utilizando-se o programa estatístico *Graphpad Prism 9*. Para dados qualitativos e frequências, utilizou-se o teste do Qui-quadrado seguido, quando apropriado, pelo teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$ ou $p \leq 5\%$.

9.0. Descarte de resíduos

Os resíduos químicos e biológicos, bem como os materiais utilizados, foram armazenados e/ou descartados obedecendo as normas estabelecidas pela Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, para o gerenciamento correto dos mesmos.

4 RESULTADOS

4.1 Teste do Nado Forçado

O comportamento de imobilidade foi avaliado durante os testes de 5 minutos em três diferentes momentos de tratamento: 40, 69, 99 DPP **(Figura 5)** Aos 40 DPP (antes de iniciar o protocolo de estresse) não foram observadas diferenças no tempo de imobilidade entre os grupos. Aos 69 DPP (1 dia antes do tratamento de escitalopram) todos os animais estressados (GE e GEe) apresentaram aumento significante no tempo de imobilidade em comparação aos grupos GC e Ge. Aos 99 DPP (2 dias após o término dos estressores e no último dia do tratamento do escitalopram 10mg/Kg), os grupos GE e GEe apresentaram um aumento no tempo de imobilidade em comparação aos demais grupos (GC e Ge). Além disso, o grupo GEe apresentou uma redução no tempo de imobilidade em comparação ao grupo GE.

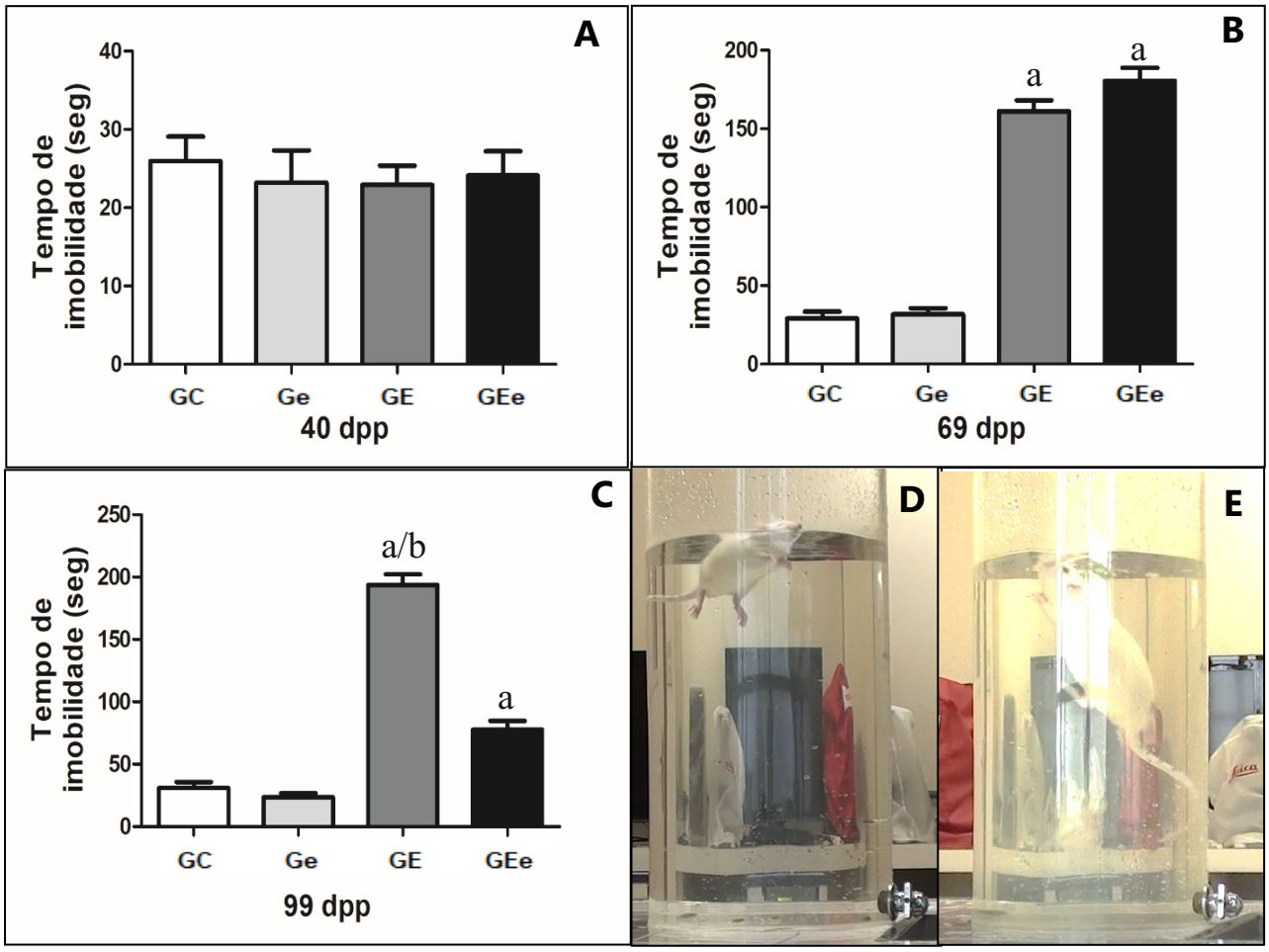


Figura 5. Histogramas dos dados obtidos referente ao tempo de imobilidade em diferentes idades dos animais pertencentes aos grupos controle (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe). Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em médias ± desvio padrão. **a: GE, GEe > GC, Ge; b: GE > GEe.** Em D e E, fotografias representando o teste de nado forçado em animais de diferentes idades: 40 DPP (D) e 69 DPP (E).

4.2 Análise do consumo de solução de sacarose a 1%

O consumo de solução de sacarose foi avaliado nos dias 38,55,69,83 e 97 **(Figura 6).** Durante as primeiras duas semanas de exposição aos estressores (55 DPP), nenhuma diferença significante foi observada entre os grupos em relação a anedonia. Após 1 mês de exposição aos estressores (69 DPP) todos os animais que foram estressados (GE e GEe) apresentaram uma redução significante no consumo da solução de sacarose em comparação aos grupos controle e escitalopram (GC e Ge, respectivamente). No dia 83, todos os grupos que foram submetidos ao protocolo de estresse apresentaram uma redução no consumo de sacarose em comparação aos grupos de animais não estressados (GC e Ge); além disso, o grupo que recebeu escitalopram durante o período de estressores (GEe) mostrou um aumento no consumo de sacarose em relação ao grupo somente submetido aos estressores (GE), mas sem diferenças entre eles. No último dia dos estressores (97 DPP), os ratos estressados tratados com escitalopram por quase um mês apresentaram um aumento significante no consumo de solução de sacarose a 1% em comparação aos ratos somente estressados. Aos 97 DPP, o grupo GE apresentou menor consumo de sacarose em relação aos demais grupos.

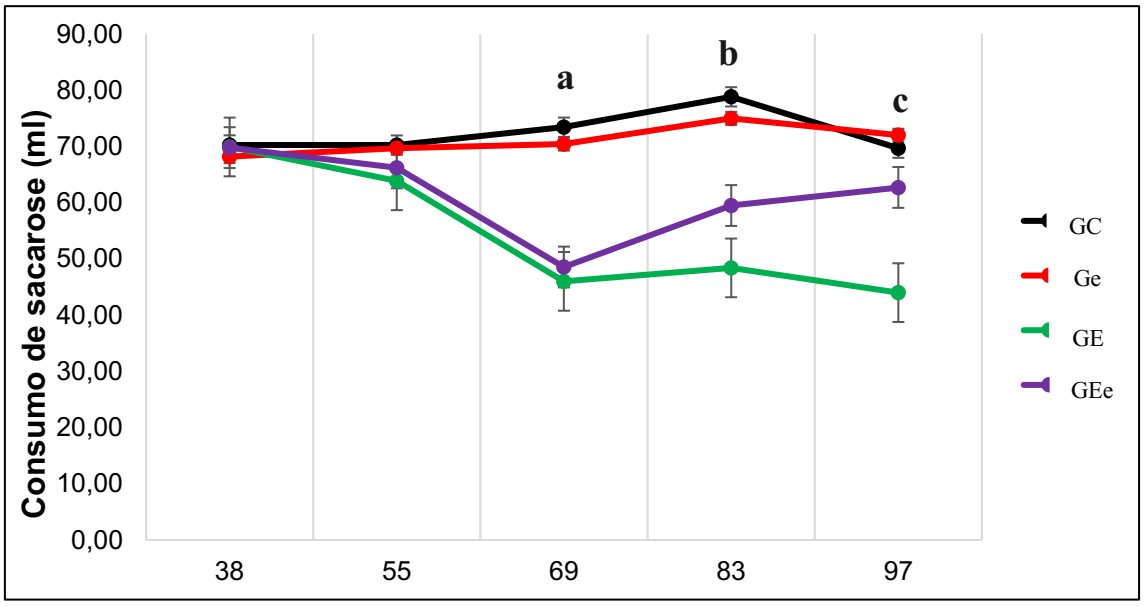


Figura 6. Gráfico representando o consumo de sacarose em diferentes idades de animais referentes a todos os grupos. Valores submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em médias ± desvio padrão.

a: GC, Ge > GE, GEe; b: GC, Ge > GE; c: GC, Ge e GEe > GE.

4.3. Análise biométrica dos órgãos reprodutivos

Os dados biométricos dos órgãos reprodutivos obtidos dos animais aos 114 DPP dos diferentes grupos experimentais estão representados na **Tabela 1**. O peso e volume testicular absoluto foram significantemente menores nos grupos Ge, GE e GEe em comparação ao grupo controle (GC). No entanto, os eixos testiculares não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, mesmo apresentando valores menores que o controle.

O peso absoluto do epidídimo foi menor nos animais tratados com escitalopram (Ge e GEe) em relação aos outros grupos (GC e GE), no entanto sem diferença significante. Além disso, o peso absoluto da próstata ventral foi significantemente menor nos grupos Ge e GEe quando comparados aos demais grupos.

Os ratos do grupo GEe apresentaram um peso de vesícula seminal cheia menor que os demais grupos. Além disso, uma diminuição no peso absoluto da vesícula seminal vazia foi observada nos grupos tratados com escitalopram (Ge e GEe) quando comparado com os grupos controle (GC) e estresse (GE).

Tabela 1: Parâmetros biométricos dos órgãos reprodutivos obtidos aos 114 dias de idade nos grupos Controle (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe).

Parâmetros	**Grupos (n = 10)**			
	GC	Ge	GE	GEe
Peso absoluto epidídimo (g)*	0,696 ±0,057	0,675 ±0,057	0,694 ±0,062	0,682 ±0,068
Peso absoluto vesícula seminal cheia (g)*	1,590 ±0,166	1,548 ± 0,176	1,569 ± 0,139	**1,326 ± 0,142 a**
Peso absoluto vesícula seminal vazia (g)*	0,714 ±0,059	**0,557 ±0,085 b**	0,669 ±0,074	**0,544 ±0,082 b**
Peso absoluto próstata ventral (g)*	0,652 ±0,034	**0,569 ±0,048 b**	0,670 ±0,046	**0,569 ±0,054 b**
Testiculares				
Peso absoluto (g)*	1,858 ± 0,132	**1,748 ± 0,116c**	**1,729 ± 0,124 c**	**1,651 ± 0,084 c**
Volume (cm^3) *	1,775 ±0,147	**1,665 ±0,117 c**	**1,643 ±0,099 c**	**1,577 ±0,113 c**
Eixo maior (mm)*	21,031 ±0.763	20,857 ±0,770	20,625 ±0,806	20,833 ±0,880
Eixo menor 1 (mm)**	11,0 (10,5 – 11,5)	11,25 (10 – 11,5)	11 (10,12 – 11,5)	11 (10 -11)
Eixo menor 2 (mm)*	11,969 ±0,531	11,750 ±0,915	11,750 ±0,775	11,633 ±0,442

* Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK).

**Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3). Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc*de Dunn.

a: GEe < GC; b: Ge e GEe < GC e GE; c: Ge, GE e GEe < GC.

4.4. Ganho de peso corpóreo

A avaliação do ganho de peso corporal ao longo do tratamento está apresentada na **Figura 7**. Os animais apresentaram pesos similares aos 41 DPP em todos os grupos. Porém, após iniciar o protocolo de estresse, aos 69 DPP, o peso corporal dos grupos GE e GEe foi menor que nos grupos GC e Ge, porém sem diferença estatística. Ao final do tratamento com escitalopram (99 DPP), os animais que receberam medicamento antidepressivo (Ge e GEe) apresentaram uma diminuição no peso corporal quando comparado aos animais controles (GC). Além disso, os ratos dos grupos Ge, GE e GEe apresentaram um peso corporal menor aos 114 DPP quando comparados aos do grupo controle (GC), porém sem diferença estatística.

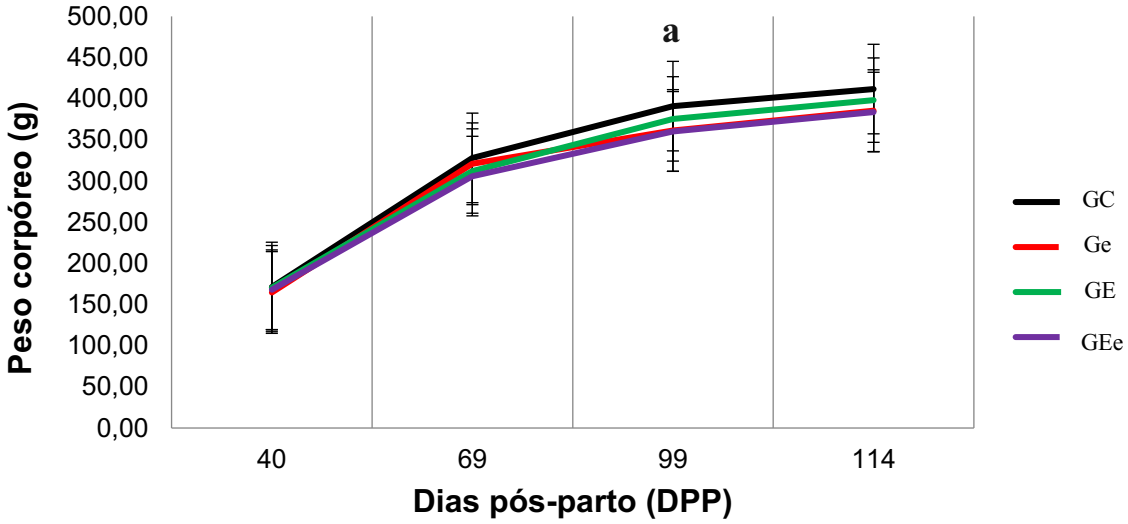


Figura 7. Gráfico representando o ganho de peso corporal em diferentes idades dos animais referentes a todos os grupos. Valores submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em médias ± desvio padrão. **a: GC > Ge e GEe.**

4.5. Peso das adrenais

O peso das adrenais (bilateral) foi avaliado pela razão do peso da adrenal pelo peso corporal (**Figura 8**). Os animais estressados (GE) apresentaram um aumento na razão em comparação aos demais grupos (GC, Ge e GEe).

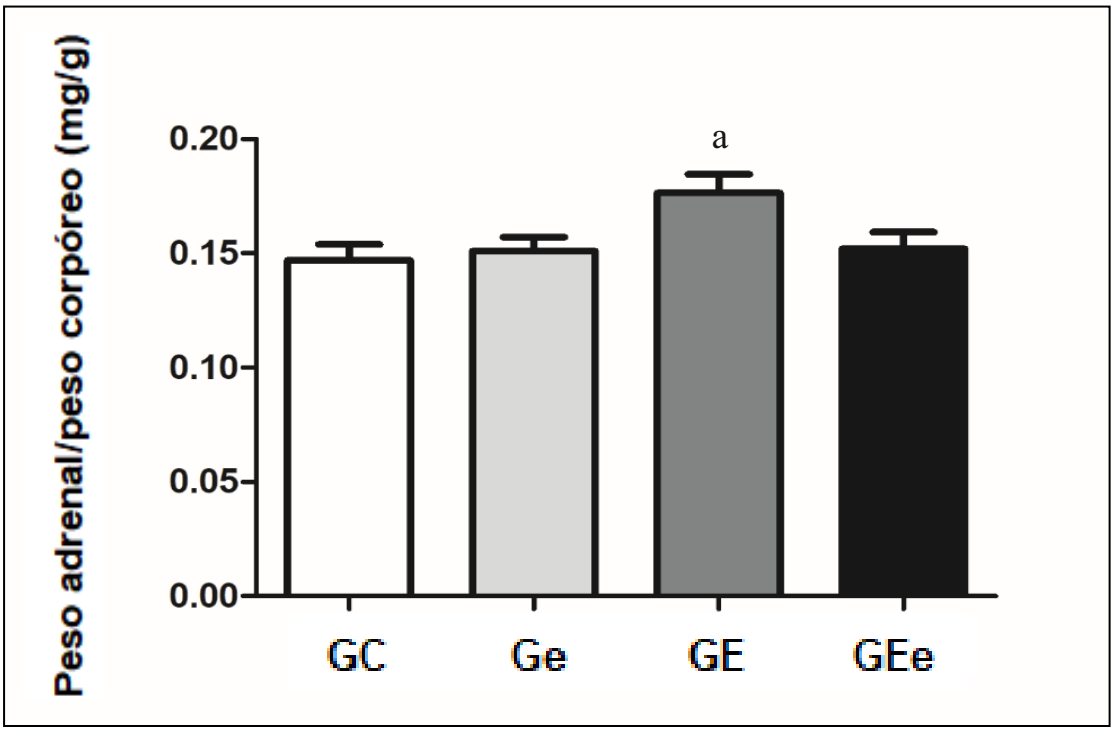


Figura 8. Histograma representando o peso das adrenais aos 114 DPP dos animais pertencentes aos grupos GC, Ge, GE e GEe. Valores submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em médias ± desvio padrão. **a: GE > GC, Ge e GEe.**

4.6. Análise histopatológica testicular

Aos 114 dpp foram coletados os testículos dos animais e, após o processamento do materia,l foram realizados cortes de 4μm de espessura, os quais foram preparados de acordo com técnicas histológicas rotineiras, seguido do método histoquímico do PAS+H. Este método possibilitou evidenciar os distintos estágios de diferenciação de células da linhagem germinativa e,principalmente, as espermátides em diferentes etapas da espermiogênese.

Os animais pertencentes ao grupo Controle (GC) apresentaram epitélio seminífero, integro, preservado, e organizado nas típicas associações celulares, correspondentes aos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (**Figura 9 e 10**). Os animais tratados com escitalopram (Ge, GEe) e aqueles submetidos ao estresse crônico moderado, mas sem o tratamento com o antidepressivo (GE), apresentaram alguns tipos de alterações do epitélio seminífero, cuja frequência mostrou-se maior em relação aos animais controles (GC) (**Figuras 9 e 10**).

Algumas seções tubulares apresentaram evidente esfoliação e descamação das células da linhagem germinativa para o lúmen, bem como presença de pequenos vacúolos intraepiteliais (**Figura 9**). Os animais submetidos ao protocolo de estresse, com ou sem o tratamento com escitalopram, apresentaram aumento significativo na porcentagem de túbulos seminíferos com descamação de células germinativas para o interior do lúmen (**Tabela 2**) A frequência de vacúolos intraepiteliais não mostrou diferenças significantes entre os grupos (**Tabela 2**).

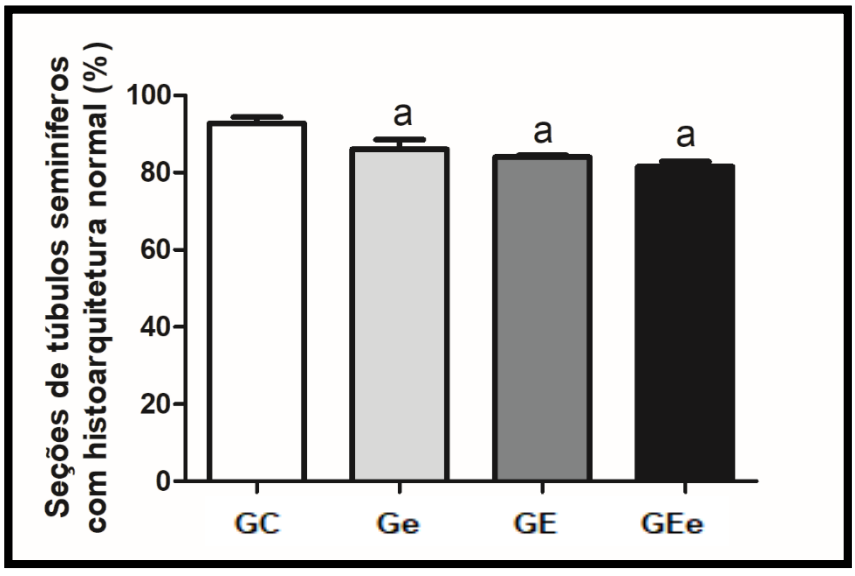


Figura 9. Histograma representando a percentagem de seções de túbulos seminíferos com histoarquitetura normal, aos 114 DPP dos animais pertencentes aos grupos GC, Ge, GE e GEe. Valores

submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em médias ± desvio padrão. **a: Ge, GE e GEe > GC.p< 0,05.**

Tabela 2 – Frequências (em percentagens) de seções de túbulos seminíferos com descamação de células germinativas para o interior do lúmen e vacuolização intraepitelial observadas em ratos machos adultos dos grupos Controle *Sham* (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe), aos 114 dias de idade.

Grupos (n= 6)	Descamação células germinativas para o lúmen (%)*	Vacuolização intraepitelial (%)*
GC	7,0 (4,14 ± 1,69)	0,9 (1,24 ± 0,55)
Ge	11,5 (3,92 ± 1,75)	0,2 (0,27 ± 0,12)
GE	**14,07 (2,58 ± 0,97) a**	1,74 (1,55 ± 0,58)
GEe	**19,33 (4,27 ± 1,74) a,b**	1,0 (1,08 ± 0,54)

*Valores expressos como média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK).

a: GE, GEe > GC; b: GEe > Ge; p < 0.01.

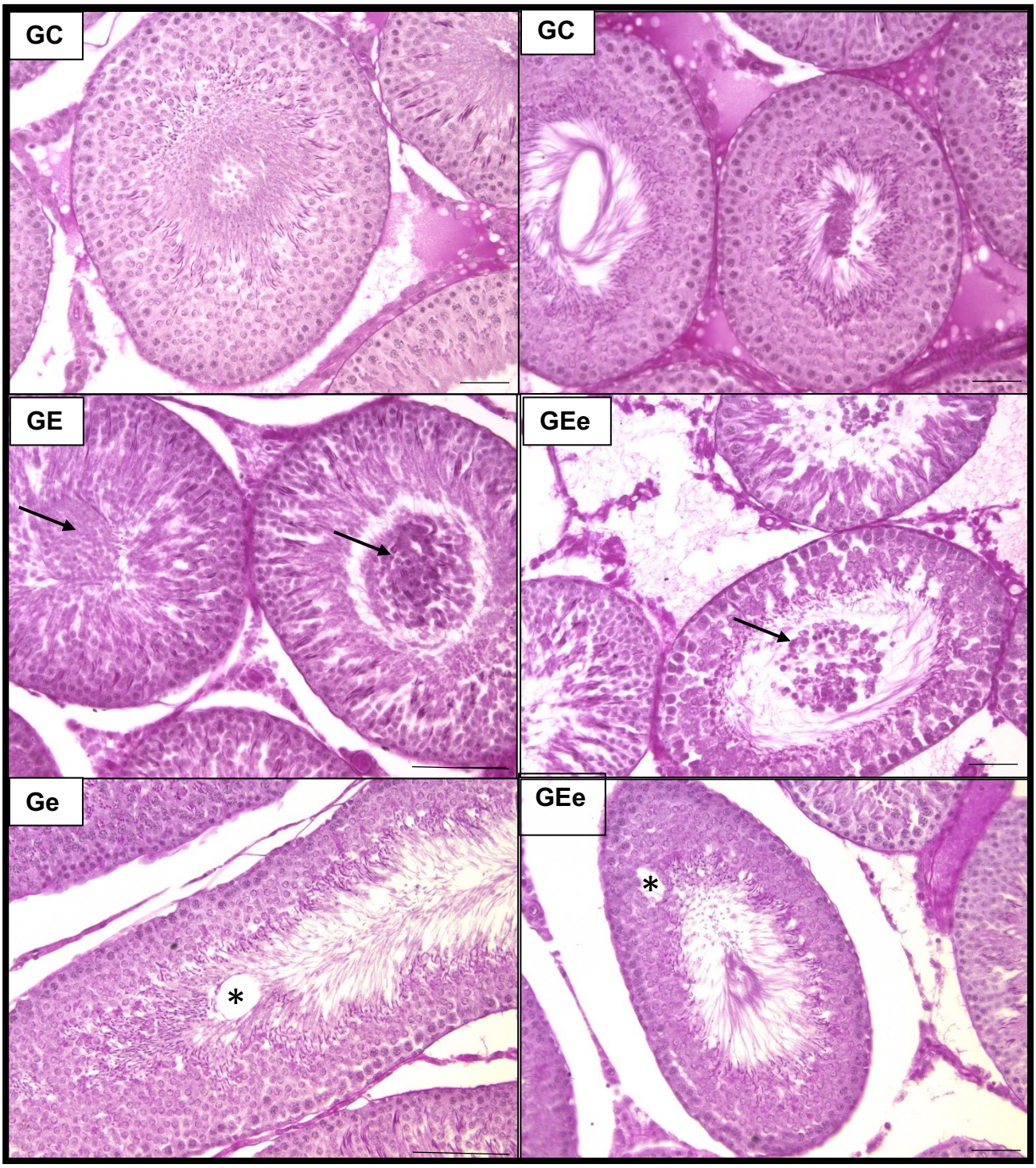


Figura 10. Fotomicrografias de seções de tùbulos seminiferos nos animais de todos os grupos experimentais (método do PAS+H). Observe a integridade do epitélio seminífero e a ausência de descamação de células da linhagem germinativa nos animais do grupo controle (GC). Intensa descamação de células da linhagem germinativa para o lúmen tubular (setas) pode ser notada nos animais submetidos ao protocolo de estresse (GE e GEe). A presença de vacúolos intraepiteliais em seções de túbulos seminíferos de animais submetidos ao estresse e/ou tratamento com escitalorpam (Ge e GEe) está indicada por asteriscos. Barra de escala = 50 µm.

4.7. Imunomarcação de SIRT1 no epitélio seminífero

No que se refere a análise quantitativa, a **Tabela 3** mostra os respectivos dados referente da densidade de volume (Vv) de células positivas para SIRT1, no epitélio seminífero de ratos dos grupos GC, Ge, GE, GEe. Observou-se uma redução deste parâmetro nos animais submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram (Ge, GE e GEe) em relação aos animais controles (GC). Assim, tanto o estresse quanto o tratamento com escitalopram reduziram a expressão de SIRT1 nos testículos.

A análise qualitativa da imunoexpressão da proteína SIRT1 nos testículos de ratos de todos os grupos (GC, Ge, GE e GEe), mostrou uma imunomarcação nuclear positiva nas espermatogônias, nos espermatócitos primários e secundários, bem como nas espermátides redondas (**Figuras 11A-B**). Esta imunomarcação positiva foi observada em seções tubulares em todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero. Não foram observadas diferenças no padrão de marcação desta proteína nos testículos dos animais pertencentes aos quatro diferentes grupos estudados. Espermatócitos primários em diferentes fases da prófase I da meiose (leptóteno a paquíteno) mostraram marcação nuclear muito forte para a proteína SIRT1 (**Figuras 11A-F**). As células de Sertoli e de Leydig e outras células intersticiais foram negativas para a marcação desta proteína (**Figura 11E-F**). As espermátides em alogamento e alongadas, nas etapas 9 a 19 da espermiogênese, não mostraram marcação positiva para a SIRT1 (**Figura 11F**). Não foi observada qualquer marcação nas lâminas do controle negativo, conforme o esperado. As imagens do controle negativo são mostradas nas **Figuras 11G-H**.

Tabela 3 – Densidade de volume **(**Vv) da imunomarcação positiva para SIRT1 no epitélio seminífero de animais dos grupos Controle *Sham* (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe), aos 114 dias de idade.

Grupos (n =5)	Vv da imunomarcação positiva para SIRT1 no epitélio seminífero
GC*	0,420 ± 0,08
Ge*	**0,327 ± 0,07 a**
GE*	**0,243 ± 0,03 a**
GEe*	**0,292 ± 0,05 a**

*Valores expressos como média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK).

a: Ge,GE e GEe < GC

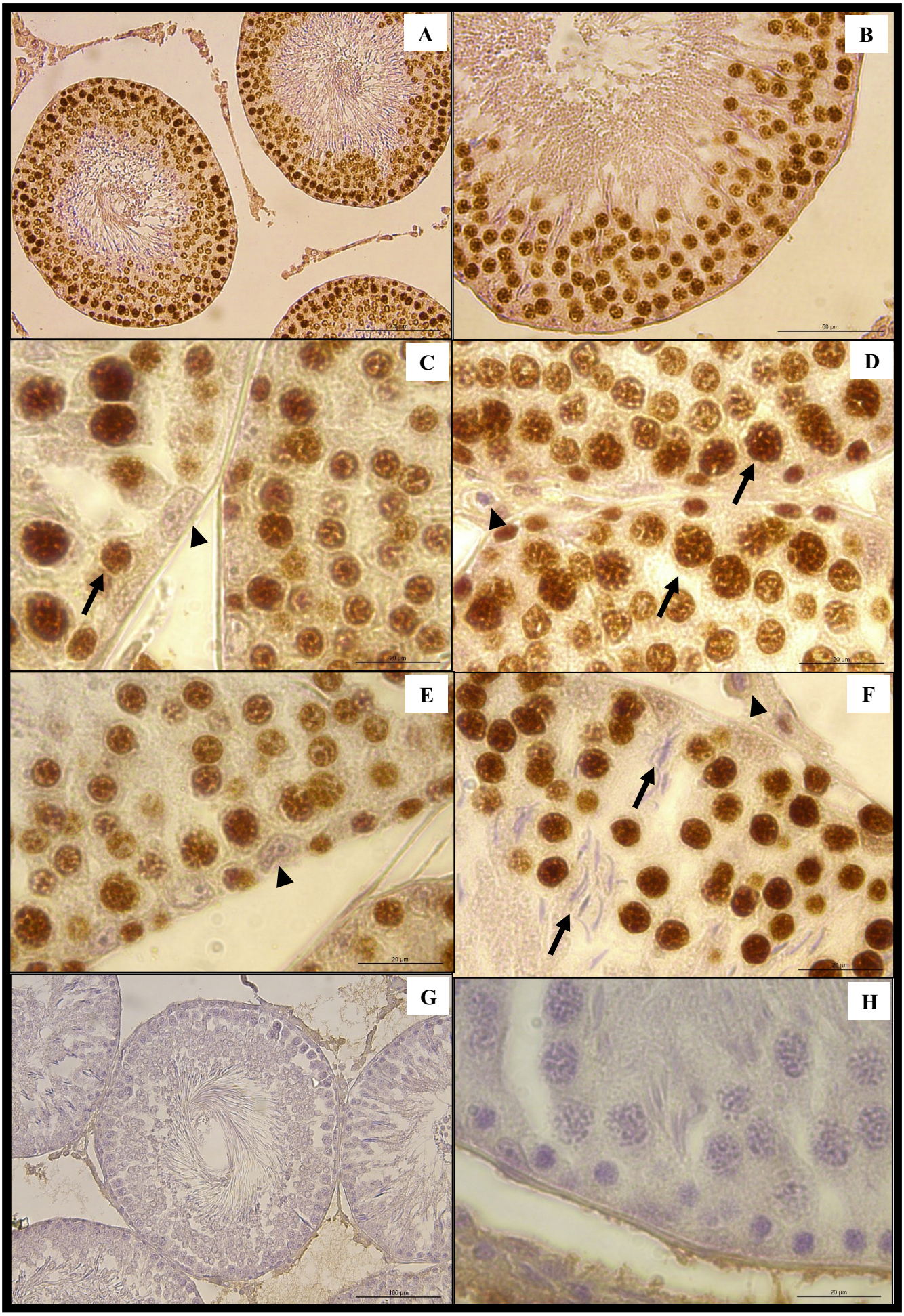

A
B
C
D
E
F
G
H

Figura 11. Fotomicrografias de seções testiculares submetidas à imunomarcação para proteína SIRT1. Nota-se a marcação positiva em espermatogônias, espermatócitos e espermátides redondas (em A e B). Observam-se espermatócitos primários em prófase I da meiose mostrando intensa marcação de núcleo (setas em C e D). As células de Sertoli (cabeças de seta em C e E) e de Leydig e outras células intersticiais (cabeças de seta em D e F) foram negativas para a marcação desta proteína. As espermátides alongadas, nas etapas 9 a 19 da espermiogênese, também não mostraram marcação positiva para a SIRT1 (setas em F). Não foi observada qualquer marcação nas lâminas do controle negativo, como esperado. As imagens do controle negativo são mostradas nas **Figuras 11G-H**.

4.8. Avaliação espermática quantitativa

Nos grupos Ge, GE e GEe houve uma redução significante tanto da contagem de espermátides no estágio 19 quanto da produção diária de espermatozoides quando comparados ao grupo controle (GC). Além disso, os animais dos grupos Ge e GEe apresentaram uma diminuição no número relativo de espermatozoides em comparação ao grupo controle **(Tabela 4).**

A contagem espermática nas porções epididimárias estão apresentadas na **Tabela 4.** Na região de cabeça + corpo do epidídimo de animais dos grupos Ge, GE e GEe houve redução do número absoluto (/órgão) e relativo (g/órgão) de espermatozoides em comparação ao grupo controle GC. No entanto; apesar da redução, não houve diferença significante no número absoluto (/órgão) de espermatozoides no grupo GE em relação ao controle GC.

Na cauda do epidídimo, por sua vez, foi observado aumento significante no tempo de trânsito espermático nos grupos Ge e GEe em comparação ao grupo controle GC. Além disso, neste mesmo segmento epididimário, o grupo GEe apresentou um aumento no tempo de trânsito em comparação ao grupo Ge.

Tabela 4. Parâmetros espermáticos obtidos aos 114 dias de idade nos grupos Controle (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe).

Parâmetros espermáticos quantitativos	**Grupos (n= 9)**			
	GC	Ge	GE	GEe
Testículo				
Produção diária espermatozoide (x10^6/testículo) *	28.881 ±5.525	**21.06 ±3.267 a**	**24.767 ±3.058 a**	**21.284 ±3.223 a**
Espermatozoides por órgão (x10^6/órgão) *	176.171 ±33.701	**132.267 ±17.476 a**	**147.792 ±20.787 a**	**125.955 ±20.676 a**
Espermatozoides por grama de órgão (x10^6/g/testículo) *	114.562 ±17.426	**95.963 ±16.363 b**	105.675 ±15.722	**89.525 ±12.369 b**
Epidídimo (cabeça + corpo)				
Trânsito de espermatozoides (dias)*	5.482 ±1.009	5.896 ±0.777	5.657 ±0.639	5.882 ±0.785
Espermatozoides por órgão (x10^6/órgão) *	150.329 ±21.749	**125.887 ±14.395 b**	135.782 ±24.235	**117.099 ±14.286 b**
Espermatozoides por grama de órgão (x10^6/g/testículo) *	473.828 ±51.41	**408.75 ±53.823 a**	**425.714 ±56.687 a**	**395.0 ±50.896 a**
Epidídimo (cauda)				
Trânsito de espermatozoides (dias)*	7.759 ±1.464	**10.523 ±1.355 c**	9.027 ±1.634	**11.456 ±1.775 c,d**
Espermatozoides por órgão (x10^6/órgão) *	219.722 ±35.882	194.863 ±23.301	213.731 ±29.193	226.296 ±32.965
Espermatozoides por grama de órgão (x10^6/g/testículo) *	863.393 ±98.886	864.808 ±121.482	871.0 ±81.102	869.091 ±89.438

* Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e teste de *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK).

a: Ge, GE e GEe < GC; b: Ge, GEe < GC; c: Ge, GEe > GC; d: GEe > Ge

4.9. Avaliação da atividade mitocondrial

Foi observada uma redução significante no número de espermatozoides com 100% de atividade mitocondrial nos grupos estressados que foram ou não tratados com escitalopram (GE e GEe) e no grupo somente tratado com escitalopram (Ge) em comparação ao grupo controle (GC). A análise também revelou um aumento na frequência de espermatozoides classe II (mais de 50% da peça intermediária corada) nos animais que receberam escitalopram e/ou submetidos aos estressores (Ge, GE e GEe) quando comparados aos animais controles. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas no que se refere às Classes III e IV, quando todos os grupos experimentais foram comparados entre si. Os resultados mostram que os animais tratados e submetidos ao protocolo de estresse (Ge, GE e GEe) apresentam um número maior de espermatozoides com menor atividade mitocondrial em relação aos animais controles. (**Tabela 5**). Na **Figura 12** estão apresentadas fotomicrografias de espermatozoides nas diferentes classificações em relação à atividade mitocondrial, sendo: (A-1) Classe I, (B-1) Classe II, (C-1) Classe III e (D-1) Classe IV.

Tabela 5: Análise da atividade mitocondrial nos grupos experimentais Controle, Escitalopram, Estresse e Estresse + Escitalopram (GC, Ge, GE, GEe) aos 114 DPP.

Atividade mitocondrial	Grupos (n= 12)			
	GC	Ge	GE	GEe
Classe I (*)	93,61 ±2,033	**85,61 ±5,29 a**	**81,80 ±4,57 a**	**84,41 ±5,19 a**
Classe II (*)	6,00 ±0,964	**14,5 ±1,612 b**	**18,667 ±2,437 b**	**17,286 ±2,797 b**
Classe III (**)	0 (0 – 0,25)	0 (0 – 0,75)	0 (0 – 1,0)	0 (0 – 1,0)
Classe IV (**)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0,25)	0 (0 – 0,25)	0 (0 – 0,75)

* Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK).

**Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3). Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn.

a: Ge, GE e GEe < GC; b: Ge, GE e GEe > GC.

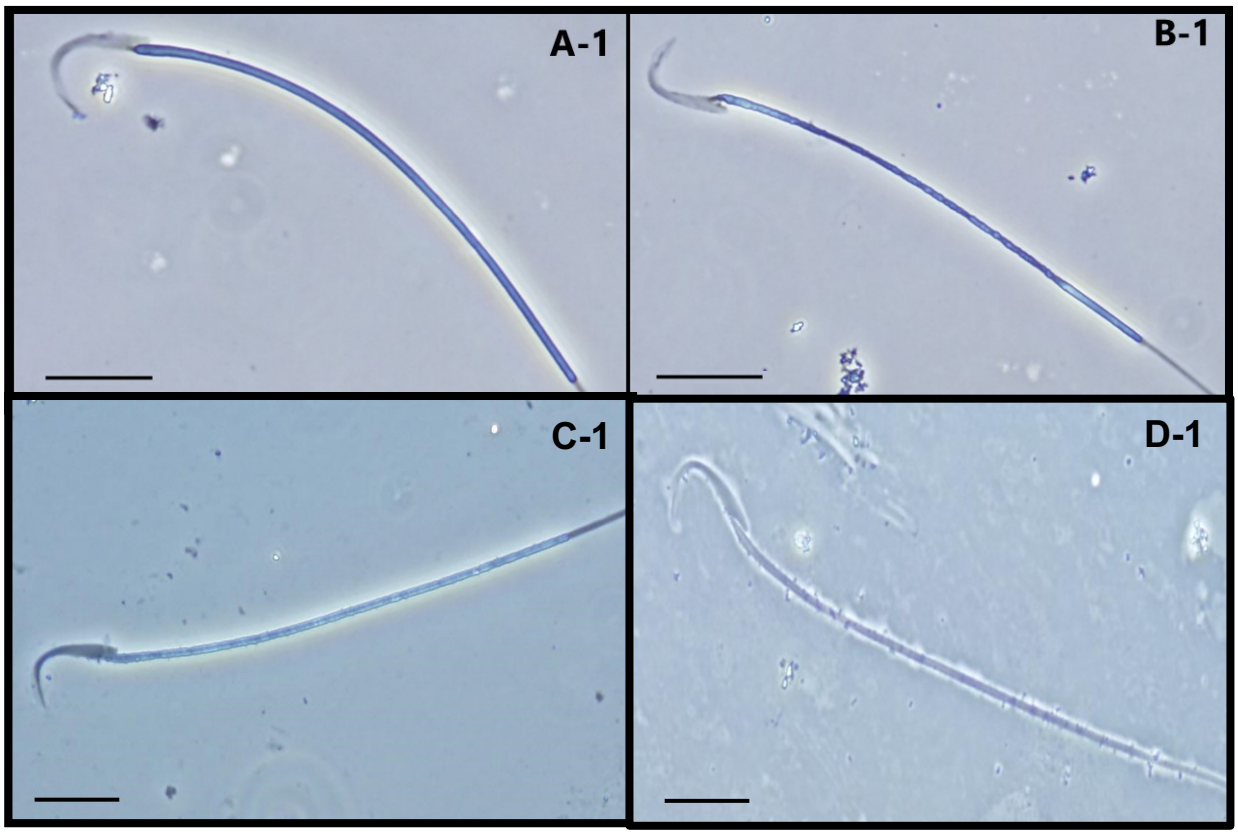


Figura 12. Fotomicrografia de espermatozoides corados com DAB para análise da atividade mitocondrial. Figura A-1 representa um espermatozoide de Classe I (100% da peça intermediária corada), Figura B-1 representa um espermatozoide Classe II (mais de 50% da peça intermediária corada), Figura C-1 representa um espermatozoide Classe III (menos de 50% da peça intermediária corada), Figura D-1 representa um espermatozoide Classe IV (ausência de mitocôndrias ativas). Barra de 10 µm.

4.10. Avaliação da integridade do acrossoma

Os espermatozoides foram classificados entre íntegros (alta intensidade de fluorescência) e não íntegros (baixa ou nenhuma intensidade de fluorescência) como representado na **Figura 13 (B1-B2)**. Utilizando o corante com PNA, foi observado que a frequência de espermatozoides com acrossoma íntegro foi significantemente menor em todos os grupos tratados e/ou estressados (Ge, GE, GEe) em comparação aos animais controles (GC). Contudo, em relação a este parâmetro, não foram encontradas diferenças significantes entre os animais expostos somente ao estresse, tratado com escitalopram e submetidos ao estresse mais escitalopram **(Figura 13-A).**

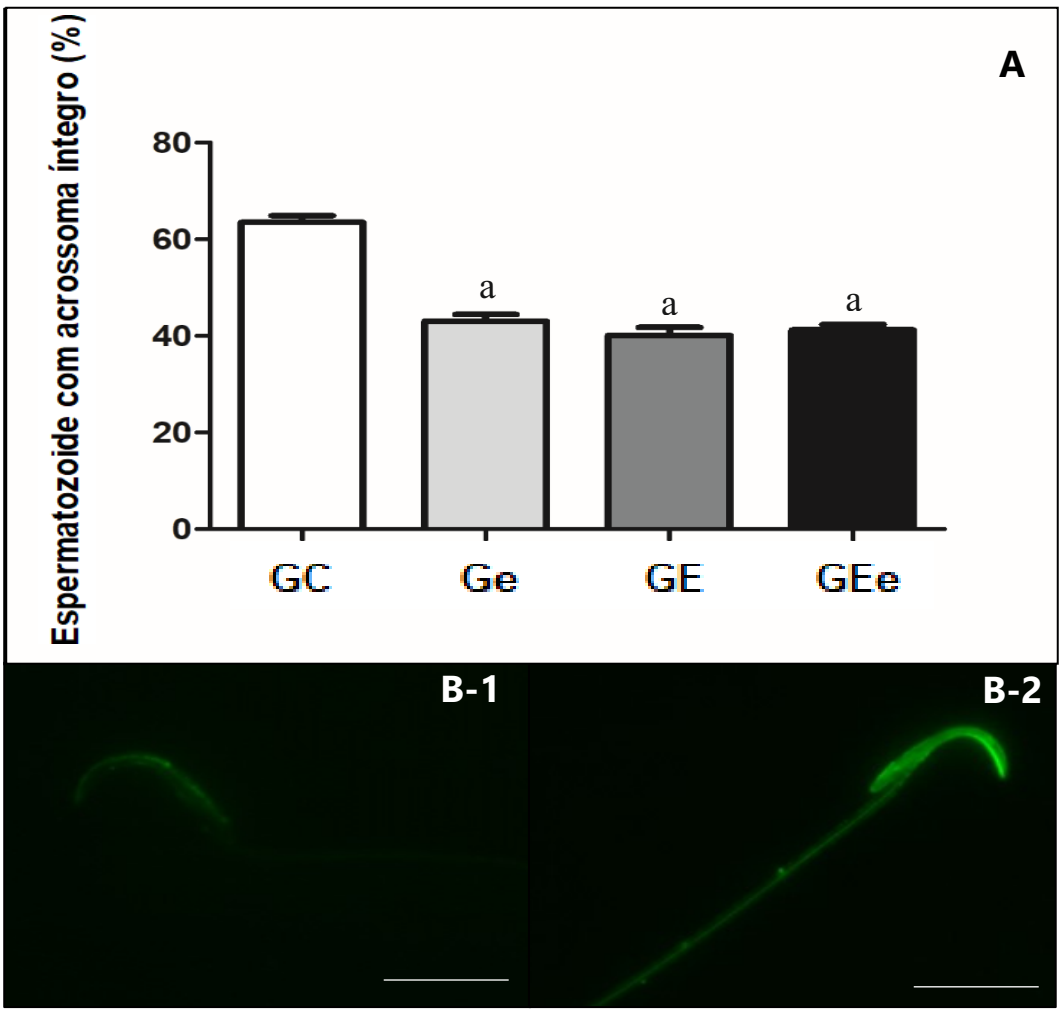


Figura 13. Em A, histograma representando a porcentagem de espermatozoides íntegros pertencentes aos animais dos grupos GC, Ge, GE e GEe. Análise de variância (ANOVA) e teste de *post hoc* de múltipla comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em média ± desvio padrão. **a: Ge, GE e GEe < GC.** Em B, fotomicrografia de espermatozoides corados com PNA apresentando acrossoma não íntegro (B-1) e íntegro (B-2). Barra: 10µm.

4.11. Avaliação da morfologia espermática

Conforme observado na **Figura 14-A**, a frequência de espermatozoides com alteração morfológica foi maior nos grupos Ge, GE e GEe em comparação ao grupo controle (GC). Um espermatozoide de forma normal está representado na **Figura 14(B)**; enquanto as alterações morfológicas, como cauda dobrada e alteração na forma da cabeça estão representadas na **Figura 14(C-F).**

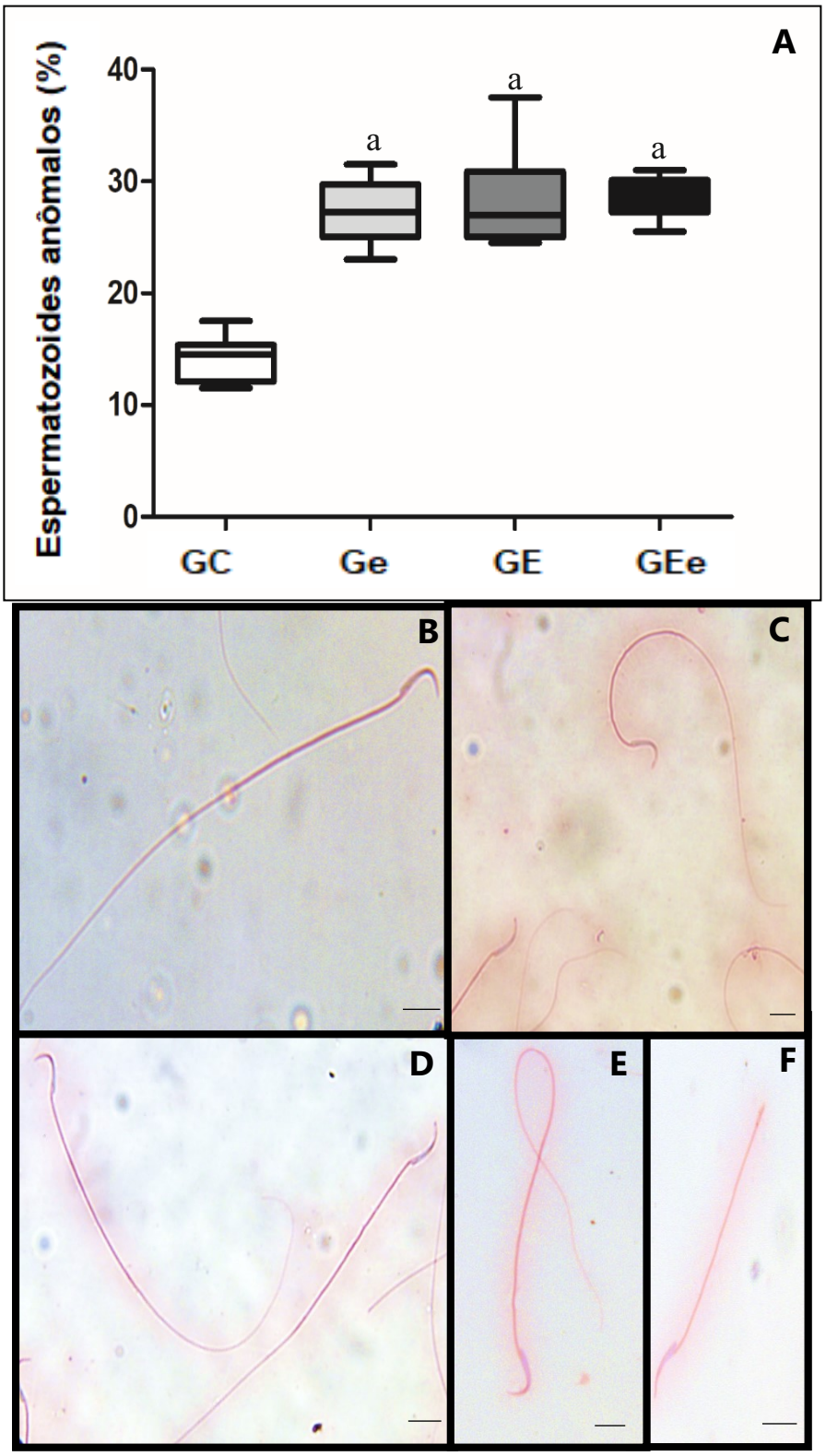


Figura 14. Em A, representação gráfica (*box plot*) dos dados obtidos referente à porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas dos animais pertencentes aos grupos GC, Ge, GE e GEe. Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn. Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3). **a: Ge, GE e GEe > GC.** De B a F, são mostradas fotomicrografias de espermatozoides representando as principais alterações morfológicas encontradas, sendo: espermatozoides com morfologia normal (A), cauda dobrada (C-D), cauda enrolada (E) e cauda quebrada e alteração na forma da cabeça (F). Coloração pelo método de Schorr. Barra: 10 µm.

4.12. Avaliação da vitalidade espermática

Os grupos Ge, GE e GEe apresentaram redução significante na porcentagem de espermatozoides vivos em comparação ao grupo controle GC (**Figura 15**). No entanto, o tratamento somente com escitalopram parece não ter impactado tanto na vitalidade espermática quando comparado ao grupo exposto aos estressores e tratado com escitalopram. Aparentemente, os estressores mais o tratamento com escitalopram parecem ter um efeito deletério maior sobre a vitalidade espermática em comparação aos ratos tratados somente com escitalopram.

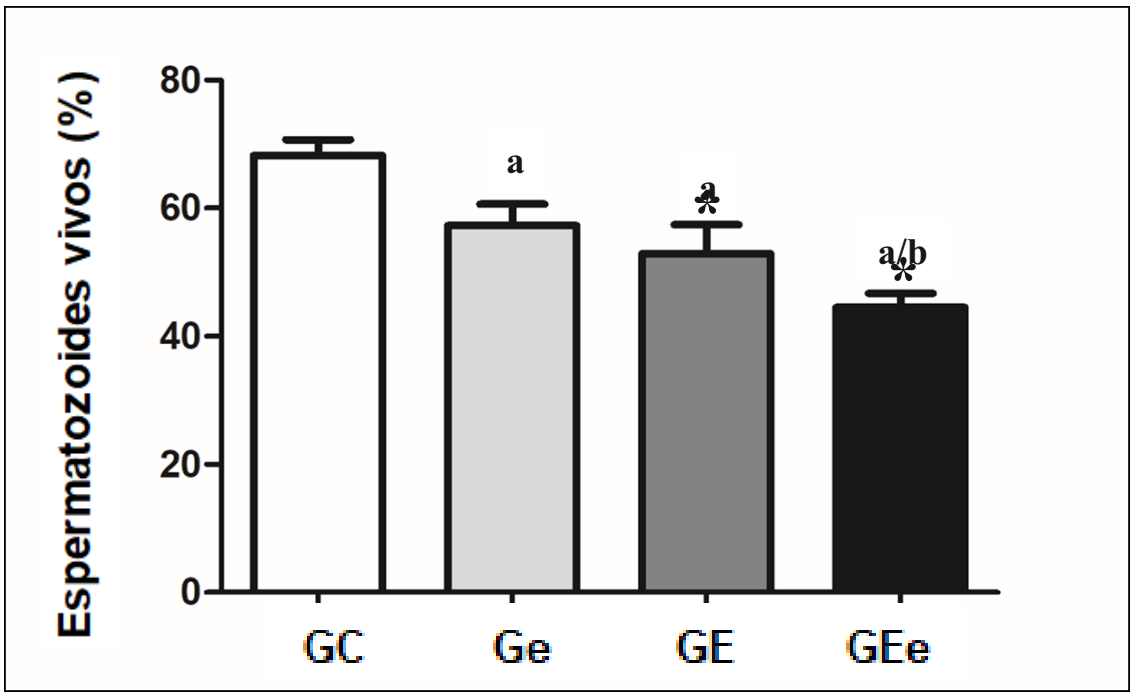


Figura 15. Histograma representando a porcentagem de espermatozoides vivos pertencentes aos animais dos grupos Controle (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe). Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em médias ± desvio padrão. **a: Ge, GE, GEe < GC; b: Ge > GEe.**

4.13. Avaliação da motilidade espermática

De acordo com os dados observados na **Tabela 6**, o tratamento com escitalopram e a exposição ao estresse causaram diminuição significante na qualidade de dois parâmetros da motilidade espermática quando comparado aos animais controles. A porcentagem de espermatozoides móveis não progressivos aumentou em todos estes grupos (Ge, GE, GEe) ao passo que os móveis progressivos diminuíram nos mesmos. Além disso, a frequência de móveis progressivos foi menor no grupo submetido aos estressores mais tratamento com escitalopram quando comparado ao grupo que recebeu somente escitalopram.

Tabela 6: Dados referentes à motilidade dos espermatozoides de animais aos 114 dias de idade relativos aos grupos Controle (GC), Escitalopram (Ge), Estressores (GE), Estressores + Escitalopram (GEe).

Motilidade espermática	Grupos (n= 7)			
	GC	Ge	GE	GEe
Progressivo*	59,11 ±8,34	**48,25 ±6,88 a**	**45,58 ±10,38 a**	**37,21 ±3,06 a,b**
Não-progressivo*	19,71 +3,61	**28,50 ±6,30 c**	**30,25 ±2,30 c**	**31,78 ±6,80 c**
Imóvel*	21,42 +3,32	25,83 +6,19	26,14 +3,63	26,88 +3,72

***** Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). **a: Ge, GE e GEe < GC; b: GEe < Ge; c: Ge, GE e GEe > GC.**

4.14. Análise da fragmentação do DNA espermático (Ensaio Laranja de Acridina - Citometria)

A análise para avaliar a estrutura da cromatina nos espermatozoides foi realizada em citômetro de fluxo, utilizando-se o ensaio Laranja de Acridina. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a) Porcentagem do índice de fragmentação de DNA (% IFD); b) Média do IFD; c) Desvio padrão do IFD **(Figura 16)**. Os espermatozoides que possuem fragmentação de DNA são identificados na % IFD; a maior concentração de espermatozoides é composta pela média do IFD e o desvio padrão representa a distribuição dos espermatozoides no IFD.

Os animais tratados com escitalopram (Ge e GEe) apresentaram um aumento no índice de fragmentação do DNA espermático (% IFD), no entanto sem diferenças significantes. O desvio padrão e a média de IFD não apresentaram diferenças significantes entre os grupos (GC, Ge, GE, GEe).

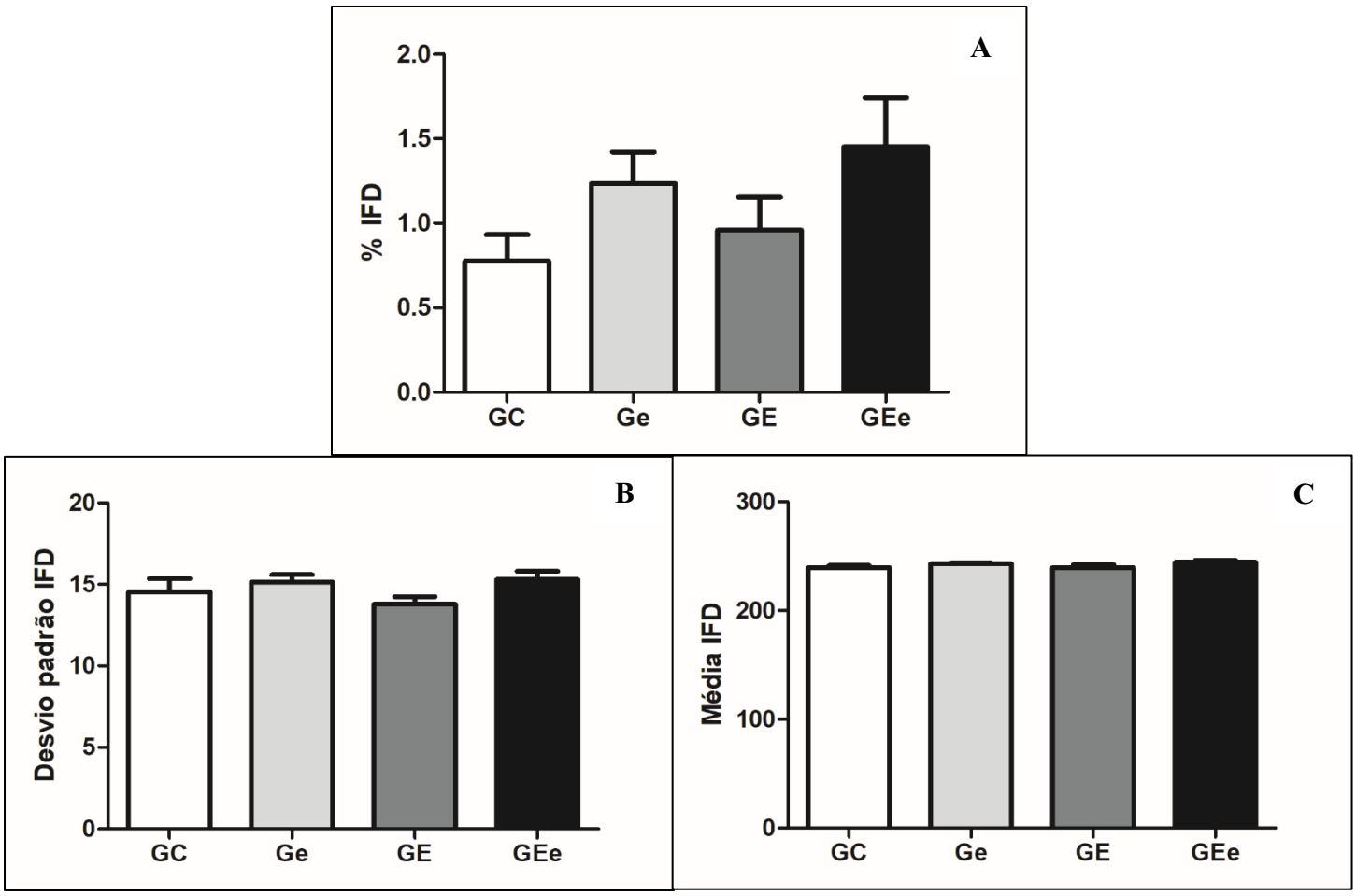


Figura 16. Análise da fragmentação do DNA de espermatozoides nos grupos GC, Ge, GE e GEe, em citômetro de fluxo, e utilizando-se a técnica de Laranja de Acridina. Valores submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores

expressos em médias ± desvio padrão. **p < 0,05, n = 9.** Em A, representado o índice de fragmentação do DNA, em B o desvio padrão do IFD e em C a média do IFD.

4.15. Análise da fragmentação do DNA espermático (Ensaio Laranja de Acridina - Fluorescência)

O ensaio Laranja de Acridina permite evidenciar a ocorrência de quebras de DNA espermático com base na fluorescência emitida. Não foram observadas alterações significantes entre os grupos mediante a utilização deste ensaio (**Figura 17**).

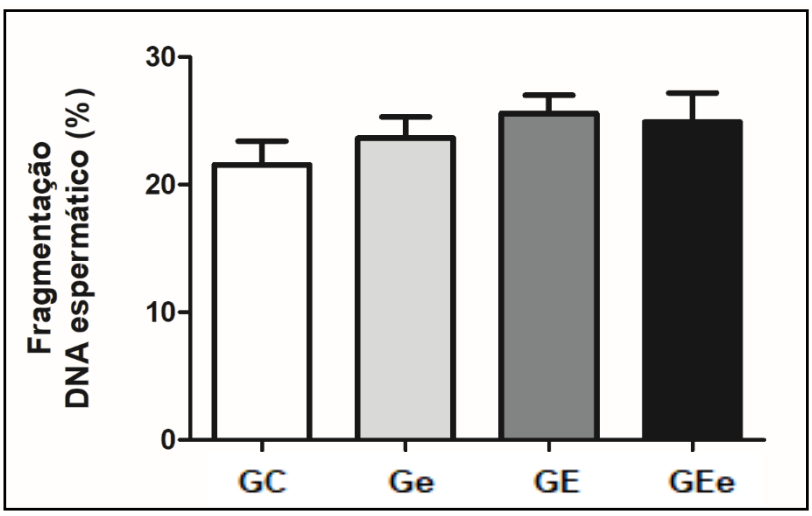


Figura 17. Porcentagem de espermatozoides com fragmentação de DNA em animais dos grupos GC, Ge, GE e GEe. Valores expressos como média ± desvio padrão. Ensaio Laranja de Acridina. Análise de variância (ANOVA) e teste post hoc de StudentNewman-Keuls (SNK), de comparação múltipla; n=7. ($p \leq 0.05$)

4.16. Análise da fragmentação do DNA espermático (Kit Halomax)

A avaliação através do Kit Halomax permite evidenciar a ocorrência de quebras de DNA espermático com base na presença de um halo formado ao redor da cabeça de cada espermatozoide. Quando o DNA está intacto, a cabeça se mantém intacta (**Figura 18A**), no entanto quando o DNA está fragmentado há a formação de um grande halo (**Figura 18B**).

Observou-se um aumento de fragmentação no DNA do grupo submetido ao estresse crônico (GE), que, entretanto, não diferiu significativamente dos demais grupos. Portanto, não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos no que se refere a este parâmetro (**Figura 18C**).

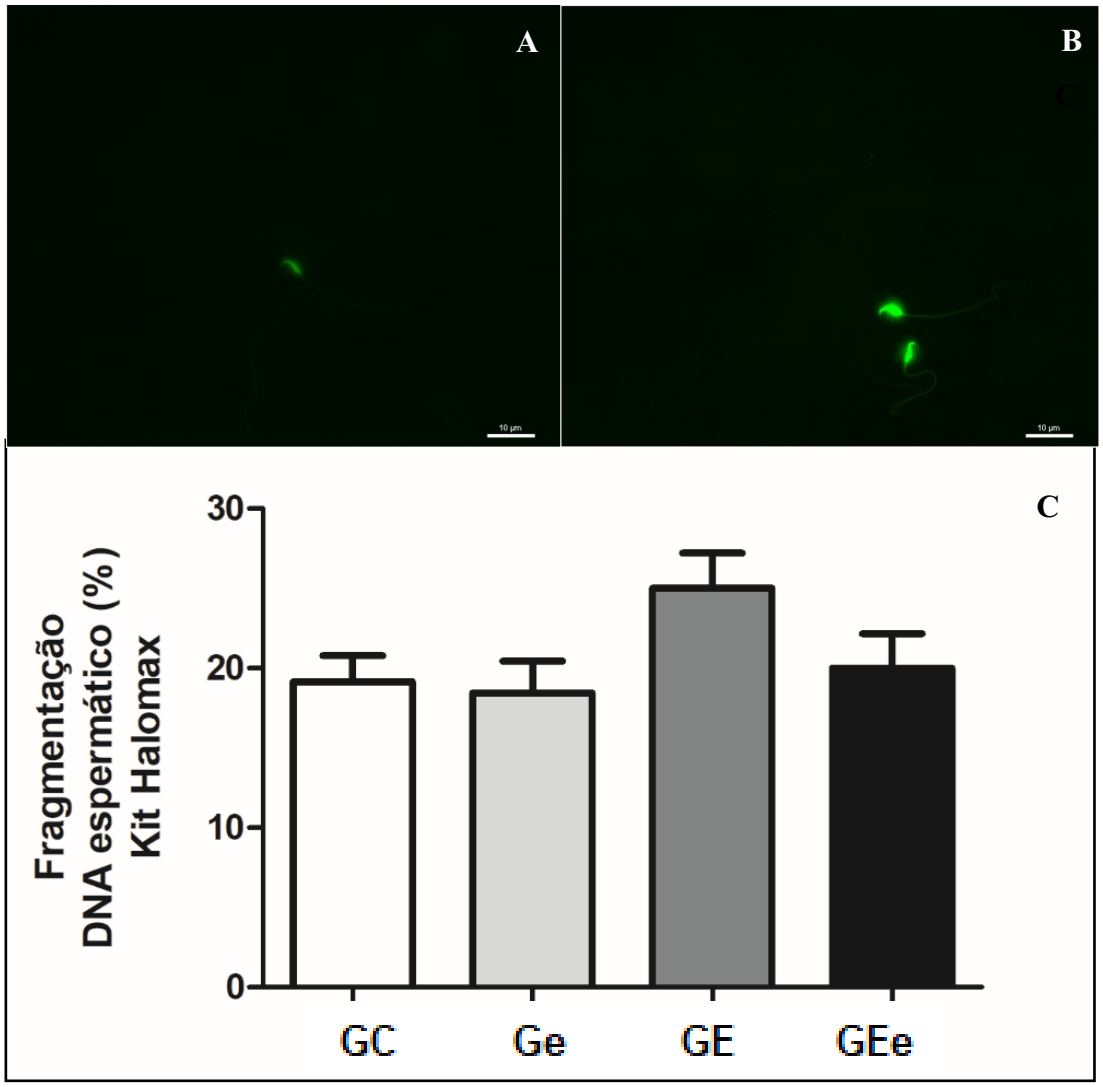


Figura 18. Em A e B, fotomicrografias de espermatozoides corados com Kit Halomax apresentando DNA íntegro (A) e DNA fragmentado - presença de halo (B). Barra: 10 µm. Em C, histograma revelando a porcentagem de espermatozoides mostrando fragmentação do DNA, em animais dos grupos GC, Ge, GE e GEe. Valores expressos como média ± desvio padrão. Kit Halomax para rato. Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de StudentNewman-Keuls (SNK), de comparação múltipla; n = 7.

4.17. Avaliação da fragmentação do DNA espermático (Ensaio COMETA)

A avaliação através do Ensaio Cometa permite evidenciar a ocorrência de quebras de DNA espermático com base no deslocamento do material genético pela lâmina de agarose durante a corrida de eletroforese, formado um rastro (semelhante a cauda de um cometa). Os parâmetros analisados como porcentagem de DNA da cauda, comprimento de cauda, momento de cauda e momento de Olive não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais (**Tabela 7**). Existem diferentes graus de fragmentação espermática avaliados durante o teste, através de um software (*Lucia Comet*), os quais podem ser visualizados na **Figura 19 (A-C)**.

Tabela 7 – Fragmentação do DNA espermático pelo Ensaio Cometa nos animais dos Grupos GC, Ge, GE e GEe.

	Grupos (n=6)			
Parâmetros	**GC**	**Ge**	**GE**	**GEe**
DNA cauda (%)*	0,380 (0,21-3,07)	0,235 (0,18-1,24)	0,425 (0,28-1,05)	0,240 (0,18-2,56)
Comp. Cauda (μm)*	0,190 (0,14-0,63)	0,150 (0,13-0,53)	0,240 (0,18-0,85)	0,180 (0,14-0,67)
Momento cauda*	0,02 (0,00-0,20)	0,01 (0,00-0,02)	0,03 (0,01-0,53)	0,01 (0,01-0,05)
Momento de Olive*	0,01 (0,01-0,17)	0,01 (0,01-0,11)	0,01 (0,01-0,11)	0,01 (0,01-0,08)

*Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3).

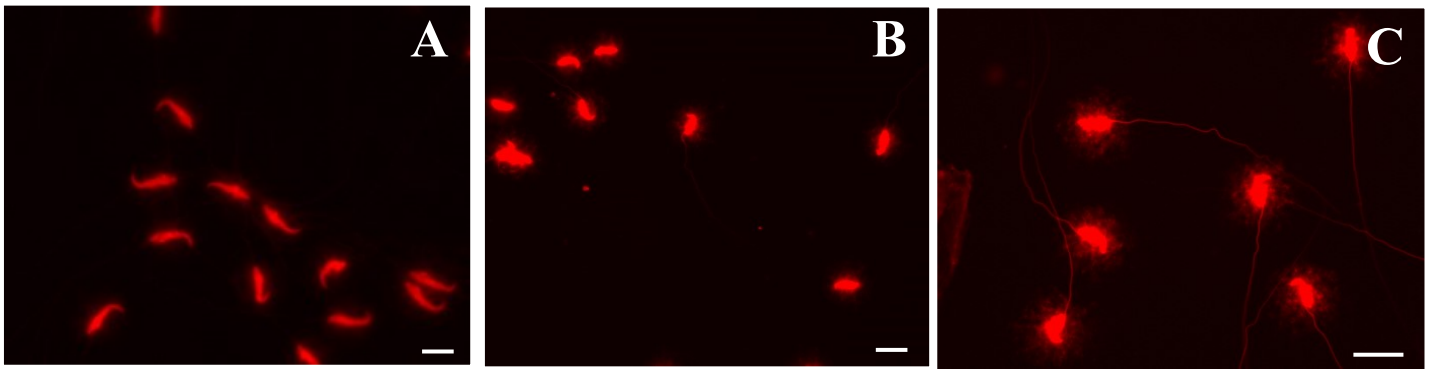


Figura 19. Fotomicrografias de espermatozoides, ao microscópio de fluorescência, corados com solução de brometo de etídeo após a realização do ensaio COMETA. Observar os diferentes graus de fragmentação do DNA espermático partindo do sem fragmentação (A), pouco fragmentado (B) e muito fragmentado (C). Barra: 10 μm.

4.18. Avaliação da compactação da cromatina dos espermatozoides (Azul de Toluidina)

O método Azul de Toluidina permite visualizar alterações de compactação da cromatina de espermatozoides através da intensidade de cor (azul escuro ou púrpura, sem ou pouca compactação; azul claro compactado). Observou-se um aumento na porcentagem de espermatozoides com alterações na compactação da cromatina nos animais submetidos ao estresse crônico e/ou tratados com escitalopram (Ge, GE e GEe) em relação aos animais controles (GC) **(Figura 20).**

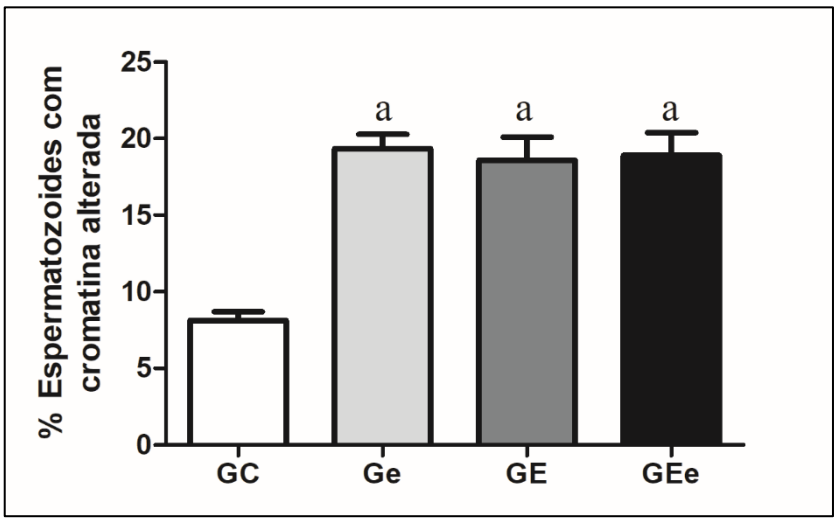


Figura 20. Porcentagem de espermatozoides com cromatina alterada em animais dos grupos GC, Ge, GE e GEe. Valores expressos como média ± desvio padrão. Método Azul de Toluidina. Análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla *pós-hoc* Student-Newman-Keuls (SNK); n=7

a: Ge, GE e GEe > GC.

4.19. Avaliação da protaminação da cromatina dos espermatozoides (*Chromomycin A3*)

A avaliação da protaminação da cromatina dos espermatozoides utilizando-se o corante Cromomicina A3 (CMA3) foi realizada em citômetro de fluxo.

A porcentagem de espermatozoides CMA3 positivos foi significativamente maior nos grupos Escitalopram, Estresse e Estresse tratado com Escitalopram, comparativamente àquela obtida a partir do grupo controle (**Figura 21**). Espermatozoides CMA3 positivos são aqueles que possuem uma deficiência na protaminação. Ainda, no que concerne a este parâmetro, embora os dados relativos aos grupos submetidos somente ao estresse (GE) não tenham apresentado diferenças significantes em relação aos obtidos a partir dos grupos Ge e GEe, uma frequência maior de espermatozoides CMA3 positivos foi aquilatada no grupo estresse (GE) quando comparada às frequências obtidas a partir dos demais grupos.

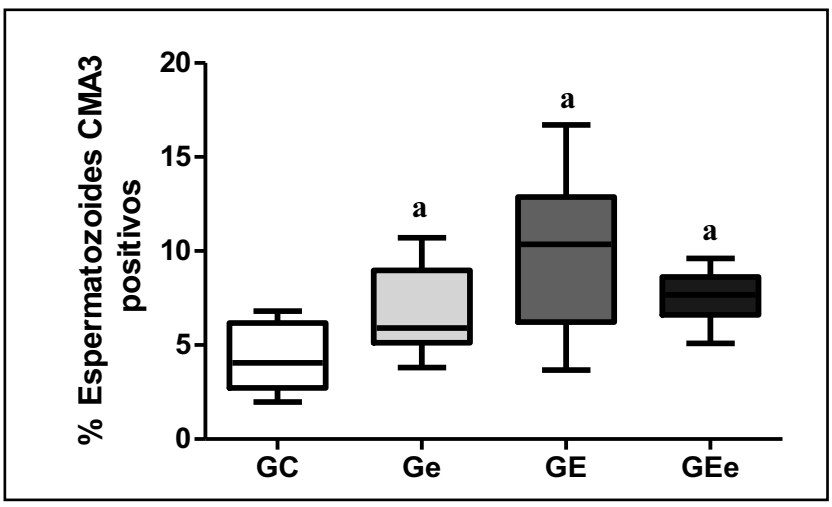


Figura 21. Análise da protaminação de espermatozoides nos grupos GC, Ge, GE e GEe. Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3).

a: Ge, GE e GEe > GC ($p < 0,05$), n = 10.

4.19. Dosagens plasmáticas hormonais: corticosterona e testosterona

O nível de corticosterona plasmática, avaliado aos 114 DPP (após 17 dias sem nenhum estressor), foi maior no grupo de animais submetidos somente ao estresse (GE) em comparação aos demais grupos; todavia, esta diferença não mostrou significância do ponto de vista estatístico (**Figura 22A**). Em contrapartida, o nível plasmático de testosterona, também avaliado aos 114 DPP, apresentou-se mais baixo nos animais submetidos ao estresse (GE e GEe), os quais foram ou não tratados com escitalopram, em comparação ao grupo controle. Além disso, os animais que receberam somente escitalopram (Ge) apresentaram concentração plasmática de testosterona mais alta que os animais estressados e tratados com escitalopram (GEe) **(Fig. 22B)**.

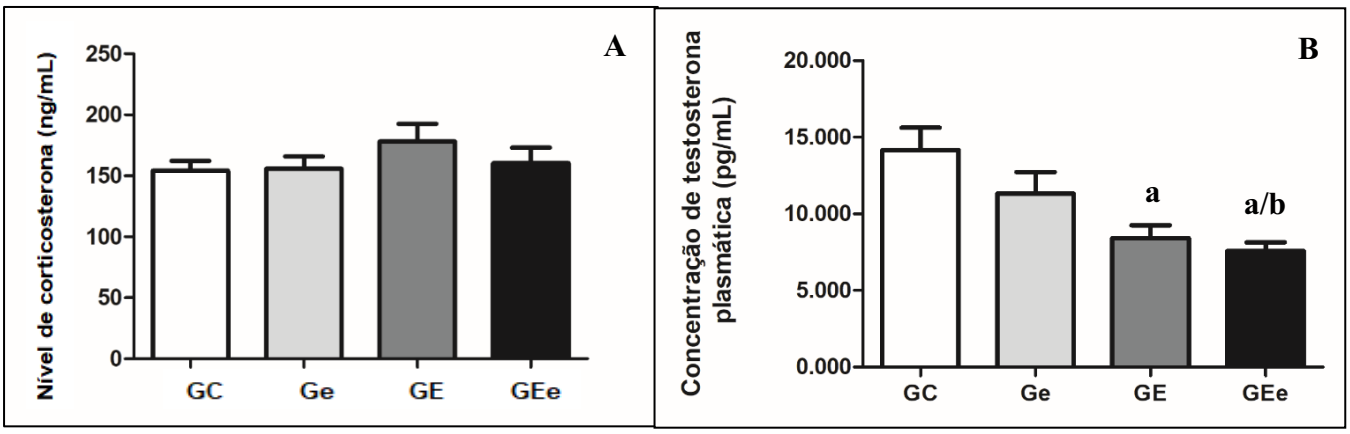


Figura 22. Histogramas representando o nível plasmático de corticosterona (A) e testosterona (B) nos animais pertencentes aso grupos GC, Ge, GE e GEe, aos 114 DPP. Valores submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em médias ± desvio padrão. **a: GE, GEe < GC b: GEe < Ge. (p < 0,05; n = 8).**

4.20. Análise do nível de peroxidação lipídica em espermatozoides (BODIPY)

A análise de peroxidação lipídica em espermatozoides foi realizada por citometria de fluxo onde os espermatozoides foram corados com a sonda BODIPY. Desta forma, de acordo com a metodologia utilizada, espermatozoides com alto índice de peroxidação lipídica apresentaram alto índice de fluorescência verde.

Observou-se um aumento significante na porcentagem de espermatozoides positivos para o marcador BODIPY nos grupos Ge, GE e GEe, em comparação ao grupo controle GC **(Figura 23).** Por sua vez, o grupo GEe apresentou frequência mais alta de espermatozoides positivos, ou seja, com nível mais alto de peroxidação lipídica na membrana celular (expressa em percentagem), embora este dado não tenha mostrado diferenças estatísticas quando comparado aos obtidos de animais dos grupos Ge e GE.

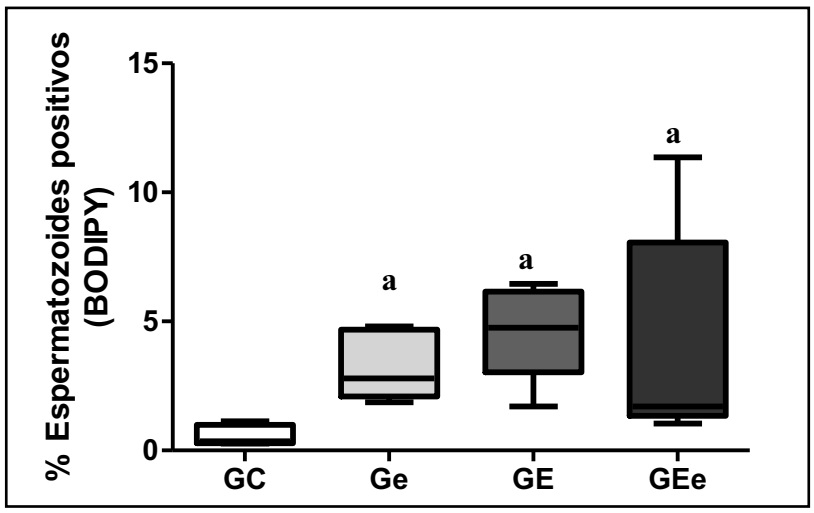


Figura 23. Análise da peroxidação lipídica de espermatozoides nos grupos GC, Ge, GE e GEe. Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3).

a: Ge, GE e GEe > GC ($p < 0,05$), n = 5.

4.21. Dosagem de peroxidação lipídica (estresse oxidativo) no testículo e epidídimo

O estresse oxidativo foi avaliado através de ensaio para obtenção de dosagens de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica. O grupo submetido ao estresse crônico (GE) apresentou um aumento significante da concentração de MDA em nível testicular (**Figura 24A**) em relação aos demais grupos (GC, Ge, GEe). Além disso, houve um aumento de MDA no grupo submetido ao estresse (GE), em nível epididimário na região de cabeça+corpo, quando comparado ao grupo controle (GC) (**Figura 24B**). Observou-se um aumento significante na concentração de MDA na cauda epididimária nos animais submetidos e/ou tratados com escitalopram (Ge, GE e GEe) em relação aos animais controles (GC) (**Figura 24C**).

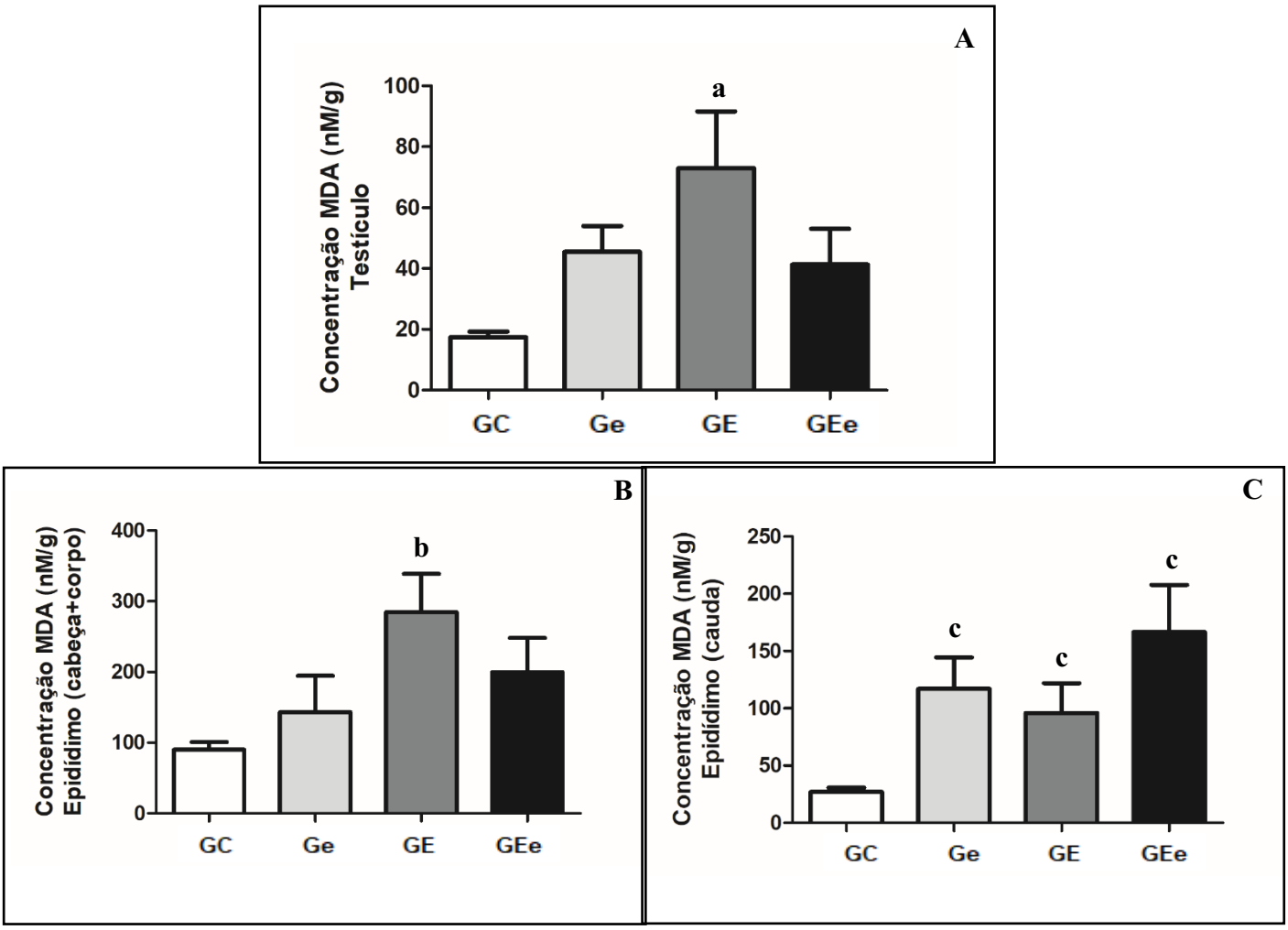


Figura 24. Histogramas representando a concentração de malondialdeído (MDA) no testículo (A), e nas regiões da cabeça+corpo (B) e cauda epididimárias (C). Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3).

a: GE> GC, Ge e GEe; b: GE > GC; c: Ge, GE e GEe > GC. n =7, p < 0,05.

4.22. Avaliação do Comportamento Sexual

A avaliação do comportamento sexual nos animais foi realizada aos 114 dias de idade. Durante os primeiros 10 minutos do teste, 81,8% dos animais expostos ao protocolo de estresse crônico, tratados ou não com escitalopram (grupos GE e GEe), apresentaram atividade sexual (**Tabela 8**). Além disso, durante os 30 min de teste, apenas 63,6% dos animais dos grupos GE e GEe realizaram a primeira ejaculação (**Tabela 8**), apresentando, então, uma redução significativa em comparação aos grupos Controle e Escitalopram (GC e Ge). Além disso, apenas 54,5% dos animais do grupo GEe mostraram algum comportamento sexual após a primeira ejaculação, o que é uma redução notável em comparação aos grupos GC e Ge (**Tabela 8**).

Nos parâmetros analisados, observou-se um aumento no número de montas no grupo estresse + escitalopram (GEe) em relação aos demais grupos (GC, Ge e GE) e um aumento na latência da primeira monta nos grupos submetidos ao estresse (GE e GEe) em relação ao grupo controle (GC). Os demais parâmetros não mostraram diferenças significantes entre os grupos **(Tabela 9)**. Contudo, observou-se que, nos dez primeiros minutos de teste, 18,19% dos animais submetidos ao estresse, e que foram ou não tratados com o escitalopram (GE e GEe), não realizaram comportamentos sexuais. Além disso, 36,37% dos animais submetidos ao estresse (GE) e não tratados com o anti-depressivo e 45,46% dos animais submetidos ao estresse + tratamento com escitalopram (GEe) não realizaram todos os comportamentos, que analisados durante o período inteiro do teste (30 minutos). Assim, constatou-se uma diminuição na eficiência copulatória dos animais tratados com escitalopram e/ou submetidos ao estresse (Ge, GE e GEe) em relação aos animais controles (GC); contudo, diferenças significantes não foram observadas em relação a estes parâmetros.

Tabela 8 - Número de animais dos grupos: Controle (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe) que apresentaram comportamento sexual durante os 30 min de teste. Valores estão expressos pelo número total de animais que apresentou comportamento sexual pelo número total de animais avaliados de cada grupo. Os resultados, em porcentagem, estão nos parênteses.

	GC	**Ge**	**GE**	**GEe**
Parâmetros (%)				
Monta nos primeiros 10 min*	10/10 (100%)	12/12 (100%)	9/11 (81.8%)	9/11 (81.8%)
1ª ejaculação*	10/10 (100%)	12/12 (100%)	**7/11 (63.6%)a**	**7/11 (63.6%)a**
Comportamento pos-ejaculação*	9/10 (90%)	11/12 (91.6%)	7/11 (63.6%)	**6/11 (54.5%)b**

*Teste de Fisher

a: GE, GEe < GC, Ge; b: GEe < GC, Ge; $p \leq 0.05$.

Tabela 9: Acasalamento e comportamento sexual obtidos, aos 114 dias de idade, nos animais dos grupos: Grupo controle (GC), Grupo Escitalopram (Ge), Grupo Estresse (GE) e Grupo Estresse + Escitalopram (GEe).

Parâmetros	Grupos			
	GC (n=10)	Ge (n=12)	GE (n=11)	GEe (n=11)
Nº de montas [a]	8,60 (2,70 ± 1,20) (n=10)	5,80 (1,30 ± 0,58) (n=12)	8,60 (1,51 ± 0,67) (n=9)	**15,50 (6,75 ± 3,37) (n=9) a**
Nº de intromissões [b]	22,50 (15,00 – 27,75) (n=10)	21,50 (20,00 -33,00) (n=12)	27,00 (15,50 – 36,75) (n=8)	24,00 (19,25 – 33,50) (n=8)
Nº de ejaculações [b]	2 (1,0 -2,0) (n=10)	2 (1,2 – 3,0) (n=12)	2 (0,0 - 2,0) (n=7)	1 (0,0 - 3,0) (n=7)
Nº de montas pós ejaculação [b]	6 (2,5 – 12,5) (n=9)	7 (5,0 -12,0) (n=11)	10 (8,0 -13,0) (n=7)	7,5 (4,0 - 11,25) (n=6)
Nº de intromissões pós ejaculação [b]	14 (10,5 – 17,5) (n=9)	21 (19,5 – 23) (n=11)	20 (16 – 23) (n=7)	16,5 (14,5 – 22,5) (n=6)
Latência 1ª monta por minuto [b]	0,26 (0,16 – 0,45) (n=10)	1,40 (0,58 – 1,72) (n=12)	**1,70 (0,65 – 4,61) (n=9) b**	**1,98 (0,46 – 2,53) (n=9) b**
Latência 1ª intromissão por minuto [b]	0,67 (0,26 – 1,45) (n=10)	1,42 (1,07 – 1,54) (n=12)	2,18 (1,05 – 4,74) (n=8)	2,16 (0,64 – 3,02) (n=8)
Latência 1ª ejaculação por minuto [a]	17,54 (5,60 ± 1,77) (n=10)	14,90 (5,14 ± 1,48) (n=12)	14,19 (4,84 ± 1,83) (n=7)	16,53 (7,66 ± 2,89) (n=7)
Latência 1ª monta pós ejaculação por minuto [a]	20,35 (3,80 ± 1,43) (n=9)	17,58 (1,86 ± 0,62) (n=11)	17,50 (4,20 ± 1,71) (n=7)	18,59 (5,30 ± 2,37) (n=6)
Latência 1ª intromissão pós ejaculação por minuto [b]	21,95 (4,76 – 1,58) (n=9)	19,12 (3,87 – 1,16) (n=11)	18,67 (5,38 – 2,03) (n=7)	19,60 (5,34 – 2,18) (n=6)
Frequência de montas por minuto [b]	2,02 (1,60 – 2,79) (n=10)	2,37 (2,08 – 2,74) (n=12)	1,95 (0 – 2,81) (n=7)	2,12 (0 – 2,59) (n=7)
Frequência de intromissões por minuto [a]	1,44 (0,60 + 0,19) (n=10)	1,63 (0,51 ± 0,14) (n=12)	1,53 (0,84 ± 0,29) (n=7)	1,68 (0,35 ± 0,13) (n=7)
Intervalo inter-intromissões [a]	0,67 (0,19 + 0,06) (n=10)	0,60 (0,15 ± 0,04) (n=12)	0,63 (0,22 ± 0,08) (n=7)	0,61 (0,18 ± 0,04) (n=7)
Intervalo pós-ejaculatório[a]	5,58 + 0,73 (n=9)	5,29 ± 0,63 (n=11)	4,75 ± 1,77 (n=7)	5,33 ± 0,61 (n=6)
Eficiência copulatória [a]	0,71 ± 0,09 (n=10)	0,74 ± 0,09 (n=12)	0,67 ± 0,27 (n=8)	0,63 ± 0,28 (n=8)
Índice de atividade sexual (IAS)[a]	13,31 ± 1,92 (n=10)	12,79 ± 1,90 (n=12)	12,05 ± 2,37 (n=7)	13,22 ± 1,47 (n=7)

a Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e teste de post hoc de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). b Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3). Análise de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn. (N=*) representa o n de animais que realizaram o comportamento em cada parâmetro **a: GEe > GC, Ge e GE; b: GE e GEe > GC. p < 0,05.**

4.23. Avaliação da fertilidade e da capacidade reprodutiva

A avaliação da fertilidade e da capacidade reprodutiva foi realizada em função do acasalamento dos animais em estudo com fêmeas saudáveis e primíparas, e não submetidas a quaisquer tipos de tratamentos. Os dados referentes aos índices de fertilidade, gestacional e placentário bem como às taxas de implantação, de reabsorção e de perdas pré- e pós-implantação estão apresentados na **Tabela 10**. Os resultados da avaliação reprodutiva foram aquilatados a partir das fêmeas prenhes, no 20º dia de gestação, as quais haviam sido acasaladas com os ratos dos diferentes grupos (GC, Ge, GE, GEe), nesta ocasião com 114 dias de idade.

Os pesos dos úteros gravídicos foram reduzidos nas fêmeas acasaladas com os animais do grupo GE em relação àquelas acasaladas com os ratos dos demais grupos (GC, Ge e GEe). O peso das ninhadas e das placentas, resultantes dos acasalamentos com o grupo submetido somente ao estresse (GE), foram menores comparativamente ao grupo controle (GC). Por outro lado, o peso corpóreo das ratas no 20° dia de gestação, as quais foram acasaladas com ratos do grupo GE, não apresentaram diferenças significantes em relação ao controle. As taxas de implantação e gestacação, obtidas das fêmeas acasaladas com ratos do grupo estresse (GE), foram reduzidas em relação a aquela observada em fêmeas acasaladas com os ratos do grupo controle GC. Além disto, a taxa de perda pré-implantação foi maior em fêmeas acasaladas com ratos deste mesmo grupo (GE) em relação à apresentada pelo grupo controle (GC). Entretanto, as taxas de reabsorção obtidas do acasalamento de fêmeas com ratos dos grupos estresse (GE) e estresse com escitalopram (GEe) apresentaram-se maiores que em relação às obtidas do acasalamento com ratos do grupo controle (GC) e somente escitalopram (Ge), todavia sem significância estatística. Além disso, a taxa de perda pós-implantação, obtida do acasalamento das fêmeas com ratos do grupo estresse (GE) apresentou valor maior, no entanto sem significância estatística em comparação aos demais grupos. Também, os índices gestacional e de fertilidade não diferiram entre os animais dos diferentes grupos experimentais, quando acasalados com fêmeas saudáveis. A quantidade de fetos por ninhada e a razão sexual (número de machos/número de fêmeas), obtidas através do acasalamento dos machos de todos os grupos com fêmeas saudáveis e primíparas, também não apresentaram diferenças significantes entre os grupos. Além disso, observou-se uma redução na espessura das placentas oriundas dos acasalamentos dos animais dos grupos Ge, GE e GEe. Durante a realização das laparotomias, observou-se um útero gravídico com tamanho e espessuras reduzidos, os quais não correspondem a idade

gestacional de 20 dias, indicando atraso no desenvolvimento gestacional. Além disso, foram encontradas algumas reabsorções, os quais estão apresentados nas **Figuras 25 A e C**.

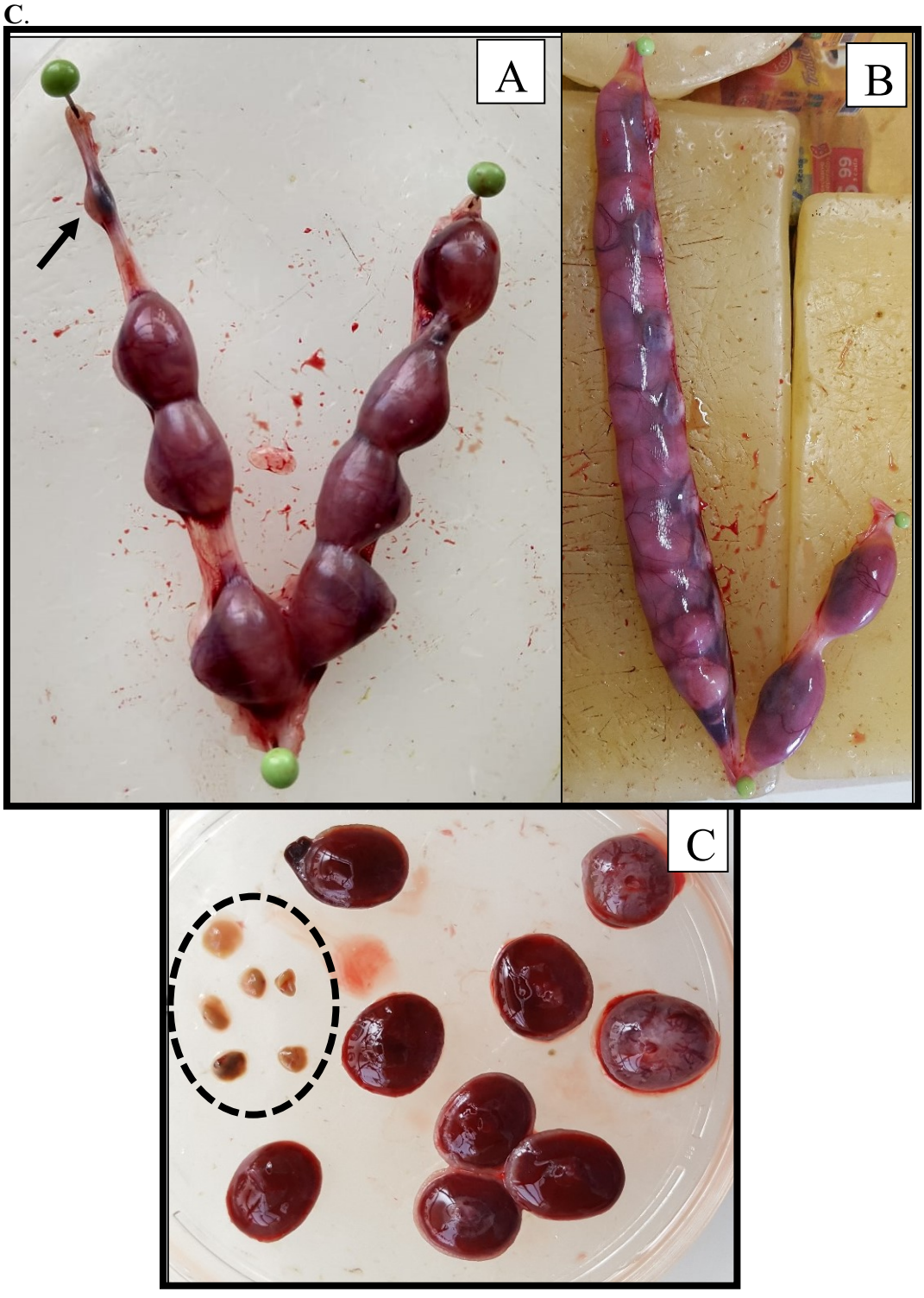


Figura 25. Em A observa-se um útero gravídico que não correspondia à idade gestacional, na época da coleta (20 dias), apresentando aspecto. tamanho e espessura reduzidos, caracterizando-se como atraso gestacional. Ainda em A, observa-se uma reabsorção dentro do útero (seta). Em B, observa-se um útero gravídico com seus dois cornos, com tamanho e espessuras equivalentes com 20 dias gestacionais. Em C observamos as placentas e reabsorções (circuladas).

Tabela 10: Avaliação dos parâmetros reprodutivos em fêmeas controles, com 20 dias de gestação, as quais foram acasaladas com os animais dos grupos GC, Ge, GE, GEe.

Parâmetros	**Grupos (n = 11)**			
	GC	Ge	GE	GEe
Peso				
Ratas prenhes (g)**	364,39	356,95	342,73	354,50
	(40,24 ±12,72)	(43,96 ±13,25)	(26,23 ± 7,90)	(37,43 ± 11,28)
Útero gravídico (g)**	62,31 (4,14 ±1,46)	64,89 (6,89 ±2,18)	**55,56 (6,70 ±2,23) a**	63,56 (7,35 ±2,32)
Ninhada (g)**	39,42 (4,90 ± 1,55)	37,05 (3,91 ± 1,30)	**32,54 (4,46 ± 1,48) b**	35,90 (3,93 ± 1,39)
Placentas por ninhada (g)**	7,67 (0,99 ± 0,31)	7,19 (0,86 ± 0,26)	**6,39 (1,13 ± 0,37) b**	7,17 (0,75 ± 0,25)
Taxas				
Reabsorção*	0 (0 – 7,27)	0 (0 – 8,33)	7,14 (0 – 10)	7,69 (0 – 9,09)
Implantação*	100	92,86	**91,43 b**	93,49
	(98,3 – 100)	(92,31 – 100)	**(84,62 – 100)**	(85,43 – 100)
Perda pré-implantação*	0 (0 – 1,66)	7,14 (0 – 7,69)	**11,66 (5,35 – 18,67) c**	7,14 (0 – 15,38)
Perda pós-implantação*	0 (0 – 7,14)	0 (0 – 7,43)	7,14 (0 – 11,53)	0 (0 – 3,84)
Índices				
Fertilidade (%)*	100 (100 – 100)	100 (93 – 100)	100 (92 – 100)	100 (100 – 100)
Placentário *	0,22 (0,20 – 0,24)	0,19 (0,18 – 0,20)	0,20 (0,19 – 0,21)	0,20 (0,19 – 0,22)
Gestacional (%)***	100	91,66	**90,90 b**	100
Razão sexual (Macho/Fêmea)	1,37 (74/54)	0,84 (63/75)	0,77 (51/66)	1,20 (72/60)
Nº fetos/ninhada**	12,70 (1,16 ±0,36)	12,63 (1,62 ±0,49)	11,12 (1,55 ±0,54)	12,80 (1,98 ±0,62)
Placentas				
Peso individual (g)*	0,46 (0,40-0,49)	0,41 (0,39-0,45)	0,40 (0,37-0,44)	0,42 (0,40-0,47)
Eixo 1 (mm)*	14,33 (13,68-14,63)	14,27 (13,88-14,55)	14,08 (13,93-14,63)	14,09 (13,88-14,70)
Eixo 2 (mm)*	12,60 (12,23-13,43)	12,07 (12,04-12,72)	12,27 (11,55-13,0)	12,38 (11,86-12,5)
Espessura (mm)*	2,58 (2,34-2,89)	**1,87 (1,77-2,10) d**	**1,83 (1,60-2,0) d**	**1,94 (1,70-2,05) d**

*Análise de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3).

** Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de múltipla comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Valores expressos em média ± desvio padrão.

***Teste exato de Fisher

a: GE < GC, Ge, GEe; b: GE < GC; c: GE > GC; d: Ge, GE e GEe < GC (p < 0,05; n = 11)

4.24. Avaliação de malformações fetais

Um total de 524 fetos foi avaliado em relação aos seguintes parâmetros: peso corporal, comprimento crânio-caudal, número de fetos vivos e mortos e, também, possíveis malformações externas (**Tabela 11**). O peso corporal e o comprimento crânio-caudal mostraram-se reduzidos em fetos oriundos de pais submetidos ao estresse crônico, apresentando diferenças estatísticas significativas quando comparados com os fetos oriundos dos pais controles. A presença de malformações externas como, por exemplo, a ocorrência de fetos hidrópicos (**Figura 26.A**) foi observada nos animais oriundos de pais submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram (Ge, GE e GEe); a fenda palatina (**Figura 26.F**) apareceu em um feto oriundo de pai submetido ao estresse e tratado com escitalopram (GEe); a gastrosquise (**Figura 26.G-H**) apareceu em fetos oriundos de pais submetidos ao estresse (GE) e o atraso no desenvolvimento (**Figura 26.B-C**) foi observado em todos os grupos, inclusive nos fetos oriundos de pais controles (GC, Ge, GE, GEe). Além disso, os fetos oriundos de pais submetidos ao estresse (GE) apresentaram um aumento no número de fetos malformados em relação aos demais grupos.

Um total de 243 fetos foi analisado em relação ao desenvolvimento ósseo, considerando os ossos do crânio, membros anteriores e posteriores, coluna vertebral, costelas e esternébrio (**Tabela 12**). As análises das falanges não foram realizadas devido ao período gestacional em que as ratas prenhes se encontravam (20° dia gestacional), por ser um período anterior àquele normalmente requerido para ossificação destas estruturas ósseas (**Figura 26.L**). A análise de malformações esqueléticas nos 3 grupos experimentais mostrou que um aumento da frequência destas anomalias ocorreu nestes grupos em comparação ao grupo controle (GC, 4,83%); quais sejam: 1- tratados com escitalopram (Ge, 18,84%), submetidos ao estresse (GE, 42,59%) e submetidos ao estresse com escitalopram (GEe, 41,37%). Além disso, observou-se um aumento não somente no número de fetos com alterações esqueléticas, como também na quantidade de ninhadas com fetos alterados nos grupos submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram (Ge, GE e GEe). Foram observadas alterações no esternébrio como: agenesia (**Figura 26.J**), ossificação anormal (**Figura 26.I**) e ossificação incompleta (**Figura 26.K**) em todos os grupos submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram. Já a ausência de esternébrio foi observada em fetos oriundos de pais submetidos ao estresse com escitalopram (GEe). O centro vertebral bipartido (**Figura 26.M**) apareceu em todos os grupos, incluindo dos fetos oriundos de animais controles. Por fim, alterações

nas costelas foram observadas, como: supranumerárias (uni e bilateralmente, **Figura 26.O-P**) em fetos oriundos de pais submetidos ao estresse com escitalopram; e costelas disformes (**Figura 26.N**) em fetos oriundos de pais submetidos ao estresse (GE).

A análise de malformações viscerais foi realizada em 245 fetos através dos cortes seriados nas diversas regiões da (o): cabeça, pescoço, tórax, abdômen e pelve (**Tabela 13**). Uma única alteração foi observada, de forma isolada, somente em um feto proveniente dos acasalamentos de pais dos grupos tratados com o escitalopram (GE), submetido ao estresse (GE) e submetido ao estresse com o tratamento de escitalopram (GEe). A anomalia visceral referiu-se ao aumento do tamanho do átrio (**Figura 26.D**). Portanto, as análises estatísticas realizadas não indicaram alterações significativas entre os grupos no que concerne ao desenvolvimento visceral.

Tabela 11- Análise externa dos fetos oriundos do acasalamento e comportamento sexual dos ratos machos, aos 114 dias de idade, pertencentes aos grupos: Controle Sham (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe).

	Grupos			
	GC	Ge	GE	GEe
Fetos				
Vivos/Mortos	126/128	134/139	113/124	130/133
Viabilidade (%)	98,43	96,40	91,12	97,74
Peso (g)	2,80 (2,46 – 3,03)	2,50 (2,19 – 2,76)	**2,44 (2,24 – 2,60) a**	2,68 (2,35 – 2,980)
Tamanho (cm)	3,05 (2,85 – 3,20)	2,95 (2,85 – 3,20)	**2,92 (2,80 – 3,0) a**	3,0 (2,85 – 3,20)
Análise externa				
Atraso no desenvolvimento	1	2	9	2
Gastrosquise	0	0	4	0
Fenda palatina	0	0	0	1
Hidrópicos	0	2	2	1
Nº fetos examinados	128	139	124	133
N° fetos com anomalias	1	4	**15 a**	4
Anomalias externas (%)	*0,78*	*2,87*	***12,09 a***	*3,00*
Ninhadas alteradas/total	1/10	2/11	5/11	3/10

Teste exato de Fisher

a: GE > GC, Ge, GEe, p<0,05.

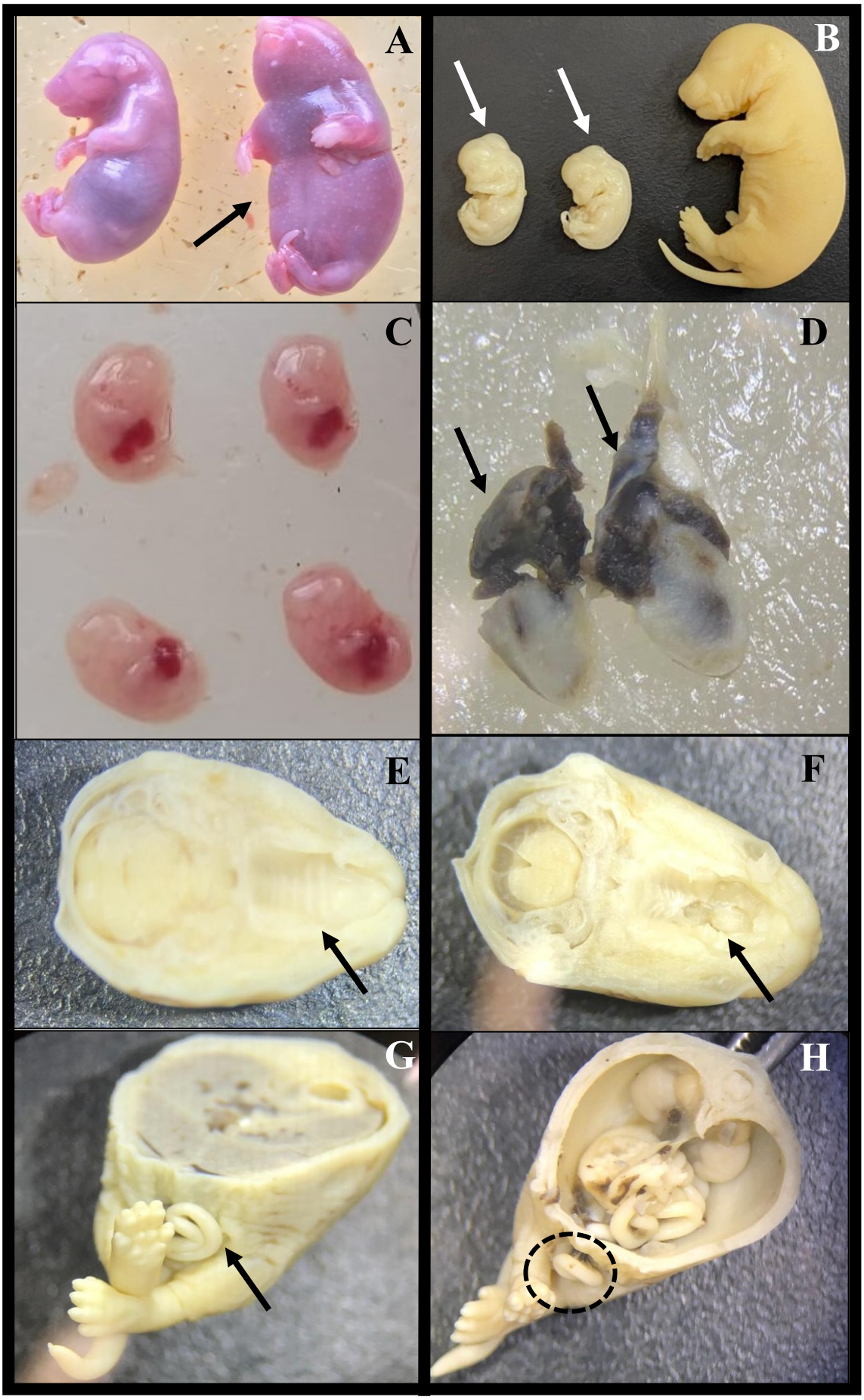
Tabela 12- Análise esquelética dos fetos oriundos do acasalamento e comportamento sexual dos ratos machos, aos 114 dias de idade, pertencentes aos grupos: Controle Sham (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe).

	Grupos			
	GC	Ge	GE	GEe
Fetos				
Anomalias esqueléticas				
Agenesia esternébrio	0	2	7	7
Esternébrio anormal	1	4	2	1
Ausência de esternébrio	0	0	0	2
Ossif. incomp. esternébrio	0	3	10	5
Centro vertebral bipartido	3	3	4	7
Costela disforme	0	1	0	0
Costela supranumérica	0	0	0	2
Nº fetos examinados	62	69	54	58
Nº fetos com anomalias	3	**13 a**	**23 a,b**	**24 a,b**
Anomalias esqueléticas (%)	*4,83*	***18,84 a***	***42,59 a,b***	***41,37 a,b***
Ninhadas alteradas/total	*3/10*	**9/11 a**	**11/11 a**	**9/10 a**
Teste exato de Fisher				

a: Ge, GE e GEe > GC; b: GE e GEe > Ge. p<0,05

Tabela 13- Análise visceral dos fetos oriundos do acasalamento e comportamento sexual dos ratos machos, aos 114 dias de idade, pertencentes aos grupos: Controle Sham (GC), Escitalopram (Ge), Estresse (GE) e Estresse + Escitalopram (GEe).

	Grupos			
	GC	Ge	GE	GEe
Fetos				
Anomalias viscerais				
Átrio aumentado	0	1	1	1
Nº fetos examinados	64	69	65	70
N° fetos com anomalias	0	1	1	1
Anomalias viscerais (%)	*0*	*1,44*	*1,53*	*1,42*
Ninhadas alteradas/total	0/10	1/11	1/11	1/10
Teste exato de Fisher				


A
B
C
D
E
F
G
H

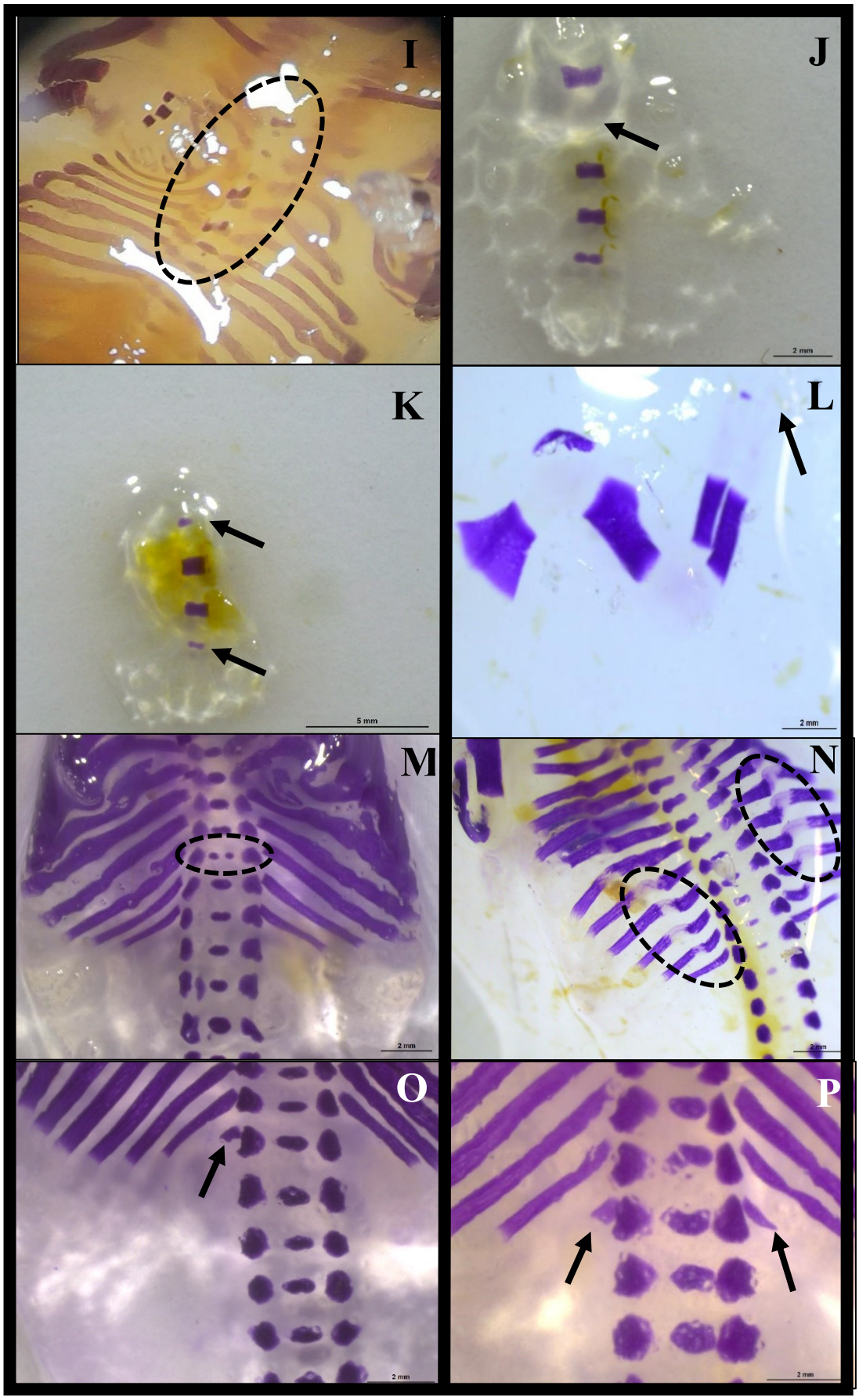

I
J
2 mm
K
5 mm
L
2 mm
M
2 mm
N
2 mm
O
2 mm
P
2 mm

Figura 26. Fotografias mostrando as alterações externas, viscerais e esqueléticas encontradas durante as avaliações fetais. A) Feto hidrópico (seta), B-C) Atraso no desenvolvimento D) Átrio aumentado (seta), E) Palato normal (seta), F) Palato com fenda (seta), G) Gastrosquise em visão frontal (seta), H) Gastrosquise em visão superior (circulado), I) Esternébrio com anormalidades (setas), J) Esternébrio com agenesia (seta), K) Esternébrio com ossificação incompleta (seta), L) Membro superior sem falanges, M) Disco vertebral bipartido (circulado), N) Costelas disformes (circuladas), O) Costela supranumerária (unilateral, seta), P) Costelas supranumerárias (bilateral, setas).

5 DISCUSSÃO

Depressão e ansiedade são problemas de saúde pública que afetam de 5-10% da população mundial e ocorrem frequentemente durante as idades reprodutivas (WIEGNER *et al.*, 2015; WHO, 2021).

Em 2009, *Food and Drug Administration* (FDA- USA) aprovou o escitalopram, um ISRS, para tratar transtorno depressivo maior (TDM) em pacientes adolescentes na faixa etária de 12-17 anos (EMSLIE *et al*., 2009). O escitalopram é um s-enantiômero do citalopram com farmacocinética semelhante, porém mais seletivo e com ação mais potente em baixas doses (HAYES *et al*., 2010). Apesar dos tratamentos medicamentosos para depressão melhorarem os sintomas depressivos, alguns estudos mostram que efeitos sexuais adversos pode ocorrer, como anorgasmia, disfunção erétil, diminuição na libido (CSOKA & SHIPKO, 2006; ATTIA & BAKHEET, 2013), queda na qualidade espermática (SAFARINEJAD, 2008; KOYUNCU *et al*., 2011; AKASHEH *et al*., 2014) e alterações da ejaculação em homens (TANRIKUT *et al*.,2010; BIJILSMA *et al*., 2013; AKASHEH *et al*., 2014).

De fato, a serotonina tem um papel importante na modulação da secreção de gonadotrofinas e existem alguns receptores presentes nas células de Sertoli que participam da espermatogênese normal em ratos imaturos (MOGUILEYSKY *et al*., 1985; JUSTO *et al*., 1989; SYED *et al*., 1999; SHISHKINA & DYGALO, 2000).

No sistema genital masculino, receptores de serotonina foram localizados nos vasos deferentes sendo responsáveis por sua contração (HAY, WADSWORTH, 1982). Os receptores de serotonina também foram identificados nos testículos, onde exercem função na regulação do fluxo sanguíneo testicular (COLLIN *et al*., 1996). Além disso, eles também estão presentes no epitélio epididimário, no sistema neuroendócrino e nos mastócitos (JIMÉNEZ-TREJO, 2007). No epidídimo, os receptores de serotonina exercem função relacionada à maturação dos espermatozoides. A enzima triptofano hidroxilase, que converte triptofano em serotonina, foi detectada em células epiteliais e neuroendócrinas do epidídimo, sustentando a proposição de ocorrência de síntese local de serotonina. Alguns estudos sugerem que estes mesmos receptores estariam também localizados em células de Sertoli e que desempenhariam função na espermatogênese (SYED *et al*., 1999). Os receptores de serotonina, em particular 5-HT2A, estão co-localizados com receptores de LH e alguns estudos mostraram que, em células de Leydig, os receptores de serotonina podem ligar-se ao LH ou, ainda, desempenhar um papel na síntese de testosterona produzida por estas células. Receptores de serotonina 5-HT2A e 5-HT3 também foram detectados na cauda de espermatozoides de rato, sugerindo que teriam alguma ação sobre a sua atividade funcional (FUJINOKI, 2011).

O tratamento com escitalopram pode ocorrer durante a adolescência, todavia os efeitos desta terapia sobre parâmetros espermáticos, tanto quantitativos quanto qualitativos, e as consequências sobre a fertilidade, bem como a viabilidade das progênies têm sido pouco exploradas e, portanto, ainda praticamente desconhecidas. O potencial efeito do tratamento com escitalopram sobre a fertilidade precisa ser considerado, especialmente nos pacientes jovens e adultos em fase reprodutiva. De fato, atualmente, reprodução e fertilidade são itens considerados relevantes para a qualidade de vida pela Organização Mundial de Saúde.

Este é provavelmente o primeiro trabalho experimental que investiga os efeitos do protocolo de depressão induzida em ratos com tratamento de escitalopram nesta faixa etária. Existem poucas informações usando modelos animais, acerca das consequências reprodutivas tardias do tratamento com ISRS, especialmente o escitalopram, e os mecanismos neuroendócrinos que modulam os principais eventos reprodutivos (AYALA, 2009).

Estudos também mostram que o estresse crônico moderado, aplicado a roedores, pode provocar, por sua vez, mudanças neuroquímicas e alterações variadas no comportamento, tais como redução na atividade sexual e locomotora, aumento nos níveis de corticosterona, diminuição no consumo de solução de sacarose e distúrbios no ciclo circadiano, os quais também são observados em quadros de depressão em humanos (KATZ, 1981; STEWART *et al*., 1990; SOLBERG *et al*., 1999; GRONLI *et al*., 2005; MILLER *et al*., 2009). Em relação ao protocolo experimental de depressão induzida em ratos, foram observadas variações metodológicas na literatura, como: (I) tipos de estressores (II) horário e duração dos estressores (III) duração do experimento e idade de eutanásia. Contudo, a grande maioria dos trabalhos analisados utilizou animais adultos e um período de estressores equivalente a 4 semanas (GAMARO *et al*., 2003; GRIPPO *et al*., 2003; GRONLI *et al*., 2005; SAKR *et al*., 2015). Contudo, o protocolo de estresse crônico moderado é considerado um modelo válido para indução de depressão em roedores (HENNINGCEN *et al*., 2009). Todavia, o tipo, duração, severidade ou previsibilidade dos estressores aplicados podem causar diferentes respostas ao estresse (HARGREAVES, 1990; PARÉ & REDEI, 1993; PUCILOWSKI *et al*., 1993; MARTI *et al*., 1994). Portanto, o modelo utilizado parece ser conveniente para este tipo de estudo.

No presente estudo foi observado um aumento no tempo de imobilidade durante o TNF e uma redução no consumo de sacarose em resposta ao estresse crônico moderado (GE), indicando ocorrência de anedonia. Além disso, foi notado um aumento no peso da adrenal nos animais submetidos ao estresse, o que pode ser considerado outro índice de

efetividade do protocolo de estresse (GAMARO *et al.*, 2003). Os grupos GC e Ge mantiveram o tempo de imobilidade e o consumo de sacarose durante todo o tratamento, enquanto os animais submetidos ao estresse crônico, tratados com escitalopram, mostraram um aumento no consumo de sacarose e uma diminuição no tempo de imobilização ao final do tratamento medicamentoso em comparação aos animais do grupo estresse e sem o tratamento medicamentoso (GE). Aqui, como já era esperado o tratamento com medicamentos que afetam a neurotransmissão serotonérgica, como é o caso do escitalopram e outros, tais como fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram (CASTAGNE *et al.,* 2011); aumentou o tempo de natação no TNF. Por outro lado, ao contrário do que se esperava, não foram observadas diferenças nos níveis de corticosterona e no peso corpóreo final. Provavelmente, este fato deveu-se à amplitude do intervalo decorrido desde o término do protocolo de estresse até a eutanásia, quando se procedeu a coleta de sangue para a dosagem de corticosterona. Em resumo, a maior amplitude do intervalo decorrido entre o final dos estressores e o dia de eutanásia; pode ter provido tempo suficiente para um período de recuperação nos níveis de corticosterona e no ganho/perda de peso corporal (GRIPPO *et al*., 2003; GALAL et al., 2015), fato que poderia explicar as diferenças entre os resultados aqui observados e os reportados por outros autores que utilizaram ratos como modelo para avaliação do estresse crônico moderado (GAMARO *et al*., 2003; SAKR *et al*., 2015).

Estresse crônico moderado e tratamento com escitalopram causaram impacto negativo sobre os parâmetros espermáticos quantitativos e qualitativos. De fato, a qualidade espermática, no que concerne à atividade mitocondrial, integridade do acrossoma, motilidade, viabilidade e frequência de espermatozoides com morfologia normal mostrou-se reduzida em animais tratados com escitalopram que foram submetidos ou não aos protocolos de estresse. Portanto, os dados apresentados neste trabalho corroboram com estudos prévios sobre as alterações na qualidade espermática em humanos que avaliaram os efeitos tanto do estilo de vida estressante quanto de outros tipos de inibidores seletivos de recaptação de serotonina, tais como sertralina, fluoxetina, fluvoxamina. (BRAMBILLA *et al*, 2005; KUMAR *et al*., 2006; BHONGADE *et al*., 2015; ZOU *et al*., 2018). Apesar dos mecanismos, através do quais os ISRS agem afetando a qualidade espermática, serem pouco entendidos, sugere-se que a desregulação no metabolismo do triptofano poderia causar perturbações na espermatogênese normal (ELNAZER & BALDWIN, 2014) como também inibir a fosforilação oxidativa na mitocôndria dos espermatozoides, influenciando a síntese de ATP (KUMAR *et al.,* 2006). Contudo, estudos mostram que ATP derivado de mitocôndrias não tem papel chave na

motilidade espermática; de fato, a glicólise parece ser o principal mecanismo utilizado para a aquisição de energia e motilidade. Assim, o papel das mitocôndrias na função espermática pode estar predominantemente relacionado a outros aspectos fisiológicos (AMARAL *et al*., 2013). No entanto, não há uma conclusão final sobre a fonte de energia da motilidade espermática, ou seja, fosforilação oxidativa ou glicólise. Além disso, pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio mitocondrial parecem ser fundamentais para que os espermatozoides adquiram competência para a fertilização (PIOMBONI *et al*., 2012).

Os hormônios FSH, LH e testosterona participam na manutenção das funções reprodutivas masculinas, além de uma complexa rede de fatores parácrinos testiculares. Alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gônada podem impactar direta e negativamente na espermatogênese (BABU *et al*., 2004; RAMASWAMY & WEINBAUER, 2015). O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é sintetizado como um pró-hormônio sendo processado no hipotálamo e liberado no sistema porta-hipofisário de modo pulsátil; ele estimula a liberação de FSH e LH na circulação sanguínea (ATLI *et al.*, 2017). Em mamíferos, o LH controla a biossíntese de testosterona, a qual é produzida pelas células de Leydig. O LH se liga a receptores existentes em células de Leydig estimulando, desta forma, a produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) que, então, estimula a produção deste hormônio a partir do colesterol (STOCCO, 2000). A testosterona assim produzida é, por sua vez, a responsável não só pelo desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, mas também pela regulação da espermatogênese normal como também pela liberação/armazenamento adequado de espermatozoides no epidídimo. O FSH, por sua vez, liga-se a receptores presentes nas células de Sertoli as quais exercem papel fundamental no controle e na manutenção da espermatogênese (WISNIEWSKI *et al*., 2015). Os neurotransmissores responsáveis pela comunicação neuronal no sistema nervoso central (SNC) podem afetar o eixo hipotálamo-hipófise-testículo (LOVINGER, 2008), pois o controle neuroendócrino das funções reprodutivas é baseado na harmonia entre distintos sinais neuronais e hormonais que ocorrem em diferentes níveis deste eixo (MAFFUCI & GORE, 2009; OYOLA & HANDA, 2017). Medicamentos da classe de antidepressivos e ansiolíticos podem afetar a liberação de GnRH, modulando a atividade de neurotransmissores envolvidos nesta rede neuronal hipotalâmica, podendo assim afetar o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (ILGIN, 2020) e, por conseguinte, a produção do hormônio masculino.

O tratamento com escitalopram pode alterar os níveis de testosterona, o que implicaria em alterações dos processos espermatogênicos e de maturação espermática,

este último ocorrendo na cabeça e corpo do epidídimo (ROBAIRE *et al*., 2006, ERDEMIR *et al*., 2014; HANSEN *et al*., 2017). As dosagens de testosterona plasmática revelaram que houve uma redução nos seus níveis em animais submetidos ao estresse, com e sem o uso de escitalopram. Os animais tratados somente com escitalopram apresentaram sugestiva redução dos níveis plasmáticos de testosterona, em comparação aos animais controle; estas dosagens, porém, não se mostraram estaticamente significantes. Este fato, poderia ser explicado em razão do período ocorrido entre o término do uso do medicamento e o dia da eutanásia, o que pode ter possibilitado uma recuperação do nível plasmático deste hormônio. Além disso, a dose de escitalopram administrada aos animais (10mg/Kg/dia) foi uma adaptação da dose mínima diária recomendada para humanos (10mg), e algumas pesquisas mostram que alterações de hormônios, como testosterona, são observadas somente em doses elevadas de antidepressivos e antiepilépticos (ATLI *et al*., 2017; BAYSAL *et al*., 2017). Contudo, a redução nos níveis de testosterona plasmática foi relatada, em ratos, com o uso prolongado de fluoxetina, um tipo de inibidor seletivo de recaptação de serotonina, resultante da ação danosa sobre as células de Leydig, as quais são andrógeno-dependentes (BATAINEH & DARADKA, 2007; ELSEDAWI *et al*., 2021). Neste estudo, o escitalopram causou redução de peso em alguns órgãos andrógeno-dependentes como próstata, vesícula seminal, testículo; sugerindo assim, uma alteração no eixo hormonal, porém corroborando com o que foi dito anteriormente sobre a recuperação do nível hormonal após a interrupção do uso do medicamento. Erdemir e colaboradores (2014), estudando a ação danosa de alguns antidepressivos da classe de inibidores seletivos de recaptação de serotonina, dentre eles o escitalopram, sobre a fertilidade de ratos machos, constataram alterações hormonais significantes somente em animais tratados com sertralina sugerindo, portanto, que um efeito mais brando sobre os níveis plasmáticos de testosterona teria ocorrido mediante o uso de outros medicamentos, quais sejam, a fluoxetina, a paroxetina e o escitalopram.

Além disto, os animais estressados, que foram tratados ou não com escitalopram, apresentaram diminuição do peso e do volume testicular. Os dados biométricos dos órgãos reprodutivos, observados na presente pesquisa, estão de acordo com os apresentados na literatura, que relataram que exposição ao estresse crônico em ratos, causa alterações nos órgãos reprodutivos, alterando diâmetros e expessuras testiculares, causando apoptose de células testiculares, bem como diminuindo os níveis plasmáticos de testosterona (HOU *et al*., 2014; ZOU *et al*., 2019). França e colaboradores (1998) comentaram que quando ocorre massiva perda celular no epitélio seminífero, um

acentuado declínio das medidas morfométricas testiculares consequentemente acontece. Neste caso, é provável que a apoptose de células da linhagem germinativa possa ter ocorrido em decorrência da ação danosa do escitalopram, como já relatado com o uso de outros antidepressivos desta classe, e pela exposição ao estresse crônico (GAO *et al*., 2003; ILGIN *et al*., 2017; HAMDI, 2019; ELSEDAWI *et al*., 2021). O estresse crônico aumenta os níveis séricos de corticosterona o que pode acabar inibindo a síntese de testosterona e, como resultado, causar apoptose em células de Leydig e comprometer a esteroidogênese (GAO *et al*., 2003). Nossos resultados estão de acordo com o que foi citado anteriormente, tendo em vista que níveis plasmáticos de testosterona nos animais submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado foram menores e os animais estressados sem uso de antidepressivo apresentaram um aumento no tamanho das adrenais, corroborando com a ideia do aumento sérico de corticosterona. Além disso, a análise histopatológica dos testículos, revelou que os túbulos seminíferos dos animais tratados com escitalopram e/ou submetidos ao estresse apresentaram maior freqüência de alterações estruturais em comparação aos dos animais controles. Essas alterações corroboram os dados relativos às alterações biométricas testiculares e de órgãos andrógeno-dependentes, além dos danos espermáticos causados pelo tratamento com escitalopram e estresse, conforme já relatados.

De fato, várias condições ou eventos associados à infertilidade masculina são indutores de estresse oxidativo (GALAL *et al*., 2016). Estresse oxidativo pode causar mudanças na dinâmica do fluxo sanguíneo da microvascularização testicular, na sinalização endócrina e na apoptose de células germinativas. O dano oxidativo pode ocorrer em várias classes de moléculas, incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares. Isto significa que a célula, o núcleo, as membranas mitocondriais, o RNA e o DNA são vítimas potenciais do estresse oxidativo (TURNER & LYSIAK, 2008). O aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) é, portanto, conhecido por ter impacto negativo sobre parâmetros espermáticos (AITKEN & ROMAN, 2008); ele é causado pelo desequilíbrio entre os níveis de EROs e de antioxidantes. Os tecidos testiculares são muito susceptíveis à oxidação e isso ocorre devido à grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados contidos na membrana das células germinativas e dos próprios espermatozoides (AITKEN, 1995; GRIVEAU & LANNOU, 1997; AGARWAL *et al*., 2014). Outro fator importante é que o estresse oxidativo prolongado nos testículos pode causar mudanças histopatológicas (AYINDE *et al*.,2012; EL-NEWESHY *et al*., 2013). Os radicais livres podem induzir a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas das células germinativas e dos gametas, resultando,

em possível atrofia testicular e degeneração dos túbulos seminíferos (MANDAL & DAS, 2011). De fato, conforme comentado, ácidos graxos insaturados são encontrados em quantidades elevadas nas células germinativas, em nível testicular. Isto favorece o aumento da produção de EROs em resposta a diferentes situações danosas (ASADI *et al.,* 2017), o que ocorreu, no presente trabalho, em relação à submissão ao estresse crônico moderado e ao tratamento com o escitalopram. Existe também um sistema natural de defesa antioxidante local, que protege o tecido testicular contra possíveis lesões causadas por EROs (AITKEN et al., 2008). Contudo, quando há superprodução de EROs, ocorre sobrecarrega do sistema antioxidante natural. Tal fato pode conduzir à peroxidação lipídica culminando com danos à membrana celular (MARITIM *et al.*, 2003; RATO *et al*., 2014).

Na presente pesquisa, a análise de estresse oxidativo através da sonda BODIPY, mostrou que houve um aumento nos níveis de peroxidação lipídica nos espermatozoides dos animais submetidos ao estresse moderado crônico, que foram ou não tratados com o escitalopram, em relação aos animais controles. Além disso, avaliações do *status* oxidativo, em nível testicular e epididimário, utilizando, como marcador, o malondialdeído, um produto secundário da peroxidação lipídica (AYOUB et al. 2000), revelaram que houve um aumento deste marcador nestes tecidos. O estresse oxidativo pode causar alterações nos componentes lipídicos da membrana de células imaturas da linhagem germinativa e nos espermatozoides, de modo que mudanças na fluidez e na permeabilidade destes últimos podem ocorrer (ASADI et al., 2017), resultando em alterações da reação acrossômica, fluidez inadequada da membrana celular e possíveis disfunções do processo de fertilização (TRAMER et al.,1998; KO et al., 2014) Os dados de peroxidação lipídica nos espermatozoides, aqui observados, estão de acordo com aqueles relativos à integridade do acrossoma, já que, tanto animais submetidos ao estresse como também os tratados com o escitalopram mostraram alteração destes parâmetros. Além disso, alguns trabalhos revelaram que o uso de sertralina e citalopram, inibidores seletivos de recaptação de serotonina, causaram aumento de estresse oxidativo em nível testicular aumentando os níveis de malondialdeído e diminuindo a atividade da enzima glutationa (GSH) (ATLI et al., 2017; ILGIN *et al*., 2017; HAMDI, 2019). Além da lesão testicular, deve-se também considerar a possibilidade de dano epididimário e o dano direto ao espermatozoide. Desta forma, deve-se atentar, neste caso, para o fato de que membranas celulares de espermatozoides também são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e que estas células carecem de reparos enzimáticos. Tal fato torna estes gametas largamente expostos ao estresse oxidativo, aumentando a

vulnerabilidade do seu DNA à peroxidação lipídica (AITKEN, 1995; GRIVEAU & LANNOU, 1997; AGARWAL *et al*., 2014). Neste trabalho, os resultados obtidos pela dosagem de MDA em testículos apresentaram diferenças significantes nos animais submetidos ao protocolo de estresse crônico, os quais mostraram um aumento deste parâmetro analisado. Por outro lado, modificações estruturais do tecido epididimário podem resultar em desequilíbrio de seu microambiente, o qual é imprescindível para uma maturação espermática adequada, de modo a prejudicar a qualidade espermática. Além disso, o epidídimo do rato pode ser dividido anatomicamente em 4 regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda; formando um complexo segmentado (19 segmentos), onde cada segmento expressa e coordena seus próprios genes, proteínas, enzimas, eletrólitos e vias de sinalização (ROBAIRE et al., 2006; DOMENICONI et al., 2016). Consequentemente, as células de cada segmento possuem regulação diferenciada da expressão gênica e proteica, resultando em composições fluídicas distintas em cada região (ROBAIRE et al., 2006). Neste trabalho constatamos alterações no tecido epididimário nas suas diferentes porções; onde os animais submetidos ao estresse crônico (GE) apresentaram aumento nos níveis de MDA na região de cabeça+corpo ao passo que os animais submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram (Ge, GE e GEe) apresentaram aumento nos níveis de MDA na região da cauda. As diferentes alterações encontradas em cada região podem ser reflexo da especificidade estrutural e funcional dos segmentos epididimários, resultando em distintas respostas ao tratamento com escitalopram e/ou à exposição ao protocolo de estresse. Além disso, estas alterações podem estar associadas às alterações encontradas em diversos parâmetros espermáticos aqui apresentados.

Em outro trabalho realizado por nosso grupo, no qual também utilizou-se o rato como modelo experimental, administrou-se o escitalopram, na mesma dose e por um período aproximadamente similar (35 dias) mas que, diferentemente do protocolo utilizado nesta pesquisa, se estendeu desde a peripuberdade (41 dpp) até a fase de jovem adulto (76 dpp); no presente trabalho, a administração do referido anti-depressivo aos animais iniciou-se a partir do 70° dpp, estendendo-se até o 103° dpp (maturidade sexual plena). Como resultado, observou-se, no trabalho anterior, um aumento significativo dos níveis de malondialdeído, um marcador importante de peroxidação lipídica, tanto no testículo como no epidídimo (dados ainda não publicados), corroborando de certa forma os achados, em espermatozoides, apresentados neste relatório. Nesta pesquisa, o estresse oxidativo observado nos órgãos reprodutivos, como testículo e epidídimo, em razão da administração do escitalopram, corrobora os efeitos deletérios notados nos

espermatozoides. Contudo, a ação direta deste antidepressivo sobre os espermatozoides, durante o trânsito no epidídimo, também deve ser considerada, já que estas células apresentam membrana celular rica em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), o que as torna suscetíveis ao dano oxidativo. De fato, o estresse oxidativo é o maior fator contributivo para a infertilidade masculina (AITKEN & SHAUN, 2008; AGARWAL et al., 2018; BARATI et al., 2019; SENGUPTA et al., 2022), resultando em alterações na atividade esteroidogênica das células de Leydig (HALES et al., 2005) e na diferenciação do epitélio germinativo em espermatozoides normais (NAUGTHON et al., 2001).

De acordo com os dados aqui apresentados, os ratos estressados e/ou tratados com escitalopram apresentaram alterações nos parâmetros espermáticos quantitativos. A produção diária de espermatozoides e o número de espermátides na etapa 19 sofreram diminuição causada pelo tratamento com escitalopram e/ou pela aplicação do protocolo de estresse. Como mencionado anteriormente, a longa exposição às drogas da classe ISRS pode causar prejuízos à fertilidade masculina.

O escitalopram também é usado no tratamento de ejaculação precoce (HATZIMOURATIDIS *et al*., 2010). Os espermatozoides ficam estocados na porção caudal do epidídimo até a sua ejaculação; portanto, qualquer alteração neste órgão pode alterar o tempo de trânsito, o processo de maturação e comprometer a qualidade do gameta masculino. Em mamíferos, o epidídimo desempenha múltiplas funções tais como reabsorção do fluído dos túbulos seminíferos, transporte de espermatozoides, eliminação de gametas anormais, além da maturação do espermatozoide. Assim, alterações epididimárias podem causar comprometimento das funções essenciais e inerentes ao gameta masculino (SULLIVAN *et al*., 2005).

Os espermatozoides provenientes diretamente do testículo, em diferentes espécies de mamíferos, são funcionalmente imaturos em decorrência da incapacidade destes gametas em "nadar", de forma progressiva, e interagir de modo produtivo com o complexo cumulus-oócito. Na verdade, estes atributos funcionais desenvolvem-se progressivamente durante a passagem (descida) destas células através do epidídimo (ZHOU *et al.,* 2018). Atraso no tempo de trânsito pelo epidídimo parece não alterar a capacidade fértil dos gametas (KEMPINAS *et al*., 1998). Em contrapartida, quando este tempo é acelerado podem ocorrer prejuízos à fertilidade, pois o tempo disponível para a aquisição da capacidade fertilizante dos espermatozoides, em nível epdidimário, é reduzido (KLINEFELTER *et al*., 1994). Os resultados deste estudo mostraram que animais tratados com escitalopram (Ge e GEe) tiveram alterações no tempo de trânsito espermático na região da cauda epididimária. De acordo com Jimenez-Trejo *et al*. (2007),

a cabeça do epidídimo do rato possui um sistema serotonérgico local que inclui a expressão de enzimas para a biossíntese de serotonina (5- hidroxitriptamina, 5-HT) além de vários subtipos de receptores para este ISRS, alguns envolvidos nas contrações do músculo liso da cauda do epidídimo; isto, indica que essa transmissão serotonérgica pode contribuir para a contração coordenada desta porção do ducto epididimário, durante o transporte de espermatozoides (MUELLER *et al*., 2019), evento fundamental para a fertilidade. Deste modo, o significado e impacto das alterações de trânsito epididimário aqui observadas, sobre a fertilidade dos animais mediante uso de escitalopram, necessitam maior investigação.

Neste estudo, avaliaram-se os efeitos do estresse sobre o sistema reprodutivo masculino. Os mecanismos celulares e moleculares que envolvem a depressão induzida por estresse ainda são incertos (QIU *et al*., 2014); entretanto, o estresse pode induzir a liberação de corticosteroides pelas adrenais (MCEWEN, 2007) e o aumento nos níveis de corticosterona pode acarretar alterações no metabolismo da serotonina tanto no sistema nervoso central como no periférico (PARIS *et al*., 1987; MALYSKO *et al*., 1994, NISHI & AZMITIA, 1996). Portanto, a redução nos níveis sinápticos de serotonina (5-HT; 5-hidroxitriptamina) nas regiões cerebrais somada a baixa produção de fatores neurotróficos derivados do cérebro na região hipocampal podem contribuir para a depressão induzida por estresse (DUMAN & MONTEGGIA, 2006).

No presente estudo, a estrutura da cromatina dos espermatozoides foi avaliada empregando-se as técnicas: Laranja de Acridina, Ensaio COMETA, Azul de Touidina, Cromomicina A3 (CMA3) como também através da utilização de Kit específico para análise de fragmentação de DNA espermático em ratos (Halomax®). As análises em que se utilizaram respectivamente o método Laranja de Acridina, o Ensaio COMETA e o Kit Halomax avaliaram a fragmentação/integridade de DNA espermático enquanto as análises referentes aos métodos do Azul de Toluidina e da Cromomicina A3 avaliaram a integridade da cromatina dos espermatozoides. Durante a espermiogênese, grande parte das histonas presentes na cromatina dos espermatozoides são trocadas por protaminas, processo intitulado “protaminação”, permitindo uma condensação maior do material genético e garantindo maior resistência mediante exposição a fatores danosos (MILLER et al., 2010).

Karimipour e colaboradores (2020) observaram, em camundongos oriundos de mães tratadas com fluoxetina (outro medicamento da classe do escitalopram - ISRS), um aumento significativo na fragmentação do DNA espermático. Em contrapartida, a análise dos resultados obtidos na presente pesquisa não apresentou diferenças significantes em

relação à fragmentação do DNA espermático, e isto pode ter acontecido, provavelmente, em razão do período ocorrido entre o término do tratamento e a eutanásia dos animais, proporcionando uma recuperação natural. De fato, alguns danos espermáticos causados por essa classe de medicamentos podem ser reversíveis após o fim da utilização da medicação (GALAL *et al*., 2016). Em relação à integridade e maturidade da cromatina espermática, observamos um aumento de espermatozoides CMA3 positivos, indicando uma baixa compactação da cromatina nestas células, dados que foram corroborados através da técnica de Azul de Toluidina, em que os resultados revelaram uma redução na compactação da cromatina em espermatozoides nos animais tratados com escitalopram e/ou submetidos ao protocolo de estresse crônico, em relação aos animais do grupo controle. O CMA3 e o corante Azul de Toluidina são marcadores eficazes na detecção indireta e direta, respectivamente, de espermatozoides com deficiência de protamina, os quais apresentam alterações na compactação fisiológica do DNA espermático, onde os marcadores se ligam em resíduos de fosfato do DNA espermático devido à frouxa compactação da cromatina (BIANCHI *et al.*,1993; SAKKAS *et al.*, 1995, SHAMSI, IMAM, DADA, 2011). Novamente, o aumento da peroxidação lipídica, em espermatozoides e epidídimos de animais tratados com escitalopram e/ou submetidos ao estresse crônico moderado imprevisível, corrobora o papel do estresse oxidativo na piora da qualidade espermática. De fato, observou-se, aqui, não somente a ocorrência de alterações de parâmetros espermáticos, comumente investigados em análises de rotina, tais como vitalidade, motilidade, e morfologia, como também em parâmetros mais específicos, quais sejam: integridade do acrossoma e estrutura da cromatina (protaminação).

Alguns trabalhos sugerem que níveis adequados de FSH e testosterona são essenciais durante os estágios de condensação espermática. Desta forma, acredita-se que exista um mecanismo molecular de regulação endócrina durante a transição histona-protamina, a qual mantém a integridade da cromatina durante a sua condensação, ocorrida durante a espermiogênese (ALEEM *et al*, 2008; GILL-SHARMA *et al.,* 2011). Segundo Aleem e colaboradores (2008), os métodos convencionais para estudo da integridade da cromatina, tais como laranja de acridina e dispersão da cromatina, não são sensíveis para a detecção de mudanças na compactação da cromatina (falhas na protaminação) que sejam causadas por desequilíbrios hormonais (FSH e testosterona). Em resumo, alterações na condensação da cromatina de espermatozoides epididimários, causadas por mudanças nos níveis de testosterona ou FSH, podem estar associadas com desequilíbrio endócrino e queda de fertilidade (ALEEM *et al*., 2008). Além disso, exposições

ambientais, como o estresse crônico, podem interferir na diferenciação de células da linhagem germinativa, por meio do estabelecimento de marcas epigenéticas, as quais podem transmitir informações durante a fertilização, afetando o desenvolvimento e a saúde da prole (RODGERS, *et al*., 2015; MARCHO *et al*., 2020). Deste modo, ainda que os testes de fragmentação do DNA espermático aqui utilizados não tenham mostrado diferenças significantes entre os grupos, não podemos excluir a ocorrência de danos através de mecanismos e "marcas" epigenéticas que podem impactar negativamente o desenvolvimento das progênies. Corroborando esta ideia, é importante enfatizar que alterações significantes nos níveis de testosterona foram observadas nos grupos submetidos ao estresse e submetidos ao estresse com escitalopram (GE e GEe), como também alterações da condensação da cromatina em animais submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram (Ge, GE e GEe).

O comportamento sexual e a capacidade reprodutiva também foram alvos de estudo nesta pesquisa. O comportamento sexual de ratos machos envolve uma série neurotransmissores, neuropeptídios e de interações neuroendócrinas. Este comportamento pode ser alterado mediante a exposição a agentes ambientais, incluindo medicamentos, especialmente na fase de puberdade, em que ocorrem eventos hormonais complexos, aumentando a suscetibilidade de alterações comportamentais na vida adulta (GRAY *et al*., 1998; VIEIRA *et al*., 2017).

Em roedores, o comportamento sexual masculino é caracterizado por em uma série de padrões motores estereotipados, executados em uma sequência ordenada, caracterizada inicialmente pela aproximação ou investigação do rosto e da região anogenital da fêmea, seguida pela realização de montas sem ou com intromissões, ejaculação e de intervalo pós-ejaculatório. Em ratos, no início do comportamento sexual, a fêmea receptiva normalmente permanece imobilizada enquanto o macho se aproxima da região traseira de seu corpo, abraça seus flancos com suas patas dianteiras, e inicia uma série de movimentos superficiais da pélvis (*thrusting*), caracterizando a monta. O pênis está parcialmente ereto durante esses movimentos. A fêmea, por sua vez, assume postura de lordose, com encurvamento característico do dorso e a cauda desviada para um lado, expondo a vagina. Em alguns casos, mesmo a fêmea estando receptiva, esta pode rejeitar o macho, principalmente se as suas abordagens não forem adequadas. A intromissão define o comportamento copulatório. A ocorrência da intromissão peniana é inferida pela presença de monta, com consequente lordose da fêmea, movimentos de penetração vaginal, seguidos da desmonta rápida e limpeza da área genital do macho. Esta sequência de movimentos requer ereção peniana e, também, atividade coordenada dos

músculos estriados do pênis, estando associada com a ativação dos reflexos ejaculatórios; portanto, a taxa de intromissão pode fornecer indícios sobre a função erétil (AGMO, 1997; HULL & RODRÍGUEZ-MANZO, 2017).

A ejaculação é evidenciada pela ocorrência de monta com intromissão, seguida pelo levantar-se do tronco do macho por alguns segundos e, em sequência, da desmonta lenta e limpeza genital. A maioria dos mamíferos machos somente ejacula após a estimulação de várias intromissões. Após a ejaculação, os ratos machos entram em período refratário, ou seja, ausência de interesse sexual que pode variar de 5 a 10 minutos. Os primeiros 50% a 75% deste intervalo são considerados como período refratário absoluto, quando o macho não irá copular de novo, mesmo se estimulado (AGMO, 1997; HULL & DOMINGUEZ, 2007; HULL & RODRÍGUEZ-MANZO, 2017).

Neste estudo, o comportamento sexual dos ratos machos foi avaliado sob dois aspectos distintos: a motivação sexual (libido) e a desempenho ou potência copulatória (execução dos atos copulatório). A motivação sexual é influenciada por fatores sensoriais e motores e é avaliada pela latência para a 1ª monta e a latência para a 1ª intromissão. Entretanto, a latência de intromissão pode também ser influenciada pela atividade motora e a função erétil, que podem ser prejudicadas por manipulações experimentais, sem afetar a motivação sexual. Portanto, a latência de monta é o melhor parâmetro para avaliar a motivação sexual (AGMO, 1997; CHEN *et al.,* 2017; HULL & RODRÍGUEZ-MANZO, 2017). Desta forma, aumento na latência para 1ª monta observada nos ratos dos grupos GE e GEe sugere alteração nos mecanismos relacionados à motivação sexual, mas sem efeito sobre a ereção peniana.

Além do número e da latência de montas estarem associadas à motivação sexual, deve-se considerar que resposta aos estímulos sensoriais do rato também afetam este parâmetro. Desta forma, aumento na sensibilidade tátil ou na sensibilidade olfatória pode afetar a capacidade do rato macho de localizar a fêmea. Portanto, deve-se ter cautela na análise do aumento do número e da latência das montas (AGMO, 1997).

Embora as intromissões sejam essenciais para a estimulação peniana e o comportamento copulatório de ratos machos, que culmina com a ejaculação, a realização de montas também desempenha papel importante para o padrão de comportamento sexual do rato macho. O comportamento de monta determina o padrão temporal da cópula por contribuir para o estado de excitação e estimular a ejaculação (BITRAN & HULL, 1987; AGMO, 1997; HUIJGENS *et al*., 2021). Portanto, o comportamento de monta está relacionado tanto à motivação sexual quanto à performance copulatória.

A performance copulatória é avaliada pelo número de montas e de intromissões, latência para a 1ª ejaculação, intervalo pós-ejaculatório, número de ejaculações em um determinado intervalo de tempo (neste estudo foi de 30 minutos), eficiência copulatória e índice copulatório (HULL & RODRÍGUEZ-MANZO, 2017).

Embora a maioria dos parâmetros do comportamento sexual não tenham apresentado diferença significante entre os grupos experimentais, deve-se considerar a proporção de ratos que não apresentaram monta nos 10 minutos iniciais do teste, a partir da introdução da fêmea receptiva, e a proporção de ratos que alcançaram a ejaculação. Nos grupos GC e Ge, 100% dos animais realizaram a monta e ejacularam pelo menos uma vez durante os 30 minutos do teste. Por outro lado, nos grupos GE e GEe, 81,8% dos ratos apresentaram comportamento de monta nos primeiros 10 minutos do teste, com aumento significante na latência da primeira monta, e destes, somente 63,6% ejacularam. Ainda, o grupo GEe apresentou aumento significante no número de montas.

A serotonina é o neurotransmissor mais amplamente distribuído no cérebro e suas vias de sinalização são essenciais para várias funções, incluindo o comportamento sexual. Vias serotonérgicas em áreas cerebrais críticas para a orquestração de comportamentos sexuais incluem núcleos hipotalâmicos, principalmente a área pré-óptica medial (MPOA), a área septal, a amígdala e a estria terminalis, no sistema límbico, e as áreas olfatórias (HULL & DOMINGUEZ, 2007; OLIVIER, 2014).

O sistema serotonérgico está envolvido na coordenação dos processos motores, autonômicos e sensoriais, de forma que a serotonina atua como moduladora do comportamento sexual e não como um mediador central, de forma que o aumento de serotonina extracelular acarretada por inibidores seletivos de recaptação de serotonina pode alterar a comportamento sexual em humanos e ratos. Entretanto, devido à grande variedade de receptores serotonérgicos (famílias de receptores de 5-HT 1 a 7), os efeitos deste neurotransmissor se modificam de acordo com o receptor ativado e via de sinalização desencadeada, podendo ser excitatória ou inibitória (SNOERENM *et al*., 2014).

Conforme já abordado anteriormente, o escitalopram é um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, que se liga à proteína transportadora da serotonina (SERT) e inibe a recaptação da serotonina pelo neurônio pré-sináptico. Essa atividade aumenta a quantidade de serotonina na fenda sináptica, potencializando a neurotransmissão serotonérgica no sistema nervoso central. Desta forma, a serotonina interage tanto com os receptores pós-sinápticos, quanto com autoreceptores pré-sinápticos. A estimulação dos autoreceptores 5-HT1A pré-sinápticos ocasiona, inicialmente, modulação na

liberação de serotonina, seguido por dessensibilização destes receptores, alteração no mecanismo de automodulação e, consequentemente, aumento da libertação de serotonina para a fenda sináptica. Embora a serotonina seja geralmente inibidora sobre o comportamento copulatório, a ativação de receptores 5-HT1A diminui a latência e o número de intromissões e estimula o reflexo ejaculatório; no entanto, com a dessensibilização dos autoreceptores 5-HT1A, pode ocorrer retardo no reflexo ejaculatório. A paroxetina e a fluoxetina parecem mais potentes na dessensibilização dos receptores 5-HT 1A e inibição dos reflexos ejaculatórios quando comparadas ao citalopram e a fluvoxamina. Por outro lado, a ativação de receptores 5-HT1B, 5-HT2C e de outros receptores 5-HT2 determina um efeito inibitório sobre o comportamento copulador masculino e aumento do limiar ejaculatório, mas promovem a ereção peniana (AHLENIUS *et al*., 1989; FERNANDEZ-GUASTI *et al*., 1992; AHLENIUS & LARSSON, 1999; RODRÍGUEZ-MANZO *et al*., 2002; SNOERENM *et al*., 2014; ANGOA-PÉREZ & KUHN, 2015). Além da diminuição da atividade serotonérgica via receptores 5-HT 1A, o aumento na transmissão dopaminérgica e noradrenérgica ocorrem no modelo de depressão em roedores induzida por estresse crônico imprevisível (MAHAR *et al*., 2014; LU *et al*., 2019; DU *et al*., 2020) e podem influenciar no comportamento sexual em direções opostas e mascarando possíveis efeitos sobre a motivação e a eficiência copulatória.

Desta forma, no presente estudo, os parâmetros de comportamento sexual avaliados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, em parte, provavelmente, devido à ativação dos diferentes tipos de receptores serotonérgicos e os complexos mecanismos serotonérgicos envolvidos no controle das fases do comportamento sexual masculino.

O comportamento sexual masculino é altamente dependente da testosterona e de seus produtos metabólitos, o estrógeno e a di-hidrotestosterona. No entanto, os níveis de testosterona necessários para a ocorrência normal da espermatogênese são muito maiores que aquela exigida para estimular o comportamento sexual e, portanto, reduções na concentração de testosterona nem sempre afetam o comportamento (DAVIDSON *et al*., 1978; ALVARENGA *et al*., 2010).

Mos e colaboradores (1990) relataram que animais sem experiencia sexual apresentam maior estímulo dos mecanismos ejaculatórios, alcançando a ejaculação mais rapidamente quando comparados a animais experientes. Entretanto, não ocorreu nenhum efeito sobre a motivação sexual e o desempenho copulatório de ratos após o tratamento com ISRSs. Os autores então sugeriram que este fator poderia mascarar os efeitos

inibitórios potenciais esperados dos bloqueadores de recaptação de 5-HT no rato e pode justificar, também, a ausência de significância estatística dos parâmetros de comportamento sexual observados no presente estudo, já que também foram utilizados ratos machos não experientes.

No que se refere à capacidade reprodutiva, foram observadas algumas alterações quando se analisaram os dados obtidos do acasalamento de animais, que foram submetidos somente ao estresse, mostrando que o protocolo com os diferentes estressores foi capaz de alterar a fertilidade. Alguns estudos, nos quais camundongos foram submetidos a protocolos de estresse crônico, revelaram a existência de marcadores epigenéticos em células da linhagem germinativa, relacionados ao aumento na expressão de um tipo de RNA, o sncRNA ("small noncoding RNA"), como também a mudanças na metilação do DNA (CARONE *et al*., 2010; DIETZ *et al*, 2011; RODGERS *et al*., 2013; LAMBROT *et al*., 2013; DIAS & KESSLER, 2014). Espermatozoides passam por várias etapas de diferenciação, desenvolvimento e maturação; o período de exposição ao estresse pode afetar mecanismos distintos ao longo da espermatogênese (RODGERS & BALE, 2015). No protocolo utilizado neste projeto, a exposição ao estresse teve início da peripuberdade e se desenvolveu por 56 dias consecutivos, garantindo um período superior a 53 dias - tempo de espermatogênese em ratos da linhagem Wistar (HUCKINS, 1965). Liu e colaboradores (2012) relataram a existência de miRNAs nos espermatozoides, os quais são essenciais para a embriogênese normal, quando a inibição dos mesmos pode culminar em falha do desenvolvimento. Em um outro trabalho realizado por Chan e colaboradores (2017), a exposição de camundongos machos ao estresse crônico gerou, nos espermatozoides, um aumento destes miRNAs, comprovando o efeito negativo do estresse crônico sobre os gametas masculinos. Por fim, em outro estudo sobre a herança paterna observou-se que alterações espermáticas, tais como problemas na maturação e na motilidade, decorrentes da exposição ao estresse, podendo afetar a fertilização e eventos pré-implantacionais, consequentemente afetando o desenvolvimento da prole (RANDO, 2012). Os dados da presentes pesquisa indicam alguns efeitos negativos do estresse sobre os gametas paternos causando diminuição na taxa de implantação, alteração no peso dos fetos e das placentas, além de aumento significativo de perdas pré-implantacionais. A análise dos dados de animais tratados com o escitalopram, por sua vez, não mostrou interferência significante deste antidepressivo sobre a fertilidade, nas condições do presente experimento. Todavia, sabe-se que a produção de espermatozoides em roedores excede muito a quantidade necessária para que ocorra fertilização, tornando-se necessário um dano mais acentuado na espermatogênese para que ocorra um impacto significativo

sobre à progênie (ZENICK & CLEGG, 1989; BELTRAME *et al*., 2019). Além disso, a queda na qualidade seminal não está, necessariamente, relacionada à queda na fertilidade (DROBNIS & NANGIA, 2017).

Neste estudo, foi também constatado que a exposição crônica de ratos ao escitalopram, desde a fase de jovem adulto até a fase adulta, de maturidade sexual plena, causou aumento de estresse oxidativo espermático, bem como diminuição da protaminação e da integridade na estrutura da cromatina espermática, em relação ao grupo controle. Importante ressaltar que alterações na integridade, estrutura e na compactação da cromatina podem ocorrer independentemente da presença de alterações de outros parâmetros seminais qualitativos e quantitativos (SALEH et al., 2002; TANRIKUT et al., 2010; BEEDER & SAMPLASKI, 2020).

De acordo com Zou e colaboradores (2019) duas explicações são sugeridas com respeito aos mecanismos moleculares envolvidos nos prejuízos sobre a espermatogênese, causados pelo estresse, quais sejam: (I) indução da parada do ciclo celular nas espermatogônias durante a fase G0/G1; (II) dano e apoptose em espermátides que, no caso de exposição ao estresse, parecem ser as células mais susceptíveis. De fato, foram observadas alterações na produção diária de espermatozoides, na concentração e no trânsito epididimário; além de alterações nos parâmetros espermáticos qualitativos nos animais submetidos ao protocolo de estresse (GE e GEe), o que poderia ser explicado por estes dois tópicos mencionados acima.

Existe ampla literatura relacionada a diferentes eventos ocorridos durante a gestação, com uma diversidade de fatores, incluindo exposição a tratamentos medicamentosos e exposições ambientais. De fato, a associação entre saúde materna e desenvolvimento da prole tem sido bastante estudada e é relativamente bem definida. No entanto, a importância da qualidade seminal e da integridade da cromatina e do DNA espermático no desenvolvimento pós-concepção da prole foi por muito tempo negligenciada. Contudo, a saúde paterna e o desenvolvimento pós-fertilização podem ser influenciados por mecanismos ligados a alterações do epigenoma do espermatozoide (metilação do DNA, modificações de histonas e perfis de RNA). Neste aspecto, investigamos a associação das alterações espermáticas e de possível ocorrência de malformações congênitas na prole de ratos adultos mediante o tratamento crônico com o escitalopram a partir da fase de jovem adulto e a exposição ao estresse crônico moderado a partir da peripuberdade.

As avaliações dos fetos resultantes do acasalamento dos animais tratados com as fêmeas saudáveis mostraram a ocorrência de malformações externas como atraso no

desenvolvimento, gastrosquise (não fechamento da parede abdominal e exteriorização das alças intestinais), falha no fechamento do palato (fenda palatina) e hidropisia fetal (acúmulo de líquidos em diversas partes do corpo). O aumento significante de malformações externas nos fetos oriundos de pais expostos ao estresse crônico, pode ser indicativo de efeito teratogênico de origem paterna. Além disso, em vista das alterações importantes, como hidropisia fetal e gastrosquise, observadas nos fetos oriundos de pais submetidos ao estresse ou tratados com escitalopram devemos atentar para possíveis efeitos teratogênicos, em ambos os casos, considerando que estas alterações não foram encontradas em fetos oriundos de pais controles. No que se refere à avaliação visceral, houve apenas a ocorrência isolada de hipertrofia atrial, nos fetos oriundos de pais estressados e/ou tratados com escitalopram. Em relação à avaliação esquelética, maior frequência de alterações ocorreu nos fetos oriundos de pais submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram. Com base nestes dados, podemos relacionar a exposição ao estresse crônico e o tratamento com escitalopram com maior incidência de anomalias fetais. Em resumo, a exposição ao estresse crônico causou um maior impacto no desenvolvimento fetal tanto na análise externa quanto na esquelética. Por outro lado., tanto o estresse como o tratamento com escitalopram não impactaram negativamente sobre o desenvolvimento visceral dos fetos. No entanto, os grupos tratados com escitalopram apresentaram alterações esqueléticas em grande incidência quando comparado aos animais controles.

Com o crescente aumento dos casos de depressão em todo mundo, um consequente aumento de prescrição de medicamentos para tratamento de distúrbios psiquiátricos vem ocorrendo, tanto em homens como em mulheres em fase reprodutiva. Os efeitos do uso de antidepressivos durante a gestação, tanto em curto como em longo prazo, têm sido amplamente investigados. Contudo, como já mencionado, há escassez de dados no que concerne à utilização paterna destas substâncias e seu impacto sobre o desenvolvimento da progênie, com base, sobretudo, nas conhecidas alterações observadas nos espermatozoides, frente a uma diversidade de agentes danosos, em grande parte medicamentosos (VIKTORIN *et al*., 2018). No entanto, a associação entre a qualidade do genoma e epigenoma do espermatozoide com o sucesso da fertilização e gestação, bem como no bom desenvolvimento e saúde das progênies já é reconhecida. Em resumo, a integridade do genoma paterno desempenha papel importante no estabelecimento da gestação, como também na sua manutenção e viabilidade (SAKKAS & ALVAREZ, 2010). Assim, podemos sugerir que uma frequência maior das alterações fetais encontradas nos grupos tratados com escitalopram poderia estar relacionada, ainda que

parcialmene, com alterações da compactação da cromatina e redução na protaminação. Desta forma, é de suma importância um entendimento abrangente sobre o nível de impacto que a saúde reprodutiva masculina apresenta, não somente no que concerne à fertilidade, como também para as mães e as proles, (MORGAN *et al*., 2020).

Os efeitos do estresse sobre a reprodução masculina estão envolvidos com a relação do sistema simpático-adrenal e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (FLAK *et al*., 2014). O estresse de duração crônica pode trazer efeitos negativos sobre o sistema reprodutivo em animais (SAKR *et al.,* 2015). O estresse crônico aumenta os níveis de glicocorticoides o que acaba ativando o eixo HPA, suprindo a função do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) (ZOU *et al*., 2019). Segundo Gilbeau e Smith (1985), no estresse crônico, ocorre uma supressão na liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) causando uma diminuição na secreção do hormônio folículo estimulante (FSH). Além disso, o estresse crônico aumenta os níveis séricos de corticosterona o que pode acabar inibindo a síntese de testosterona, conforme já discutido anteriormente (GAO *et al*., 2003). Estes eventos acabam levando a uma disfunção no receptor acoplado à proteína G (GPR54) resultando em danos na barreira hematotesticular (HAUTANEN, 2000; WANG, 2011; CHEN *et al*., 2012). A exposição parental a experiências estressantes pode resultar em reprogramações epigenéticas levando a mudanças de padrões na expressão gênica e nas funções celulares, a longo prazo. Mais especificamente, o estresse pode causar alterações epigenéticas nos gametas (espermatozoides e oócitos) resultando na transmissão destas "marcas" epigenéticas no zigoto (RODGERS & BALE, 2015). Além disso, o estresse pode causar alterações epigenéticas diretamente sobre o desenvolvimento fetal, através de alterações nos tecidos extraembrionários como, por exemplo, a placenta, a qual tem papel chave no desenvolvimento embrionário-fetal, de modo que estas alterações podem permanecer nas progênies, até a fase adulta (CHAN *et al*., 2017).

A Sirtuína-1 (SIRT1) é uma desacetilase NAD (+) dependente que pertence à classe III de histonas desacetilases. Ela é altamente preservada entre as espécies e atua epigeneticamente na regulação da expressão gênica (BOSCH-PRESEGUE *et al*., 2015; LEI *et al.*, 2019). Além disso, SIRT1 regula a acetilação de fatores de transcrição específicos, enzimas e proteínas, modulando suas funções (VAQUERO *et al.,* 2007; PENG *et al*., 2011; HALLOWS *et al*., 2012). Alguns estudos em modelos animais revelam a importância da SIRT1 na regulação das emoções (LIBERT *et al*., 2011; FERLAND *et al.*, 2013; LO IACONO *et al*., 2015; ABE-HIGUCHI *et al*., 2016; KIM *et*

*a*l., 2016). No entanto, a ação exata da SIRT1 sobre os neurônios, em quadros de depressão, ainda não está clara. Sabe-se que a SIRT1 está amplamente distribuída no cérebro, em altos níveis, nas regiões do hipocampo e córtex (QIN *et al*., 2006; MICHAN *et al*., 2007; RAMADORI *et al*., 2008; MICHAN *et al*., 2010; ZAKHARY *et al*., 2010), pois são regiões ricas em neurônios glutamatérgicos (TANG *et al*., 2017). Existem evidências de que alterações no sistema glutamatérgico constituem a principal característica patológica em transtornos de humor, servindo, portanto, como alvo farmacológico. Neste caso, a relação entre SIRT1 e depressão, através de alterações no sistema glutamatérgico é sugerida por alguns autores (KISHI *et al*., 2010, KOVANEN *et al*., 2015; LU *et al*., 2018). A SIRT1 está diretamente envolvida no desenvolvimento de comportamentos depressivos causados por protocolo de estresse crônico, em modelos animais (LU *et al.,* 2018; LEI *et al*., 2019). Quando a SIRT1 é ativada, o desenvolvimento de comportamentos depressivos e anormalidades nas estruturas dendríticas, os quais são induzidos pelo estresse crônico, podem ser bloqueados (ABE-HIGUCHI *et al*., 2016). Na presente pesquisa, a redução nos níveis de SIRT1 nos ratos submetidos ao estresse crônico, ainda que no tecido testicular e, também, as alterações de comportamento apresentadas por estes mesmos animais durante os testes de nado forçado e consumo de sacarose, corroboram o envolvimento da SIRT1 em quadros de depressão, e vêm reforçar a eficácia do protocolo de estresse crônico no modelo de estudo aqui utilizado.

O papel das sirtuínas na regulação da fertilidade, tanto masculina quanto feminina, foi relatado após um estudo onde analisaram fenótipos reprodutivos alterados de camundongos SIRT1-/- (MC BURNEY *et al*., 2003). Além disso, alguns trabalhos mostraram que a redução na imunoexpressão da SIRT1 compromete o desenvolvimento fetal, aumenta as taxas de morte pós-natal e causa redução no peso fetal (MCBURNEY *et al*., 2003; LI *et al*., 2007; COUSSENS *et al*., 2008), correspondendo com os dados da capacidade reprodutiva e de malformações fetais dos animais submetidos ao estresse crônico aqui apresentados.

Além das alterações histopatológicas observadas nos testículos dos animais submetidos ao estresse e/ou tratados com escitalopram, observou-se, também, uma redução significativa da imunoexpressão testicular de SIRT1 nestes grupos em comparação aos animais controles. Os resultados obtidos estão de acordo com dados da literatura, em pesquisas utilizando modelos de depressão em animais, nas quais também se observou redução nos níveis de SIRT1, porém em regiões cerebrais (ABE-HIGUCHI *et al*., 2016; LU *et al*., 2018 LEI *et al.,* 2019). Também, há poucos estudos a respeito do binômio “tratamento com antidepressivos X expressão de SIRT1”, principalmente sobre

órgãos reprodutivos masculinos. Por outro lado, Wong *et al* (2015), investigando, no cérebro de camundongos, a área pré-óptica, não observaram relação significante entre terapia com citalopram e expressão do gene para SIRT1. Contudo, notaram, nesta mesma região, um aumento da regulação do gene para SIRT4, mediante esta mesma terapia (WONG *et al*., 2015). No entanto, os resultados aqui apresentados revelaram que o tratamento com escitalopram foi capaz de reduzir a imunoexpressão de SIRT1 em testículos, talvez devido a mecanismo de ação e potência diferenciados, quando comparados a aqueles observados na terapia com citalopram. De fato, o escitalopram é um S (+) -enantiômero do citalopram, porém mais seletivo que este último e com ação mais potente em doses mais baixas (HAYES *et al*., 2010).

Por fim, estudos mais detalhados são necessários para elucidar o papel das sirtuínas na biologia reprodutiva masculina.

6 CONCLUSÕES E COMENTÁRIO FINAL

A presente pesquisa, de cunho translacional, mostrou que a terapia com escitalopram, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, pode causar danos no sistema reprodutivo masculino dos animais, quais sejam: i) alterações de parâmetros espermáticos, tanto qualitativos como qualitativos, quantitativos; ii) alterações histopatológicas testiculares; iii) redução da imunoexpressão de SIRT1 no epitélio seminífero; iv) aumento da incidência de malformações fetais esqueléticas.

Por sua vez, o estresse crônico moderado, aliado ou não à terapia com o escitalopram, causou alterações reprodutivas similares, que acarretaram prejuízos à fertilidade masculina, aumento da incidência de malformações fetais esqueléticas e externas (estresse crônico isolado), além de declínio no comportamento sexual e nos níveis plasmáticos de testosterona.

Desta forma, considerando a alta incidência de distúrbios psiquiátricos e o largo uso do escitalopram, como medicação antidepressiva bastante utilizada, atualmente, em crianças, adolescentes e em jovens adultos, maior atenção deve ser dada a saúde reprodutiva desta população, considerando-se a importância da qualidade do genoma paterno para a fertilidade e o desenvolvimento adequado da progênie.

7 REFERÊNCIAS

7.1 Lista de referências (ordem alfabética)

ABD-ALLAH, A.R.; HELAL, G.K.; AL-YAHYA, A.A.; ALEISA, A.M.; AL-REJAIE, S.S.; AL-BAKHEET, S.A. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity,** 2, 73-81, 2009.

ABE-HIGUCHI N, UCHIDA S, YAMAGATA H, HIGUCHI F, HOBARA T, HARA K, et al. Hippocampal sirtuin 1 signaling mediates depression-like behavior. Biol Psychiatry. 80:815–26, 2016.

ABELAIRA, H.M.; REUS, G.Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 35, 2013.

AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S.S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World Journal of Mens Health**. 32, 1-17, 2014.

AGARWAL A, RANA M, QIU E, ALBUNNI H, BUI AD, HENKEL R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. **Andrologia**. 50(11), 2018.

AGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Research Protocols**. 1, 203-209, 1997.

AHLENIUS, S.; LARSSON, K.; ARYIDSSON, L.E. Effects of stereoselective 5-HT1A agonists on male rat sexual behavior. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. 33, 691-695, 1989.

AHLENIUS S.; LARSSON, K. Synergistic actions of the 5-HT1A receptor antagonist WAY-100635 and citalopram on male rat ejaculatory behavior. **European Journal of Pharmacology**. 379, 1-6, 1999.

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function**. Reproduction, Fertility and Development**. 7, 659-668, 1995.

AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 1, 15-24, 2008.

AITKEN, R.J., SHAUN, D.R. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxid Med Cell Longev**., 1:15-24, 2008.

AKASHEH, G., SIRATI, L., KAMRAN, A.R., SEPEHRMANESH, Z. Comparison of the effect of sertraline with behavioral therapy on semen parameters in men with primary premature ejaculation. **Urology**. 83: 800–4, 2014

ALLEM, M., CHOUDHARI, J., BALASINOR, N., GILL-SHARMA, M.K. Sperm protamine levels indicators of fertilizing potential in sexyally mature rats. **Andrologia**, (1):29-37, 2008.

ALVARENGA, T. A.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Influence of progesterone on sexual performance in male rats. **The Journal of Sexual Medicine**, v.7, n.7, p.2435-2444, 2010.

AMARAL, A.; LOURENÇO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**. 146, 163-74, 2013.

ANGOA-PÉREZ, M.; KUHN, D.M. Neuroanatomical dichotomy of sexual behaviors in rodents: a special emphasis on brain serotonin. **Behavioural Pharmacology**. 26, 595-606, 2015.

ARAGÓN, M.A.; AYALA, M.E.; MARÍN, M.; AVILÉS, A.; DÁMIAN-MATSUMURA, P.; DOMÍNGUEZ, R. Serotoninergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. **Reproduction**, 129, 717-727, 2005.

ASADI, N.; BAHMANI, M.; KHERADMAND, A.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research.** 11, 1-5, 2017.

ASADI, M.H.; ZAFARI, F.; SARVEAZAD, A.; ABBASI, M.; SAFA, M.; KORUJI, M.; YARI, A.; ALIZADEH MIRAN, R. Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. **Neprhourology monthly**. 6, 2013.

ATLI, O.; BAYSAL, M.; AYDOGAN-KILIC, G.; KILIC, V.; UCARCAN, S.; KARADUMAN, B.; ILGIN, S. Sertraline-induced reproductive toxicity in male rats: evaluation of possible underlying mechanisms. **Asian Journal of Andrology**. 19, 672-679. 2017.

ATTIA, S.M.; BAKHEET, S.A. Citalopram at the recommended human doses after long-term treatment is genotoxic for male germ cell. **Food and Chemical Toxicology**. 53, 281-5, 2013.

AYALA, M.E. Brain serotonin, psychoactive drug, and effects on reproduction. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, 9, 258-276, 2009.

AYINDE, O.C.; OGUMMOWO, S.; OGEDEGBE, R.A. Influence of Vitamin C and Vitamin E on testicular zinc content and testicular toxicity in lead exposed albino rats. **BMC Pharmacology and Toxicology**. 14, 13–7, 2012.

AYOUB, R. S.; YOUSIF, W. H.; AZIZ, B. N. Serum glucose, cholesterol and total lipids levels and issue lipid peroxidation in alloxan-diabetic rats treated with aqueous extract of Nigella sativa seeds. Iraqi **Journal of Veterinary Sciences**, 13, 43-49, 2000.

BABU, S.R.; SADHNANI, M.D.; SWARNA, M.; PADMAVATHI, P.; REDDY, P.P. Evaluation of FSH, LH and testosterone levels in different subgroups of infertile males. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**.19, 45–49, 2004.

BARATI E, NIKZAD H, KARIMIAN M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. **Cell Mol Life Sci**. 77(1):93-11, 2020.

BARROW, MV, TAYLOR WJ. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. **J Morphol**. 127(3):291-305, 1969.

BATAINEH, H.N.; DARADKA, T: Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adult male rats. **Neuroendocrinology Letters**. 28, 321-5, 2007.

BAYSAL, M., ILGIN, S., KILIC, G., KILIC, V., UCARCAN, S., ATLI, O. Reproductive toxicity after levetiracetam administration in male rats: Evidence for role of hormonal status and oxidative stress. **Plos One**, 18, 12(4), 2017.

BENEDETTI, S.; TAGLIAMONTE, M.R.; CATALANI, S.; PRIMITERRA, M.; CANESTRARI, F.; STEFANI, S.; PALINI, S.; BULLETTI, C. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. **Reproductive BioMedicine Online**, 25, 300-306, 2012.

BEEDER, L.A.; SAMPLASKI, M.K. Effect of antidepressant medications on semen parameters and male fertility. **International Journal of Urology.** 27, 39-46, 2020.

BELTRAME, F.L.; SANTI, F.; VENDRAMINI, V.; ELIZABETH, R.; CABRAL, L.; MIRAGLIA, S.M.; CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Vitamin B12 prevents cimetidine-induced androgenic failure and damage to sperm quality in rats. **Frontiers in endocrinology**. 10, 309, 2019.

BELETTI, MARCELO EMILIO ET AL., Anomalias em complexo DNA-proteina de espermatozoides de touro: contribuição metodologica. 1992. http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/317808/1/Beletti_MarceloEmilio_M.pd f. Accessed October 2021.

BELL EL, NAGAMORI I, WILLIAMS EO, DEL ROSARIO AM, BRYSON BD, WATSON N, WHITE FM, SASSONE-CORSI P, GUARENTE L. SirT1 is required in the male germ cell for differentiation and fecundity in mice. **Development.** Sep;141(18):3495- 504, 2014.

BHONGADE, M.B.; PRASAD, S.; JILOHA, R.C.; RAY, P.C.; MOHAPATRA, S.; KONER, B.C. Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. **Andrologia**, 47, 336-342, 2015.

BIANCHI, P. G. et al. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. **Biology of Reproduction**. 49, 1083-8, 1993.

BIJILSMA, E.Y.; CHAN, J. S.W.; OLIVIER, B.; VEENING, J. G.; MILLAN, M. J.; WALDINGER, M. D.; OOSTING, R. S. Sexual side effects of serotonergic antidepressants: Mediated by inhibition of serotonin on central dopamine release? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 2013.

BIRMAHER, B.; RYAN, N.; WILLIAMSON, D.E.; BRENT, D.; KAUFMAN, J. Childhood and Adolescent Depression: A Review of the past 10 years. **Child & Adolescent Psychiatry**,35, 1575-1583, 1996.

BITRAN, D.; HULL, E.M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 11,365-389, 1987.

BLUMER, C. G.; FARIELLO, R. M.; RESTELLI, A. E.; SPAINE, D. M.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, 90, 1716-1722, 2008.

BOSCH-PRESEGUE, L. VAQUERO, A. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. **FEBS J**., 285, 1745-1767, 2015.

BRAMBILLA, P.; CIPRIANI, A.; HOTOPF, M.; BARBUI, C. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a meta-analysis ofclinical trial data. **Pharmacopsychiatry**. 38, 69-77, 2005

BREZINA, P.R.; YUNUS, F.N.; ZHAO, Y. Effects of pharmaceutical medications on male fertility. **Journal of Reproduction & Infertility**, 13, 3-11, 2012.

BROUWERS, J. F.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine.** 35, 1382-91, 2003.

CARONE, B.R.; FAUQUIER, L.; HABIB, N.; SHEA, J.M.; HART, C.E.; BOCK, C.; LI, C.; GU, H.; ZAMORE, P.D.; MEISSNER, A.; WENG, Z.; HOFMANN, H.A.; FRIEDMAN, N.; RANDO, O.J. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. **Cell**. 143, 1084-1096, 2010.

CARRASCO, J.L.; SANDNER, C. Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview. **International Journal of Clinical Practice**, 59, 1428-1434, 2005.

CASPAR, R.C.; REDMOND JR, E.; KATZ, M.M.; SCHAFFER, C.B.; DAVIS, J.M.; KOSLOW, S.H. Somatic symptoms in primary affective disorder presence and relationship to the classification of depression. **Jama Psychiatry**,42, 1098-1104, 1985.

CASTAGNE, V.; MOSER, P. ROUX, S. PORSOLT, R.D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current protocols in neuroscience**. 8, 2011.

CAVALCANTE, T. V.; ESPER, C. R.; FERREIRA, J. L.; DIAS, F. E. F.; AZEVEDO, H. C.; CORDEIRO, M. F.; SOUZA, J. A. T. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelação de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e primavera. **Archives of Veterinary Science**, 10, 89-93, 2005.

CELEGHINI EC, DE ARRUDA RP, DE ANDRADE AF, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF, RODRIGUES PH. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim Reprod Sci**. 3;104(2-4):119-31, 2008

CHAN, J.C., NUGENT, B.M., BALE, T.L. Maternal and Paternal Stress can impact offspring neurodevelopment. **Biol Psychiatry**, 15, 83(10):886-894, 2017.

CHAREST, P.L., VROLYK, V., HERST, P., LESSARD, M., SLOBODA, D.M., DALVAI, M., HARUNA, J., BAILEY, J.L. BENOIT-BIANCAMANO, M.O. Histomorphologic analysis of the late-term rat fetus and placenta. **Toxic Pathol**, 46(2): 158-168, 2018.

CHEN, G.; YANG, B.; CHEN, J.; ZHU, L.; JIANG, H.; YU, W.; ZANG, F.; CHEN, Y.; DAI, Y. Changes in male rat sexual behavior and brain activity revealed by functional magnetic resonance imaging in response to chronic mild stress. **The Journal of Sexual Medicine**, 1-12, 2017.

CHEN, Y.; WANG, Q.; WANG, F.F.; GAO, H.B.; ZHANG, P. Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells in vivo. **Stress**. 15, 74–84, 2012.

CHEN F, ZHENG D, LIU J, GONG Y, GUAN Z, LOU D. Depression and anxiety among adolescents during COVID-19: a cross-sectional study. **Brain Behav Immun**. 88:36-38, 2020.

CHRISTENSEN, T.; BISGAARD, C.F.; WIBORG, O. Biomarkers of anhedonic-like behavior, antidepressant drug refraction, and stress resilience in a rat model of depression. **Neuroscience**, 196, 66-79, 2011.

CHON, M.W.; LEE, J.; CHUNG, S.; KIM, Y.; KIM, H.W. Prescription Pattern of Antidepressants for Children and Adolescents in Korea Based on Nationwide Data. **Journal of Korean Medical Science**, 32, 1694-1701, 2017.

CODRIGNTON, A. M.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Spermiogenic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. **Journal of Andrology**, 25, 354-362, 2004.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M.M.A.; LIMA, C.R.; ARRUDA, V.M.; ARAÚJO, A.V.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis Aublet* on pregnancy in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 112, 122-126, 2007.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological Sciences**, 23, 238-245, 2002.

COLLIN O, DAMBER JE, BERGH A. 5-Hydroxytryptamine--a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats**. J Reprod Fertil**. 1996;106(1):17-22.

COUSSENS, M., MARESH, J.G., YANAGIMACHI, R., MAEDA, G., ALLSOPP, R. Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function. **Plos One**, 13; 3(2), 2008.

CURRY, J.F. Specific psychotherapies for childhood and adolescent depression. **Biological Psychiatry**, 49, 1091-1100, 2001.

CSOKA, A.B.; SHIPKO, S. Persistent sexual side effects after SSRI discontinuation. **Psychother Psychosom**. 75, 187–8, 2006

DAMBERG, M.; EKBLOM, J.; ORELAND, L. Chronic pharmacological treatment with certain antidepressants alters the expression and DNA-binding activity of transcription factor AP-2. **Life Sciences**, 68, 669-678, 2000.

DAVIDSON, J. M.; STEFANICK, M. L.; SACHS, B. D.; SMITH, E. R. Role of androgen in sexual reflexes of the male rat. **Physiology & Behavior**. 21, 141-146, 1978.

DHANABALAN, S.; JUBENDRADASS, R.; LATHA, P.; MATHUR, P.P. Effects of corticosterone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin on epididymal antioxidant system in adult rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 24, 242−249, 2010.

DIAS, B.; RESSLER, K. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. **Nature Neuroscience** 17, 89-96, 2014.

DIETZ, D.M.; LAPLANT, Q.; WATTS, E.L.; HODES, G.E.; RUSSO, S.J.; FENQ, J.; OOSTING, R.S.; VIALOU, V.; NESTLER, E.J. Paternal transmission of stress-induced pathologies. **Biological psychiatry**, 1 5, 408-414, 2011.

DOMENICONI, R.F., SOUZA, A.C.F., XU, B., WASHINGTON, A.M., HINTON, T. Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side by Side? **Biol. Reprod**, (95)1, 1-8, 2016.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, Á.; MARTINEZ-PASTOR, F.; FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARDE, J.J. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals.** 45, 360-8, 2010.

DROBNIS, E.Z.; NANGIA, A.K. Male reproductive functions disrupted by pharmacological agents. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1034:13–24, 2017.

DU, X.; YIN, M.; YUAN, L.; ZHANG, G.; FAN, Y.; YUAM, N.; LV, X.; ZHAO, X.; ZOU, S.; DENG, W.; KOSTEN, T.R.; ZHANG, X.Y. Reduction of depression-like behavior in rat model induced by ShRNA targeting norepinephrine transporter in locus coeruleus. **Translation Psychiatry**. 10, 130, 2020.

DUMAN, R.S & MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Pshychiatry**. 59, 1116-1127. 2006.

ELSEDAWI, B.F.; HUSSEIN, Y.; SABRY, M.A.; AZIA, J.A. Effect of fluoxetine on the testes of adult albino rats and the possible protective role of curcumin. **Anatomical Science International**. 96, 187-196. 2021.

EL-NEWESHY, M.; EL-MADDAWY, Z.; EL-SAYED, Y. Therapeutic effects of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) pollen extract on cadmium-induced testicular toxicity. **Andrologia**. 45, 1-10. 2013.

ELNAZER, H.Y.; BALDWIN, D.S. Treatment with citalopram, but not with agomelatine, adversely affects sperm parameters: a case report and translational review. **Acta Neuropsychiatrica**, 26, 125-129, 2014.

EMSLIE, G.J.; VENTURA, D.; KOROTZER, A.; TOURKODIMITRIS, S. Escitalopram in the treatment of adolescent depression: a randomized placebo-controlled multisite trial. **Child & Adolescent Psychiatry**, 48, 721-729, 2009.

ERDEMIR, F.; ATILGAN, D.; FIRAT, F.; MARKOC, F.; PARLAKTAS, B.S.; SOGUT, E. The effect of sertaline, paroxetine, fluoxetine and escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rat. **International Brazilian Journal of Urology**, 40, 1000-1088, 2014.

EVENSON, D. P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects.

Reproduction, Fertility and Development. 11,1-15, 1999.

EVENSON, D. P. et al. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. **Reproductive Toxicology.** 5, 115-25, 1991.

EVENSON, D. P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**. 23, 25-43, 2002.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). **Toxicology and Applied Pharmacology**. 207, 532-7, 2005.

FARLEY, R.L. Pharmacological treatment of major depressive disorder in adolescents. **The Scientific World Journal.** 5, 420-426, 2005.

FERLAND CL, HAWLEY WR, PUCKETT RE, WINEBERG K, LUBIN FD, DOHANICH GP, et al. Sirtuin activity in dentate gyrus contributes to chronic stress-induced behavior and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 cascade changes in the hippocampus. **Biol Psychiatry**. 74:927–35, 2013.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; ESCALANTE, A. L.; AHLENIUS, S.; HILLEGAART, V.; LARSSON, K. Stimulation of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in brain regions and its effects on male rat sexual behaviour. **European journal of pharmacology.** 210, 121-129, 1992.

FILLER, R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: CHAPIN, R. E.; HEINDEL, J. J. Eds. Methods in Toxicology – Part A: male reproductive toxicology. California: **Academic Press**. 335-343, 1993.

FLAK, J.N.; MYERS, B.; SOLOMON, M.B.; MCKIVEEN, J.M.; KRAUSE, E.G.; HERMAN, J.P. Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress. **European Journal of Neuroscience**. 39, 1903–1911, 2014.

FRANÇA, L. R.; PARREIRA, G.G.; GATES, R.J.; RUSSEL, L.D. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. **Journal of Andrology**. 19, 335-40, 1998

.

FUJINOKI, M: Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. **Reproduction**, 142, 255-266, 2011.

FURUKAWA. S., HAYASHI, S., USUDA, K., ABE, M., HAGIO, S., OGAWA, I. Toxicological pathology in the rat placenta**. J Toxicol Pathol**., 24:95-111, 2011.

GALAL, A.A.A.; ALAM, R.T.M.; ABD EL-AZIZ, R.M. Adverse effects of long-term administration of fluvoxamine on haematology, blood biochemistry and fertility in male albino rats: a possible effect of cessation. **Andrologia**. 1-9, 2016.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, 42, 107-114, 2003.

GAO, H.B.; TONG, M.H.; HU, Y.Q.; YOU, H.Y.; GUO, Q.S.; GE, R.S.; HARDY, M.P. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 199, 153–163, 2003.

GODMANN, M.; LAMBROT, M.; KIMMINS, S. The dynamic epigenetic program in male germs cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. **Microscopy Research and Technique.** 72, 603-619, 2009.

GONZALES, G.F.; GARCIA-HJARLES, M.; VELASQUEZ, G.: Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: their relationship to seminal quality. **Andrologia**, 24, 95- 100, 1992.

GILBEAU, P.M.; SMITH, C.G. Naloxone reversal of stress-induced reproductive elects in the male rhesus monkey. **Neuropeptides**. 5, 335–338, 1985.

GILL-SHARMA, M.K., CHOUDHURI, J., D´SOUZA, S. Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. **Protein and peptide letters**. 18(8), 786-801, 2011.

GRAY, J. R.; LEON, E.; OSTBY, J. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanisms. **Toxicology and Industrial Health.** 14, 159-184, 1998.

GRIPPO, A.J.; BELTZ, T.G.; JOHNSON, A.K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiology & Behavior**.78, 703-710, 2003.

GRIVEAU, J.F. & LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**. 20, 61-69, 1997.

GRONLI, J.; MURISON, R.; FISKE, E.; BJORVATN, B.; SORENSEN, E.; PORTAS, C.; URSIN, R. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. **Pshysiology & Behavior**. 84, 571-577. 2005.

GONZALES, G.F.; GARCIA-HJARLES, M.; VELASQUEZ, G.: Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: their relationship to seminal quality. **Andrologia.** 24, 95- 100, 1992.

GU, Q.; DILLON, C.; BURT, V.L. Prescription Drug use continues to increase: U.S. prescription drug data for 2007-2008. **NCHS Data Brief.** 42, 1-8, 2010.

GUERRERO-BOSAGNA, C.; SETTLES, M.; LUCKER, B.; SKINNER, M.K. Epigenetic transgenerational actions of Vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. **Plos one.** 5, 1-17, 2010.

GUNDERSEN HJ, BENDTSEN TF, KORBO L, MARCUSSEN N, MØLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, SØRENSEN FB, VESTERBY A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**. 96(5):379-94, 1998

HAINES, G. A.; HENDRY, J. H.; DANIEL, C. P.; MORRIS, I. D. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the Comet assay in murine spermatozoa after testicular x-irradiation. **Biology of Reproduction.** 67, 854-861, 2002.

HALES, D.B., ALLEN, J.A., SHANKARA, T., JANUS, P., BUCK, S., DIEMER, T., HALES, K.H. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. **Ann N Y Acad Sci**. 1061:120-134, 2005.

HALLOWS, W.C., YU, W., DENU, J.M. Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1 protein-mediated deacetylation. **J Biol Chem**., 287: 3850-3858, 2012

HANSEN, C. H.; LARSEN, L.W.; SORENSEN, A. M.; HALLING-SORENSEN, B.; STYRISHAVE, J. The six most widely used selective serotonin reuptake inhibitors decrease androgens and increase estrogens in the H295R cell line. **Toxicology In Vitro**. 41, 1-11, 2017.

HAMANI, C.; MACHADO, D.C.; HIPOLIDE, D.C.; DUBIELA, F.P.; SUCHECKI, D.; MACEDO, C.E.; TESCAROLLO, F.; MARTINS, U.; COVOLAN, L.; NOBREGA, N.J. Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. **Biological Psychiatry**, 71, 30-35, 2012.

HAMDI, H. The preventive role of wheat germ oil against sertraline-induced testicular damage in male albino rats**. Andrologia**. 51, 1-9. 2019.

HARGREAVES, K.M. Neuroendocrine markers of stress. **Anesthesia progress**. 36, 99-105. 1990.

HATZIMOURATIDIS, K.; AMAR, E.; EARDLEY, I.; GUILIANO, F.; HATZICHRISTOU, D.; MONTORSI, F.; VARDI, Y.; WESPES, E. **European Association of Urology.** 57, 804-814, 2010.

HAUTANEN, A. Synthesis and regulation of sex hormone-binding globulin in obesity. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders.** 24, 64–70, 2000.

HAY, D.W.; WADSWORTH, R.M. The contractile effects of 5-hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens. **British Journal of Pharmacology.** 77, 605-613, 1982.

HAYES, Bryan D. et al. Comparison of Toxicity of Acute Overdoses with Citalopram and Escitalopram. The **Journal of Emergency Medicine.** 39,.44-48, 2010.

HELLSTROM, W.J. Update on treatments for premature ejaculation. **International Journal of Clinical Practice.** 65, 16–26, 2011.

HENNINGCEN, K.; ANDREASEN, J.T.; BOUZINOVA, E.V.; JAYATISSA, M.N.; JENSEN, M.S.; REDROBE, J.P.; WIBORG, O. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonic-like reponses. **Behavioural Brain Research**, 198, 136-141, 2009.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, 10, 809-828, 1987.

HOU, G.; XIONG, W.; WANG, M.; CHEN, X.; YUAN, T. Chronic Stress Influences Sexual Motivation and Causes Damage to Testicular Cells in Male Rats. **The Journal of Sexual Medicine**. 11, 653-663, 2014.

HUCKINS, C. Duration of spermatogenesis in pre and postpuberal Wistar rats. **The Anatomical Record.** 151, 364, 1965.

HUI, J.J.; XI, G.J.; LIU, S.S.; LI, X.L.; GENG, L.Y.; TENG, G.J.; NIE, B.B.; SHAN, B.C.; YAN, J.; DONG, L.; REYNOLDS, G.P.; ZHANG, Z.J. Blood oxygen level-dependent signals via fMRI in the mood-regulating circuit using two animal models of depression are reversed by chronic escitalopram treatment. **Behavioral Brain Research.** 311, 210-218, 2016.

HUIJGENS, P.T.; GARRACI, F.A.; OLIVIER, J.D.A.; SNOEREN, M.S. Male rat sexual behavior: insights from inter-copulatory intervals. **BioRXiv**. 2021 (preprint)

HULL, E.M.; DOMINGUEZ, J.M. Sexual behavior in male rodents. **Hormones Behavior.** 52, 45-55, 2007.

HULL, E.M.; RODRÍGUEZ-MANZO, G. Male Sexual Behavior. In: Pfaff DW, Joëls M. **Hormones, Brain and Behavior.** Third Edition, Academic Press, 1-57, 2017.

ILGIN, S. The adverse effects of psychotropic drugs as an endocrine disrupting chemicals on the hypothalamic-pituitary regulation in male. **Life Sciences**. 253, 2020.

ILGIN, S.; KILIC, G.; BAYSAL, M.; KILIC, V.; KORKUT, B.; UCARCAN, S.; ATLI, O. Citalopram induces reproductive toxicity in male rats. **Birth defects research.** 109, 475-485, 2017.

JAYATISSA, M.N.; BISGAARD, C.; TINGCTROM, A.; PAPP, M.; WIBORG, O. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. **Neuropsychopharmacology.** 31, 2395-2404, 2006.

JIMENEZ-TREJO, F.; TAPIA-RODRÍGUEZ, M.; QUEIROZ, D.B.; PADILLA, P.; AVELLAR, M.C.; MANZANO, P.R.; MANJARREZ-GUTIÉRREZ, G.; GUTIÉRREZ-OPINA, G. Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. **Journal of Andrology.** 28, 136-149, 2007.

JUSTO, S.N.; ROSSANO, G.L.; SZWARCFARB, B.; RUBIO, M.C.; MOGUILEVSKY, J.A. Effect of sertoninenergic system on FSH secretion in male and female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions. **Neuroendocrinology.** 50, 382-386, 1989.

KAFFMAN, A.; RYSTAL, J.J. New frontiers in animal research of psychiatric illness. **Psychiatric disorders.** 829, 3-30, 2012.

KARIMIPOUR, M.; AHMADI, A.; ZIRAK-JAVANMARD, M.; JAFARI, A.; MOHEBI, M.; HOSSEINALIPOUR, E. The effects of exposure to fluoxetine during lactation on testicular tissue and sperm parameters in mice offspring. **Veterinary Research Forum.** 11, 35-42, 2020.

KATZ, R.J.; ROTH, K.A.; CARROLL, B.J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 5, 247-251, 1981.

KEEL, B.A.; KAROW JR, A.M. Motility characteristics of human sperm, nonfrozen and cryopreserved. **Archives of Andrology**. 4, 205-212, 1980.

KEMPINAS, W.G.; SUAREZ, J.; ROBERTS, N.L.; STRADER, L.F.; FERREL, J.; GOLDMEN, J.M.; NAROTSKY, M.G.; PERREAULT, S.D.; EVENSON, D.P.; RICKER, D.D.; KLINEFELTER, G.R. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. **Biology of Reproduction**, 59, 897-904, 1998.

KIM HD, HESTERMAN J, CALL T, MAGAZU S, KEELEY E, ARMENTA K, et al. SIRT1 mediates depression-like behaviors in the nucleus accumbens**. J Neurosci**. 36:8441–52, 2016.

KISHI T, YOSHIMURA R, KITAJIMA T, OKOCHI T, OKUMURA T, TSUNOKA T, et al. SIRT1 gene is associated with major depressive disorder in the Japanese population. **J Affect Disord**. 126:167–73, 2010.

KLINEFELTER, G.R.; LASKEY, J.W.; PERREAULTS, S.D.; FERREL, J.; JEFFAY, S.; SUAREZ, J.; ROBERTS, N.L. The ethane dimethanesulphonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis. **Journal of Andrology.** 15, 318-327, 1994.

KO, E.Y.; SABANEGH, E.S; AGARWAL, A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. **Fertility and Sterility**. 102:1518-1527, 2014.

KOVANEN L, DONNER K, PARTONEN T. SIRT1 polymorphisms associate with seasonal weight variation, depressive disorders, and diastolic blood pressure in the general population. **PLoS ONE**.10:0141001, 2015.

KOYUNCU, H.; SEREFLOGU, E.C.; OZDEMIR, A.T.; HELLSTROM, W.J. Deleterious effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on semen parameters in patients with lifelong premature ejaculation. **International Journal of Impotence Research**. 24, 171-173, 2012.

KOYUNCU, H.; SEREFOGLU, E.C.; YENCILEK, E.; ATALAY, H.; AKBAS, N.B.; SARICA, K. Escitalopram treatment for premature ejaculation has a negative effect on semen parameters. **International Journal of Impotence Research**. 23, 257-261, 2011.

KUMAR, K.; SHARMA, L.V.; TIWARI, P.; SINGH, D.; MAIKHURI, J.P.; GUPTA, G.; SINGH, M.M. The spermicidal and antitrichomonas activities of SSRI antidepressants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** 16, 2509–2512, 2006.

LAMBROT, R.; XU, C.; SAINT-PHAR, S.; CHOUNTALOS, G.; COHEN, T.; PAQUET, M.; SUDERMAN, M.; HALLET, M.; KIMMINS, S. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. **Nature Communications.** 4: 2013.

LEI, Y., WANG, J., WANG, D., LI, C., LIU, B., FANG, X., YOU, J., GUO, M., LU, X. SIRT1 in forebrain excitatory neurons produces sexually dimorphic effects on depression-related behaviors and modulates neuronal excitability and synaptic transmission in the medial prefrontal cortex. **Molecular Psychiatry.** 25, 1094-1111, 2019

LEMOS, A.J.J.M., SILVA, F.C.A., MELO, I.M.F., SILVA-JUNIOR, V.A., TEIXEIRA, A.A.C., WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Histoquimica e morfometria da placenta de ratas tratadas com dexametasona. **Pesq Vet Brasil**, 34(7): 703-708, 2014.

LI H, RAJENDRAN GK, LIU N, WARE C, RUBIN BP, GU Y. SirT1 modulates the estrogen-insulin-like growth factor-1 signaling for postnatal development of mammary gland in mice. **Breast Cancer Res**, 2007.

LIBERT S, POINTER K, BELL EL, DAS A, COHEN DE, ASARA JM, et al. SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive. **Cell**. 147:1459–72, 2011.

LIU, W.M; PANG, R.T.; CHIU, P.C.; WONG, B.P.; LAO, K.; LEE, K.F.; YEUNG, W.S. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of National Academy of Sciences (USA).** 109: 490–494, 2012.

LO IACONO L, VISCO-COMANDINI F, VALZANIA A, VISCOMI MT, COVIELLO M, GIAMPA A, et al. Adversity in childhood and depression: linked through SIRT1. **Transl Psychiatry**.5:629, 2015.

LOVINGER, D.M. Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. **Alcohol Research & Health**. 31, 196–214, 2008.

LU, G.; LI, J.; ZHANG, H.; ZHAO, X.; YAN, L.-J.; YANG, X. Role and Possible Mechanisms of Sirt1 in Depression. **Oxidative Med. Cell. Longev**. 1–6, 2018.

LU, Q.; MOURI, A.; YANG, Y.; KUNISAWA, K.; TESHIGAWARA, T.; HIRAKAWA, M.; MORI, Y.; YAMAMOTO, Y.; LIBO, Z.; NABESHIMA, T.; SAITO, K. Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression. **Behavioural Brain Research**. 17;372:112053, 2019.

LUCCA, G., COMIM, C.M., VALVASSORI, S.S., REUS, G.Z., VUOLO, F., PETRONILHO, F., DAL-PIZZOL, F., GAVIOLI, E.C., QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochem Int**., 54(5-6): 358-362, 2009.

MAFFUCCI, J.A.; GORE, A.C. Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. **International Review of Cell and Molecular Biology**. 274, 69–127, 2009.

MAHAR, I.; BAMBICO, F.R.; MECHAWAR, N.; NOBREGA, J.N. Stress, serotonin and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 38, 173-192, 2014.

MALYSKO, J.; URANO, T.; YAN, D.; SERIZAWA, K.; KOZIMA, Y.; TAKADA, Y.; TAKADA, A. Foot Shock-Induced Changes in Blood and Brain Serotonin and Related Substances in Rats. **The Japanese Journal of Physiology**. 44, 35-47. 1994.

MANDAL, T. K & DAS, N. S. Correlation of testicular toxicity and oxidative stress induced by chlorpyrifos in rats. **Human and experimental toxicology**. 30, 1529-39, 2011.

MARCON, L.; HALES, B.F.; ROBAIRE, B. Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics bleomycin, etoposide, and cisplatin on spermatogenesis, fertility, and progeny outcome in the male rat. **Journal of Andrology**, 29, 408-417, 2008.

MARCHO, C., OLUWAYIOSE, O.A., PILSNER, J.R.. The preconception environment and sperm epigenetics**. Andrology** 8, 924–942, 2020.

MARITIM, A.C.; SANDERS, A.; WATKINS, I.J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. 17, 24-38, 2003.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 424, 83-95, 1999.

MARTI, O.; MARTI, J.; ARMARIO, A. Effect of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. **Physiology & Behavior**, 55, 747-753. 1994.

MASELLI, J. et al. Exposure to bleomycin, etoposide, and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. **Biology of Reproduction.** 86, 166, 1-10,2012.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 184, 436-452, 2006.

MCBURNEY MW, YANG X, JARDINE K, HIXON M, BOEKELHEIDE K, WEBB JR, LANSDORP PM, LEMIEUX M. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. **Mol Cell Biol**. 23:38–54, 2003.

MCEWEN, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological Review**. 87, 873-904. 2007.

MICHAN S, LI Y, CHOU MM, PARRELLA E, GE H, LONG JM, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. **J Neurosci.** 30:9695–707, 2010.

MICHAN S, SINCLAIR D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochem J**. 404:1–13, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2022. https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/setembro/na-america-latina-brasil-e-o-pais-com-maior-prevalencia-de-depressao.

MILLER, A.H.; MALETIC, V.; RAISON, C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological psychiatry**. 65, 732-741, 2009.

MIRANDA-SPOONER, M.; PACCOLA, C.C.; NEVES, F.M.O.; OLIVA, S.U.; MIRAGLIA, S.M. Late reproductive analysis in rat male offspring exposed to nicotine during pregnancy and lactation. **Andrology,** 4, 218–231, 2016.

MOGUILEVSKY, J.A.; FAIGON, M.R.; RUBIO, M.C.; SCACCHI, P.; SZWARCFARB, B. Sexual differences in the effect of serotonin on LH secretion in rats. **Acta endocrinologica**, 109, 320-325, 1985.

MONTGOMERY, S.A.; LOFT, H.; SANCHEZ, C.; REINES, E.H.; PAPP, M. Escitalopram (S-Enantiomer of Citalopram): Clinical efficacy and onset of action predicted from a rat model. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 88, 282-286, 2001.

MORGAN HL, EID N, KHOSHKERDAR A, WATKINS AJ. Defining the male contribution to embryo quality and offspring health in assisted reproduction in farm animals. **Anim Reprod.**. 17(3), 2020.

MOS, J.; MOLLET, I.; TOLBOOM, J.T.; WALDINGER, M.D.; OLIVIER, B. A comparison of the effects of different serotonin reuptake blockers on sexual behaviour of the male rat. **European Neuropsychopharmacology**. 9, 123-135, 1999.

MUELLER, A.; KIGUTI, L.R.A.; SILVA, E.J.R.; PUPO, A. Contractile effects of serotonin (5-HT) in the rat cauda epididymis: expression and functional characterization of 5-HT receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 369, 98-106, 2019.

Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. **Hum Reprod Update** 5:473–481, 2001.

NEILD, D. M. et al. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development.** 72, 230-8, 2005.

NISHI, M. & AZMITIA, E.C. 5HT1a receptor expression. Is modulated by corticosteroid receptor agonist in primary rat hippocampal culture. **Brain Reseacrh**. 722, 190-194. 1996.

NG, S.F.; RUBY, C.Y.; ROSS LAYBUTT, R.; BARRES, R.; OWENS, J.A.; MORRIS, M.J. Chronic high fat diet in fathers programs B-cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, 467, 963-966, 2010.

NUSIER, M.K.; BATAINEH, H.N.; DARADKA, H.M. Adverse effects of propranolol on reproductive function in adult male mice. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 10, 2728-2731, 2007.

OLIVA, S. U.; MIRAGLIA, S. M. Carbamazepine damage to rat spermatogenesis in different sexual developmental phases. **International Journal of Andrology**, 32, 563-574, 2009.

OLIVIER, B.; CHAN, J.S.W.; SNOEREN, E.M.; OLIVIER, J.D.A.; VEENING, J.G.; VINKERS, C.H.; WALDINGER, M.D.; OOSTING, R.S. Differences in sexual behaviour in male and female rodents: role of serotonin. **Current Topic in Behavioral Neurosciences**. 8, 15–36, 2011.

OYOLA, M.G; HANDA, R.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. **Stress**. 20, 476–494, 2017.

PACCOLA, C. C.; MIRAGLIA, S. M. Prenatal and lactation nicotine exposure affects Sertoli cell and gonadotropin levels in rats. **Reproduction.** 151(2):117-33, 2016.

PARÉ, W.P.; REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. **Physiology & Behavior**. 54, 1179-1185. 1993

PARIS, J.M.; LORENS, S.A.; VAN DE KAR, L.D.; URBAN, J.H.; RICHARDSON-MORTON, K.D.; BETHEA, C.L. A comparison of acute stress paradigms: hormonal responses and hypothalamic serotonin. **Physiology & Behavior**. 39, 33-43. 1987.

PARISI, E.; DE PRISCO, P.; CAPASSO, A.; DEL PRETE, M. Serotonin and sperm motility. **Cell Biology International Reports**, 8, 95, 1984.

PAUMGARTTEN F, SOLECKI R, BUSCHMANN J, CLARK R, GROTE K, RAUCH M, CHAHOUD I. Harmonization of terminology in developmental toxicology: the quest for

a more precise description and a harmonized classification of fetal observations**. Reprod Toxicol**.27(1):8-13, 2009.

PENG, L, YUAN, Z, LING, H, FUKASAWA, K, ROBERTSON, K, OLASHAW, N, et al. SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. **Mol Cell Biol**. 31: 4720–34, 2011.

PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **International Journal of Andrology**. 35, 109-24, 2012.

PIRRAGLIA, P.A.; STAFFORD, R.S.; SINGER, D.E. Trends in Prescribing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Other Newer Antidepressant Agents in Adult Primary Care. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**, 5, 153-157, 2003.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, 266, 730-732, 1977.

PUCILOWSKI, O.; OVERSTREET, D.H.; REZVANI, A.H.; JANOWSKY, D.S. Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. **Physiology & Behavior**. 54, 1215-1220. 1993.

QIU, J.; SY, H.; ZHANG, C.H.; SHI, G.Q.; WANG, S.; XIANG, T. The effect of Chaihu-Shugan-San and its components on the expression of ERK5 in the hippocampus of depressed rats. **Journal of ethnopharmacology**. 152, 320-326. 2014.

QIN W, YANG T, HO L, ZHAO Z, WANG J, CHEN L, et al. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. **J Biol Chem**. 281:21745–54, 2006.

RANDO, O. Daddy Issues: Paternal Effects on Phenotype. **Cell**, 151: 702–708, 2012.

RAMADORI G, LEE CE, BOOKOUT AL, LEE S, WILLIAMS KW, ANDERSON J, et al. Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. **J Neurosci**. 28:9989–96, 2008.

RAMASWAMY, S.; WEINBAUER, G.F. Endocrine control of spermatogenesis: role of FSH and LH/testosterone. **Spermatogenesis**. 4: e996025, 2015

RATO, L.; DUARTE, A.I.; TOMÁS, G.D.; SANTOS, M.S.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; CAVACO, J.E.; ALVES, M.G.; OLIVEIRA, P.F. Pre-diabetes alters testicular PGC1-α/SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress. **Biochimica Biophysica Acta**. 1837,335-344, 2014.

RELWANI, R.; BERGER, D.; SANTORO, N.; HICKMON, C.; NIHSEN, M.; ZAPANTIS, A.; WERNER, M.; POLOSTKY, A.J.; JINDAL, S. Semen parameters are unrelated to BMI but vary with SSRI use an prior urological surgery. **Reproductive sciences**, 18, 391-397, 2011.

REZAKHANIHA B, HEIDARI R, ABBASI M. Can Melissa officinalis improve chromatin structure and sperm parameters in a rat model of varicocele? **Andrologia.**, 2018

RIGGIN, L.; KOREN, G. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on sperm and male fertility. **Canadian Family Physician**, 61, 529-530, 2015.

ROBAIRE, B.; HENDERSON, N.A. Actions of 5alpha-reductase inhibitors on the epididymis**. Molecular and Cellular Endocrinology.** 16, 190-5, 2006.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, 54, 103-107, 1978.

ROBOON, J.; NUDMAMUD-THANOI, S.; THANOI, S. Recovery effect of pre-germinated brown rice on the alteration of sperm quality, testicular structure and androgen receptor expression in rat model of depression. **Andrologia**, 49, 1-10, 2017.

RODGERS, A.B.; BALE, T.L. Germ Cell Origins of Posttraumatic Stress Disorder Risk: TheTransgenerational Impact of Parental Stress Experience. **Biological Psychiatry,** 78: 307–314, 2015.

RODGERS, A.B.; MORGAN, C.P.; BRONSON, S.L.; REVELLO, S.; BALE, T.L. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and Reprograms offspring HPA stress axis regulation. **Journal of Neuroscience**, 33, 9003-9012, 2013.

RODRIGUEZ-MANZO, G.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; HEN, R.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Participation of 5-HT(1B) receptors in the inhibitory actions of serotonin on masculine sexual behaviour of mice: pharmacological analysis in 5-HT(1B) receptor knockout mice**. British Journal of Pharmacology**. 136, 1127-1134, 2002.

ROSEN, R.C.; LANE, R.M.; MENZA, M. Effects of SSRIs on sexual function: a critical review. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, 19, 67-85, 1999.

RUSSEL, L.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. **Cache River Press**,16, 83, 1990.

SAFARINEJAD, M.R. Sperm DNA damage and semen quality impairment after treatment with selective serotonin reuptake inhibitors detected using semen analysis and sperm chromatin structure assay. **Journal of Urology**,180,2124–2128, 2008.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; NELSON, D.R.; NADA, E.A.; EL-TONSY, M.H.; ALVAREZ, J.G.; THOMAS, A.J J.R.; SHARMA, R.K. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. **Fertility Sterility**, vol. 78(2), 313-318, 2002.

SAKKAS, D. MANICARDI, G.; BIANCHI, P.G.; BIZZARO, D. BIANCHI, U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, 52, n. 5, 1149-55, 1995.

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

SARKAKI, A.; BADAVI, M.; ALIGHOLI, H.; MOGHADDAM, A.Z. Preventive effects of soy meal (+/- isoflavone) on spatial cognitive deficiency and body weight in an ovariectomized animal model of Parkinson's disease. **Pakistan Journal of Biological Science**, 12, 1338-1345, 2009.

SCARANO, W.R. **Diabetes experimental: Fertilidade de ratos machos após procedimento de inseminação artificial in utero.** 1999. 79p. Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, UNFESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas - Modalidade Médica).

SENGUPTA P, ROYCHOUDHURY S, NATH M, DUTTA S. Oxidative Stress and Idiopathic Male Infertility. **Adv Exp Med Biol.** 1358:181-204, 2022.

SHAMSI MB, IMAM SN, DADA R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **J Assist Reprod Genet**.. 28(11):1073-85, 2011.

SHEEHAN, D.V.; MAO, C.G. Paroxetine treatment of generalized anxiety disorder. **Psychopharmacology Bulletin.** 37, 64-75, 2003.

SHISHKINA, G.T.; DYGALO, N.N. Role of the serotoninergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. **Comparative Biochemistry and Physiology.** 125, 45-51, 2000.

SHORR, E. A new technic for staining vaginal smears: III, a single differential stain. **Science.** 94, 545-546, 1941.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.** 175, 184-191, 1988.

SKINNER, M.K.; GUERRERO-BOSAGNA, C. Environmental signals and transgenerational epigenetics. **Epigenomics**. 1, 111-117, 2009.

SLATTERY, D.; CRYAN, J. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature protocols.** 7, 1009-114, 2012.

SNOERENM, E.M.; VEENING, J.G.; OLIVIER, B.; OOSTING, R.S. Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: a review. **Pharmacol Biochem Behav**. 121, 102-14, 2014.

SOLBERG, L.C.; HORTON, T.H.; TUREK, F.W. Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. **The American Journal of Physiology**. 276, 152-161. 1999.

SOLECKI R, BERGMANN B, BÜRGIN H, BUSCHMANN J, CLARK R, DRUGA A, VAN DUIJNHOVEN EA, DUVERGER M, EDWARDS J, FREUDENBERGER H, GUITTIN P, HAKAITE P, HEINRICH-HIRSCH B, HELLWIG J, HOFMANN T, HÜBEL

U, KHALIL S, KLAUS AM, KUDICKE S, LINGK W, MEREDITH T, MOXON M, MÜLLER S, PAUL M, PAUMGARTTEN F, RÖHRDANZ E, PFEIL R,RAUCH-ERNST M, SEED J, SPEZIA F, VICKERS C, WOELFFEL B, CHAHOUD I. Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the Fourth Workshop on

the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 18-20 April 2002. **Reprod Toxicol.** 17(5):625-637, 2003.

STAPLES RE, SCHNELL VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. Stain Technol. 39:61–63, 1964.

STEWART, K.T.; ROSENWASSER, A.M.; HAUSER, H.; VOLPICELLI, J.R.; ADLER, N.T. Circadian rhythmicity and behavioral depression: I. Effects of stress. **Physiology & Behavior**. 48, 149-155. 1990.

STOCCO, D.M. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. **The Journal of Endocrinology**. 164, 247-253, 2000.

STREKALOVA, T.; SPANAGEL, R.; BARTSCH, D.; HENN, F.A.; GASS, P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology.** 29, 2007-2017, 2004.

STUMPP T, FREYMÜLLER E, MIRAGLIA SM. Sertoli cell function in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. **Histochem Cell Biol**. ;126(3):353-61, 2006.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood cells, molecules and diseases.** 35, 1-10, 2005.

SWAAB, D.F.; BAO, A.; LUCASSEN, P.J. The stress system in the human brain in depression and neurogeneration. **Ageing Research Reviews**. 4, 141-194, 2005.

SYED, V.; GOMEZ, E.; HECHT, N.B. Messenger ribonucleic acids encoding a serotonin receptor and a novel gene are induced in Sertoli cells by a secreted factor(s) from male rat meiotic germ cells. **Endocrinology**. 140, 5754-5760, 1999.

TANG S, WANG IJ, YUE C, TAKANO H, TERZIC B, PANCE K, et al. Loss of CDKL5 in glutamatergic neurons disrupts hippocampal microcircuitry and leads to memory impairment in mice. **J Neurosci**. 37:7420–37, 2017.

TANRIKUT, C.; FELDMAN, A.S.; ALTEMUS, M.; PADUCH, D.A.; SCHLEGEL, P.N. Adverse effect of paroxetine on sperm. **Fertility and Sterility**. 94, 1021–1026, 2010.

TANRIKUT, C.; SCHEGEL, P.N. Antidepressant-associated changes in semen parameters. **Urology.** 69, 185–187, 2007.

TRAMER, F.; ROCCO, F.; MICALI, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**. 59:753-758, 1998.

TURNER, T.T.; LYSIAK, J.J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of Andrology**. 29, 488-98, 2008.

VAQUERO A, SCHER M, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, SERRANO L, REINBERG D. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. **Nature**. 450:440–4, 2007.

VARISLI, O.; UGUZ, C.; AGCA, C.; AGCA, Y. Various physical stress factors on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane. **Journal of Andrology**, 30, 75-86, 2009.

VASSOLER, F.M.; WHITE, S.L.; SCHIMIDT, H.D.; SADRI-VAKILI, G.; PIERCE, R.C. Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype. **Nature neuroscience**, 16, 42-47, 2013.

VAZ ADC, PACCOLA CC, MENDES TB, CABRAL REL, SIMAS JN, VENDRAMINI V, MIRAGLIA SM. Sertoli Cell Alterations in Peripubertal Varicocelized Rats: Evidence of Primary Damage on Spermatogenesis. **J Histochem Cytochem**. 68(3):185- 198, 2020.

VENDRAMINI, V.; ROBAIRE, B.; MIRAGLIA, S. M. Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. **Human Reproduction**, 27, 2457-2466, 2012.

VIEIRA, M. L.; COSTA, N. O.; PEREIRA, M. R. F.; DE FÁTIMA PACCOLA MESQUITA, S.; MOREIRA, E. G.; GERARDIN, D. C. C. Chronic exposure to the fungicide propiconazole: Behavior and reproductive evaluation of F1 and F2 generations of male rats. **Toxicology**. .389, 85-93, 2017.

VIKTORIN A, LEVINE SZ, ALTEMUS M, REICHENBERG A, SANDIN S. Paternal

use of antidepressants and offspring outcomes in Sweden: nationwide prospective cohort study. **BMJ.** ;361:2233, 2018.

WANG, O. Glucocorticoids inhibit kisspeptin neurons during stress-induced reproductive inhibition. **Endocrine Reviews**. 32, 3–141, 2011.

WEISSMAN, M.M.; WOLK, S.; GOLDSTEIN, R.B.; MOREAU, D.; ADAMS, P.; GREENWALD, S.; KLIER, C.M.; RYAN, N.D.; DAHL, R.E.; WICKRAMARATNE, P. Depressed adolescentes grown up. **Jama**, 281, 1707-1713, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Depression. **World Health Organization**; 2021. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression

WIEGNER, L.; HANGE, D.; BJORKELUND, C.; AHLBORG Jr, G. Prevalence of perceived stress and associations to symptons of exhaustion, depression and anxiety in a working age population seeking primary care- an observational study. **BMC Family Practice**, 16, 1-8, 2015.

WILNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, 6, 78-93, 2017.

WILSON JC. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In: WILSON JC, WARKANY J (Eds.). Teratology: principles and techniques. Chicago: **University of Chicago Press**, 262-277, 1965.

WISNIEWSKI, P.; ROMANO, R.M.; KIZYS, M.M.; OLIVEIRA, K.C.; KASAMATSU, T.; GIANNOCCO, G.; CHIAMOLERA, M.I.; DIAS DA SILVA, M.R.; ROMANO, M.A. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. **Toxicology**. 329:1-9, 2015.

WITSCHI, E. Prenatal Vertebrate: Rat. In: ALTMAN, P. L. D. (Ed.). **Growth, Biological Handbooks of Federation of American Societies for Experimental Biology.** Washington., 304-314, 1962.

WONG DW, SOGA T AND PARHAR IS. Aging and chronic administration of serotonin-selective reuptake inhibitor citalopram upregulate Sirt4 gene expression in the preoptic area of male mice. **Front. Genet**. 6:281, 2015.

YANKELEVITCH-YAHAV, R.; FRANKO, M.; HULY, A.; DORON, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **Journal of Visualized Experiments**, 97, 1-7, 2015.

YANG, S.Z.; WANG, Y.H.; TUNG, C.S.; KO, C.Y.; LIU, Y.P. Effects of escitalopram on a rat model of persistent stress-altered hedonic activities: towards a new understanding of stress and depression. **Chinese Journal of Physiology**, 58, 404-411, 2015.

YILMAZ, N.; DEMIRDAS, A.; YILMAZ, M.; SUTCU, R.; KIRBAS, A.; CURE, M.C.; EREN, I. Effects of Venlafaxine and Escitalopram treatments on NMDA receptors in the rat depression model. **The Journal of Membrane Biology**, 242, 145, 2011.

ZAKHARY SM, AYUBCHA D, DILEO JN, JOSE R, LEHESTE JR, HOROWITZ JM, et al. Distribution analysis of deacetylase SIRT1 in rodent and human nervous systems. **Anat Rec (Hoboken**). 293: 1024–32, 2010.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; ADAMSON, G. D.; DE MOUZON, J.; ISHIHARA, O.; MANSOUR, R.; NYGREN, K.; SULLIVAN, E.; VANDERPOEL, S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. **Fertility and Sterility**, 92, 1520-1524, 2009.

ZENICK, H.; CLEGG, E.D. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: Hayes AW, editor. **Principles and Methods of Toxicology**, Raven Press. 1989.

ZHOU, W. DE IULIIS, G.N.; DUN, M.D.; NIXON, B. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. **Frontiers Endocrinology (Lausanne),** 9, 59, 2018.

ZOU, P.; WANG, Y.; LIU, C.; CHEN, Q.; YANG, H.; ZHOU, N.; ZENG, Y.; CHEN, H.; ZHANG, G.; LIU, J.; CAO, J.; AO, L.; SUN, L. Mechanisms of Stress-Induced Spermatogenesis Impairment in Male Rats Following Unpredictable Chronic Mild Stress (uCMS). **International Journal of Molecular Sciences**. 20, 1-17. 2019.

ZOU, P.; WANG, X.; SUN, L.; CHEN, Q.; YANG, H.; ZHOU, N.; CHEN, H.; ZHANG, G.; LING, X.; WANG, Z. Semen Quality in Chinese College Students: Associations with Depression and Physical Activity in a Cross-Sectional Study. **Psychosomatic Medicine**. 80, 564–572, 2018.

ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da EPM/UNIFESP

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do Estresse Crônico Moderado, induzido a partir da peripuberdade, e do tratamento com Escitalopram sobre os Parâmetros Reprodutivos de Ratos Adultos", protocolada sob o CEUA nº 6763010218 (ID 006806), sob a responsabilidade de **Leonardo Wensing Fischer** *e equipe; Sandra Maria Miraglia; Samara Urban de Oliva* - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 20/03/2018.

We certify that the proposal "Effects of moderate chronic stress, induced from peripuberty, and the treatment with Escitalopram on reproductive parameters in adult male rats", utilizing 135 Heterogenics rats (25 males and 110 females), protocol number CEUA 6763010218 (ID 006806), under the responsibility of **Leonardo Wensing Fischer** *and team; Sandra Maria Miraglia; Samara Urban de Oliva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 03/20/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2018 a 12/2019 Área: Biologia do Desenvolvimento/morfologia

Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	100 a 110 dias	N:	10
Linhagem:	Rattus norvegicus albinus / Wistar			Peso:	330 a 350 g		
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	100 a 110 dias	N:	15
Linhagem:	Rattus norvegicus albinus / Wistar			Peso:	330 a 350 g		
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	90 a 100 dias	N:	30
Linhagem:	Rattus norvegicus albinus / Wistar			Peso:	220 a 260 g		
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	90 a 100 dias	N:	80
Linhagem:	Rattus norvegicus albinus / Wistar			Peso:	220 a 260 g		

Local do experimento: Laboratórios da Disciplina de Biologia do Desenvolvimento - UNIFESP

São Paulo, 13 de junho de 2022

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Rua Botucatu, 740 - 2º andar - Vila Clementino - CEP 04023-061 - São Paulo/SP - tel: +55 (11) 5576-4848
Horário de atendimento: 2ª a 6ª, das 8h às 12h e das 14h às 17h : e-mail: ceuasecretaria@gmail.com
CEUA Nº 6763010218

ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da EPM/UNIFESP (Prorrogação do prazo em decorrência do *upgrade* de mestrado para doutorado direto)

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1933

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 23 de outubro de 2019
CEUA N 6763010218

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Leonardo Wensing Fischer
Área: Biologia Do Desenvolvimento/morfologia

Título da proposta: "Efeitos do Estresse Crônico Moderado, induzido a partir da peripuberdade, e do tratamento com Escitalopram sobre os Parâmetros Reprodutivos de Ratos Adultos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP (ID 004634)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 15/outubro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Eu, Leonardo Wensing Fischer, aluno do programa de pós graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) fiz upgrade do mestrado para o doutorado direto, portanto o meu prazo de término do projeto foi alterado. Sendo assim, necessito prorrogar o meu cronograma na CEUA. ".

Comentário da CEUA: "Emenda Aprovada. Upgrade do mestrado para o doutorado direto. Nova previsão de término: 11/2021.".

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

ANEXO 3 – Aprovação na proficiência em inglês (Cultura Inglesa) – Exame realizado 21/08/2019

cultura inglesa

Declaração

São Paulo, 28 de agosto de 2019.

Declaramos para os devidos fins que **LEONARDO WENSING FISCHER** portador(a) do CPF **089.263.699-86,** obteve o número de **36** acertos e foi **APROVADO**(a) por meio da média de **72%** que obteve no teste de conhecimento em inglês, elaborado pela Cultura Inglesa de São Paulo e aplicado pela filial Cultura Inglesa Vila Mariana para a **Universidade Federal de São Paulo.**

O exame foi realizado em **21/08/2019.**

O teste avalia a capacidade de entender e interpretar textos em inglês, sendo pré-requisito para aqueles que desejam frequentar o curso de pós-graduação oferecido pela universidade. Seu resultado limita-se a este objetivo, não sendo válido para qualquer outra aplicação.

Helena Nagano

Sede Cultura Inglesa
R. Ferreira de Araújo, 741
Pinheiros – São Paulo/SP
CEP 05428-002

ANEXO 4 – Manuscrito publicado dentro da área de atuação do orientador em revista indexada (o aluno como 1º autor e o orientador como último)

Received: 17 August 2022 | Revised: 4 October 2022 | Accepted: 26 October 2022

DOI: 10.1111/andr.13333

ANDROLOGY WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Effects of escitalopram treatment and chronic mild stress induced from peripuberty on spermatic parameters of adult rats

Leonardo Wensing Fischer | Talita Biude Mendes | Joana Noguères Simas | Marina Nunes | Samara Urban de Oliva | Sandra Maria Miraglia

Department of Morphology and Genetics, Graduate Program in Structural and Functional Biology (PPGBEF), Laboratory of Biology of Reproduction and Development Biology (LabRed), Universidade Federal de Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Correspondence
Sandra Maria Miraglia, Department of Morphology and Genetics, Graduate Program in Structural and Functional Biology (PPGBEF), Laboratory of Biology of Reproduction and Development Biology (LabRed), Universidade Federal de Sao Paulo (UNIFESP), Botucatu Street, 740. Leitão da Cunha Building, 2nd floor. CEP: 04023900, Sao Paulo, SP, Brazil.
Email: miraglia.valdeolivas11@unifesp.br

Funding information
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001; Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Numbers: 2019/11220-8, 2019/08785-3

Abstract

Background: The prevalence of depression in adolescents has significantly increased worldwide. Escitalopram is a selective serotonin reuptake inhibitor approved for treatment of psychiatric disorders in children and adolescents by the Food and Drugs Administration.

Aims: This study aimed to evaluate the sperm parameters of adult rats exposed to chronic mild stress (CMS), from peripuberty to adulthood, treated or not with escitalopram.

Materials and methods: Sixty-two male rats were distributed into four groups: S - submitted to CMS; E - Escitalopram (10 mg / kg, via gavage); ES - CMS + ES; SC - Sham control. The induced depression protocol consisted of the exposure of the animals to nine different stressors (one stressor/day), randomly for 8 weeks, from peripuberty (41 days postpartum, dpp) to adulthood (97 dpp). The escitalopram treatment period started at 70 dpp and lasted 4 weeks. The euthanasia was performed for biological material collection at 114 dpp. Morphometric, biometric, sperm parameters, oxidative stress analyses, and corticosterone dosage were carried out.

Results: There was a reduction of the sperm daily production and sperm concentration in the epididymis of rats treated and/or submitted to CMS. These groups (E, S, ES) also showed reduction of the mitochondrial activity; acrosome integrity; sperm chromatin compaction; sperm motility and vitality, besides an increased frequency of morphologically abnormal sperm. The sperm transit time through the epididymis was significantly higher in the escitalopram-treated rats (E, ES). No differences were observed regarding the sperm DNA fragmentation. The lipid peroxidation was significantly increased at the epididymal (E, S, and ES group) and testicular levels (S group).

Conclusion: The CMS with or without escitalopram treatment altered the oxidative status in sperm and male organs, worsening the qualitative and quantitative sperm parameters, which can probably compromise the male fertility.

© 2022 American Society of Andrology and European Academy of Andrology.

KEYWORDS
chronic mild stress, depression, escitalopram, oxidative stress, rat, sperm

1 | INTRODUCTION

Mental diseases usually have multifactorial etiologies and are expressed in a multifactorial way, like major depressive disorder (MDD), the clinical depression.[1] MDD has a serious mood disorder and a predominance of thereabout 10%–15% in the global population.[1] Depression affects around 280 million people worldwide.[2]

Depression accompanied by anxiety is often observed in the reproductive period as shown in epidemiological research.[3] This mental disease is usually associated with suicide episodes, and so, it is the fourth cause of death in people around 15–29 years.[2] Depression episodes are strongly related to prolonged stressful situations in life.[4]

Furthermore, psychiatric disorders like depression became more evident after the pandemic of COVID-19 increasing the concern regarding the prescription of antidepressant drugs at this time, especially to young adulthood.[5] In addition, antidepressants and antipsychotics are widely recommended for the treatment of psychiatric illnesses like depression, autistic spectrum, and neurodevelopmental delay.[6] So, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have gained extensive clinical importance and are the most common drugs prescribed for the treatment of mental illnesses, including depression.[7]

However, some SSRIs can cause sexual adverse effects in men, such as: anorgasmia; penis erectile alterations; low libido;[8] decrease in the sperm quality,[9] sperm production and ejaculation.[10,11] Escitalopram is a SSRIs and an active S-enantiomer of citalopram. Thus, escitalopram has faster acting compared to other antidepressants, including citalopram.[12] In 2009, the Food and Drugs Administration (FDA) approved the use of escitalopram for treatment of major depressive and obsessive-compulsive disorders, generalized anxiety and enuresis in adolescents.[7]

The effects of antidepressant drugs on male reproduction are poorly understood and investigated. Indeed, studies involving depressed men have not provided enough information regarding the sperm alterations in these patients.[9,10,13] In addition, there are also few studies regarding experimentally induced depression by chronic mild stress (CMS), using rat as a model.[14,15] On the other hand, there is an increased concern about the feasible negative impact of CMS as well as the possible side effects of long-term escitalopram therapy on the male reproduction, with emphasis on sperm production and quality, when the treatment begins from childhood or adolescence.

The rat is a recognized experimental model both in neuroscience and male reproductive toxicology.[16,17] Thus, we proposed here a translational study using this experimental model, aiming to investigate, in early adulthood, the effects of CMS when induced from peripuberty on male reproduction. The CMS simulates depression in rodents. The impact of escitalopram therapy on reproductive parameters, associated or not with CMS, was also scrutinized.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Maintenance and obtainment of the rats

After the mating of the adult rats, belonging to the Center of Development of Experimental Models for Medicine and Biology, a total of 62 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were obtained. Up to four male animals were maintained in cages under appropriate hygiene and environmental conditions, such as: temperature (22 ± 2°C), humidity (45%–55%), and photoperiod (12 h light/dark cycle, except for the stressed groups when the stressor "changing photoperiod" was applied). The animals had free access to water and commercial laboratory chow (Nuvilab CR1; Brazil) except for the stressed groups during the period when the stressor applied required "no water" or "no food", respectively.

2.2 | Ethics committee approval

The Sectorial Animal Facility of the Laboratory of Biology of Reproduction and Development Biology and the experimental protocol of this study have followed all standards and rules established by the Ethical Committee for Animal Research of the Federal University of Sao Paulo (CEUA), Brazil (number: 6763010218), which also includes periodic monitoring of the animals by a veterinarian. Thus, the National Council of Animal Experimentation's ethical principles were respected (CONCEA, Brazil).

2.3 | Experimental design

Sixty-two peripubertal male rats were randomly distributed into groups at 41 days of age. The four groups were: Sham-control (SC; $n = 16$), Escitalopram (E; $n = 15$), Stress (S; $n = 16$), and Escitalopram-stress (ES, $n = 15$). The S and ES groups were composed of animals exposed to unpredictable CMS protocol, which was induced from the 41st to 97th day of age. This duration of stress (56 days) was chosen aiming to include a complete period of spermatogenesis (around 53 days in rats[18]), thus exposing germ cells at all phases of differentiation. The depressive behavior-induced protocol in the peripubertal rats was elaborated based on some studies.[15,19–22]

Nine different stressors were randomly administered, one per day, consecutively for 8 weeks. The sequence of the use of the nine stressors was alternated during each week, without repetition of the

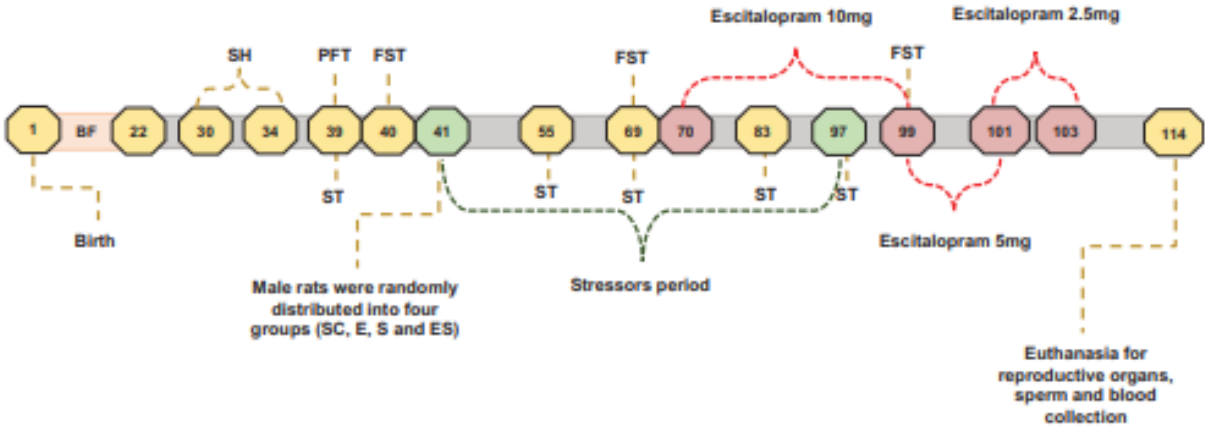


FIGURE 1 Experimental design: Peripubertal 41-day-old male rats were randomly distributed into four groups: Sham-control (SC), Escitalopram (E), Stress (S), and Escitalopram-stress (ES). The groups S and ES were composed of animals exposed to chronic mild stress (CMS) protocol, which was induced from the 41st to 97th day of age. The rats from groups E and ES received, from 70 to 99 days of age, the antidepressant escitalopram oxalate (Aché, Sao Paulo), in a daily dose of 10 mg/kg body weight by gavage route. This dose was gradually reduced in the last 5 days of treatment (5 mg/kg body weight from 99 to 101 days of age; 2.5 mg/kg body weight from 102 to 103 days of age), aiming to avoid some undesirable symptoms related of the drug discontinuation. The animals of Sham-control group were also submitted to a same daily dose and period; however, they received, by gavage, filtered water instead of escitalopram. At 114 days of age, the animals were weighed, and the euthanasia was performed by intraperitoneal injection with a lethal dose of anesthetic for organs, sperm, and blood collection. Every animal was submitted to two tests (forced swim test and sucrose consumption) during the all experimental time. The forced swim test was performed at different ages (40, 69, and 99 days postpartum) with one pretest on day 39. Before the sucrose consumption tests, the animals were habituated to consuming a palatable sucrose solution - 1.5% and the habituation period lasted 5 days (from 30 to 34 days of age). The sucrose consumption test was performed at different ages (39, 55, 69, 83, 97 dpp). BF, breastfeeding; SH, sucrose habituation (5 days); PFT, Pre-Forced Swim Test (10 min); FST, Forced Swim Test (5 min); ST, Sucrose Test (24 h)

stressor. The stressors were randomly applied to be unpredictable,[23] aiming to prevent animals from getting used to them. The nine stressors used here were: (1) period without food (12 h) followed by 1 h of limited food (five pellets/cage); (2) period without water bottle (12 h) followed by 1 h with an empty bottle; (3) isolation housing (24 h); (4) switch cage mates (three times/day); (5) wet sawdust (overnight); (6) changing photoperiod (24 h darkness); (7) 1 h of restraint in plastic tubes, where the animals were maintained immobile and with air circulation); (8) 1 h of exposure to predator odor (Fox odor: 1:5000 2,4,5-trimethylthiazole; Sigma); (9) different object placed in the bottom of the cage (eight marbles per cage overnight).

The rats from the groups E and ES received, from 70 to 99 days of age, the antidepressant escitalopram oxalate (Aché, Sao Paulo), in a daily dose of 10 mg/kg body weight by gavage route, using an 18-G stainless steel needle.[17] This dose was gradually reduced in the last 5 days of treatment (5 mg/kg body weight from 99 to 101 days of age; 2.5 mg/kg body weight from 102 to 103 days of age), aiming to avoid some undesirable symptoms related to the drug discontinuation. The Sham-control animals received, by gavage, the same daily dose and period; filtered water instead of escitalopram. Please, see Figures 1 and 2 illustrating the experimental timeline and a 9-day example of the stressors.

2.4 | Immobility time

The immobility time was evaluated in each animal through the application of the Forced Swim Test (FST) using the Porsolt's method[24] with modifications. The test was performed at different ages (40, 69, and 99 days postpartum). The first test was applied 24 h (at 40 dpp) before the beginning of the usage of stressors; the second test was used during the stressor period and 24 h (at 69dpp) before starting the escitalopram treatment. At a third time, the FST was applied at the end of the stressors period (at 99 dpp) and the escitalopram treatment (10 mg/Kg).

To carry out the FST, the rats were individually placed to swim in a glass cylinder filled with a column of water at 30 cm of depth, to prevent the exit of the animal from the container. The water was maintained at room temperature. Twenty-four hours before the first test, the rats were exposed to a 10 min pretest aiming to acclimate them to the forced swim tank. The first test (24 h after the pretest) had an exposure period that lasted 5 min, as well as the two other tests; however, these last ones were without a pretest. The animals were gently dried and returned to their respective cages after each test. The immobility time was quantified during each 5-min exposure of FST with the Software X-PloRat Version 2005 (University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil). The individual behavior was evaluated

Stressor / Day	Water deprive*	Wet cage	Fox odor	Isolation house	Novel object	Restraint	Switch cage	Change photoperiod	Food deprive*
Monday	7pm ↓								
Tuesday	7am (+1h empty bottle)							7am ↓	
Wednesday				7am ↓				7am	
Thursday			1h	7am					
Friday						1h			
Saturday					7pm ↓				
Sunday		7pm ↓			7am				
Monday		7am							7pm ↓
Tuesday							10am/ 3pm/ 6pm (3 times)		7am (+1h five pellets)

FIGURE 2 Stressors protocol: An example of time and length of stressors during a period of 9 days. Each week seven different stressors were randomly administered, one per day, consecutively for 8 weeks. The sequence of the use of the nine stressors was alternated during each week, without repetition of the stressor, aiming to prevent animals from getting used to them. The chronic mild stress procedure was designed to maximize the unpredictable nature of the stressors. The nine stressors used were: (1) food deprivation (12 h) immediately followed by 1 h of restricted access to food (five pellets); (2) water deprivation (12 h) immediately followed by 1 h of exposure to an empty bottle; (3) isolation housing (24 h); (4) switch cage mates (three times/day); (5) wet cage (200 ml water in 100 g sawdust bedding - overnight); (6) changing photoperiod (24 h darkness); (7) 1 h of restraint in plastic tubes, where the animals were maintained immobile and with air circulation; (8) 1 h of exposure to fox odor (1:5000 2,4,5-trimethylthiazole; Acros Organics); (9) novel object placed in the bottom of the cage (eight marbles per cage overnight). The food deprivation and water deprivation were never applied during the same week and before a sucrose test.

and classified according to the different movements observed: (a) swimming, (b) climbing, and (c) immobility (the animal just produces the movements to maintain itself breathing out of the water).

2.5 | Anhedonia behavior

To identify the anhedonia behavior during the stress protocol, the animals were submitted to another test: the sucrose consumption. It is a recognized test to identify anhedonia behavior in rats and is characterized by the reduction in sucrose intake in comparison to the baseline intake values of control group.[23] Before the test, the animals received for 5 days (from 30 to 34 days of age) a palatable sucrose solution (1.5 %)[21] for habituation to consumption. During the test, the animals were isolated in individual cages, and two bottles were offered for a period of 24 h: one containing 1% sucrose solution and another with filtered water. After twelve hours from the beginning of the sucrose test, the bottles had their positions changed aiming to avoid a possible preference of the animals in relation to the choice of a specific side. The stressors "food and water restriction" were not applied before each sucrose consumption test.[25] The sucrose consumption for each animal was simultaneously estimated in all the groups through the obtainment of the weighing of the bottles at the beginning and at the end of the test.[16] The sucrose consumption test was performed at different ages (55, 69, 83, 97 dpp). Furthermore, the first test was applied at 39 days of age (before the stress protocol and escitalopram treatment started). The sucrose intake = volume at the beginning − volume at the end of the test.

2.6 | Euthanasia and sperm samples

The animals were weighed, and the euthanasia was performed by intraperitoneal injection with a lethal dose of anesthetic (240 mg/kg body weight ketamine + 24 mg/kg body weight xylazine, Dopalen-Anasedan, Ceva, Sao Paulo, Brazil) at 114 dpp. The testes and epididymides were immediately removed from the scrota. To the collection of the sperm, the right cauda of epididymis was minced several times with a scalpel blade in a pre-warmed (37°C) Petri dish containing 4 ml of Hank's solution (KCl, KH2PO4, NaCl, Na2HPO4, NaHCO3, pH 7.2), supplemented with bovine serum albumin (2 mg/ml).

The testes and epididymides from left the side were collected. One part was frozen at −20°C for the sperm quantitative analyses and the other at −80°C for the stress oxidative evaluation.

2.7 | Biometric analysis

For biometric analysis, the male organs (testes, epididymides, prostates, seminal vesicles) and adrenals were collected and individually weighed on a semi-analytical electronic scale (Marte-AS1000). The volume and measurements of the right testes (minor and major axes) were obtained in accordance with Scherle's method[26] and with a manual caliper,[27] respectively.

2.8 | Plasmatic corticosterone levels

The rats at 114 days of age were individually weighed and received the anticoagulant heparin (1 ml/1 kg body weight); immediately after 10 min from the heparin injection, the euthanasia was performed by intraperitoneal administration of a lethal dosage of ketamine (240 mg/Kg) associated with xylazine (24 mg/Kg). Blood samples were collected, centrifuged for 10 min at 4000 r/min (Refrigerated centrifuge 5430R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and stored in a freezer (at −20°C). The measurement of plasmatic corticosterone levels was assessed using a commercial kit CEA540Ge (USCN, Life Science Inc, USA) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and following the kit's instructions.

2.9 | Quantitative parameters

The left testes and epididymis were thawed and homogenized to obtain the spermatids in step 19 and sperm, respectively.[28,29] The spermatids in step 19 and the number of sperm were represented by absolute (sperm/organ) and relative (sperm/g/organ) values. To obtain the daily sperm production (DSP), the total number of resistant spermatids in step 19, after the homogenization, was divided by 6.1, considering that this is the time (in days) that spermatids in step 19 stay on the seminiferous epithelium of rats.[28,29] To obtain the sperm transit time, the sperm number in each portion of the epididymis (caput + corpus and cauda respectively) was divided by the DSP.[28,29]

2.10 | Sperm morphology (Shorr/hematoxylin)

The sperm morphology was assessed by obtaining samples of epididymal fluid that was smeared on a glass slide and dyed with Shorr/Hematoxylin method.[30] Morphological analysis was performed counting 200 sperm randomly under a light microscope (Olympus BX-51, Olympus Optical CO, Japan). The sperm were classified based on morphological defects of the head, middle piece, and tail.[31]

2.11 | Sperm mitochondrial activity (diaminobenzidine)

This methodology for assessment of activity of the mitochondria was described by Hrudka.[32] The technique consists in an oxidation reaction in the mitochondria by the cytochrome c complex with the 3,3′-diaminobenzidine (DAB) in the middle piece of spermatozoa.

The fluid collected from epididymal cauda was incubated at 37°C for 60 min in DAB + PBS solution (1:2 ratio; 1 mg/ml DAB in phosphate buffered saline (PBS), pH = 7.4). Under a phase-contrast microscope (Eclipse E200, Nikon Instruments Inc), a total of two hundred spermatozoa were analyzed at 100× magnification.

The mitochondrial activity classification of the middle piece of the spermatozoa was performed according to Hrudka (1987)[32]: Class I (100% of the middle piece stained, only active mitochondria); Class II (>50% of staining in the middle piece, predominance in active mitochondria); Class III (<50% of staining in the middle piece, predominance in inactive mitochondria), and Class IV (no staining in the middle piece, only inactive mitochondria).

2.12 | Acrosome integrity (Peanut Agglutinin)

The Varisli's methodology[33] was performed to determine the acrosome integrity using the Peanut Agglutinin (PNA) (Lectin from *Arachis hypogaea* with a fluorescent dye) (Alexa Fluor 488 Conjugate,Molecular Probes).

The sperm samples of epididymal fluid were incubated at 37°C in amber microtubes with 100 ml of Alexa Fluor 488 and PNA (20 ng/ml) for 30 min. After that, these samples (20 μl) were placed on glass microscope slides. Two hundred spermatozoa were analyzed under an epifluorescence microscope Nikon Eclipse CI (Nikon, Melville, NY, USA). The classification was: (I) intact acrosome - sperm acrosome region with intense and moderately bright fluorescence and (II) altered acrosome - sperm acrosome region with weak, irregular, or absent fluorescence.

2.13 | Sperm motility

Fresh sperm from the right epididymis cauda was mixed with a medium containing Hank's solution with 2 mg/ml BSA, prewarmed to 37°C and was placed into a Neubauer counting chamber. The sperm motility was evaluated under a light microscope at 500× magnification (Olympus BX-51, Olympus Optical CO, Japan). Thus, two hundred sperms were analyzed and classified as: (I) progressive motile, (II) nonprogressive motile, or (III) immotile.[34]

2.14 | Sperm vitality (eosin Y)

The eosin Y dye (5% in saline solution) was used to sperm vitality evaluation.[35] For the smears preparation, fresh epididymal fluid (40 μl) was mixed with 10 μl of eosin Y 5%, and a total of two hundred spermatozoa were observed under a light microscope at 500× final magnification (Olympus BX-51, Olympus Optical CO, Japan). Live spermatozoa remained unstained, whereas spermatozoa with pink or

red stained head were considered dead.[35] The percentage of live spermatozoa was recorded.

2.15 | Sperm DNA fragmentation (comet assay)

The alkaline comet assay with minor modifications[36] was performed to measure the DNA fragmentation in sperm.

Sperm samples were diluted in a prewarmed 0.5% low melting point agarose (LGC Laboratories, Sao Paulo, Brazil) at 3×10^5 cells/ml final concentration. After that, 125 μl from the mixture (spermatozoa + low melting point agarose) were placed onto precoated slides with 1% normal melting point agarose (LGC Laboratories, Sao Paulo, Brazil). The slides were coverslipped and maintained at 4°C for 20 min. Then, coverslips were gently removed, and slides were covered with two lysis solutions: the first one for 1 h at 4°C and the second solution containing proteinase k (0.1 mg/ml) for 2 h and 30 min, at 37°C. The slides (12/each time) were washed in distilled water after each lysis solution. Thus, the slides were covered with alkaline solution for 45 min at 4°C and washed with tris-borate-EDTA (TBE) solution for 5 min. The horizontal electrophoresis was performed under 300 mA electrical field using TBE buffer for 25 min. Then, the slides were fixed with 70% ethanol (4°C), air dried, and stored in a place protected from light. After dry, the slides were dyed with ethidium bromide and evaluated under an epifluorescence microscope Nikon Eclipse CI (Nikon, Melville, NY, USA). A total of one hundred spermatozoa were analyzed per animal using the Software Lucia Comet Assay (Version 7.02, Czech Republic), to obtain: (I) the percentage of DNA in the cauda, (II) tail length and tail extent moment (tail length × cauda DNA%/100), and (III) olive tail moment (cauda DNA% × a fraction of the tail length/100).[37]

2.16 | Sperm DNA integrity (Kit Halomax)

DNA fragmentation in spermatozoa was also performed using a commercial kit (Halomax, HT-RN40, Halotech, Madrid, Spain) from samples at 6×10^6 sperm/ml final dilution in PBS.

On the day of analysis, sperm samples were mixed to a prewarmed microtube (37°C) with low melting point agarose. Drop of the mixture (2 μl) was spread onto a previously cooled slide and coverslipped maintained at 4°C for 10 min. After that, the samples were covered with Lysis Solution for 5 min and immediately washed with distilled water for 5 min. Then, the samples were submitted to a sequential dehydration in 70% and 100% ethanol solutions, respectively (2 min/each). The dyeing was performed with a mix of fluorescent solutions (1 Reagent A: 1 Reagent B). All the procedures followed the kit's instructions (HT-GFS100, Halotech, Madrid, Spain). A total of hundred spermatozoa were observed under an epifluorescence microscope, at 40× final magnification per animal. The spermatozoa showing an intensely colored and widespread halo around their head were considered with fragmented DNA, while spermatozoa showing a soft and weakly colored halo were considered with intact DNA.

2.17 | Chromatin compaction (toluidine blue staining)

The toluidine blue staining is a good marker for assessing chromatin compaction. The test is used to evaluate sperm chromatin structure, since toluidine blue binds with free phosphate radicals that are not bound to protamines, thus indicating the protamination level.[38] On the day of analysis, sperm samples were placed onto microscope glasses slides and air-dried; then, they were fixed in 1:1 ethanol/acetone solution for 30 min, at 4°C. The slides were exposed to hydrochloric acid (0.1N HCl) at 4°C, for 10 min to hydrolyze the proteins. Subsequently, the slides were washed three times in distilled water (1 min/each) and stained with 0.05% toluidine blue in 50% citrate buffer, pH 3.5 for 20 min. A total of two hundred spermatozoa per sample were evaluated under a light microscope at a 100× lens (Olympus BX-51, Olympus Optical CO, Japan), and the chromatin quality was classified according to metachromatic staining of the head: spermatozoa showing light blue head (preserved chromatin) and spermatozoa showing dark blue or purple head (abnormal chromatin).[39]

2.18 | Sperm lipid peroxidation (BODIPY probe)

The Domínguez-Rebolledo's methodology[40] was used to perform lipid peroxidation on spermatozoa. The sperm samples were diluted in buffer solution to 2×10^6 sperm/ml final concentration. A sample was previously incubated for 15 min with H_2O_2 for the obtainment of the positive assay control. The samples were sonicated on ice (Sonics, Vibra Cell VCX 130) at low power. After that, the samples were incubated at 37°C in the dark with C11 BODIPY 581/591 (D3861; Molecular Probe) at 2 mM in DMSO, for 30 min, washed in PBS and centrifuged for 10 min (3000 g). Supernatants were resuspended in 400 ml of PBS. The analysis was performed in a flow cytometer (FACSCANTO II – BD Biosciences, Brazil) evaluating a total of 10 thousand spermatozoa per animal. The data were analyzed using the WinList 3D 9.0 (Verity Software House Topsham, USA) to obtain the BODIPY positive spermatozoa (%).

2.19 | Obtainment of the measurements of malondialdehyde for evaluation of the lipid peroxidation at testicular and epididymal levels

The malondialdehyde (MDA) at testicular and epididymal levels was performed through a thiobarbituric acid (TBA) reaction that generated TBA reactive substances (TBARS).[41]

A sample of 0.1 g of each testis was thawed and homogenized (Ultra Turrax - model T-10; Labstore, Curitiba, PR, Brazil), for 20 min, in a 1.15% KCl solution. In addition, the epididymis of each animal was divided into two parts: (1) Caput + corpus and (2) Cauda and also homogenized. One aliquot of each homogenized tissue was separated for MDA dosage. An aliquot of 0.1 ml of each tissue homogenate was added to a microtube containing: 1.5 ml of 20% acetic acid (pH 3.5),

0.2 ml of 8.1% sodium dodecyl sulphate, 1.5 ml of 0.8% 2-BA and 0.7 ml of distilled water. After that, the microtubes were incubated in a water bath at 95°C for 60 min. Then, the microtubes were cooled in ice and centrifuged for 10 min at 1792 g (Refrigerated centrifuge 5430R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The supernatants were placed in 96 wells plates for analysis using the ELISA. The absorbance was measured in a spectrophotometer (Spectra Max Plus 384; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 532 nm according to Abd-Allah's methodology.[41]

2.20 | Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Sigma Plot software version 12.0 (Systat Software Inc., USA). The parametric test one-way analysis of variance (ANOVA) was applied when the results showed normal distribution and a post hoc test Student–Newman–Keuls (SNK). On the other hand, the nonparametric test of analysis of variance (Kruskal–Wallis test) was applied when the data did not show normal distribution and similarity of variance followed by a post hoc test for multiple comparisons (Dunn's test or the SNK test) when the results were significant. The values among the groups (SC, E, S, and ES) must have the p value less or equal to 0.05 ($p \leq 0.05$) to be considered significant.

3 | RESULTS

3.1 | Immobility time

The immobility time measured in seconds, evaluated through the FST (5-min of duration), was performed at day 40, 69, and 99 (Figure 3). At 40 dpp (before starting the stress protocol), the experimental groups did not show significant differences among them. At 69 dpp (1-day before the escitalopram treatment), there was a significant increase of the sperm immobility time in all stressed groups (S and ES) in comparison with the SC and E groups. At 99 dpp, that is, 2 days after the end of the stress period and at the last day of escitalopram treatment (10 mg/kg dose), the S and ES groups showed a significantly longer immobility time than the other groups (SC and E). However, the immobility time from ES group decreased compared to the S group.

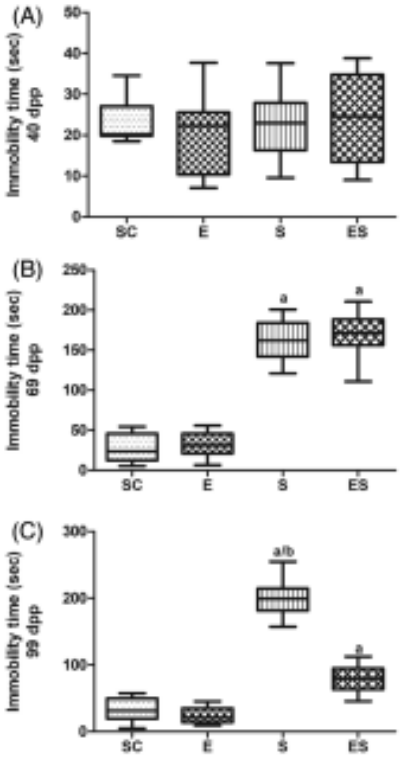


FIGURE 3 Box plot illustrating the immobilization time in the 5-min Forced Swim Test at the day 40 (A), 69 (B), and 99 (C) in animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES). Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 10$. ($p < 0.001$). **a: S and ES > SC and E; b: S > ES**

3.2 | Anhedonia behavior

The anhedonia was evaluated using the sucrose consumption test applied on 38, 55, 69, 83, and 97 dpp (Figure 4). During the first 2 weeks of exposure to the stressors (55 dpp), the experimental groups did not show significant differences among them, regarding the anhedonia presence. After a month of exposure to stressors (at 69 dpp), all animals of the S and ES groups presented a significant reduction in sucrose consumption compared to the SC and E groups. On the 83th dpp, both stressed groups (S and ES) presented lower sucrose consumption in comparison with those nonstressed (SC and E); furthermore, the group that received escitalopram (ES) during the period of chronic mild-stress induction showed an increase of sucrose consumption in relation to the only stressed group (S group); however, this difference was not significant. At 97 dpp (last day of stress period), the consumption of sucrose solution was higher in SC, E, and ES groups in comparison with S group, showing that, after the escitalopram therapy, there was an increase in the sucrose consumption in stressed animals (ES) in relation to the only stressed rats (S).

3.3 | Biometric analysis

All organs were collected at 114 dpp, and the biometric analyses are shown in the Table 1. The data showed no significant differences among the groups regarding the absolute weight of epididymis. The absolute weight of the full seminal vesicle in ES was lower in comparison to the other groups. Also, the absolute weight of empty seminal vesicle was significantly lower in the E and ES groups when compared to the SC and

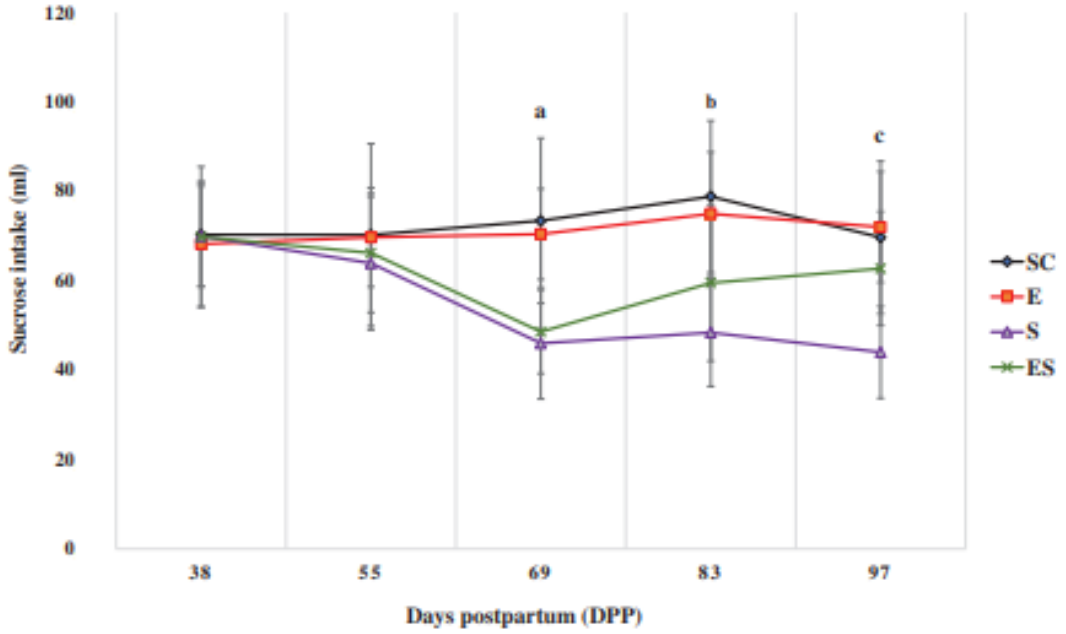


FIGURE 4 Sucrose consumption test at different ages in the animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES). Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as mean ± SD; $n = 7$. ($p < 0.05$). **a: SC and E > S and ES; b: SC and E > S; c: SC, E and ES > S**

TABLE 1 Biometric parameters of male reproductive organs obtained from control and experimental groups (SC, E, S, ES) at 114 days of age. Data are expressed as mean + S.D. (Standard Deviation) or as median (Interquartile Range (IQR): Q1–Q3)

	Groups ($n = 10$)			
Parameters	**SC**	**E**	**S**	**ES**
Absolute epididymis weight (g)*	0.69 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.06	0.68 ± 0.06
Absolute full seminal vesicle weight (g)*	1.59 ± 0.16	1.54 ± 0.17	1.56 ± 0.13	**1.32 ± 0.14 a**
Absolute empty seminal vesicle weight (g)*	0.71 ± 0.05	**0.55 ± 0.08 b**	0.66 ± 0.07	**0.54 ± 0.08 b**
Absolute ventral prostate weight (g)*	0.65 ± 0.03	**0.56 ± 0.04 b**	0.67 ± 0.04	**0.56 ± 0.05 b**
Testicular				
Absolute testicular weight (g)*	1.85 ± 0.13	**1.74 ± 0.11c**	**1.72 ± 0.12c**	**1.65 ± 0.08 c**
Volume (cm^3)*	1.77 ± 0.14	**1.66 ± 0.11 c**	**1.64 ± 0.09c**	**1.57 ± 0.11 c**
Major axis (mm)*	21.03 ± 0.76	20.85 ± 0.77	20.62 ± 0.80	20.83 ± 0.88
Minor axis 1 (mm)**	11.0 (10.5–11.5)	11.25 (10–11.5)	11 (10.12–11.5)	11 (10–11)
Minor axis 2 (mm)*	11.96 ± 0.53	11.75 ± 0.91	11.75 ± 0.77	11.63 ± 0.44

Note: a: ES < SC; b: E and ES < SC and S; c: E, S and ES < SC. ($p < 0.05$).
*ANOVA and SNK.
**Analysis of Kruskal–Wallis and Dunnt's test.

S groups. Furthermore, the ventral prostate absolute weight presented a significant decrease in the E and ES animals compared to the others.

There was a significant reduction at testicular absolute weight and volume in the E, S, and ES animals comparing with the sham control animals (SC). Although, the measurements of testicular axes did not statistically vary among the groups studied, lower values were observed in the groups S, E, and ES in comparison with the control group SC.

3.4 | Body weight

During all experiment period, the animals from all groups were monitored and weighed (Figure 5). At 41 dpp, the data presented no significant differences in relation to the body weight when all groups were compared among them. However, after 4-weeks of the stress protocol (at 69 dpp), a reduction of body weight was noted in the S and ES groups comparatively to the SC and E rats, although no statistical

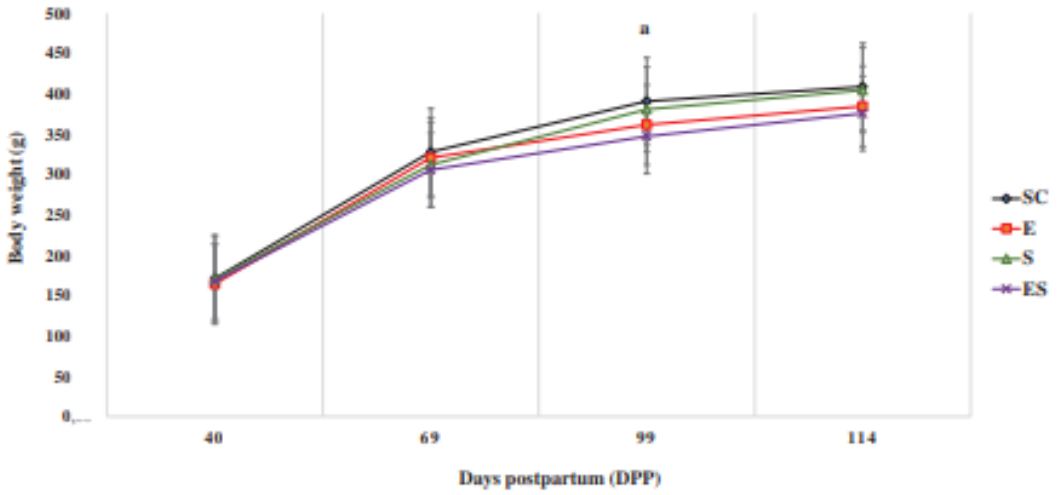


FIGURE 5 Body weight at different ages in the in the animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES). Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as mean ± SD; n = 14. ($p < 0.05$). **a: SC > E and ES**

significance has been observed. After the escitalopram treatment (99 dpp) in the full dosage (10 mg/kg), the rats from the E and ES groups showed decreased body weight when compared to the SC group. Beyond that, the E, S, and ES groups presented a reduction in body weight at 114 dpp, in comparison to animals from the SC group; but with no significant statistical differences.

3.5 | Adrenal weight

The adrenal relative weight (organ weight per 100 g of body weight) was obtained. The data showed that the animals exposed to the stress protocol without escitalopram treatment (S group) presented an increase of adrenal relative weight compared to the other animals from SC, E, and ES groups (Figure 6).

3.6 | Corticosterone levels

The corticosterone plasma level at 114 dpp (17-days without any stressor) was elevated in stressed rats comparing to the rats from the other groups (SC, E, and ES). However, a statistical significance was not observed in this case (Figure 7).

3.7 | Sperm morphology

The analysis of the sperm morphology data showed an elevated percentage of abnormal forms in the E, S, and ES than in the control rats (SC) Figure 8. There was an increase in the frequency of tail alterations in the escitalopram and stressed groups (E = 48.9%, S = 49.2%, ES = 51.4%) in comparison with the control rats (SC = 23.3%). Also, there was an increase in the frequency of head alterations in the

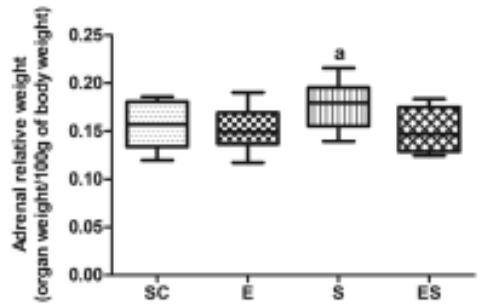


FIGURE 6 Box plot illustrating the adrenal weight per body weight from animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S) and escitalopram + stress (ES) at 114 days. ANOVA followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 10$. ($p < 0.05$). **a: S > SC, E and ES**

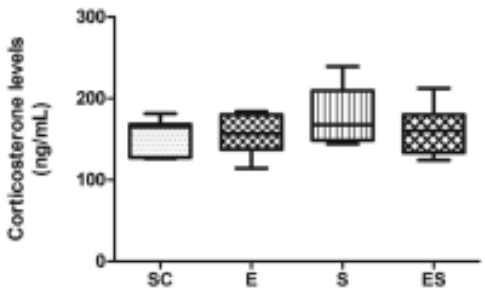


FIGURE 7 Box plot illustrating the plasmatic hormone levels of corticosterone from animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. Corticosterone Kit for rat. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 7$. ($p < 0.05$)

TABLE 2 Spermatozoon mitochondrial activity in rats from the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days of age. Data are expressed as mean + S.D. (Standard Deviation) or as median (Interquartile Range (IQR): Q1–Q3)

	Groups ($n = 12$)			
Mitochondrial activity	SC	E	S	ES
Class I*	93.61 ± 2.03	**85.61 ± 5.29 a**	**81.80 ± 4.57 a**	**84.41 ± 5.19 a**
Class II*	6 ± 0.96	**14.5 ± 1.61 b**	**18.66 ± 2.43 b**	**17.28 ± 2.79 b**
Class III**	0 (0–0.25)	0 (0–0.75)	0 (0–1.0)	0 (0–1.0)
Class IV**	0 (0–0)	0 (0–0.25)	0 (0–0.25)	0 (0–0.75)

Note: **a: E, S and ES < SC; b: E, S and ES > SC.** ($p < 0.001$).
*ANOVA and SNK.
**Analysis of Kruskal–Wallis and Dunnt's test.

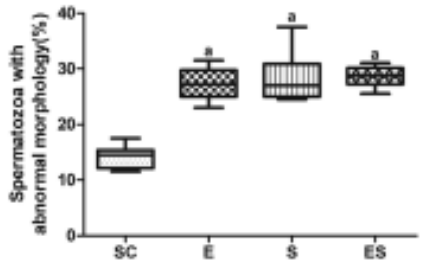


FIGURE 8 Box plot illustrating the percentage of spermatozoa with abnormal morphology from animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. Shorr/hematoxylin method. Kruskal–Wallis followed by Dunnt's posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 8$. ($p < 0.001$). **a: E, S and ES > SC**

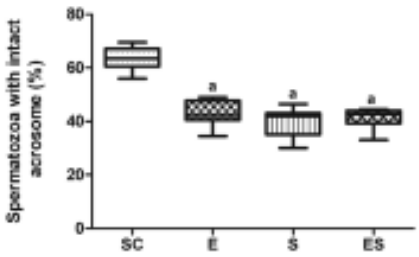


FIGURE 9 Box plot illustrating the percentage of spermatozoa with intact acrosome from animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. PNA method. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 10$. ($p < 0.001$). **a: E, S and ES < SC**

escitalopram and stressed groups (E = 6.5%, S = 7%, ES = 6.5%) compared to the control group (SC = 2.5%).

3.8 | Sperm mitochondrial activity

It was observed that the number of spermatozoa with active mitochondria (Class I) was lower in the treated and stressed groups (E, S, ES) in comparison to the control rats. Thus, the number of spermatozoa Class II was higher in the escitalopram and stressed groups (E, S, ES) compared to the SC group. Nonetheless, the data regarding spermatozoa Class III and IV presented no significant differences among the groups (Table 2).

3.9 | Acrosome integrity

The data showed a significantly lower frequency of spermatozoa with intact acrosome in both treated and stressed rats (E, S, ES) than in the control rats (SC) (Figure 9). The difference between a sperm with intact acrosome and altered acrosome is represented in Figure 10.

3.10 | Sperm motility

As shown in the Table 3, the escitalopram treatment and the stress exposure resulted in a significant reduction of sperm quality regarding the parameter "motility" compared to the sham control rats. Thus, the percentage of sperm with nonprogressive motility increased in the stressed rats that were treated or not with escitalopram (S, ES) as well as in those no-stressed but treated with this antidepressant drug (E). On the contrary, the frequency of sperm with progressive motility in all these groups decreased relating to the SC group. Furthermore, progressive sperm frequency in the stressed + escitalopram animals (ES) was lower comparing with the stressed animals (S).

3.11 | Sperm vitality

The live spermatozoa percentage was reduced in the E, S, and ES groups in relation to the SC group (Figure 11). The frequency of alive sperm in the stressed group, which was treated with escitalopram (ES), was lower than in that not stressed, but submitted to the therapy with this antidepressant drug (E).

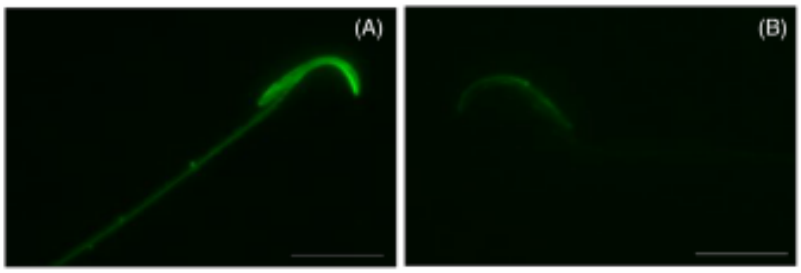


FIGURE 10 Photomicrographs of spermatozoa stained with PNA. Observe the intact acrosome (A) and the alteration in acrosome integrity (B). Scale bar: 10 μm

TABLE 3 Percentage of motile (progressive and nonprogressive) and immotile spermatozoa in rats from the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days of age. Data are expressed as mean + S.D. (Standard Deviation)

	Groups ($n = 7$)			
Sperm motility	SC	E	S	ES
Progressive*	59.11 ± 8.34	**48.25 ± 6.88 a**	**45.58 ± 10.38 a**	**37.21 ± 3.06 a,b**
Nonprogressive*	19.71 ± 3.61	**28.50 ± 6.30 c**	**30.25 ± 2.30 c**	**31.78 ± 6.80 c**
Immotile*	21.42 ± 3.32	25.83 ± 6.19	26.14 ± 3.63	26.88 ± 3.72

*ANOVA and SNK.
a: E, S and ES < SC; b: ES < E; c: E, S and ES > SC. ($p < 0.01$)..

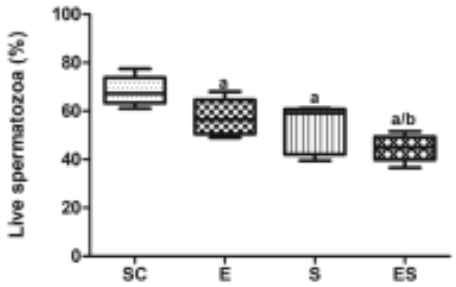


FIGURE 11 Box plot illustrating the percentage of live spermatozoa from animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. Eosin method. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 10$. ($p < 0.001$). **a: E, S and ES < SC; b: ES < E**

3.12 | Comet assay

The data regarding the DNA fragmentation obtained from the Comet Assay did not showed significant alterations among the groups and are represented in the Table 4. The photomicrographs of the spermatozoa after Comet Assay and ethidium bromide staining are in the Figure 12.

3.13 | Kit Halomax

The sperm DNA integrity was also evaluated using the specific kit (Halomax) for rat. Here, the sperm frequency with nonintact chromatin presented elevated values in the stressed animals (S) when compared to rats from the other groups (SC, E, and ES); however, statistical significance was not observed (Figure 13). The spermatozoa with intact DNA and with fragmented DNA are represented in the Figure 14.

3.14 | Sperm chromatin compaction (toluidine blue)

The percentage of spermatozoa with nonintact chromatin was higher in animals after the escitalopram treatment and stress exposure (E, S, and ES) in comparison to the control animals (SC) (Figure 15).

3.15 | Sperm lipid peroxidation (BODIPY Probe)

The data regarding the sperm lipid peroxidation showed an increase in BODIPY positive spermatozoa percentage in the escitalopram and/or stressed rats (E, S, and ES) than in the control group (SC) and are represented in Figure 16.

3.16 | Lipid peroxidation at testicular and epididymal level (MDA dosage)

The MDA, a marker for lipid peroxidation, was evaluated at testicular and epididymal levels. It was observed an increase in the MDA concentration at testicular level in the stressed animals compared to the sham control animals (Figure 17A). In addition, it was observed an increase in MDA concentration at epididymal caput+corpus portion in

TABLE 4 Data on spermatozoon DNA fragmentation in rats from the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days of age with Comet Assay method. Data are expressed as median (Interquartile Range (IQR): Q1–Q3)

	Groups ($n = 6$)			
Parameters	SC	E	S	ES
Tail DNA (%)*	0.38 (0.21–3.07)	0.23 (0.18–1.24)	0.42 (0.28–1.05)	0.24 (0.18–2.56)
Tail length (μm)*	0.19 (0.14–0.63)	0.15 (0.13–0.53)	0.24 (0.18–0.85)	0.18 (0.14–0.67)
Tail moment*	0.02 (0.00–0.20)	0.01 (0.00–0.02)	0.03 (0.01–0.53)	0.01 (0.01–0.05)
Olive moment*	0.01 (0.01–0.17)	0.01 (0.01–0.11)	0.01 (0.01–0.11)	0.01 (0.01–0.08)

*ANOVA and SNK. ($p < 0.001$).

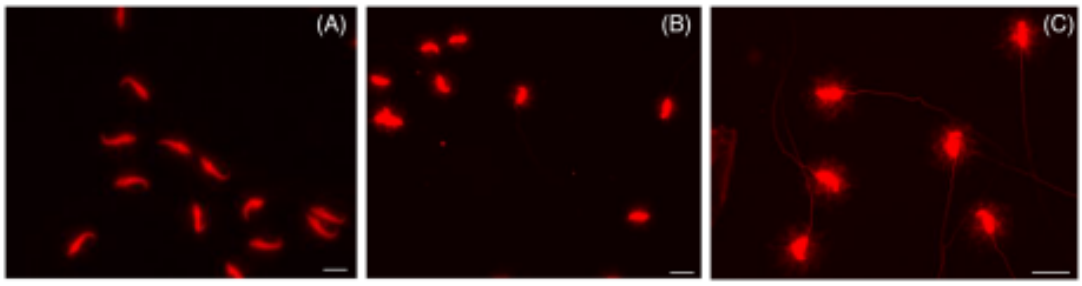


FIGURE 12 Photomicrographs of spermatozoa, under a fluorescence microscope, stained with ethidium bromide after performing the Comet assay. Observe the different degrees of DNA fragmentation: (A) intact DNA; (B) few fragmented, and (C) highly fragmented. Scale bar: 10 μm

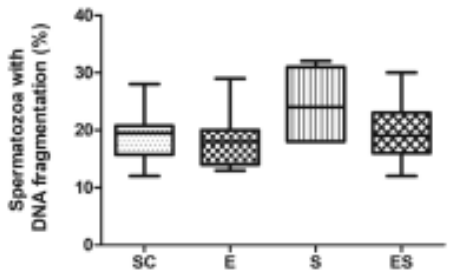


FIGURE 13 Box plot illustrating the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation in animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. Halomax Kit for rat. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 7$. ($p < 0.05$)

the stressed rats compared to the sham control rats (Figure 17B). Also, it was observed an increase in MDA concentration at epididymal cauda portion in the E, S, and ES rats in comparison to the sham control rats (Figure 17C).

3.17 | Quantitative parameters

The data showed a significant reduction in the DSP in the E, S, and ES animals compared to the sham control animals (SC) (Table 5).

A significant reduction in the sperm counts was observed in the epididymis caput/corpus portion (absolute and relative) in the E, S, and ES animals when compared to the SC (Table 5).

In epididymal cauda, an increase in the transit time was noted in the E and ES rats compared to those from the SC group. Thus, the ES group showed an improvement in transit time compared to the E group (Table 5).

4 | DISCUSSION

Depression and anxiety are considered a common public health problem. They often occur during the reproductive years and can affect around 10%–15% of the world population.[1,3] In 2009, the escitalopram, an SSRI, was approved by the FDA (USA) for treatment of mental illnesses, like major depressive disorder, in adolescents, with ages around 12–17 years.[7]

Escitalopram is the s-enantiomer form of citalopram, with similar pharmacokinetic, but more selective and presenting powerful action in low doses.[12] Although the antidepressant therapy generally improves symptoms, some studies have shown that sexual adverse effects can occur such as anorgasmia, erectile dysfunction, low libido[8] as well as decrease in sperm quality.[9] Still during this type of therapy, there are reports on alterations of sperm emission and ejaculation in men.[10,11]

Indeed, serotonin has a key role in the gonadotropin secretion and modulation, and there are some serotonin receptors present in Sertoli cells that are involved in events of the normal spermatogenesis

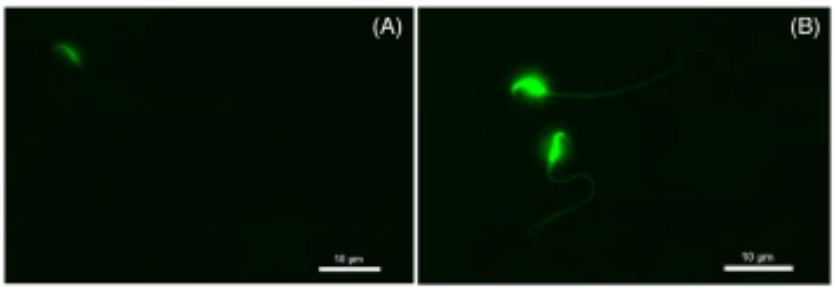


FIGURE 14 Photomicrographs of spermatozoa stained with Halomax Kit for rats. Observe the intact DNA (A) and the DNA fragmentation, the presence of halo (B). Scale bar: 10 μm

TABLE 5 Testicular and epididymal quantitative parameters observed in rats from the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days of age. Data are presented as mean + S.D. (Standard Deviation)

	Groups ($n = 9$)			
Quantitative spermatic parameters	**SC**	**E**	**S**	**ES**
Testis				
Daily sperm production ($\times 10^6$/day)*	28.88 ± 5.52	**21.06 ± 3.26 a**	**24.76 ± 3.05 a**	**21.28 ± 3.22 a**
Absolute spermatid number ($\times 10^6$/organ)*	176.17 ± 33.70	**132.26 ± 17.47 a**	**147.79 ± 20.78 a,b**	**125.95 ± 20.67 a**
Relative spermatid number ($\times 10^6$/g/ of testis)*	114.56 ± 17.42	**95.96 ± 16.36 b**	105.67 ± 15.72	**89.52 ± 12.36 b**
Epididymal caput/corpus				
Sperm transit time (days)*	5.48 ± 1.00	5.89 ± 0.77	5.65 ± 0.63	5.88 ± 0.78
Absolute sperm number ($\times 10^6$/organ)*	150.32 ± 21.74	**125.88 ± 14.39 b**	135.78 ± 24.23	**117.09 ± 14.28 b**
Relative sperm number ($\times 10^6$/ g of organ)*	473.82 ± 51.41	**408.75 ± 53.82 a**	**425.71 ± 56.68 a**	**395.00 ± 50.89 a**
Epididymal cauda				
Sperm transit time (days)*	7.75 ± 1.46	**10.52 ± 1.35 c**	9.02 ± 1.63	**11.45 ± 1.77 c/d**
Absolute sperm number ($\times 10^6$/organ)*	219.72 ± 35.88	194.86 ± 23.30	213.73 ± 29.19	226.29 ± 32.96
Relative sperm number ($\times 10^6$/ g of organ)*	863.39 ± 98.88	864.80 ± 121.48	871.00 ± 81.10	869.09 ± 89.43

Note: **a: E, S and ES < SC; b: E and ES < SC; c: E and ES > SC; d: ES > E.** ($p < 0.05$).
*ANOVA and SNK.

of immature rats.[42,43] Also, serotonin receptors have been found in different male organs as well as in the sperm tail of rats[44] In the vas deferens, for example, these receptors are related to the organ contraction,[45] while in the testis, they are involved in the local blood flow regulation[46]; in the epididymis, in turn, they are observed on epithelial, neuroendocrine, and mast cells participating in sperm maturation process.[47] Thereby, any alteration in serotonin levels can result in sperm damage,[48,49] such as: reduction in DSP; reduction in sperm qualitative parameters as presented here.

In turn, the CMS induced in rodents seems to cause neurochemical changes and a variety of behavioral alterations, such as reduction in sexual and locomotor activities, increased corticosterone levels, reduced sucrose consumption, and disturbed circadian rhythms, all observed in human depression[19,50,51] and were also noticed here, in stressed rats.

However, concerning the experimental protocol of depression induced in rats, we observed methodological variations at the literature, such as (i) type of stressors, (ii) duration of the exposure to the stressors, (iii) the age and period of the experiment was applied, and the age of the euthanasia was performed. Nevertheless, in the great majority of them, adult animals and a period of 4 weeks of exposure to stressors were adopted.[14,20,23,51] In any case, the CMS protocol is considered valid as a model of depressive behavior in rats.[16] Otherwise, the type, duration, severity, or predictability of the stressor applied can cause different responses.[52] Thus, the protocol applied here seemed to be appropriate for the type of the study since we used specific tests (sucrose intake test and FST) that confirmed the depressant state of the animals. In the current study, we observed an increased immobilization time during the FST and a reduced sucrose intake in response to CMS (S group). In addition, we detected an increase in the adrenal weight in stressed animals, which could be considered another evidence of the effectiveness of stress protocol.[20] The SC and E groups showed a lower immobilization time (indicating that the animals were swimming more) and high sucrose intake levels

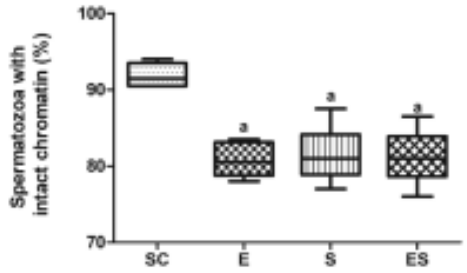


FIGURE 15 Box plot illustrating the percentage of spermatozoa with intact chromatin in animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. Toluidine-blue method. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 7$. ($p < 0.05$). **a: E, S and ES < SC**

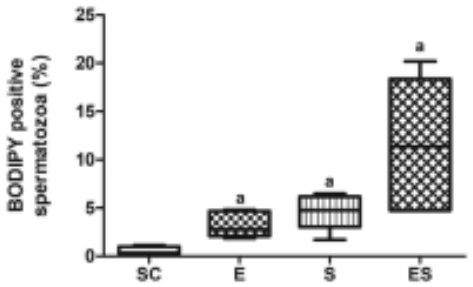


FIGURE 16 Box plot illustrating the percentage of BODIPY positive spermatozoa in animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. BODIPY probe. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 5$. ($p < 0.05$). **a: E, S and ES > SC**

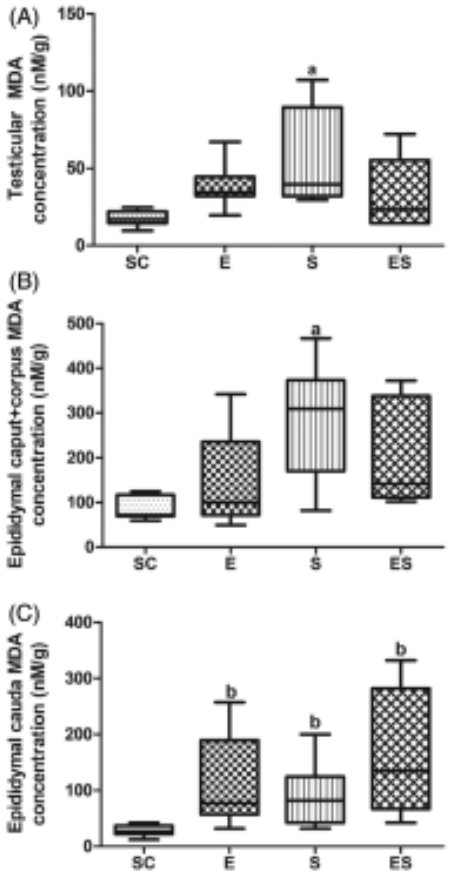


FIGURE 17 Box plot illustrating the malondialdehyde concentration in the testicular tissue (A) and epididymal tissues considering all portions of epididymis: caput + corpus (B) and cauda (C) in animals of the sham control (SC), escitalopram (E), stress (S), and escitalopram + stress (ES) at 114 days. TBARS assay. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls (SNK) posttest. Data are presented as the median and interquartile range (Q1–Q3); $n = 7$. ($p < 0.05$). **a: S > SC; b: E, S and ES > SC**

during all period of treatment, whereas the chronically stressed rats, treated with escitalopram (ES group), presented an increase in the consumption of sucrose solution and a reduction in immobilization time at the end of drug therapy in comparison with the stressed animals (S). According to Castagne et al. (2011),[53] therapies with drugs that affect serotonergic neurotransmission can result in an increase of the swimming time (e.g., fluoxetine, sertraline, paroxetine, citalopram, and escitalopram). Conversely, our results did not show differences regarding the corticosterone levels and final body weight; maybe the intervals of euthanasia used to assess the effects of the stress could explain the difference among our results and others reported in the database, using rat as experimental model.[14,20] Indeed, a wide interval between the end of the stressors and the euthanasia day can have supplied enough time for recovery of corticosterone dosage.[23,54]

It was observed here the effects of stress and escitalopram on spermatic parameters. The results showed many alterations regarding qualitative parameters such as motility, vitality, mitochondrial activity, acrosome integrity, and frequency of morphologically abnormal spermatozoa in the stressed and/or escitalopram-treated groups (E, S, and ES). Thus, previous studies corroborate our data concerning the sperm quality alterations after antidepressant therapy or depression/mild chronic stress.[55–57] Besides, the mechanisms through which the selective serotonin inhibitors may affect sperm quality are poorly understood; however, some studies suggested that alterations of tryptophan metabolism can cause disruption on spermatogenesis[13] or may influence the adenosine triphosphate (ATP) synthesis with the inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation in spermatozoa consequently affecting the sperm quality.[55]

Regarding the biometry alterations in male reproductive organs, our data revealed that escitalopram treatment (E group) reduced the ventral prostrate, seminal vesicles, and testis weights as well as the testis volume. In addition, the stressed groups (S and ES) showed a

decrease in testicular weight and volume. These data are in accordance with the study of Bataineh and Daradka, (2007)[58] that observed, in rats, alterations of the spermatogenesis, weights of reproductive organs besides testosterone and follicle-stimulating hormone (FSH) levels, after a long-term intake of fluoxetine, another SSRI.

Indeed, many events or conditions related to male infertility are in turn associated with the oxidative stress (OS).[54] The oxidative damage can occur in several classes of molecules and the nucleus, mitochondrial membranes, RNA and DNA are potential targets of OS[59] triggered due to an imbalance between reactive oxygen species (ROS) levels and the natural anti-oxidant system.

The testicular tissue is very susceptible to oxidation, because of the high polyunsaturated fatty acid content in the germ line cells and sperm membranes.[60,61] This can trigger lipid peroxidation, culminating in cell membrane damage.[60–62] In addition, the OS imbalance can affect the plasmatic membrane of the spermatozoa modifying the fluidity and increasing the damage over the DNA.[63] Therefore, lipid peroxidation produces the MDA that can affect the sperm cell membrane at the lipidic structure generating alterations in its fluidity and permeability.[60] Consequently, alterations in acrosome reaction and at membrane fluidity can negatively impact the fertilization process.[63,64]

In the current study, the data regarding the sperm lipid peroxidation corroborate those about acrosome integrity, since all animals exposed to CMS and/or treated with escitalopram showed high levels of lipid peroxidation leading probably to a decrease in the number of sperm with intact acrosome, as also observed. Indeed, the high ROS levels promote damage in spermatozoa because they are unable to self-repair due to lack of cytoplasmatic enzyme in their repair systems.[62] On the other hand, dead sperm can present a false negative acrosome reaction,[65] and so, the data regarding the alterations of acrosome integrity that included live and dead sperm, which were analyzed through the PNA method, could overestimate the damage over acrosome membrane, caused by stress and/or escitalopram. However, the acrosome integrity is little affected by liquid storage,[66] and the PNA method maintains the specificity regarding the acrosome membrane even after fixation procedures.[67] Besides that, here, animals of all groups were submitted to the same protocol and experimental conditions; thus, we used the sham control group (SC) as a data baseline comparing the results from each group. Therefore, the negative effects of escitalopram therapy and the stress over the acrosome integrity presented here should be considered.

In the present research, we evaluated the level of lipid peroxidation using BODIPY probe in sperm and measuring MDA levels in testicular and epididymal tissues. In relation to sperm lipid peroxidation, there were elevated levels of MDA at the testicular tissue of animals exposed to stress. Indeed, the testicular damage caused by some SSRIs is associated with increased MDA and decreased glutathione levels.[14,58] Besides the testicular damage by OS, we should also consider the epidydimal oxidative injury, since the progressive motility and maturation of sperm occur during their transit through this organ. In rats, the epididymis is anatomically divided: (i) initial segment; (ii) caput; (iii) corpus, and (iv) cauda. Each epididymal part shows a different regulation in the expression of genes and proteins secretion.[68,69] In the present study, changes were observed in the epididymal portions of the experimental groups. The animals exposed to CMS, for example, showed an increased MDA level in caput+corpus and cauda regions, while those exposed to stress and/or treated with escitalopram also presented an increased concentration of MDA, but only in the cauda region. These variations found may reflect the structural and functional specificity of each epididymal segment, resulting in different responses to the treatment with escitalopram and/or exposure to the stress protocol.[68,69] Furthermore, these changes can be related to the alterations observed in sperm parameters presented here.

Also, the increase of the lipid peroxidation in sperm and epididymis observed in rats after the stressors period, with or without escitalopram treatment, corroborates the damage on qualitative spermatic parameters caused by the increased levels of ROS.

In the results presented here, the stressed and escitalopram-treated rats showed alterations in the quantitative spermatic parameters. The DSP and step 19 spermatid number were decreased in escitalopram and/or stressed rats. As mentioned previously, a long-term use of SSRIs drugs can reduce the male fertility. Thus, there was an increase in the transit time at the epididymal caudal portion in escitalopram-treated rats (E and ES groups). As a result, considering that sperms are stored in the caudal portion of the epididymis for a later ejaculation, any epididymal damage causing an increase in transit time could delay the maturation of these gametes and, consequently, compromise the sperm quality.[70] In addition, in some species of mammals, the sperms from testis are functionally immature since they are not capable of progressively swimming and also interacting with the cumulus-oocyte complex. In fact, these characteristics are developed during the transit of these cells through the epididymis.[57] According to Jimenez-Trejo et al. (2007),[47] the caput portion of the epididymis, in rats, has a local serotonergic system that controls the expression of enzymes for the biosynthesis of serotonin (5-Hydroxytruptamine – 5HT), besides some receptors for SSRI that are involved in muscular contractions in the cauda portion. This indicates that serotonergic transmission participates of the muscular contraction of the epididymal cauda during the sperm transit period, which is a fundamental event for the fertility.[71] In fact, escitalopram is used to treat premature ejaculation, so, the impact of changes in epididymal transit observed here, related to the escitalopram treatment, deserves further investigation.

During spermiogenesis, most of the histones present in sperm chromatin are exchanged for protamines, and this protamination process allows a greater condensation of sperm DNA, making it less susceptible to harmful agents.[72] According to Karimipour et al. (2020),[73] in mice, the maternal exposure to SSRI can increase the DNA fragmentation index in spermatozoon of the offspring. However, in the current research, the protocol applied (stressors and/or escitalopram therapy) did not altered the sperm DNA fragmentation; this may have happened due to the interval established between the end of the escitalopram treatment and the euthanasia, thus providing a natural recovery. In fact, some sperm injuries can be reversible after the end of certain medication therapies.[54] On the other hand, concerning the sperm chromatin integrity and maturity, there was a decrease in its compaction in

rats after the period of the stress protocol, with or without escitalopram treatment, as shown through the toluidine blue method; in this case, the sperms DNA that presents low compaction and protamination have free phosphate groups that in turn have affinity of this dye. So, the toluidine blue staining is an effective marker for a direct detection of protamine-deficient sperm, with alterations in physiological compaction of DNA.[72,74]

The epigenome present in sperm cells can be easily affected by environmental alterations, and this can have a negative impact on the paternal transgenerational epigenetic inheritance.[75] The paternal DNA component has several epigenetics regulators that can affect embryonic development[76]; thus, studies on sperm compaction alterations may constitute an important tool for understanding issues related to infertility and transgenerational inheritance. This deserves further investigation.

In the present study, it was also analyzed the impact of stress on male reproductive systems. The cellular and molecular mechanisms that are correlated to the stress induced-depression are still unclear.[77] However, stress induces adrenal corticosteroid release,[78] and an increase in corticosterone levels can alter serotonin metabolism in the central and periphery nervous system.[79,80]

In addition, the stress can cause an impact on male reproduction altering the regulation of the sympathetic-adrenal system and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis.[81] In fact, exposure of rats to chronic stress can negatively impact the testicular structure and function; reduction in plasmatic testosterone levels; reduction of sperm qualitative parameters (motility and morphology); reduction in antioxidants enzymes and increase in OS.[14] Chronic stress increases glucocorticoids levels activating the HPA axis that in turn suppresses hypothalamic-pituitary-gonadal function.[57] According to Gilbeau and Smith (1985),[82] in the chronic stress exposure there is a suppression of the release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) leading to a decrease in the secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. Furthermore, chronic stress exposure increases serum corticosterone levels, and this could inhibit the testosterone synthesis caused by Leydig cells apoptosis and an impairment of the steroidogenesis in these cells.[83]

Finally, according to Zou and collaborators (2019),[57] the stress-induced spermatogenesis impairment would occur due to: (i) induction of cell cycle arrest in spermatogonia at G0/G1 phase; (ii) apoptosis in testicular cells, mainly in spermatids. Indeed, alterations of the DSP and sperm qualitative parameters were observed in the stressed animals (S and ES) such as significant reduction of the absolute and relative epididymal sperm counts (step 19) in the caput/corpus portion comparatively to the control group (SC).

Escitalopram treatment can occur during the adolescence; however, its effects on quantitative and qualitative sperm parameters and the consequences on the fertility and offspring viability are still uncertain. Thus, the harmful effects of escitalopram therapy on the fertility must be considered; especially in patients of reproductive age wishing to have children.

This is the first translational work investigating the effects of CMS-induced depression applied from peripuberty on the reproduction of adult rats, which were treated or not with escitalopram, an SSRI. Thus, the impact of escitalopram therapy from this age range in stressed and no stressed rats was also carried out since there is little information regarding the late reproductive consequences of SSRI treatments, especially with escitalopram, and the neuroendocrine mechanisms that modulate the main reproductive events.

Thus, based on the results obtained, we concluded that both the therapy with escitalopram and the chronic mild stress triggered from peripuberty can lead to an impairment of sperm qualitative and quantitative parameters in adult rats. So, even considering the interspecies differences, an alert should be made regarding the sperm quality of adolescents and young adults and its possible impact on reproduction. This matter should be carefully addressed.

In addition to the study of the sperm parameters here scrutinized, we believe that researches regarding the impairment of the fertility and reproductive capacity in major depressive disorder, associated or not with the antidepressant therapies, should also be considered for better understanding the impact of the current results on the future fertility. This subject is the next goal of our group using the same protocol presented here.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LWF carried out all the experiments, statistical analysis of results and wrote this manuscript. TBM, JNS, and MN helped with the execution of the experiments. SUO helped with the sperm quantitative and sperm morphology analysis, with the experimental design and review of the manuscript. SMM created the experimental design, supervised all the experiments, helped with the analysis of results, and reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express gratitude to the Laboratory of Human Reproduction - UNIFESP for the support with the phase contrast microscope to perform the mitochondrial activity analyses. The authors would like to express gratitude to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and to Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant numbers: 2019/11220-8 and 2019/08785-3) for the financial support and scholarships.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest that could compromise the current research and publication of this article.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in Repositorio Institucional da UNIFESP at https://repositorio.unifesp.br/handle/11600/61133. cd_value_code=text

ORCID

Leonardo Wensing Fischer https://orcid.org/0000-0001-8702-1565
Sandra Maria Miraglia https://orcid.org/0000-0001-5649-4749

REFERENCES

1. Kessler RC, Berglund P, Demler O. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*. 2003;289:3095-3105. 10.1001/jama.289.23.3095
2. World Health Organization (WHO). Depression. World Health Organization; 2021. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression
3. Wiegner L, Hange D, Björkelund C, Ahlborg Jr G. Prevalence of perceived stress and associations to symptoms of exhaustion, depression and anxiety in a working age population seeking primary care-an observational study. *BMC Family Practice*. 2015;16:1-8. 10.1186/s12875-015-0252-7
4. Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 1999;256:837-841. https://doi.org/10.1176/ajp.156.6.837
5. Chen F, Zheng D, Liu J, Gong Y, Guan Z, Lou D. Depression and anxiety among adolescents during COVID-19: a cross-sectional study. *Brain Behav Immun*. 2020;88:36-38. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.061
6. Erdemir F, Atilgan D, Firat F, Markoc F, Parlaktas BS, Sogut E. The effect of sertaline, paroxetine, fluoxetine and escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rat. *Int Brazilian J Urology*. 2014;40:1000-1088. https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.01.15
7. Emslie GJ, Ventura D, Korotzer A, Tourkodimitris S. Escitalopram in the treatment of adolescent depression: a randomized placebo-controlled multisite trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2009;48:721-729. https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e3181a2b304
8. Csoka AB, Shipko S. Persistent sexual side effects after SSRI discontinuation. *Psychother Psychosom*. 2006;75:187-188. https://doi.org/10.1159/000091777
9. Safarinejad MR. Sperm DNA damage and semen quality impairment after treatment with selective serotonin reuptake inhibitors detected using semen analysis and sperm chromatin structure assay. *J Urol*. 2008;180:2124-2128.
10. Tanrikut C, Feldman AS, Altemus M, Paduch DA, Schlegel PN. Adverse effect of paroxetine on sperm. *Fertil Steril*. 2010;94:1021-1026. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.039
11. Bijlsma EY, Chan JSW, Olivier B, et al. Sexual side effects of serotonergic antidepressants: mediated by inhibition of serotonin on central dopamine release? *Pharmacol Biochem Behav*. 2013;121:88-101. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.004
12. Sanchez C, Gruca P, Papp M. R-citalopram counteracts the antidepressant-like effect of escitalopram in a rat chronic mild stress model. *Behav Pharmacol*. 2003;14:465-470. https://doi.org/10.1097/01.fbp.0000087733.21047.60
13. Elnazer HY, Baldwin DS. Treatment with citalopram, but not with agomelatine, adversely affects sperm parameters: a case report and translational review. *Acta Neuropsychiatrica*. 2014;26:125-129. https://doi.org/10.1017/neu.2013.60
14. Sakr HF, Abbas AM, Elsamanoudy AZ, Ghoneim FM. Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66:515-527. PMID: 26348076.
15. Roboon J, Nudmamud-Thanoi S, Thanoi S. Recovery effect of pregerminated brown rice on the alteration of sperm quality, testicular structure and androgen receptor expression in rat model of depression. *Andrologia*. 2017;49:1-10. https://doi.org/10.1111/and.12596
16. Henningsen K, Andreasen JT, Bouzinova EV, et al. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonic-like reponses. *Behav Brain Res*. 2009;198:136-141. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.039
17. Yang SZ, Wang YH, Tung CS, Ko CY, Liu YP. Effects of escitalopram on a rat model of persistent stress-altered hedonic activities: towards a new understanding of stress and depression. *Chin J Physiol*. 2015;58:404-411. https://doi.org/10.4077/CJP.2015.BAD335
18. Huckins C. Duration of spermatogenesis in pre and postpuberal Wistar rats. *Anat Rec*. 1965;151:364.
19. Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1981;5:247-251. https://doi.org/10.1016/0149-7634(81)90005-1
20. Gamaro GD, Manoli LP, Torres ILS, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int*. 2003;42:107-114. https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00080-3
21. Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingstrom A, Papp M, Wiborg O. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:2395-2404. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301041
22. Hamani C, Machado DC, Hipolide DC, et al. Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. *Biol Psychiatry*. 2012;71:30-35. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.08.025
23. Grippo AJ, Beltz TG, Johnson AK. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav*. 2003;78:703-710. https://doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00050-7
24. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature*. 1977;266:730-732. https://doi.org/10.1038/266730a0
25. Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:2007-2017. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300532
26. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26:57-63. PMID: 5530651.
27. Miraglia SM, Hayashi H. Histomorphometry of immature rat testis after heating. *J Morphol*. 1993;217:65-74. https://doi.org/10.1002/jmor.1052170106
28. Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*. 1978;54:103-107. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103
29. Blazak WF, Treinen KA, Juniewicz PE. Application of testicular sperm head counts in the assessment of male reproductive toxicity. *Methods Toxicol*. 1993;3:86-94. https://doi.org/10.2131/jts.26.51
30. Shorr E. A new technic for staining vaginal smears: III, a single differential stain. *Science*. 1941;94:545-546. https://doi.org/10.1126/science.94.2449.545-a 1941
31. Filler R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: Chapin RE, Heindel JJ, eds. *Methods in Toxicology – Part A: Male Reproductive Toxicology*. Academic Press; 1993:335-343.
32. Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl*. 1987;10:809-828. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00385.x
33. Varisli O, Uguz C, Agca C, Agca Y. Effect of chilling on the motility and acrosomal integrity of rat sperm in the presence of various extenders. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48(5):499-505. PMCID: PMC2755019.
34. Björndahl L, Söderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Pourian MR, Kvist U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *J Androl*. 2004;25:671-678. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02839.x
35. Asadi MH, Zafari F, Sarveazad A, et al. Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. *Nephourol Mon*. 2013;6:e12125. https://doi.org/10.5812/numonthly.12125
36. Vendramini V, Robaire B, Miraglia SM. Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and

early developmental arrest. *Hum Reprod*. 2012;27:2457-2466. https://doi.org/10.1093/humrep/des159

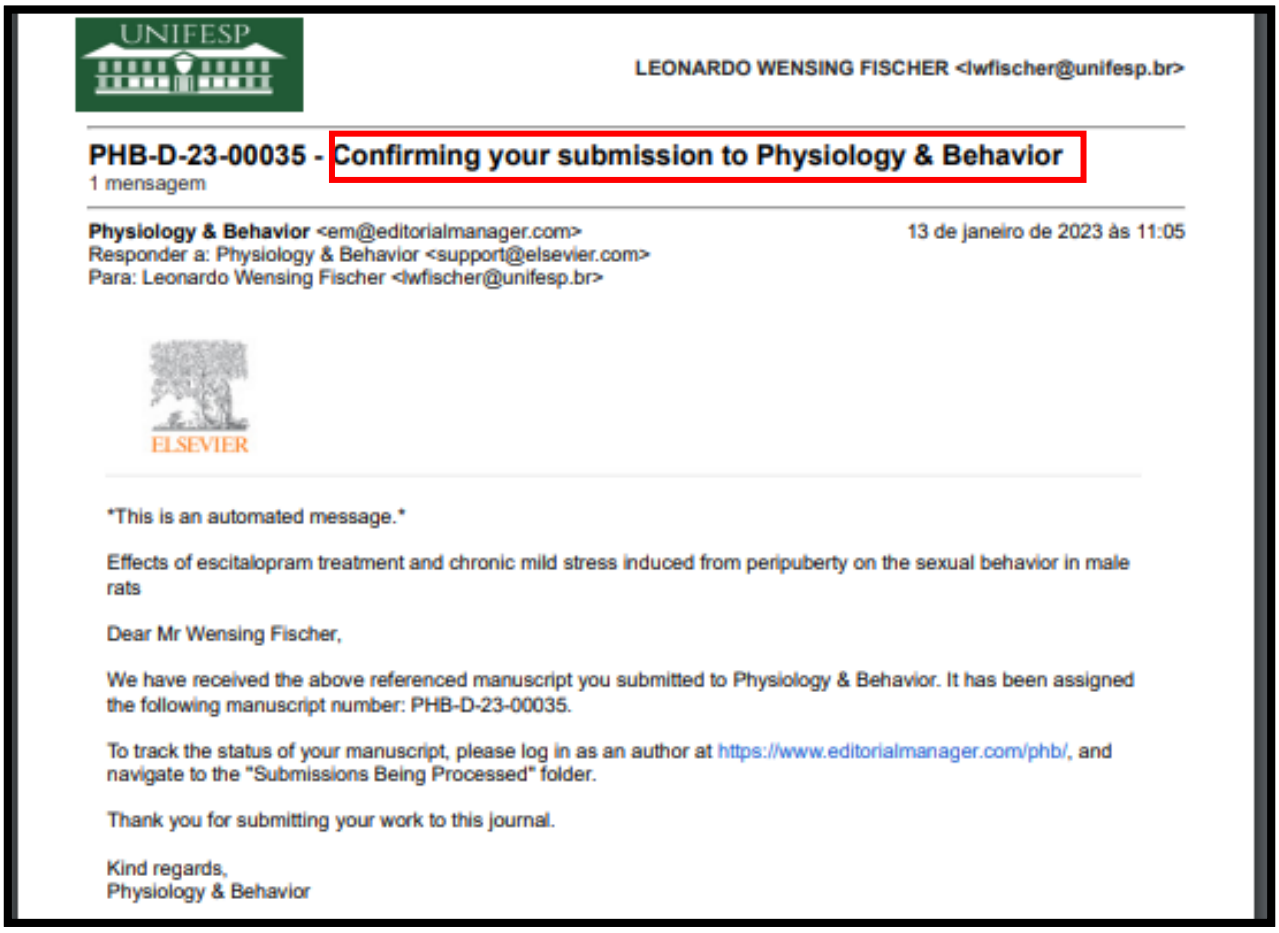
37. Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet' assay. *Radiation Res*. 1990;122:86-94. PMID: 2320728.
38. Beletti ME, Mello MLS. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabitt sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*. 2004;62:398-402. http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/317808/1/Beletti_MarceloEmilio_M.pdf
39. Rezakhaniha B, Heidari R, Abbasi M. Can Melissa officinalis improve chromatin structure and sperm parameters in a rat model of varicocele? *Andrologia*. 2018;50(8):e13058. https://doi.org/10.1111/and.13058
40. Domínguez-Rebolledo Á, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, et al. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2010;45:360-368. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01578.x
41. Abd-Allah AR, Helal GK, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Bakheet SA. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine. *Oxid Med Cell Long*. 2009;2:73-81. https://doi.org/10.4161/oxim.2.2.8177
42. Mogilevsky JA, Faigon MR, Rubio MC, Scacchi P, Szwarcfarb B. Sexual differences in the effect of serotonin on LH secretion in rats. *Acta Endocrinol*. 1985;109:320-325. https://doi.org/10.1530/acta.0.1090320
43. Shishkina GT, Dygalo NN. Role of the serotoninergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comp Biochem Physiol*. 2000;125:45-51. https://doi.org/10.1016/s0742-8413(99)00092-4
44. Fujinoki M. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*. 2011;142:255-266. https://doi.org/10.1530/REP-11-0074
45. Hay DW, Wadsworth RM. The contractile effects of 5-hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens. *Br J Pharmacol*. 1982;77:605-613. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1982.tb09338.x
46. Collin O, Damber JE, Bergh A. 5-Hydroxytryptamine--a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *J Reprod Fertil*. 1996;106:17-22. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060017
47. Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Queiroz DB, et al. Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. *J Androl*. 2007;28:136-149. https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000653
48. Parisi E, De Prisco P, Capasso A, Del Prete M. Serotonin and sperm motility. *Cell Biol Int Rep*. 1984;8:95. https://doi.org/10.1016/0309-1651(84)90075-4
49. Gonzales GF, García-Hjarles M, Velasquez G. Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: their relationship to seminal quality. *Andrologia*. 1992;24:95-100. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1992.tb02617.x
50. Stewart KT, Rosenwasser AM, Hauser H, Volpicelli JR, Adler NT. Circadian rhythmicity and behavioral depression: I. Effects of stress. *Physiol Behav*. 1990;48:149-155. https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90276-a
51. Gronli J, Murison R, Fiske E, et al. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Pshysiol Behav*. 2005;84:571-577. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.02.007
52. Martí O, Martí J, Armario A. Effect of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav*. 1994;55:747-753. https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90055-8
53. Castagne V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protoc Neurosci*. 2011;8. https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0508s49
54. Galal AAA, Alam RTM, Abd El-Aziz RM. Adverse effects of long-term administration of fluvoxamine on haematology, blood biochemistry and fertility in male albino rats: a possible effect of cessation. *Andrologia*. 2016;48(9):914-922. https://doi.org/10.1111/and.12532
55. Kumar K, Sharma LV, Tiwari P, et al. The spermicidal and antitrichomonas activities of SSRI antidepressants. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:2509-2512. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.01.078
56. Bhongade MB, Prasad S, Jiloha RC, Ray PC, Mohapatra S, Koner BC. Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. *Andrologia*. 2015;47:336-342. https://doi.org/10.1111/and.12268
57. Zou P, Wang Y, Liu C, et al. Mechanisms of stress-induced spermatogenesis impairment in male rats following unpredictable chronic mild stress (uCMS). *Int J Mol Sci*. 2019;20:1-17. https://doi.org/10.3390/ijms20184470
58. Bataineh HN, Daradka T. Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adult male rats. *Neuro Endocrinol Lett*. 2007;28:321-325. PMID: 17627270.
59. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl*. 2008;29:488-498. https://doi.org/10.2164/jandrol.108.005132
60. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7:659-668. https://doi.org/10.1071/rd9950659
61. Griveau JF, Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. 1997;20:61-69. https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1997.00044.x
62. Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014;32:1-17. https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1
63. Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G, Panfili E. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*. 1998;59:753-758. https://doi.org/10.1095/biolreprod59.4.753
64. Ko EY, Sabanegh ES, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril*. 2014;102:1518-1527. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.020
65. Yániz JL, Palacín I, Silvestre MA, Hidalgo CO, Tamargo C, Santolaria P. Ability of the ISAS3Fun method to detect sperm acrosome integrity and its potential to discriminate between high and low field fertility bulls. *Biology (Basel)*. 2021;10(11):1135. https://doi.org/10.3390/biology10111135
66. Varisli O, Scott H, Agca C, Agca Y. The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*. 2013;67(2):109-116. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.009
67. Lybaert P, Danguy A, Leleux F, Meuris S, Lebrun P. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol Histopathol*. 2009;24(8):999-1007. 10.14670/HH-24.999
68. Robaire B, Henderson NA. Actions of 5alpha-reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;16:190-195. https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.044
69. Domeniconi RF, Souza ACF, Xu B, Washington AM, Hinton T. Is the epididymis a series of organs placed side by side? *Biol Reprod*. 2016;95:1-8. https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.138768
70. Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35:1-10. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.03.005
71. Mueller A, Kiguti LRA, Silva EJR, Pupo A. Contractile effects of serotonin (5-HT) in the rat cauda epididymis: expression and func-

tional characterization of 5-HT receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;369:98-106. https://doi.org/10.1124/jpet.118.254110

72. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod*. 1993;49:1083-1088. https://doi.org/10.1095/biolreprod49.5.1083
73. Karimipour M, Ahmadi A, Zirak-Javanmard M, Jafari A, Mohebi M, Hosseinalipour E. The effects of exposure to fluoxetine during lactation on testicular tissue and sperm parameters in mice offspring. *Vet Res Forum*. 2020;11:35-42. 10.30466/vrf.2018.82090.2082
74. Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod*. 1995;52(5):1149-1155. https://doi.org/10.1095/biolreprod52.5.1149
75. Skinner MK, Guerrero-Bosagna C. Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics*. 2009;1:111-117. https://doi.org/10.2217/epi.09.11
76. Le Blevec E, Muronová J, Ray RF, Arnoult C. Paternal epigenetics: mammalian sperm provide much more than DNA at fertilization. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;518:110964. https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110964
77. Qiu J, Sy H, Zhang CH, Shi GQ, Wang S, Xiang T. The effect of Chaihu-Shugan-San and its components on the expression of ERK5 in the hippocampus of depressed rats. *J Ethnopharmacol*. 2014;152:320-326. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.004
78. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007;87:873-904. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006
79. Paris JM, Lorens SA, Van de Kar LD, Urban JH, Richardson-Morton KD, Bethea CL. A comparison of acute stress paradigms: hormonal responses and hypothalamic serotonin. *Physiol Behav*. 1987;39:33-43. https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90341-6
80. Malysko J, Urano T, Yan D, et al. Foot shock-induced changes in blood and brain serotonin and related substances in rats. *Jpn J Physiol*. 1994;44:35-47. https://doi.org/10.2170/jjphysiol.44.35
81. Flak JN, Myers B, Solomon MB, McKlveen JM, Krause EG, Herman JP. Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress. *Eur J Neurosci*. 2014;39:1903-1911. https://doi.org/10.1111/ejn.12587
82. Gilbeau PM, Smith CG. Naloxone reversal of stress-induced reproductive effects in the male rhesus monkey. *Neuropeptides*. 1985;5:335-338. https://doi.org/10.1016/0143-4179(85)90021-6
83. Gao HB, Tong MH, Hu YQ, et al. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;199:153-163. https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00290-3

How to cite this article: Fischer LW, Mendes TB, Simas JN, Nunes M, de Oliva SU, Miraglia SM. Effects of escitalopram treatment and chronic mild stress induced from peripuberty on spermatic parameters of adult rats. *Andrology*. 2023;11:177–195. https://doi.org/10.1111/andr.13333

ANEXO 5 – Segundo manuscrito relacionado à tese submetido à publicação, em revista indexada (o aluno como 1º autor e o orientador como último)



UNIFESP

LEONARDO WENSING FISCHER <lwfischer@unifesp.br>

PHB-D-23-00035 - Confirming your submission to Physiology & Behavior

1 mensagem

Physiology & Behavior <em@editorialmanager.com> 13 de janeiro de 2023 às 11:05
Responder a: Physiology & Behavior <support@elsevier.com>
Para: Leonardo Wensing Fischer <lwfischer@unifesp.br>

ELSEVIER

This is an automated message.

Effects of escitalopram treatment and chronic mild stress induced from peripuberty on the sexual behavior in male rats

Dear Mr Wensing Fischer,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Physiology & Behavior. It has been assigned the following manuscript number: PHB-D-23-00035.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at https://www.editorialmanager.com/phb/, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Physiology & Behavior

ANEXO 6 – Prêmio José Carlos Prates – Melhor apresentação oral na categoria Doutorado no XXI Congresso do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da UNIFESP/EPM (Referente à Tese de doutorado do aluno)

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

O XXI Congresso do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da UNIFESP/EPM concede o

Prêmio José Carlos Prates

a **Leonardo Wensing Fischer**

pela Apresentação Oral de **"Efeitos tardios do estresse crônico moderado, induzido a partir da peripuberdade, sobre os parâmetros reprodutivos de ratos adultos, tratados ou não com o escitalopram"** na categoria Doutorado.

São Paulo, 4 de dezembro de 2021.

Prof.ª Dr.ª Isabel Cristina Céspedes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional

ANEXO 7 – Manuscritos publicados dentro da área de atuação do orientador em revista indexada (o aluno como coautor e a orientadora como última)

Received: 21 October 2021 | Revised: 30 March 2022 | Accepted: 5 April 2022

DOI: 10.1111/andr.13183

ANDROLOGY WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Resveratrol reverses male reproductive damage in rats exposed to nicotine during the intrauterine phase and breastfeeding

Camila Monteiro Francisco | Leonardo Wensing Fischer | Vanessa Vendramini | Samara Urban de Oliva | Camila Cicconi Paccola | Sandra Maria Miraglia

Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence
Sandra Maria Miraglia, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
Email: miraglia.sm@gmail.com

Abstract

Background: Nicotine leads to reproductive changes culminating in male infertility and subfertility. Resveratrol, a polyphenol, is a biological modulator. Sirtuin 1 (SIRT1) protein can positively act on male reproduction, and its expression can be affected by nicotine and modulated by resveratrol.

Objectives: The capability of resveratrol to reverse the reproductive damage in adult male offspring, which was nicotine-exposed during the intrauterine phase and breastfeeding, was investigated.

Materials and methods: Four groups were established with male offspring born from nicotine-exposed and non-exposed rat dams during pregnancy and lactation. Forty-eight male Wistar rats were distributed into four groups: sham control (SC), resveratrol (R), nicotine (N), and nicotine + resveratrol (NR). Rat dams of the N and NR offspring were exposed to nicotine (2 mg/kg/day) during pregnancy and lactation using a subcutaneously implanted minipump. The offspring of the R and NR groups received resveratrol (300 mg/kg of body weight, gavage) for 63 days from puberty. At 114 days of age, the male rats were euthanized.

Results: Nicotine did not alter the body weight, biometry of reproductive organs, or quantitative sperm parameters of adult offspring but caused an evident worsening of all sperm qualitative parameters studied. Daily treatment with resveratrol from puberty up to adulthood improved all qualitative sperm parameters significantly, leading some of them close to the control values. Resveratrol also improved the morphological integrity and expression of SIRT1 in the seminiferous epithelium of nicotine-exposed offspring.

Conclusion and Discussion: Resveratrol reversed the male reproductive damage caused by nicotine. Nicotine crosses the blood-placental membrane and is present in the breast milk of mothers who smoke. Resveratrol restored the altered reproductive parameters in the male adult offspring that were nicotine-exposed during intrauterine life and breastfeeding. The epigenetic modulating action of resveratrol can be involved in this nicotine damage reversion. Resveratrol may be a promising candidate to be investigated regarding the adjuvant strategies in the treatment of male infertility.

© 2022 American Society of Andrology and European Academy of Andrology.

Received: 6 December 2021 | Revised: 24 February 2022 | Accepted: 27 February 2022

DOI: 10.1111/and.14417

ORIGINAL ARTICLE

ANDROLOGIA WILEY

Resveratrol benefits on sperm DNA, chromatin structure and reproductive outcomes of varicocelized rats

Talita Biude Mendes | Joana Noguères Simas | Leonardo Wensing Fischer | Camila Cicconi Paccola | Samara Urban de Oliva | Vanessa Vendramini | Sandra Maria Miraglia

Laboratory of Reproduction and Developmental Biology (LaBReD), Department of Morphology and Genetics, Federal University of Sao Paulo, UNIFESP, Sao Paulo, Brazil

Correspondence
Sandra Maria Miraglia, Laboratory of Developmental Biology, Department of Morphology and Genetics, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740 – Ed Leitão da Cunha, 2° andar, Vila Clementino, CEP 04023-900, São Paulo/SP/Brasil.
Email: miraglia.sm@gmail.com

Funding information
This study was financed by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brazil* (CAPES) finance Code 001 and by Sao Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–FAPESP, grant number 2016/14546-3)

Abstract

In varicocele, the main cause of sperm DNA damage is oxidative stress (OS). Resveratrol, a polyphenol with antioxidant properties, can protect cells from injuries caused by OS. We investigated the benefits of resveratrol against reproductive damage caused by experimental varicocele induced from peripuberty. Eighty peripubertal male rats were distributed into 4 groups: sham–control (S), varicocele (V), resveratrol (R) and varicocele treated with resveratrol (VR). Varicocele was induced through the partial ligature of the left renal vein. Resveratrol was given in a daily dose of 300 mg/kg body weight (gavage). Sperm samples were collected at 100 days of age for vitality, DNA fragmentation and chromatin protamination evaluations. OS analyses were carried out. Rats from all groups were mated with healthy primiparous females for evaluation of reproductive capacity and embryonic quality. The V group showed reduction of sperm vitality, altered chromatin protamination and sperm DNA integrity and high levels of OS. The VR group showed an improvement of oxidative status, sperm vitality, DNA integrity and chromatin structure, and an enhancement in the gestational index and embryonic quality. Therefore, we showed in this experimental model that resveratrol is a promising nutraceutical adjuvant and should be deeply studied to mitigate subfertility in varicocele.

KEYWORDS
male reproduction, rat, resveratrol, spermatozoa, varicocele

1 | INTRODUCTION

Varicocele is the most common cause of infertility in the world with high incidence among adults and adolescents (Agarwal et al., 2012; Shefi & Turek, 2006). Epidemiological studies have shown that the onset of varicocele coincides with the onset of puberty (Akbay et al., 2000; Alsaikhan et al., 2016) and also it has a progressive deleterious effect on fertility (Çayan et al., 2017). In fact, due to the high prevalence of varicocele in adolescents, more attention should be directed to this population aiming an early therapy in order to avoid irreparable consequences on the fertility (Abbasi et al., 2007).

In varicocele, there is a reduction in the total antioxidant capacity together with an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) (Agarwal et al., 2012; Khosravanian et al., 2015) account for quantitative and qualitative sperm alterations (Agarwal et al., 2009; Blumer et al., 2012; Tavalaee et al., 2014). Changes in the sperm DNA integrity are directly related to low fertilization rates, embryonic developmental changes, failure in embryo implantation and increased rates of spontaneous abortion (Alvarez Sedó et al., 2017; Nasr-Esfahani et al., 2005).

Antioxidant therapies have been considered promising therapeutic alternatives for the treatment of male infertility (Gual-Frau

 © 2022 Wiley-VCH GmbH

Received: 6 March 2020 | Revised: 10 August 2020 | Accepted: 13 August 2020

DOI: 10.1111/andr.12891

ORIGINAL ARTICLE

ANDROLOGY WILEY

Resveratrol improves sperm DNA quality and reproductive capacity in type 1 diabetes

Joana N. Simas | Talita B. Mendes | Leonardo W. Fischer | Vanessa Vendramini | Sandra M. Miraglia

Laboratory of Developmental Biology, Department of Morphology and Genetics, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

Correspondence
Joana N. Simas and Sandra M. Miraglia, Department of Morphology and Genetics Federal University of Sao Paulo (UNIFESP) Rua Botucatu, 740. Leitão da Cunha building, 2nd floor, Sao Paulo SP Brazil. CEP: 04023-900.
Email: jns53@hotmail.com; miraglia.sm@gmail.com

Funding information
This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil—CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel- finance code 001).

Abstract

Background: In the coming decades, diabetes mellitus might affect 628 million individuals. Its final impact on male fertility and reproductive outcomes should be considered since the number of adolescents and young adults presenting diabetes is rising. Resveratrol (RES), a polyphenol, is a biological modulator with multitarget and multi-action characteristics.

Objectives: to evaluate if RES is effective against the male reproductive damage caused by type 1 diabetes (DM1), focusing on sperm DNA integrity and reproductive outcome.

Materials and methods: At 30 dpp (days postpartum), male rats were divided into 7 groups: Sham control (SC); RES vehicle (RV); RES (R); STZ-diabetic (D; induced at 30dpp with 65 mg/kg of streptozotocin); STZ-diabetic + insulin (DI); STZ-diabetic + RES (DR); STZ-diabetic + insulin +RES (DIR). DR, DIR, and R groups received 150mg RES/kg b.w./day by gavage (from 33 to 110dpp). DI and DIR received insulin (from day 5 after DM1 induction until 110dpp). Blood glucose was monitored in different time points. Animals were mated with healthy females. Euthanasia occurred at 110 dpp.

Results: DM1 increased lipid peroxidation (testis and epididymis) and sperm DNA fragmentation, alterations of chromatin structure, reduced mitochondrial mass and acrosome integrity, causing a decline in fertility and pregnancy rates. RES improved the parameters.

Discussion: RES, as an adjuvant, activates specific reactions against hyperglycemia, the main trigger of most complications of diabetes, by controlling oxidative stress, probably as a result of SIRT1 activation. We present here more evidences showing its valuable role in diminishing diabetes seriousness to male reproduction, not only to spermatogenesis in the first instance, but also to sperm overall quality and fertility outcomes, regardless of insulin treatment.

Abbreviations: AMPK, adenosine monophosphate–activated kinase; AO, acridine orange dye; BGM, blood glucose measurement; CMA3, Chromomycin A3 Assay; D group, streptozotocin-diabetic rats; DI group, streptozotocin-diabetic rats treated with insulin; DIR group, streptozotocin-diabetic rats treated with insulin and resveratrol; DM, diabetes mellitus; DNA, deoxyriboncleic acid; Dpp, days postpartum; DR group, streptozotocin-diabetic rats treated with resveratrol; FSH, follicle-stimulating hormone; HPG axis, hypothalamic-pituitary-gonadal axis; LH, luteinizing hormone; LP, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde; MTG, MitoTracker™ Green FM; mtDNA, mitochondrial DNA; OS, oxidative stress; PNA, lectin from *Arachis hypogaea*; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; R group, resveratrol treated rats; RES, resveratrol; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; RV group, resveratrol vehicle-treated rats; SCSA, Sperm Chromatin Structure Assay; SDS, sodium dodecyl sulfate; SC group, sham control rats; SIRT1, Sirtuin 1; STZ, streptozotocin; T1DM, type 1 diabetes mellitus; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

© 2020 American Society of Andrology and European Academy of Andrology

ANEXO 8 – Manuscrito publicado dentro da área onde o aluno e a orientadora encontram-se como coautores

Brazilian Journal of health Review

Efeitos da carbamazepina sobre o epidídimo e possíveis impactos sobre a maturação espermática

Epididymal effects of carbamazepine and potential impacts on sperm maturation

DOI:10.34119/bjhrv3n3-017

Recebimento dos originais:01/04/2020
Aceitação para publicação: 06/05/2020

Marina Nunes
Mestre em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/ EPM
Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM
Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2° andar – Vila Clementino, São Paulo, SP
E-mail: marinunes.biomed@gmail.com

Leonardo Wensing Fischer
Especialista em Reprodução Humana Assistida pelo Instituto Sapientiae
Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM
Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2° andar – Vila Clementino, São Paulo, SP
E-mail: leof2192@gmail.com

Rafaela Doretto do Valle Freitas
Discente do curso de Biomedicina – Centro Universitário São Camilo
Aluna de Iniciação Científica – UNIFESP/ EPM
Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM
Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2° andar – Vila Clementino, São Paulo, SP
E-mail: rafaela.doretto@hotmail.com

Sandra Maria Miraglia
Doutora em Ciências pela Escola Paulista de Medicina (EPM) e Livre-docente em Embriologia pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM
Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM
Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2° andar – Vila Clementino, São Paulo, SP
E-mail: miraglia.sm@gmail.com

Brazilian Journal of health Review

Samara Urban de Oliva
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM
Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM
Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2° andar – Vila Clementino, São Paulo, SP
E-mail: samaraurban@gmail.com; oliva.samara@unifesp.br

ANEXO 9 – Certificado de participação como membro da Comissão de Mídias Sociais do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

CERTIFICADO

Certificamos que **Leonardo Wensing Fischer** integrou a **Comissão de Mídias Sociais** do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), no período de agosto/2018 a abril/2022, totalizando 05 créditos.

São Paulo, 30 de abril de 2022.

Luís Otávio Carvalho de Moraes

Prof. Dr. Luis Otávio Carvalho de Moraes
Coordenador da Comissão de Mídias Sociais

Prof.ª Dr.ª Isabel Cristina Céspedes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional

Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional
Escola Paulista de Medicina
Universidade Federal de São Paulo