ANDREA LUCIA NATALI OLIANI

**Efeitos da administração perinatal do Citrato de Clomifeno na função reprodutiva
de ratos Wistar: comportamento sexual, avaliação hormonal e plasmática**

**São Paulo
2012**

ANDREA LUCIA NATALI OLIANI

Efeitos da administração perinatal do Citrato de Clomifeno na função reprodutiva de ratos Wistar: comportamento sexual, avaliação hormonal e plasmática.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

De acordo: Cláudio A. de Oliveira

Orientador

São Paulo
2012

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2657
FMVZ

Oliani, Andrea Lucia Natali
Efeitos da administração perinatal do Citrato de Clomifeno na função reprodutiva de
ratos Wistar: comportamento sexual, avaliação hormonal e plasmática / Andrea Lucia
Natali Oliani. -- 2012.
88 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Comportamento sexual. 2. Diferenciação sexual. 3. Aromatase. 4. Estrógeno.
5. Citrato de Clomifeno. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Efeitos na fertilidade e no comportamento sexual de ratas fêmeas induzidos pelo tratamento neonatal com um inibidor da aromatase, o citrato de clomifeno", protocolado sob o nº1837/2009, utilizando 60 (sessenta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/12/2009.

We certify that the Research "Effects on fertility and sexual behavior in female rats induced by neonatal treatment with an aromatase inhibitor, clomiphene citrate", protocol number 1837/2009, utilizing 60 (sixty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 12/09/2009.

São Paulo, 10 de dezembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIANI, Andrea Lucia Natali

Título: Efeitos da administração perinatal do Citrato de Clomifeno na função reprodutiva de ratos Wistar: comportamento sexual, avaliação hormonal e plasmática

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Reprodução Animal da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

**Ao meu marido, Leonardo Rosito Oliani,
com amor, admiração e gratidão,
por sua compreensão, carinho,
presença e incansável apoio
ao longo do período de elaboração
e confecção desse trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À colega Elizabeth Teodorov, que sempre me auxiliou e não mediu esforços nas orientações e nas mais ignorantes dúvidas que surgiam diariamente ao longo dos experimentos no laboratório.

Aos meus queridos amigos do biotério da FMVZ-USP e do laboratório de patologia, pelo cuidado e ajuda que sempre dispensaram gentilmente à mim quando precisei.

Aos colegas do laboratório de dosagem hormonal que constantemente doaram parte de seus conhecimentos e espaço para que meus experimentos fossem realizados, em especial à Dra. Lilian Mara Kirsch Dias e à Dr. Priscila Viau. "Quem tem amigo, tem tudo", obrigada amigas por toda ajuda técnica, científica e PESSOAL.

Aos meus alunos de graduação e de iniciação científica que me mostraram a importância do trabalho em equipe e do aprendizado no dia a dia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a CAPES e ao CNPQ por financiarem parte dos projetos experimentais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Claudio Alvarenga, que desde o primeiro contato que tivemos criamos uma grande empatia e confiança mútua, sempre me orientando da melhor maneira possível e permitindo que meus horários fossem cumpridos dentro das minhas possibilidades, depositando uma enorme confiança na minha capacidade intelectual e demonstrando, acima de tudo, muito carisma, compreensão, sabedoria e amizade. Em todos os momentos, sempre estive amparada por um grande mestre e amigo. Obrigada Claudinho!

À Prof. Dra. Maria Martha Bernardi, primeiro de tudo, por ser essa pessoa iluminada que com sabedoria de mestre e paciência de monge esteve ao meu lado em todos os momentos de dúvidas. Pela amizade e competência em me orientar e auxiliar nos resultados dos experimentos com os animais, ensinando a ética no trabalho com animais de laboratório. Por ser essa pessoa maravilhosa que acreditou na minha capacidade e está sempre me incentivando na luta do dia-a-dia, além de todo apoio e companheirismo sempre presente na UNIP.

À Prof. Dra. Jeanete Lopes, minha grande e eterna amiga, que sempre esteve ao meu lado. Sendo ou não essa a sua missão, quero dizer, querida amiga, que você é especial em tudo o que faz e sua amizade pra mim é muito importante. Obrigada por dedicar parte do seu tempo à minha pessoa e me orientar brilhantemente nas dúvidas básicas que tenho.

Ao Prof. Dr. Luciano Felício, chefe do Departamento de Patologia da FMVZ-USP pela confiança e apoio em permitir a utilização das dependências de seu laboratório.

À Prof. Dra. Marta Luppi, chefe e amiga, que me deu a grande oportunidade de trabalhar no que eu amo fazer e que me ensinou muito sobre a ética e o ofício de ser professora universitária.

AGRADECIMENTOS ETERNOS

À minha família adquirida, que me tem como filha e esteve sempre presente nos momentos de conquistas e angústias, acompanhando meu caminho desde o mestrado e possibilitando momentos de paz para que eu pudesse me concentrar nos meus estudos e finalmente realizar mais essa conquista pessoal.

À minha família amada, tão especial que antes de finalizar a primeira frase meu coração já bate forte. Família linda, querida demais! Meu irmão Neto, amigo e companheiro, comemorando conquistas e apoiando na luta diária da vida, sempre com muito carinho e bom humor. Minha irmã Nana, o que dizer dessa pessoa maravilhosa, que abdicou tanto de sua vida para que a minha fosse mais confortável, que me ajuda diariamente nas dificuldades e que curte comigo as conquistas como se fossem dela, de tão intensa, de tão querida, de tão iluminada, minha doce irmã. Meu pai, pessoa doce e amável, que carinhosamente me criou e sempre esteve ao meu lado, apoiando em todas as decisões pessoais e profissionais. Minha mãe, exemplo de mulher, de mãe, de amiga, de lutadora, de pessoa correta e ética, exemplo de ser humano. É infinito meu sentimento de gratidão e admiração, minha mãe querida, te amo te amo muito!!!

Ao meu marido, minha alma gêmea, luz da minha vida!! Léo, meu anjo, não existe um dia se quer que não agradeço à Deus por ter te colocado ao meu lado. Você me ensinou e ensina todos os dias a ser uma pessoa melhor, a ser alguém com fome de luta, a ser alguém justa e correta, me ensina a ser mãe e mulher, me ensina a ser amável, a ser ética, a ser companheira, a ser esposa! Obrigada meu amor, por esse enorme carinho que tem por mim e por estar sempre ao meu lado, me apoiando e me admirando!

À minha filha Bruna, linda!! Que enche de alegria meu coração, todos os dias, desde sementinha... Bruninha minha doce formiguinha, mamãe te ama muito!

EPÍGRAFE

“Que ingenuidade, que pobreza de espírito, dizer que os animais são máquinas privadas de conhecimento e sentimento, que procedem sempre da mesma maneira, que nada aprendem, nada aperfeiçoam! Será porque falo que julgas que tenho sentimento, memória, ideias? Pois bem, calo-me. Vês-me entrar em casa aflito, procurar um papel com inquietude, abrir a escrivaninha, onde me lembro tê-lo guardado, encontrá-lo, lê-lo com alegria. Percebes que experimentei os sentimentos de aflição e prazer, que tenho memória e conhecimento. Vê com os mesmos olhos esse cão que perdeu o amor e procura-o por toda parte com ganidos dolorosos, entra em casa agitado, inquieto, desce e sobe e vai de aposento em aposento e enfim encontra no gabinete o ente amado, a quem manifesta sua alegria pela ternura dos ladridos, com saltos e carícias. Bárbaros agarram esse cão, que tão prodigiosamente vence o homem em amizade, pregam-no em cima de uma mesa e dissecam-no vivo para mostrarem-te suas veias mesentéricas. Descobres nele todos os mesmos órgãos de sentimentos de que te gabas. Responde-me maquinista, teria a natureza entrosado nesse animal todos os órgãos do sentimento sem objetivo algum? Terá nervos para ser insensível? Não inquines à natureza tão impertinente contradição.”

Voltaire

RESUMO

OLIANI, A. L. N. **Efeitos da administração perinatal do Citrato de Clomifeno na função reprodutiva de ratos Wistar:** comportamento sexual, avaliação hormonal e plasmática. [Effects of perinatal administration of Clomiphene Citrate on the reproductive function of Wistar rats: sexual behavior, plasma and hormonal evaluation]. 2012, 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A diferenciação sexual cerebral é um fenômeno importante que ocorre no período perinatal essencial para definir alguns padrões comportamentais na orientação sexual na fase adulta. Este evento ocorre após uma descarga abrupta da testosterona testicular no recém-nascido que é convertido em estrógeno E₂ pela aromatase no hipotálamo do neonato e, juntamente com aquela de origem materna promove as alterações no cérebro que determinam a orientação sexual masculina do neonato. Em fêmeas, o E organiza o cérebro feminino e a orientação sexual. Assim, investigou-se o efeito do Citrato de Clomifeno, um inibidor da aromatase em ratos machos e fêmeas tratados perinatalmente. Os resultados mostraram alterações comportamentais e bioquímicas compatíveis com a desmasculinização, alteração do comportamento sexual de ambos os sexos, comportamento homossexual, ciclo estral, alteração dos níveis de testosterona, estrógeno, FSH e LH e do peso dos órgãos na fase adulta. Os resultados são explicados pelo bloqueio da aromatase, no período da diferenciação sexual cerebral.

Palavras-chave: Comportamento sexual. Diferenciação sexual. Aromatase. Estrógeno. Citrato de Clomifeno.

ABSTRACT

OLIANI, A. L. N. **Effects of perinatal administration of Clomiphene Citrate on the reproductive function of Wistar rats:** sexual behavior, plasma and hormonal evaluation. [Efeitos da administração perinatal do Citrato de Clomifeno na função reprodutiva de ratos Wistar: comportamento sexual, avaliação hormonal e plasmática]. 2012, 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Sexual differentiation of the brain is an important phenomenon that occurs perinatally essential to define some behavioral patterns of sexual orientation in adulthood. This event occurs after an abrupt discharge of testicular testosterone in newborns that E2 is converted into estrogen by aromatase in the hypothalamus of the newborn and, along with that of maternal origin promotes changes in the brain that determine sexual orientation male neonate. In females, the E organizes the female brain and sexual orientation. Thus, we investigated the effect of clomiphene citrate, aromatase inhibitor in male and female rats treated perinatally. The results showed behavioral and biochemical changes consistent with demasculinization, altered sexual behavior of both sexes, homosexual behavior, estrous cycle, changing levels of testosterone, estrogen, FSH and LH and organ weight in adulthood. The results are explained by blocking the aromatase during the period of sexual differentiation of the brain.

Keywords: Sexual behavior. Sexual differentiation. Aromatas. Estrogen. Clomiphene Citrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Movimento de atratividade do macho com a fêmea.....	28
Figura 2- Movimento de receptividade da fêmea com o macho.....	28
Figura 3- Movimento de cópula e período refratário da fêmea	28
Figura 4- Caixa de polipropileno.....	42
Figura 5- Demonstração ilustrativa do ciclo estral	45
Figura 6- Diagrama cronológico	46
Figura 7- (a, b e c) Ovário policístico.....	57
 Gráfico 1- Peso dos órgãos da prole masculina e feminina.....	 63
Gráfico 2- Níveis séricos hormonais de E2, PG, FSH e LH da prole masculina e feminina.....	 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comportamento sexual de ratas fêmeas	58
Tabela 2- Comportamento sexual de ratos machos	59
Tabela 3- Avaliação do comportamento homossexual de ratas fêmeas	60
Tabela 4- Avaliação do comportamento homossexual de ratos machos	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO.....	20
2.2 SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL.	23
2.3 MODULAÇÃO CEREBRAL NO PERÍODO PERINATAL E O CITRATO DE CLOMIFENO	30
2.3.1 Farmacodinâmica e aplicabilidade do citrato de clomifeno	34
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 OBJETIVOS.....	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 ANIMAIS.....	41
5.2 DROGAS UTILIZADAS	42
5.3 TRATAMENTO.....	44
5.4 PROCEDIMENTOS.....	46
5.5 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO SEXUAL E HOMOSSEXUAL DE MACHOS E FÊMEAS.....	47
5.5.1 Preparo das ratas iscas	47
5.5.2 Avaliação do comportamento sexual Ratas Fêmeas	48
5.5.3 Avaliação do comportamento sexual Ratos Machos.....	49
5.5.4 Avaliação do comportamento Homossexual Ratas Fêmeas	50
5.5.5 Avaliação do comportamento Homossexual Ratos Machos.....	51
5.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	52
5.6.1 Peso corpóreo e peso dos órgãos internos e Coleta do sangue.....	52
5.7 ANÁLISE SÉRICA HORMONAL: ESTRÓGENO, TEST., FSH E LH.	52
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6 RESULTADOS.....	55
6.1 Exp. 1: Avaliação do ciclo estral de ratas fêmeas cujas mães foram tratadas perinatalmente com o citrato de clomifeno	56
6.2 Exp. 2: Avaliação do comportamento sexual da prole feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno.....	58
6.3 Exp. 3: Avaliação do comportamento sexual da prole masculina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno	59

6.4 Exp. 4: Avaliação do comportamento homossexual da prole feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno	60
6.5 Exp. 5: Avaliação do comportamento homossexual da prole masculina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno	61
6.6 Exp. 6: Avaliação do peso dos órgãos da prle feminina e masculina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno	62
6.7 Exp. 7: Avaliação dos níveis séricos de E2, PG, FSH e LH da prle masculina e feminina de ratas expostas no período perinatal ao cictrato de clomifeno	64
7 DISCUSSÃO	66
8 CONCLUSÃO	77
9 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	79
REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, a presença do cromossomo Y desencadeia/gera a determinação sexual e a diferenciação sexual do cérebro do macho, que determina a orientação sexual. Este último evento decorre de altos níveis de estrógeno no meio fetal oriundos do próprio feto após uma descarga abrupta de testosterona testicular. Esse hormônio (testosterona) é convertido em estrógeno (E2) pela enzima aromatase no hipotálamo do neonato e daquele de origem materna. Em fêmeas, o E2 organiza o cérebro feminino e a orientação sexual. Portanto, este hormônio tem papel fundamental na orientação e no comportamento sexual de animais. Neste trabalho, investigamos o efeito da administração de Citrato de Clomifeno, um inibidor da aromatase, no comportamento sexual e, nos níveis hormonais e plasmáticos em ratos machos e fêmeas.

Os resultados mostraram alterações comportamentais e bioquímicas compatíveis com a desmasculinização, alteração do comportamento sexual de ambos os sexos, comportamento homossexual, ciclo estral, análises dos níveis de testosterona, estrógeno, FSH e LH, e também do peso dos órgãos. Resultados que poderão ser explicadas pelo bloqueio da aromatase, no período da diferenciação sexual cerebral.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi dividida em tópicos e aborda os seguintes temas: aspectos neurofisiológicos da reprodução, definição do comportamento sexual, o que determina o comportamento sexual masculino, e o papel das drogas na modulação cerebral no período perinatal.

2.1 ASPECTOS NEUROFISIOLOGICOS DA REPRODUÇÃO

O processo reprodutivo de mamíferos envolve a ação conjunta adequada do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Em ambos os sexos, o cérebro age como um regulador. Desta forma, os neurônios peptidérgicos hipotalâmicos produzem o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que, após alcançar a adenohipófise, estimula a produção do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH). A resposta à secreção de gonadotrofinas (LH e FSH), por sua vez, acarreta diferenças sexuais e varia segundo a idade e o sexo do animal. (GUYTON, 2006; MOURÃO; ABRAMOV, 2011).

A aquisição de um fenótipo sexualmente dimórfico é um evento crítico no desenvolvimento de mamíferos. Embora a maturação da função sexual e reprodutiva ocorra após o nascimento, os processos críticos ocorrem durante a embriogênese e podem ser divididos em duas etapas: a determinação sexual e a diferenciação sexual. A determinação sexual ou sexo genético – determinado pela presença ou ausência do cromossomo Y – leva à diferenciação das gônadas, a qual uma vez completada irá determinar a diferenciação sexual do sistema nervoso central. Esta

segunda etapa é mediada por hormônios gonadais e ocorre durante um período restrito do desenvolvimento perinatal, resultando em diferenças fisiológicas, morfológicas, comportamentais e neuroanatômicas entre machos e fêmeas adultos (MCCARTHY et al., 1997; DAVIDSON; STABENFELDT, 2008).

Os hormônios testiculares estão envolvidos no estabelecimento de importantes diferenças fisiológicas, neuroanatomicas, e comportamentais entre os sexos de ratos e em outras espécies. O período crítico de diferenciação sexual abrange os últimos três dias de vida fetal e a primeira semana após o nascimento, período conhecido como “período perinatal”. Antes do período de diferenciação, o hipotálamo dos mamíferos está organizado intrinsecamente como do tipo “feminino”, determinando, na vida adulta, comportamento sexual típico da fêmea e secreção cíclica de gonadotrofinas. Nos machos o hipotálamo precisa ser “masculinizado” para que ocorra o comportamento sexual tipicamente masculino e apareça o padrão tônico de gonadotrofinas. A diferenciação sexual hipotalâmica envolve deste modo, dois processos distintos: a “defeminização” e a “masculinização” (MACLUSKY; NAFTOLIN, 1981).

Perinatalmente, o sistema nervoso central encontra-se mais sensível à ação de hormônios gonadais, coincidindo com o período em que os testículos dos fetos aumentam a produção de testosterona. Segundo Beach (1975), estudos iniciais em ratos, afirmam que o processo de masculinização do hipotálamo é decorrente da exposição à testosterona. Assim, em ratos machos, a diferenciação sexual hipotalâmica é quase simultânea ao aparecimento de um pico de testosterona de origem testicular. Este pico ocorre por volta de duas horas após o nascimento e não é visto em fêmeas e em ratos machos castrados ao nascer. O pico de testosterona observado em ratos machos também é observado em machos de outras espécies,

como em camundongos, cavalos e humanos, mostrando a importância deste evento para a diferenciação sexual de mamíferos em geral (CORBIER et al., 1992). Corroborando com essa informação, Gerardin (2005) afirma ainda que nos ratos machos a concentração de testosterona no soro aumenta até quase 400% entre 0 hora dentro do útero e às 2 horas após o nascimento enquanto nos humanos a testosterona aumenta gradativamente nas primeiras 12 h após o nascimento.

Apesar de o processo de diferenciação sexual ser dependente da presença de testosterona, o processo final é decorrente de estrógeno, proveniente da aromatização da testosterona de origem testicular, por ação da enzima citocromo P-450 aromatase (MOURÃO; ABRAMOV, 2011). Sabe-se também, que o bloqueio da aromatização da testosterona no período perinatal pode levar a não perfeita defeminização e masculinização do hipotálamo de ratos machos (GERARDIN et al., 2006). Dessa forma, a aromatização da testosterona é um evento necessário para a defeminização e masculinização do hipotálamo masculino, e o estrógeno, atuando em seus receptores, é capaz de ativar a transcrição de genes e a síntese de proteínas, induzindo as diferenças sexuais no cérebro. Pesquisas feitas com exposição perinatal ao letrozol, um inibidor da aromatase (1 mg/kg/dia) nos dias 21 e 22 da gravidez, período hormônio-sensível, confirmam o fato, observando que essa exposição podia afetar a diferenciação sexual do hipotálamo e alterar aspectos comportamentais e fisiológicos na fase adulta de ratos macho. Ainda, em fêmeas, a ausência de andrógenos e/ou a exposição a pequenos níveis de estrógeno durante o período perinatal, leva à feminização do cérebro, independente da presença do ovário (PEREIRA, 2002; GERARDIN et al., 2005).

Os hormônios gonadais desempenham então, uma função organizacional durante o “período crítico” de desenvolvimento fetal e perinatal, conduzindo a um

dimorfismo sexual em regiões neurais específicas. Depois da puberdade, esses hormônios desempenham uma função ativacional, exercendo um papel regulatório pela ativação seletiva daqueles circuitos neurais estabelecidos durante o período crítico. Em muitas circunstâncias, o dimorfismo sexual, caracterizado por diferenças estruturais, leva a subseqüentes diferenças sexuais fisiológicas e bioquímicas (SUMIDA et al., 2005; TEODOROV et al., 2005; GERARDIN et al., 2006).

2.2 SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL E O PAPEL DOS NEUROTRANSMISSORES CENTRAIS

O comportamento sexual é frequentemente considerado como parte de uma série de comportamentos padrões que tem um propósito ou função de manter as espécies (AGMO, 1999). Quando observa-se o comportamento sexual de machos, são analisados a motivação e o desempenho sexual, mas apesar desta distinção, ambos estão intimamente relacionados (MEISEL; SACHS, 1994). O processo que faz o animal procurar contato sexual com outro animal é usualmente referido como motivação sexual ou libido; e o desempenho sexual ou potência é a eficiência e orientação penianas.

Os termos “libido” e “potência” são raramente usados no discurso científico, mesmo para homens, e mais raramente ainda para machos não humanos. Os termos mais comumente usados são motivação e desempenho, ou na terminologia etológica clássica, “aspectos apetitivos e consumatórios” do comportamento sexual. Em relação a este comportamento, uma distinção deve ser feita entre procurar o contato sexual (motivação ou libido) e estar apto para completar o ato copulatório

(desempenho ou potência). No entanto, motivação sexual e capacidade erétil não são usualmente independentes uma da outra (ALVES, 2007).

A motivação sexual é basicamente diferente de outras motivações, como a fome, sede, esquiva da dor, e assim por diante. Enquanto a privação de comida e água ou a infligência de dor é potencialmente perigoso para o organismo, a abstinência sexual não tem, em curto prazo, consequências adversas ao indivíduo. Há muito tempo tem sido reconhecido que a motivação sexual, isto é, o desejo para empenhar-se na atividade sexual é ativada pela presença de um(a) companheiro(a) (ALVES, 2007). Motivação sexual é, portanto, um caso de motivação incentivada (AGMO, 2003).

No caso de incentivo sexual, tem havido uma grande discussão sobre quais estímulos são incondicionados e quais são efetivos em decorrência de aprendizado prévio. Vários estudos têm demonstrado que uma rata sexualmente receptiva pode ativar diferentes comportamentos de aproximação em ratos sexualmente experientes (AGMO, 2003). Estes machos experientes ficam mais tempo na proximidade da fêmea receptiva do que na proximidade de outro macho não experiente, quando observados numa arena apropriada que impede a ocorrência de comportamento copulatório. Esta preferência pela fêmea não diminui depois de repetidas sessões, mostrando que as propriedades incentivadoras são mantidas mesmo na ausência de execução dos reflexos sexuais (copulação) (AGMO, 2003).

Por outro lado, os dados referentes ao comportamento de aproximação, obtidos com ratos inexperientes são conflitantes. Há autores que relataram que ratos inexperientes não mostraram nenhuma preferência pela fêmea receptiva (LARSON, 1994), enquanto outros observaram que estes animais têm tanta preferência pela rata quanto os ratos experientes. Outros estudos mostraram que ratos inexperientes

correm mais rápidos para uma fêmea tratada com hormônios sexuais do que para a não tratada (ALVES, 2007). Para auxiliar no entendimento destes achados conflitantes, Agmo (2003) mostrou a necessidade de fazer com que os ratos inexperientes se familiarizassem com a arena, sem a presença dos animais iscas, uma semana antes do teste. Nesta situação o autor completa que a rata receptiva é um estímulo incondicionado para o rato, independente de sua experiência.

Argiolas e Melis (2005), citando vários trabalhos da literatura, observaram que os neurotransmissores e neuropeptídeos agem em diversas áreas do cérebro conduzindo informação ao aparelho genital através da medula espinhal, e que entre estas áreas do SNC, as mais estudadas são: a APOM (área pré-ótica medial), os núcleos paraventriculares (NPV) do hipotálamo, a amígdala, os núcleos paragigantocelulares da formação reticular ventral e a própria medula espinhal. Estes autores relataram também que grupos de pesquisadores com diferentes abordagens experimentais (farmacológicas, eletrofisiológicas e neuro-anatômicas) mostraram o importante papel dos NPV do hipotálamo no controle da função erétil. Por outro lado, a APOM do hipotálamo anterior é uma região cerebral crítica para a iniciação do estímulo e comportamento sexuais (MEISEL; SACHS, 1994).

Na avaliação do comportamento sexual, a motivação pode ser medida pela latência (tempo que demora) para primeira monta que, em geral, deve ser menor que "01" (um) minuto. A latência para primeira intromissão frequentemente é a mesma que a latência para primeira monta, mas pode ser mais longa. Intromissão requer ereção peniana e atividade coordenada dos músculos estriados do pênis e, conseqüentemente, não é inteiramente determinada pela motivação sexual (AGMO, 1997). O número de montas é bastante variável e, provavelmente, reflete a

motivação sexual, mas pode ser confundida com outros fatores e deve ser interpretada com cautela.

O número de intromissões mostra a facilidade pela qual o reflexo ejaculatório é ativado. A eficiência copulatória representa o desempenho sexual ou potência. O intervalo inter-intromissão e a frequência de montas por minuto podem refletir uma mistura de motivação e desempenho sexuais (AGMO, 1997).

Sabe-se que os hormônios gonadais influenciam vários sistemas de neurotransmissores que exercem um papel importante em eventos sinápticos, incluindo mudanças na excitabilidade das membranas neuronais, e parecem ser determinantes para o estabelecimento das diferenças sexuais em estruturas do cérebro. Segundo McEwen (1978), a defeminização compreende a indução de esterilidade anovulatória e a redução da capacidade de apresentar lordose, enquanto que a masculinização compreende a capacidade de apresentar o comportamento sexual típico de monta. Pesquisas mais recentes informam ainda que o comportamento sexual da fêmea é controlado pela presença ou pela ausência de hormônios apropriados e vários neurotransmissores centrais, tais como o hormônio estrógeno, a progesterona, a norepinefrina, a dopamina, a serotonina, o GABA, opiáceos endógenos e diversos peptídeos essenciais ao controle de comportamento copulatório (CONEGLIAN-MARISE; GERARDIN, 2003).

Já está bem estabelecido que o comportamento sexual feminino é avaliado não apenas pela capacidade de apresentar lordose, como afirma McEwen (1978), mas também através dos fatores que incluem: atratividade, proximidade e receptividade (Figuras 1, 2 e 3). A atratividade refere-se àquelas características que aumentam a probabilidade do macho na atividade copulatória. Comportamentos proceptivos, que atraem a atenção do macho à fêmea seguida da intromissão, são

tidos como proximidade (PFAUS; EVERITT, 1995). A receptividade é a aceitação da fêmea ao movimento definitivo da copulação, a intromissão, exigida para a cópula bem sucedida (PFAUS & EVERITT, 1995; UPHOUSE, 2000). O reflexo de lordose (arqueamento da parte traseira, elevação do traseiro, dorso-flexão da cauda e a extensão do pescoço) é uma postura estereotipada iniciada pela estimulação do mecanorreceptor cutâneo no flanco, no traseiro, na base da cauda, e no períneo e é adotado por uma fêmea sexualmente receptiva em resposta à estimulação tátil do macho. Em fêmeas virgens, a liberação sequencial do estradiol ovariano seguida pela progesterona maximiza a probabilidade de realizar a postura de lordose quando montada por um macho experiente (TEODOROV et al., 2005). Neste sentido, já está bem definido que o estrógeno estimula a liberação da dopamina cerebral e, portanto desenvolve um papel no comportamento sexual da fêmea. A dopamina facilita a atividade de lordose ativando o receptor de progesterona, assim como esse movimento de lordose também ocorre devido à ativação do receptor D1 dopamina no VTA (Área Tegumentar Ventral). O estrógeno prepara a fêmea a mostrar o reflexo enquanto a progesterona alavanca o reflexo (SUMIDA et al., 2005). Neurotransmissores monoaminérgicos são importantes para o controle do reflexo de lordose em ratas tanto quanto os noradrenergicos na indução da ovulação com o LH nesses animais. A reposição de estrógeno e progesterona em ratas ovariectomizadas aumentou a quantidade de dopamina no *nucleo acumbens*, enquanto a progesterona sozinha apenas aumentou o nível de dopamina na VTA (MERMELSTEIN; BECKER, 1995; TEODOROV et al., 2005).

Figura 1- O macho se aproxima da fêmea (atratividade), monta e apalpa o flanco. A fêmea apresenta comportamento de proximidade.

Fonte: Gerardin, 2006

Figura 2- (Receptividade) Empurrão raso da pelve sobre a fêmea antes da penetração e depois apresenta um chute alto e intenso de uma ou ambas patas posteriores logo após a penetração. A fêmea receptiva promove o “reflexo de lordose”.

Fonte: Gerardin, 2006

Figura 3- Movimentos de estocagem do macho após breve penetração seguida de higiene da região genital. A fêmea se afasta na sequência e ambos permanecem separados (Período refratário) por 4 min (media)

Fonte: Gerardin, 2006

O papel da serotonina na regulação da lordose mostrou que esta pode tanto inibir como facilitar a lordose, dependendo do receptor onde se liga e torna-o ativo. A modulação esteroideal da serotonina pode sugerir um efeito fisiológico na atividade serotoninérgica da lordose (MENDELSON, 1992). A redução do comportamento

sexual foi sempre associada à interação social e ao comportamento exploratório. É sabido que o sistema central dopaminérgico é ativado devido ao comportamento sexual do macho e da fêmea e está intimamente associado ao sistema GABAérgico. O GABA é um importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, mediando a transmissão sináptica inibitória rápida através da ativação de receptores GABA_A (WILLIAMS et al., 2000). Segundo Bach et al. (1992), a administração perinatal de Muscimol, um agonista de receptores GABA_A reduziu significativamente o volume do núcleo sexualmente dimórfico (SDN) e da área pré-óptica (POA) em ratos machos, enquanto que em fêmeas a mesma exposição não causou nenhuma alteração.

Contrariamente ao seu papel de neurotransmissor predominantemente inibitório na vida adulta, vários trabalhos têm documentado uma possível ação excitatória do GABA durante o período perinatal (MCCARTHY et al., 1997; WILLIAMS et al., 2000; GERARDIN et al., 2005), aumentando as concentrações intracelulares de cálcio. A observação de que a neurotransmissão GABAérgica passa de excitatória para inibitória ao mesmo tempo em que termina o período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica, sugere que a ação excitatória do GABA, sob regulação de hormônios gonadais é, em parte, responsável pelas alterações neuronais que levam à diferenciação sexual do cérebro (TEODOROV et al., 2002; MONIZ et al., 2006; PEREIRA, 2006). Autores afirmam que em machos as drogas GABAérgicas afetam o comportamento sexual indiretamente, via motora, mas nas fêmeas, esse parâmetro não foi observado (SILVA et al., 1998; TEODOROV et al., 2002, 2005; BASO et al., 2003; 2005; PEREIRA et al., 2006; ALVES, 2007). Estudos demonstraram que o comportamento sexual em fêmeas é abolido pela ovariectomia, mas é restaurado pela reposição do estrógeno e da progesterona. Ao

administrar drogas GABAérgicas durante a gravidez, verificou-se malformações neurológicas e anatômicas na prole assim como a deficiência orgânica sexual na vida adulta (TEODOROV et al., 2005). Assim, hormônios sexuais neonatal promovem efeitos organizacionais e ativacionais e podem influenciar a sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na idade adulta (MCCORMICK et al., 1998).

2.3 MODULAÇÃO CEREBRAL NO PERÍODO PERINATAL E O CITRATO DE CLOMIFENO.

A redução nas concentrações de testosterona durante o período perinatal pode levar à desmasculinização do sistema nervoso central e interferir no crescimento de órgãos reprodutivos andrógeno-dependentes em mamíferos. O aumento da incidência de desordens reprodutivas masculinas, como hipospadias e criptorquidia, tem sido atribuído à exposição a agentes químicos ambientais (SULTAM et al., 2001) que, por desregulação na função endócrina, podem causar alteração nos níveis de hormônios gonadais e comprometer o processo de diferenciação sexual hipotalâmica no período perinatal e a função reprodutiva normal na vida adulta. Nesse caso, determinadas drogas e/ou agentes químicos ambientais podem ser considerados desreguladores endócrinos, ao atuar como “agentes exógenos que interferem com a produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação, ou eliminação de hormônios naturais do organismo, responsáveis pela manutenção da homeostase e regulação dos processos de desenvolvimento” (KAVLOCK et al., 1996).

O Citrato de Clomifeno, tem sido usado como droga antiestrogênica uma vez que bloqueia os receptores de estrógeno em estudos dos mecanismos moleculares da diferenciação sexual através da inibição da enzima aromatase em cérebros de ratos (GIANNAKOPOULOU et al., 2001). Estudos realizados por Gerardin (2006), demonstraram que ratos machos expostos a essa droga no período neonatal não exibiram, na fase adulta, alteração no nível de testosterona e LH, nem no peso dos órgãos úmidos, corroborando com Oliveira et al. (2002). Todavia, machos tratados com o clomifeno ao nascer, mostraram uma maior quantidade de espermatozóides devido ao atraso no tempo de trânsito na cauda do epidídimo, durante a vida adulta.

Quando aplicado no período perinatal, o clomifeno provocou atraso na latência para a primeira monta e primeira intromissão, sugerindo a ausência de atividade sexual em ratos machos (GERARDIN, 2006). Estudos feitos com o tamoxifeno, outro anti-estrógeno, apresentaram resultados similares, demonstrando a extrema sensibilidade dos receptores nos núcleos hipotalâmicos sexuais durante este período inicial da vida, o que provocou uma completa inibição da atividade sexual, em vez de provocar apenas deficiências (CSABA; KARABÉLYOS, 2001). Além disso, 70% dos machos apresentaram inatividade sexual, demonstrando a necessidade da presença de estrógeno durante esse período.

A testosterona tem papel importante no comportamento sexual masculino, o que implica no funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-testicular. No entanto, Gerardin (2006) não observou alteração nos níveis plasmáticos desse hormônio, sugerindo que níveis baixos de testosterona em machos adultos não pode ser o único fator relacionado com anormalidades comportamentais na fase adulta. Na verdade, afirma, uma diminuição da resposta do cérebro a ativação androgênica, tem sido um melhor indicativo para as anormalidades comportamentais.

O tratamento com o Citrato de Clomifeno no período neonatal levou a alterações neuroquímicas no hipotálamo e corpo estriado dos ratos machos adultos, aumentando os níveis de Noradrenalina e diminuição de DOPAC (ácido 3,4-dihydroxyphenylacetico formado a partir da deaminação e dehidrogenação da dopamina pela enzima monoamina oxidase – MAO) sem qualquer mudança nos níveis de DA (dopamina). Observou-se também uma diminuição nos níveis de 5-HT (receptor de serotonina) e 5-HIAA (principal metabólito da serotonina), indicando uma redução da atividade do sistema serotoninérgico. A área pré-óptica medial é a região mais importante para o comportamento sexual, já que modifica o processamento de estímulos sensoriais advindos da presença de uma fêmea receptiva ou a cópula em si através da liberação de dopamina, pois recebe estímulos sensoriais indiretos a partir de qualquer modalidade sensorial (GERARDIN, 2006).

As alterações no apetite sexual estudadas pelo autor (latência de monta e intromissão) podem ter sido induzidas pela diminuição da atividade dopaminérgica observada no hipotálamo. Assim, a dopamina tem um papel central na tradução dos efeitos em longo prazo com esteroides nos eventos comportamentais sexuais.

Estudos feito por Pereira (2003), demonstraram que ratas cruzadas com machos tratados com o clomifeno no período neonatal, apresentaram um aumento das perdas pré e pós implantação, podendo levantar a hipótese de que danos causados ao hipotálamo nesse período crítico poderiam influenciar no padrão tônico de liberação das gonadotrofinas ao longo da vida adulta.

A exposição hormonal ou produtos químicos durante o período de organização do cérebro pode levar a mudanças nos fenótipos sexuais, afirmam Gray et al. (1994) e Farabolini et al. (1999), gerando mudanças sexuais comportamentais nos adultos com preferências sócio-sexual alterada, mostrando que reduções nas

concentrações de receptores de estrógeno e/ou nos níveis de estradiol neonatal em regiões específicas do hipotálamo são importantes no desenvolvimento psicosssexual do rato macho. Gerardin e Pereira (2002) confirmaram a afirmativa quando demonstraram que 50% dos ratos machos tratados com o letrozol, um inibidor da aromatase no hipotálamo durante o período de diferenciação sexual, não apresentaram comportamento sexual masculino na fase adulta, sendo que 25% destes apresentaram comportamento sexual feminino (receptividade e aceitação de monta). Quando castrados e tratados com estradiol, 100% destes animais apresentaram comportamento sexual masculino, porém com frequência reduzida de monta e 60% destes apresentaram comportamento sexual feminino. Sugerindo então que interferências nesta fase crítica do desenvolvimento, onde esteroides sexuais determinam a diferenciação sexual do cérebro podendo apresentar implicações funcionais em algumas ações hormonais relacionadas com o gênero de orientação sexual, isto é, ser heterossexual ou homossexual (PEREIRA, 2003).

O Citrato de Clomifeno neonatal apresenta, portanto, uma influencia em longo prazo na quantificação de espermatozóides, comportamento sexual e neurotransmissores cerebrais em filhotes machos, indicando a necessidade de prevenir a exposição a drogas que possam alterar na diferenciação sexual e comprometer mais tarde, o sucesso do acasalamento, bem como a capacidade de gerar descendentes (PEREIRA, 2003; GERARDIN, 2006).

2.3.1 Farmacodinâmica e aplicabilidade do Citrato de Clomifeno

Segundo o fabricante (Clomid - Medley®) O Citrato de clomifeno é um agente não esteróide, com propriedades estrogênicas e antiestrogênicas, que pode induzir a ovulação em certas mulheres que não ovulam. Compete com o estrogênio endógeno nos receptores estrogênicos hipotalâmicos, produzindo aumento da secreção de GnRH e dos níveis de LH e FSH, o que resulta em estimulação ovariana, com conseqüente maturação do folículo ovariano e desenvolvimento do corpo lúteo. Estudos em humanos com citrato de clomifeno marcado com ^{14}C têm demonstrado que sua absorção é rápida e a excreção é feita principalmente pelas fezes. Aproximadamente 50% da dose administrada é excretada após 5 dias. A presença de ^{14}C nas fezes, 6 semanas após a administração sugere que a droga e/ou metabólitos são lentamente excretados pelo ciclo entero-hepático.

É indicado para tratamento da infertilidade feminina decorrente de anovulação. Bons níveis de estrógeno endógeno (estimado por secreção vaginal, biópsia endometrial, determinação do estrógeno urinário ou sangramento endometrial em resposta à progesterona), constituem prognóstico favorável para obter a resposta ovulatória induzida pelo citrato de clomifeno. Entretanto, um baixo nível de estrógeno não impede o sucesso do tratamento. O tratamento é ineficaz em pacientes com falha pituitária ou ovariana primárias e não pode ser substituído pelo tratamento específico de outras causas de falha ovulatória, tais como disfunções tireoidianas ou adrenais. Antes do tratamento, deve-se realizar uma avaliação cuidadosa particularmente em pacientes com metrorragia anormal, pois é muito importante descartar a presença de lesões neoplásicas.

Há um aumento na probabilidade de ocorrência de gravidez múltipla, Segundo o fabricante têm sido relatadas na gravidez em 21,4% das pacientes tratadas durante os estudos com citrato de clomifeno (aborto 19%; gravidez ectópica 1,18%; parto prematuro 1,0%; mola hidatiforme 0,17% e "fetus papyraceus" 0,04%). De 158 pacientes que receberam a droga depois da concepção, nasceram 8 crianças (de 7 partos) com malformações congênitas. Essa incidência está dentro do limite observado na população em geral e foi a mesma quando se administrou antes do 19º dia ou entre o 20º e 35º depois da concepção.

Entre as anomalias espontaneamente relatadas em literatura, através da publicação de casos individuais, a proporção de defeitos do tubo neural tem sido elevada em gestações associadas à ovulação induzida por citrato de clomifeno.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A presença ou ausência de hormônios apropriados como estrógeno e progesterona, e vários neurotransmissores centrais como norepinefrina, dopamina, serotonina, GABA e outros, geram alterações fisiológicas e neuroanatômicas no sistema nervoso central quando administrados no período perinatal, as quais acarretam em alterações comportamentais entre os sexos de ratos e em outras espécies na fase reprodutiva e adulta.

Considerando-se os resultados obtidos nestas considerações, e levando em conta estudos pré-realizados onde verificamos a atividade sobre o comportamento sexual dos ratos machos, com o uso do antagonista estrogênico, citrato de clomifeno, aplicado no período perinatal (CONEGLIAN-MARISE; GERARDIN, 2003; GERARDIN et al., 2006), propusemos neste trabalho, o estudo com o uso perinatal do citrato de clomifeno, utilizado como ferramenta, para avaliar os efeitos na fertilidade e comportamento sexual de ratos de ambos os sexos, além de avaliar os níveis de hormonais sorológicos relacionadas com comportamentos sexual desses animais. Este estudo auxiliará o entendimento do mecanismo de ação da droga testada em mamíferos.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Avaliar o ciclo estral de fêmeas
- Estudar os efeitos do citrato de clomifeno aplicados no período perinatal:
 - no comportamento sexual dos machos
 - no comportamento sexual das fêmeas
 - no comportamento homossexual de machos
 - no comportamento homossexual de fêmeas
 - no peso corpóreo e dos órgãos internos dos animais
- Avaliar séricamente os hormônios estrógeno, testosterona, FSH e LH.

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODO

Os materiais e métodos abordaram os temas relacionados ao manejo e execução deste trabalho assim como as metodologias empregadas para a elaboração das análises estatísticas.

5.1 ANIMAIS

Os experimentos com animais foram realizados nas instalações do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de São Paulo (23°34'10"S; 46°44'20"O), com início em fevereiro de 2010.

Foram utilizados 40 ratos fêmeas, da linhagem Wistar, prenhes, com aproximadamente 90 dias de idade, alojadas em caixas de polipropileno com tampa metálica medindo 40 x 50 x 20 cm, em número de 3 por caixa (Figura 4) e mantidos em biotério com luz controlada com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Água e comida (ração comercial balanceada) foram fornecidas aos animais *ad libitum*.

No dia gestacional 21 (DG21) foi aplicado citrato de clomifeno diluído em água destilada no grupo experimental, obtendo-se a concentração de 2mg/ml. Os animais receberam 2mg/kg desta preparação por via intraperitoneal (IP), e os animais do grupo controle receberam a mesma dosagem de solução salina. Ao

nascimento da prole foi feita a padronização das ninhadas em 8 filhotes por fêmea, sendo, quando possível, 4 fêmeas e 4 machos. A aplicação foi feita durante 4 dias consecutivos, sendo DG21, DN1, DN2 e DN3. O período de amamentação foi de 21 dias. Após o desmame, os filhotes foram separados por sexo e tratamento, e alojados em gaiolas de polipropileno, sendo mantidos nas mesmas condições laboratoriais de seus pais.

Figura 4: Caixa de polipropileno com tampa metálica (40 x 50 x 20 cm) de biotério para alojamento de ratos.

Fonte: Arquivo pessoal

5.2 DROGAS UTILIZADAS

Citrato de Clomifeno (Indux[®] 50mg - EMS).

Óleo de amendoim (usado como veículo do estradiol e progesterona)

Xilazina 1% (Rompum[®] - Bayer): usado como pré-anestésico em ratas submetidas a ovariectomia.

Cloridrato de Cetamina – 100 mg/ml (Vetaset[®] – Fort Dodge): usado como anestésico em ratas submetidas a ovariectomia.

Riodeine[®] iodopovidona tópico (Rioquímica Indústria Farmacêutica): usado para antissepsia da pele das ratas submetidas à ovariectomia.

Vetaglós[®] pomada (Univet S. A. Indústria Veterinária): usada no tratamento das feridas cirúrgicas das ratas submetidas a ovariectomia.

Paracetamol 200mg/ml (Acetamol gotas - Rioquímica Indústria Farmacêutica): usado como analgésico no período pós-operatório das ratas iscas.

Benzoato de 17 β estradiol e progesterona (Sigma): usados no tratamento das ratas iscas, conforme descrito abaixo.

O cloridrato de clomifeno foi diluído em água destilada, obtendo-se a concentração de 2mg/ml. Os animais receberam 2mg/kg desta preparação por via intraperitoneal (IP), dose previamente utilizada em pesquisas anteriores na literatura.

A xilazina e a cetamina foram administradas, por via intraperitoneal, para a anestesia das ratas submetidas a ovariectomia bilateral. No período pós-operatório foram colocadas seis a sete gotas de paracetamol em 200 mL de água oferecida no bebedouro das ratas iscas, por quatro a cinco dias, sendo trocadas diariamente.

O 17 β estradiol e a progesterona foram diluídos em óleo de amendoim, sendo administrados nas doses de 50 μ g/kg e 2 mg/kg, respectivamente, por via subcutânea (SC), em volume de 0,2mL dose/animal nas ratas iscas utilizadas na avaliação sexual, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do início de cada sessão experimental.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As 40 ratas mães foram divididas, aleatoriamente, em 2 grupos: Grupo Experimental (GE) e Grupo Controle (GC). Os tratamentos foram feitos em todas as ratas mães e divididos em 4 doses iguais, sendo a primeira dose no período perinatal (21 dias de gestação – DG21) e as outras três doses subsequentes, nos dias 1 (DN1), 2 (DN2) e 3 (DN3) após o nascimento dos filhotes (DN0) (Ver diagrama de execução - Figura 6). Com isso, na primeira dose o medicamento foi transferido para os filhotes de forma indireta e nas doses subsequentes a transferência ocorreu através da lactação.

No GE, foi aplicado nas ratas mães, no DG21, 2mg/kg de cloridrato de clomifeno (Indux[®] 50mg - EMS) intraperitoneal. Nos animais do GC, foi realizado mesmo procedimento, porém foram administradas 2mg/kg de solução salina ao invés do citrato de clomifeno.

As ratas que não pariram no DG21 foram descartadas do experimento.

Ao nascimento da prole (DN0), foi feita a padronização das ninhadas em 8 filhotes por rata mãe, sendo, quando possível, 4 filhotes fêmeas (f1) e 4 filhotes machos (m1).

Nos dias DN1, DN2 e DN3, sempre no mesmo período as 6:00h AM, foram administradas o restante das doses nas ratas mães, 2 mg/kg de cloridrato de clomifeno no GE e 2 mg/kg do solução salina no GC, via IP.

Os animais foram monitorados diariamente e pesados a cada 2 dias. O período de amamentação foi de 21 dias.

Após o desmame (DN21), os filhotes foram alojados em gaiolas de polipropileno (Figura 4), sendo mantidos nas mesmas condições experimentais de suas mães. Foram utilizadas tanto a prole masculina como a feminina neste experimento, sendo que cada animal participou de apenas uma avaliação comportamental.

Figura 5: Demonstração ilustrativa do ciclo estral de ratas com suas respectivas características histomorfológicas do lavado vaginal.

Fonte: adaptado de: <http://137.222.110.150/calnet/Ovarian/page2.htm>, acesso em dez2010

5.4 PROCEDIMENTOS

Com 70 – 90 dias de idade, os ratos machos inexperientes foram colocados na Sala de Ciclo Invertido e mantidos em ciclo de luz 12:12 h (luz acesa às 22:00h), para adaptação do ciclo biológico, por no mínimo, 30 dias antes do início dos experimentos. As ratas iscas utilizadas na avaliação do comportamento sexual também foram colocadas nesta sala após serem submetidas à ovariectomia e recuperadas da anestesia.

As observações comportamentais foram realizadas na Sala de Ciclo Invertido, iluminada com duas lâmpadas vermelhas (20W), entre 12:00 h e 18:00 h. Todas as fêmeas experimentais estavam necessariamente na fase de Estro, do ciclo estral (Figura 5). Cada rato com idade mínima de 100 dias foi utilizado somente em um experimento. Após as avaliações comportamentais, todos os animais dos grupos experimentais e controle foram decapitados para posterior análise de peso dos órgãos e concentração hormonal sérica.

Figura 6: Diagrama cronológico experimental. DG- Dia de gestação; DPN - Dia pós-natal.

5.5 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO SEXUAL E HOMOSSEXUAL DE MACHOS E FÊMEAS:

5.5.1. Preparo das ratas iscas

Para avaliação do comportamento sexual dos animais foram utilizadas 4 fêmeas, sexualmente receptivas (iscas). As fêmeas iscas, foram submetidas a uma cirurgia para retirada dos ovários e cio induzido pela administração de hormônios. As ratas foram anestesiadas com 1ml/kg de cetamina e xilazina (1:2) administrada por via IP. Após a constatação da anestesia, procedeu-se à tricotomia e a anti-sepsia da pele, com incisão do flanco direito para exposição do ovário; fez-se então, uma ligadura no ligamento meso-ovariano com fio de nylon preto e retirou-se a gônada com auxílio de bisturi. A seguir, procedeu-se a sutura do peritônio, tecido subcutâneo e pele com pontos contínuos. Repetiu-se o mesmo procedimento para a retirada do ovário esquerdo.

No período pós-operatório imediato as fêmeas foram colocadas individualmente em caixas de polipropileno com tampa metálica medindo 30 x 20 x 13 cm forradas com maravalha sob luz para mantê-las aquecidas até a recuperação da anestesia quando, foram levadas para Sala de Ciclo Invertido. As quatro ratas iscas foram tratadas com paracetamol, conforme descrito no item 5.2. Após 4–5 dias, dada a cicatrização da ferida cirúrgica, foram todas transferidas para uma caixa de polipropileno com tampa metálica medindo 40 x 50 x 20 cm, e mantidas nesta sala (ciclo invertido) até o início dos experimentos.

Estas fêmeas foram utilizadas como iscas (ou incentivos) após 21 dias do processo cirúrgico, no mínimo, tempo este necessário para a eliminação dos hormônios circulantes e adaptação ao ciclo de luz invertido (AGMO, 2003).

A receptividade sexual das ratas iscas foi induzida pela administração de 50µg/kg de 17β estradiol e 2,0 mg/kg de progesterona, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do início de cada sessão experimental, e testadas colocando-as com um macho sexualmente ativo na caixa para observação do comportamento sexual, permitindo a realização de algumas montas e observando-se a presença de lordose nessas ratas, ou seja, a presença simultânea de flexão côncava do dorso, desvio lateral da cauda e extensão do pescoço. Estas ratas iscas, participaram dos experimentos da avaliação sexual a serem descritos e foram reutilizadas somente após um intervalo de duas semanas.

5.5.2 Avaliação do comportamento sexual de Ratas Fêmeas

Da prole feminina, foram utilizadas 16 animais, sendo 10 provenientes das mães do GE e 6 do GC.

A partir de 80 dias após o nascimento (DN80) foram realizados exames de citologia vaginal para detectar as fêmeas em cio.

Após a detecção da fêmea em estro, esta era colocada na gaiola de comportamento junto com um macho experiente por um período de 15 minutos. Os parâmetros observados foram:

- 1) Latência para primeira monta com intromissão-, período entre a colocação dos animais na gaiola de comportamento e a primeira monta do macho viril com intromissão do pênis na vagina da rata. Considera-se monta com intromissão quando o macho higieniza o pênis após a penetração;
- 2) Número total de montas com intromissão;
- 3) Latência para primeira monta sem intromissão- período entre a colocação dos animais na gaiola de comportamento e primeira monta do macho viril sem intromissão do pênis na rata;
- 4) Número Total de montas sem intromissão;
- 5) Latência para primeira lordose- período entre a colocação dos animais na gaiola e primeiro comportamento de lordose da rata. O comportamento de lordose se caracteriza pelo arqueamento da parte traseira, elevação do traseiro, dorso-flexão da cauda e a extensão do pescoço seguida de aceitação da intromissão do macho (TEODOROV et al., 2005);
- 6) Número total de lordoses.

5.5.3 Avaliação do comportamento sexual de Ratos Machos

Da prole masculina, foram utilizados 18 animais, sendo 10 provenientes das mães do GE e 8 do GC.

Para a avaliação do comportamento sexual, cada rato foi colocado, um a um, na gaiola de comportamento com uma fêmea isca, por um período de 30 minutos. Os parâmetros observados foram:

- 1) Latência para a primeira monta com intromissão- período entre a colocação dos animais na gaiola de comportamento e a primeira monta do macho com intromissão do pênis na vagina da rata isca.
- 2) Número total de montas com intromissão;
- 3) Latência para primeira monta sem intromissão- período entre a colocação dos animais na gaiola de comportamento e a primeira monta do macho na rata isca;
- 4) Número Total de montas sem intromissão;
- 5) Latência para a primeira ejaculação- período entre a colocação dos animais na gaiola de comportamento e primeira ejaculação do macho.
- 6) Número total de ejaculações;
- 7) Número de montas pós-ejaculatórias- número de vezes que o macho montou na fêmea isca após a monta com ejaculação.

5.5.4 Avaliação do comportamento Homossexual de Ratas Fêmeas

Da prole feminina, foram utilizadas 22 ratas filhas, sendo 14 animais provenientes do GE e 8 do GC.

A partir de 80 dias após o nascimento (DN80) foram realizados exames de citologia vaginal para detectar a fêmea em estro.

Após a detecção da fêmea em cio, esta era colocada na gaiola de comportamento junto com uma rata isca por um período de 15 minutos. Os parâmetros observados foram:

- 1) Latência para primeira monta- período entre a colocação das fêmeas na gaiola de comportamento e a primeira monta da fêmea experimental na rata isca;
- 2) Número total de montas;
- 3) Latência para primeira lordose- período entre a colocação das fêmeas na gaiola e primeiro comportamento de lordose da fêmea experimental;
- 4) Número total de lordoses.

5.5.5 Avaliação do comportamento Homossexual de Ratos Machos

Da prole masculina, foram utilizados 20 ratos filhos, sendo 10 animais provenientes das mães do GE e 10 do GC.

Para a avaliação do comportamento sexual, cada macho experimental foi colocado, um a um, na gaiola de comportamento com um macho viril, por um período de 30 minutos. Os parâmetros observados foram:

- 1) Latência para a primeira monta- período entre a colocação dos machos na gaiola de comportamento e a primeira monta do macho experimental no macho isca;
- 2) Número total de montas;
- 3) Latência para a primeira lordose- período entre a colocação dos machos na gaiola de comportamento e o comportamento de lordose do macho experimental;
- 4) Número de lordoses.

5.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Para a realização da medição do peso dos órgãos internos e coleta de sangue, os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação. Utilizamos rigoroso controle e conhecimento sobre as técnicas de minimização do sofrimento e angústia do animal, visando respeitar os princípios éticos da experimentação animal.

5.6.1 Peso corpóreo e peso dos órgãos internos e Coleta do sangue

Após os experimentos, todos os animais foram decapitados, o sangue coletado em tubos Falcon com EDTA, centrifugados a 4000rpm durante 10 minutos e congelados a -80°C. Os órgãos (fígado, aparelho reprodutor e rins) foram retirados e pesados logo na sequência.

5.7 ANÁLISE SÉRICA HORMONAL: ESTRÓGENO, TESTOSTERONA, FSH e LH.

As análises dos hormônios Estrógeno e Testosterona foram realizadas pelo método “Coat-A-Count”, tecnologia *Siemens Medical Solutions Diagnostics* no laboratório LDH da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal. O princípio do procedimento “Coat-A-Count” Estradiol e Testosterona baseia-se em tubos revestidos com anticorpos. O estradiol marcado com ^{125}I compete com o estradiol na amostra do paciente por locais de fixação nos anticorpos. Após a incubação, a separação entre ligado e livre é

conseguida por decantação. O tubo é então colocado num contador gama e as contagens serão/estarão inversamente relacionadas com a quantidade de estradiol presente na amostra do paciente. A quantidade de estradiol na amostra é determinada através da comparação das contagens com uma curva de calibração (SIEMENS, 2006).

A análise dos hormônios FSH e LH foi realizada pelo laboratório GENESE – Produtos e Diagnósticos LTDA, que forneceu a tecnologia e metodologia utilizada. A Tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex.

Os kits “*Milliplex*” foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito (amostra) estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois *lasers* diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe classifica a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo feixe quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de qualquer procedimento experimental foi aplicado o teste de Bartlett para verificar a homocedasticidade dos dados. A partir deste dado, foram utilizados o teste *t de Student* para dois grupos e a ANOVA de uma via quando foram analisados mais de dois grupos. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL DE RATAS FÊMEAS CUJAS MÃES FORAM TRATADAS PERINATALMENTE COM O CITRATO DE CLOMIFENO. EXPERIMENTO 1.

Todas as fêmeas experimentais clomifeno apresentaram ciclo normal na primeira semana e a partir desta, apresentaram em termos celulares, células compatíveis com fase de estro. Sendo que 70% dessas fêmeas apresentaram ovário policístico (figura 7) e 80% útero edemaciado. Observa-se o mesmo resultado em mulheres que utilizam o citrato de clomifeno, como tratamento de ovários policísticos.

- Todas as fêmeas salinas (grupo controle) apresentaram ciclo normal até o final do experimento.

O material foi submetido ao exame patológico no laboratório “*Canis Felis* Diagnóstico Veterinário” que eliminou a suspeita de neoplasia em seu laudo técnico.

Figura 7 (a, b e c)- alterações morfológicas com aumento evidente dos ovários quando comparados aos ovários das fêmeas salinas de mesma idade e eutanasiadas no mesmo dia.

Fonte: Arquivo Pessoal

6.2. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL DA PROLE FEMININA DE RATAS EXPOSTAS NO PERÍODO PERINATAL AO CITRATO DE CLOMIFENO.

EXPERIMENTO 2.

Foram utilizadas 16 fêmeas, sendo 6 do grupo controle e 10 do experimental, as quais foram observadas para avaliação do comportamento sexual como descrito no item 5.5.2 de Material e Métodos. A tabela 1 mostra os dados do comportamento sexual de fêmeas oriundas de mães tratadas no período perinatal com citrato de clomifeno. O teste *t de Student* mostrou que a latência para lordose foi significativamente maior nos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle ($p=0,023$). No número de lordose observou-se o contrário, ou seja, ocorreu redução significativa no parâmetro ($p=0,011$). A latência para primeira monta não diferiu significativamente entre os grupos ($p=0,261$). Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas.

Tabela1- Comportamento sexual de fêmeas oriundas de mães tratadas no período perinatal com citrato de clomifeno

	Grupo controle n=6	Grupo experimental n=10	p
Latência para 1ª monta sem intromissão	0,58±0,17	2,77±1,42	0,261
Latência para 1ª lordose	0,91±0,31	8,39±2,22*	0,023
Número de lordoses	10,60±1,76	3,10±1,66*	0,011

6.3. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTAS NO PERÍODO PERINATAL AO CITRATO DE CLOMIFENO. EXPERIMENTO 3.

Foram utilizados 18 ratos, sendo 8 do grupo controle e 10 do experimental, foram observadas para avaliação do comportamento sexual de ratos como descrito no item 5.5.3 de Material e Métodos. A tabela 2 mostra os dados do comportamento sexual de ratos machos oriundos de mães tratadas no período perinatal. Verificamos que houve redução significativa nos animais do grupo experimental ($p=0,042$) apenas no número de ejaculações em relação àqueles do grupo controle. Verificamos ainda redução significativa em teste unicaudal ($p=0,021$) na latência para a ejaculação nestes animais. Nos demais parâmetros não verificamos diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 2- Avaliação do comportamento sexual da prole masculina de ratas exposta no período perinatal ao citrato de clomifeno

	Grupo Controle (8)	Grupo Experimental (10)	P
Ratos inativos/total	8/8(100%)	4/10 (40%)	0,068
Latência 1ª monta	2,11± 0,57	1,88±0,46	0,338
Latência 1ª intromissão	3,39±0,31	2,94±0,72	0,271
Latência 1ª ejaculação	26,05± 2,60	0*	0,028
Latência 1ª monta pós-ejaculatória	27,04±1,25	0*	0,033
Nº de montas	3,0 ±2,78	3,33±2,88	0,415
Nº de intromissões	20,75±0,49	21,67±5,41	0,423
Nº de ejaculações	0,65±0,18	0*	0,021

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste t de Student, unicaudal).

6.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO HOMOSSEXUAL DA PROLE FEMININA DE RATAS EXPOSTAS NO PERÍODO PERINATAL AO CITRATO DE CLOMIFENO. EXPERIMENTO 4.

Vinte e duas ratas, 8 do grupo controle e 14 do experimental foram observadas para avaliação do comportamento homossexual em ratas como descrito no item 5.5.4 de Material e Métodos. A tabela 3 mostra os dados do comportamento homossexual de fêmeas oriundas de mães tratadas no período perinatal com citrato de clomifeno. O teste t de Student mostrou que a latência para primeira monta foi menor ($p=0,029$) nos animais do grupo experimental quando comparada a daqueles do grupo controle. Nota-se também que o número de lordoses executadas pelas fêmeas do grupo experimental foi maior ($p=0,035$) que daqueles do grupo controle.

Tabela 3- Comportamento homossexual de fêmeas oriundas de mães tratadas no período perinatal com citrato de clomifeno

	Grupo controle n=8	Grupo experimental n=14	p
Latência para 1ª monta	13,13 $\pm$ 1,26	8,32 $\pm$ 1,65*	0,029
Número de lordoses	0,75 $\pm$ 0,62	7,14 $\pm$ 2,48*	0,035

6.5. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO HOMOSSEXUAL DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTAS NO PERÍODO PERINATAL AO CITRATO DE CLOMIFENO. EXPERIMENTO 5.

Foram avaliados 20 machos, sendo 10 do grupo controle e 10 do grupo experimental, foram observados para seu comportamento homossexual como descrito no item 5.5.5 de Material e métodos. A tabela 4 mostra os resultados do comportamento homossexual de ratos cujas mães foram tratadas ou não perinatalmente como citrato de clomifeno. Verificamos que nenhum dos parâmetros foi diferente entre os grupos.

Tabela 4- Comportamento homossexual de ratos cujas mães receberam no período perinatal o citrato de clomifeno

	Grupo controle (10)	Grupo experimental (10)	P
Latência para primeira monta	15±0	12,40±0,155	0,155
Latência para primeira lordose	11,71±1,68	11,63±1,79	0,974
Latência para primeiro ataque	5,06±1,77	3,18±1,41	0,417
Nº de montas	0	3,60±2,40	0,273
Nº de lordoses	1,10±0,67	0,3±0,21	0,273

6.6. AVALIAÇÃO DO PESO DOS ÓRGÃOS DA PROLE MASCULINA E FEMININA DE RATAS EXPOSTAS NO PERÍODO PERINATAL AO CITRATO DE CLOMIFENO. EXPERIMENTO 6.

Após os estudos comportamentais com ratos (grupo controle, $n=8$; grupo experimental, $n=13$) e ratas (grupo controle, $n=21$; grupo experimental, $n=22$) os grupos controles e experimentais foram submetidos a eutanásia e seus fígados, rins e órgãos reprodutivos foram pesados segundo descrito no item 5.6.1 de Material e Métodos. O Gráfico 1 ilustra o peso dos órgãos da prole masculina e feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno. Na prole masculina exposta ao citrato de clomifeno verificamos que o peso dos fígados ($p=0,045$) e do aparelho reprodutor ($p=0,012$) foram significativamente menores que daqueles do grupo controle; não foram verificadas alterações entre os pesos dos rins dos grupos controle e experimental nestes animais. Nota-se que nas fêmeas expostas ao citrato de clomifeno o peso dos fígados foi significativamente maior que daqueles do grupo controle ($p=0,016$); não houve diferenças significantes entre os pesos dos rins ($p=0,355$) e órgãos reprodutivos ($p=0,156$) dos dois grupos.

Gráfico 1- Peso de órgãos da prole masculina e feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. Ratas (grupo controle- n=21 ; grupo experimental- n=22) e ratos (grupo controle- n=8; grupo experimental- n=13). * $P < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle (Teste t de Student).

6.7. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ESTRÓGENO, PROGESTERONA, FSH E LH DA PROLE MASCULINA E FEMININA DE RATAS EXPOSTAS NO PERÍODO PERINATAL AO CITRATO DE CLOMIFENO. EXPERIMENTO 7.

O sangue dos animais utilizados para avaliação do peso dos órgãos foi empregado para dosagem dos níveis séricos de estrógeno, testosterona, FSH e LH da prole masculina e feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno, segundo descrito no item 5.6.1 de Material e Métodos. O Gráfico 2 ilustra os dados referentes aos níveis plasmáticos de estrógeno, testosterona, FSH e LH da prole masculina e feminina de ratas exposta no período perinatal ao citrato de clomifeno. O teste t de Student mostrou diminuição nos níveis de FSH em ratos do grupo experimental ($p=0,013$) em relação àqueles do grupo controle. Nos demais hormônios, o mesmo teste, não indicou diferenças significantes entre os níveis de hormônios de ratas (estrógeno- $p=0,757$; LH- $p=0,328$; FSH- $p=0,675$) e ratos (estrógeno- $p=0,992$; testosterona- $p=0,299$) dos grupos experimentais e controles.

Gráfico 2- Níveis séricos de estrógeno, testosterona, FSH e LH da prole masculina e feminina de ratas exposta no período perinatal ao citrato de clomifeno. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. Ratos (grupo controle- n=8; grupo experimental- n= 13) e ratas (grupo controle- n=21; grupo experimental- n=22). P< 0,05 em relação aos animais do grupo controle (Teste t de Student).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Na avaliação do ciclo estral nota-se que as fêmeas oriundas de mães tratadas com o clomifeno, após estimulação vaginal, por se encontrarem mais sensíveis que o grupo controle, por uma semana, apresentaram estro permanente que perdurou por mais 3 semanas fato não observado no grupo controle. Além disto, 70% das fêmeas do grupo experimental apresentaram ovário policístico e 80% útero edemaciado. Tentou-se cruzar estas fêmeas com machos para estudo de receptividade, mas nenhuma delas engravidou, sugerindo que estavam inférteis. Dados semelhantes foram observados por Maharjan et al (2010) após administração de Letrozol, um inibidor da aromatase, em ratas adultas. O letrozol é empregado para indução do modelo de síndrome do ovário policístico (SOP), pois o bloqueio da aromatase aumenta a produção de andrógenos ovarianos levando ao hiperandrogenismo, uma característica da síndrome do ovário policístico

Portanto, tornou-se importante a análise do seu comportamento sexual e aspectos hormonais.

As fêmeas expostas perinatalmente ao citrato de clomifeno apresentaram redução no comportamento heterossexual expresso por menor número de lordoses e latência maior para este reflexo quando comparadas às ratas do grupo controle. Notamos também que no comportamento homossexual, as fêmeas do grupo experimental mostraram menor latência para monta e maior número de lordoses, ou seja, estas fêmeas apresentaram maior resposta sexual a fêmeas iscas. Portanto, a exposição ao inibidor da aromatase no período perinatal levou a masculinização das fêmeas. A redução do comportamento sexual das fêmeas e sua masculinização

podem ter sido causadas pela redução nos níveis de estrógeno produzida pelo citrato de clomifeno.

Estudos anteriores mostraram o efeito de um estrógeno sintético (Dietilstilbestrol-DES) que foi utilizado em gestações de risco até 1971, quando sua associação com adenocarcinoma de células claras da vagina e da cérvix uterina apressaram sua retirada do mercado. As comparações entre as meninas expostas ao DES pré-natal com suas irmãs indicavam que a exposição ao DES pode aumentar o desenvolvimento de um comportamento bissexual ou homossexual nessas mulheres. Três mecanismos são aventados: 1) ação do DES através da estimulação da produção de andrógenos; 2) efeitos tóxicos do DES sobre o cérebro em diferenciação; 3) uma ação do DES semelhante à do estradiol na diferenciação sexual do sistema nervoso central (DAMIAN et al., 2005).

A importância dos hormônios sexuais para a diferenciação fisiológica e comportamental do comportamento sexual foi estabelecida desde a década de 50 (PHOENIX et al., 1959; WHALEN; EDWARDS, 1967). Assim, a manipulação do ambiente hormonal durante o desenvolvimento perinatal altera permanentemente tanto a estrutura quanto a função do SNC. Já se mostrou que a exposição de ratas ao hormônio masculino viriliza componentes do SNC, e por outro lado, a castração do rato leva ao desenvolvimento de um SNC do tipo feminino ao nascer. Dessa forma, há evidências de que a aromatização local da testosterona a estrógeno é a responsável pela masculinização das estruturas cerebrais, ou seja, a testosterona atravessa a barreira hêmato-liquórica e, nas células cerebrais do núcleo sexualmente dimórfico, é convertida a estradiol, inibindo a apoptose dessas células. Na fêmea é também o estrógeno que organizaria o comportamento e orientação sexual. Neste sentido, propôs-se que altos níveis de estrógenos geram cérebros

com orientação masculina e níveis médios, cérebros organizados segundo linhas femininas (DOHLER et al., 1984).

Os primeiros trabalhos anatômicos e fisiológicos mostraram que a gonadectomia fetal de machos e fêmeas realizada em coelhos, resultava no desenvolvimento dos dois sexos internamente e também da genitália externa feminina. Concluiu-se, na época, que o fenótipo feminino se desenvolve mesmo na ausência de qualquer secreção hormonal dos ovários durante o período de desenvolvimento fetal, enquanto que no macho, o resultado do fenótipo masculino, se dá pela secreção de testosterona e hormônio mulleriano, ambos secretadas pelo testículo do macho. A proposição de que a orientação sexual feminina se daria na ausência de hormônios foi refutada por Toran-Allerand (1976) que demonstram in vitro, que neurônios hipotalâmicos de camundongos recém nascidos de ambos os sexos, sofreram um processo de neurite somente quando o estradiol é adicionado ao meio de cultura. Dohler et al. (1984) verificaram que o tratamento pós-natal de ratas com o tamoxifeno, um antagonista de receptores de estrógeno, defeminiza tanto o controle de gonadotrofinas como o comportamento sexual das fêmeas, enquanto que a administração concomitante de doses baixas de estradiol impede estes efeitos. Mack et al. (1993), mostraram então, que a presença de estrógeno é necessária para o desenvolvimento normal do corpo caloso feminino, uma estrutura cortical que, em ratos, é maior no sexo masculino do que no feminino. Estudos com ovariectomia aos 16 dias após o nascimento reafirmaram estas observações. (FITCH; DENENBERG, 1998), sugerindo então que o estrógeno seja necessário durante o desenvolvimento para feminilizar o cérebro.

Nas fêmeas, o estrógeno circula periféricamente ligado à albumina e, sua passagem ao SNC é dificultada, não podendo exercer sua ação de inibição de

apoptose em núcleos pré-ópticos do hipotálamo (NUNEZ et al., 1979). Neste sentido, a alfafeto-proteína tem baixa afinidade por andrógenos e desta forma, em machos a testosterona testicular pode agir no feto tanto centralmente como periféricamente. Ainda nas fêmeas, os ovários no período perinatal estão quiescentes e assim, o cérebro esta menos exposto à ação dos hormônios (WENIGER, 1993).

Recentemente, verificou-se que no período pós-parto algumas regiões do cérebro sintetizam localmente o estradiol e andrógenos. O estradiol pode ser sintetizado no cérebro durante o desenvolvimento precoce (período perinatal), particularmente no cerebelo (BALTHAZART; BALL, 1998), no hipocampo (SCHLINGER; ARNOLD, 1993) e hipotálamo (STUART et al., 2004). A síntese é tida como *de novo*, pois a proteína regulatória (StAR) que libera o colesterol da membrana mitocondrial, e o sistema P450 (CYP11A), a cadeia enzimática que cliva este colesterol, esta presente no cerebelo em desenvolvimento (SAKUMA, 2009). Em machos, tanto a proteína StAR como o sistema P450 são transcritos intensamente entre os dias pós-natais 5 -10 e, deste período em diante, a transcrição decresce. Em fêmeas, o pico é menor em magnitude e a transcrição perdura até o dia 21 pós-natal. No hipotálamo da fêmea, região envolvida no controle endócrino da reprodução e do comportamento sexual, há a presença da proteína StAR e o sistema P450, juntamente com a enzima 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase (3 β -HSD), que é a enzima que gera localmente a *de novo* progesterona (Sakuma, 2009). Soma et al. 2005, afirma que o aumento da 3 β -HSD produzido pelo estrógeno está associado ao pico do hormônio luteinizante nos animais adultos, mas seu papel na diferenciação sexual permanece ainda obscuro.

Foram também detectadas diferenças nos níveis da enzima aromatase em regiões cerebrais de ratos e ratas. Em fêmeas nota-se, em particular, altos níveis na área pré-óptica medial (RAYNAUD, 1973; VANNIER; RAYNAUD, 1975; GERMAIN et al., 1978; NUNEZ et al., 1979). Supõe-se que o substrato para esta enzima na fêmeas viria das adrenais, a qual é capaz de sintetizar andrógenos no estágio inicial do desenvolvimento (ZWAIN; YEN, 1999). Além disto, algumas evidências indicam que a alfafeto-proteína pode adentrar os neurônios e serviria de fonte materna de estrógenos (BENNO; WILLIAMS, 1978; TORAN-ALLERANDO, 1987). Culturas de astrócitos e neurônios do córtex neonatal de ratos são capazes de sintetizar a DHEA e, subseqüentemente em testosterona e o estrógeno (ZWAIN; YEN, 1999)

Neste particular, camundongos *knock-out* para o gene da aromatase apresentam redução no comportamento sexual e aumento de montas em fêmeas em estro farmacológico (BAKKER et al., 2002). Portanto, tendo em vista os presentes resultados sugerimos que a presença de estrógeno é fundamental para o desenvolvimento do padrão sexual de comportamento de fêmeas.

A análise dos pesos dos órgãos não indicou diferenças significantes nos órgãos de fêmeas, em particular no fígado, isto porque a degradação de hormônios gonadais ocorre neste local. Portanto, é possível que na idade adulta a produção e síntese de hormônios que eliciam o comportamento sexual não estejam alterados. Corroborar com esta afirmação a avaliação dos níveis de hormônios gonadais. De fato, não se observaram alterações entre os níveis séricos de hormônios gonadais e hipotalâmicos entre fêmeas do grupo experimental e controle.

Em conclusão, a redução do comportamento sexual de fêmeas expostas perinatalmente ao citrato de clomifeno e, o concomitante aumento do seu

comportamento homossexual, provavelmente se devem a alterações no processo de diferenciação sexual no início da vida do animal.

Presentemente observamos que ratos machos expostos ao citrato de clomifeno no último dia da gestação e nos 3 primeiros dias da lactação não ejacularam. Em consequência, a maior latência para ejaculação e para 1ª monta pós-ejaculatória foram consequência da ausência da ejaculação e não de menor motivação. Avaliou-se também o comportamento homossexual destes ratos notando-se que não houve diferenças significativas entre os dados de animais do grupo controle e experimental.

Estudos prévios de nosso grupo mostraram que a exposição de ratos ao citrato de clomifeno (SC, 2 mg/Kg) imediatamente após o nascimento, reduziu o comportamento sexual de machos associado ao decréscimo nos níveis de serotonina e dopamina hipotalâmicos e da neurotransmissão dopaminérgica estriatal. No comportamento sexual verificou-se maior latência para a primeira monta e intromissão expressando redução na motivação sexual dos animais. Propôs-se neste trabalho que a exposição ao citrato de clomifeno teria impedido a masculinização do hipotálamo da prole masculina por impedir a aromatização da testosterona em estrógeno. Poder-se-ia supor que nossos resultados seriam também consequência da redução nos processos de masculinização do hipotálamo dos machos.

Como já comentado, a aromatização da testosterona tanto de origem materna como testicular do macho a estrógeno é fundamental para a masculinização do hipotálamo e para sua defeminização no período perinatal.

Neste sentido, parece que o momento e/ou período de inibição da aromatase atinge diferentes aspectos do comportamento sexual de machos. De fato, apesar de

ter sido observada redução total na ejaculação dos ratos expostos ao inibidor da enzima não foi observada feminilização dos animais. Além disto, não houve redução nos níveis de testosterona, assim como nos níveis séricos de LH, não havendo diferenças entre os animais do grupo controle e experimental, porém com diferenças nos níveis séricos de FSH.

A análise destes dados parece bastante complexa. De fato, os parâmetros ligados a motivação sexual, também ditos apetitivos, como as latências para monta e intromissão, não foram alterados sugerindo que os animais apresentaram orientação heterossexual. No entanto, verificou-se queda na potência do comportamento sexual, ou seja, em parâmetros consumatórios, no caso do número de ejaculações.

A ausência de ejaculações nos animais do grupo experimental provavelmente não decorreu de redução na ereção peniana, pois o número de montas com intromissão não foi modificado. Portanto, pode-se aventar a possibilidade de que a administração perinatal do citrato de clomifeno tenha reduzido o processo ejaculatório *per se*.

É fato conhecido que o GnRH – hormônio liberador do hormônio luteinizante - no hipotálamo estimula tanto a liberação de LH como a de FSH da hipófise, porém mais de LH. A proporção de FSH para LH liberado pelo GnRH aumenta quando a frequência de pulsos de secreção de GnRH diminui. O LH está envolvido com a produção de andrógenos enquanto que o FSH estimula as células de Sertoli a produzir estrógeno. O FSH estimula o gene de transcrição da aromatase, enzima específica para a síntese do estradiol (BERNE; LEVY, 2006). A observação de redução nos níveis de FSH e não de LH no presente trabalho explicaria a ausência de alterações nos níveis de testosterona. No entanto, não se esperaria ausência da

ejaculação dos ratos expostos ao citrato de clomifeno uma vez que esta depende, em parte, de níveis séricos normais de testosterona.

Neste sentido, muitos estudos indicam que a ocitocina tem um papel chave na regulação da ereção peniana. Fillipi et al. (2003), comentam em sua revisão, que a ereção peniana depende tanto da presença de testosterona como de estrógeno para ativar receptores da ocitocina a liberar um potente estimulante da contração do epidídimo, a endotelina-1, que, por sua vez, potencia o efeito da ocitocina. Os esteróides sexuais regulam a densidade dos receptores da ocitocina no epidídimo. A privação de estrógenos endógenos pelo bloqueador da aromatase, o letrozol, induz hiporesponsividade dos receptores de ocitocina, prejudicando a ejaculação. É, pois possível que a exposição perinatal ao citrato de clomifeno tenha alterado as relações ocitocina-estrógeno e com isto a ejaculação dos animais.

Outro aspecto refere-se à redução do peso dos órgãos sexuais observada nos animais do grupo experimental.

Assim, o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos na infância é consequência da ação da gonadotrofina coriônica de origem placentária. A secreção da testosterona pelos testículos fetais é estimulada por um hormônio chamado gonadotrofina coriônica. Depois que um feto começa a se desenvolver no útero materno, seus testículos começam a secretar testosterona, quando tem poucas semanas de vida apenas. Essa testosterona, então, auxilia o feto a desenvolver órgãos sexuais masculinos e características secundárias masculinas. Isto é, acelera a formação do pênis, da bolsa escrotal, da próstata, das vesículas seminais, dos ductos deferentes e dos outros órgãos sexuais masculinos, como comentado anteriormente. Além disso, a testosterona faz com que os testículos desçam da cavidade abdominal para a bolsa escrotal; se a produção de testosterona

pelo feto é insuficiente, os testículos não conseguem descer; permanecem na cavidade abdominal. Imediatamente após o nascimento da criança, a perda de conexão com a placenta remove esse feito estimulador, de modo que os testículos deixam de secretar testosterona. Em consequência, as características sexuais interrompem seu desenvolvimento desde o nascimento até à puberdade. Na puberdade, o reaparecimento da secreção de testosterona induz os órgãos sexuais masculinos a retomar o crescimento. Os testículos, a bolsa escrotal e o pênis crescem, então, aproximadamente mais 10 vezes (BERNE; LEVY, 2006).

Brown e Chakraborty (1988) observaram que a administração de citrato de clomifeno a ratos de 10 dias reduziu os níveis de gonadotrofinas séricas e comprometeu o crescimento testicular e a esteroidogênese por até duas semanas. Posteriormente, os mesmo autores verificaram que ratos machos tratados entre os dias 10 e 31 de idade e observados aos 90 dias de idade, apresentavam redução no peso dos testículos e da próstata, da produção espermática e dos receptores testiculares para o FSH aos 90 dias de idade. No entanto, nesta idade o conteúdo de receptores testiculares de LH, as concentrações séricas de LH, testosterona e FSH voltaram a valores dos controles. Os autores concluíram então que o tratamento pós-natal precoce com clomifeno não prejudica de forma permanente a função pituitária. Apesar da redução da massa testicular, as concentrações séricas de testosterona e conteúdo testicular do receptor LH em níveis normais de ratos tratados com o inibidor da aromatase, sugerem que a função das células de Leydig estaria recuperada. A redução no conteúdo dos receptores de FSH testicular e a redução na produção de espermatozóides sugerem que a função dos túbulos seminíferos havia sido comprometida no rato adulto (BROWN; CHAKRABORTY, 1989).

Nossos resultados mostraram que o peso dos órgãos reprodutivos e os níveis de FSH da prole masculina, na idade adulta, foram reduzidos nos animais tratados com o citrato de clomifeno. Desta forma, é possível que a prole masculina de ratas expostas perinatalmente ao citrato de clomifeno possa também ter comprometimento dos túbulos seminíferos levando a redução no peso dos órgãos reprodutivos da mesma forma que aqueles tratados com letrozol. Mais ainda, o comprometimento da função dos túbulos seminíferos pode ter contribuído para a ausência de ejaculações observada.

Portanto, a exposição perinatal ao citrato de clomifeno em machos não alterou a orientação sexual dos mesmos, mas reduziu o processo ejaculatório. Além disto, não foi observada defeminização dos ratos.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

De acordo com as condições em que foram conduzidas este experimento podemos inferir que na dose terapêutica utilizada no período perinatal, o citrato de clomifeno:

- ✓ não interferiu no ciclo estral, porém promoveu desenvolvimento de ovário policístico e útero edemaciado.
- ✓ no comportamento sexual da prole feminina houve redução no número de lordose porém com maior latência para a mesma, mas sem alteração para latência para primeira monta.
- ✓ no comportamento sexual da prole masculina houve redução no número de ejaculações e na latência para a mesma.
- ✓ no comportamento homossexual da prole feminina houve aumento no número de montas e maior latência para a mesma.
- ✓ não houve alterações nos parâmetros comportamentais homossexuais da prole masculina.
- ✓ houve aumento do peso dos fígados da prole feminina e diminuição do peso dos fígados e órgãos reprodutivos da prole masculina.
- ✓ houve diminuição nos níveis séricos de FSH na prole masculina.

Os dados apresentados no presente trabalho sugerem que o citrato de clomifeno pode interferir na organização e orientação sexual cerebral de ratos machos e fêmeas, quando administrado perinatalmente em fêmeas prenhes.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

9 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Período	Atividades
2010	Semestre 1 – Preparação dos animais, estudos piloto. Cruzamento dos animais experimentais e grupo controle e acompanhamento do nascimento e desenvolvimento juvenil dos animais. Semestre 2 – Realização dos experimentos comportamentais na maturidade sexual, coleta e congelamento do material avaliado.
2011	Semestre 1 – Avaliação hormonal sérica com kits especializados, avaliação neuroquímica das estruturas cerebrais. Semestre 2 – Qualificação com resultados parciais; Realização das análises químicas.
2012	Semestre 1 – Finalização das avaliações Semestre 2 – Elaboração e defesa da Tese.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGMO, A. Male rat sexual behavior (protocol). **Brain Research Protocols**, v. 1, p. 203-209, 1997.

AGMO, A. Sexual motivation – an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 105, p. 129-150, 1999.

AGMO, A. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 117, n. 1, p. 3-14, 2003.

ALVES, P. S. B. R. **Interferência da moxidectina na motivação sexual e ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriatais**. 2007. 73 f. Doctor thesis - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, .; 2007.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório – criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2007. p. 102; 275 – 279.

ARGIOLAS, A.; MELIS, M. R. Central controlo f penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Progress in Neurobiology**, v. 76, p. 1-21, 2005.

BACH, F.; FLUGGE, G.; WUTTKE, W. GABAergic influence on the development of sexually dimorphic nucleus of male and female rats. **Brain Research**., v. 573, p. 341-4, 1992.

BALTHAZART J.; BALL, G. F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends Neuroscience**, v. 21, p. 243–249, 1998.

BAKKER,J.; HONDA,S. I.; HARADA, N.; BALTHAZART, J. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. **The Journal of Neuroscience**, October 15, 22(20):9104–9112, 2002.

BASO, A. C. Z.; GOULART, F. C. ; TEODOROV, E.; FELICIO, L.F.; BERNARDI, M. M. Effects of maternal exposure to picrotoxin during lactation on physical and reflex development, square crossing and sexual behavior of rat offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, n. 75, p. 733– 40. 2003.

BEACH, F. A. Hormonal modification of sexually dimorphic behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 1, p. 3, 1975.

BENNO, R. W.; WILLIAMS, T.H. Evidence for intracellular localization of α -fetoprotein in the developing rat brain. **Brain Research**, n. 142, p. 182–186, 1978.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; BRUCE, A. S.; BRUCE, M. K. Fundamentos de Fisiologia. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2006. cap.49: **Visão geral da função reprodutiva**, p. 699-711.

BROWN, J. L.; CHAKRABORTY, P. K. Characterization of the effects of clomiphene citrate on reproductive physiology in male rats of various ages. **Acta Endocrinology (Copenhagen)**, v. 118, n. 3, p. 437-43, 1988.

BROWN, J. L.; CHAKRABORTY, P. K. Prepubertal treatment of rats with clomiphene citrate affects postpubertal testicular development. **Acta Endocrinology (Copenhagen)**, v. 120, n. 4, p.423-8, 1989.

CONEGLIAN-MARISE, M. S. P.; GERARDIN, D. C. C. Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in male rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 134, p. 545–550, 2003. Part A.

CORBIER, P.; EDWARDS, D. A.; ROFFI, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. **Archive international physiology biochemistry and biophysics**, v. 100, p. 127-31, 1992.

CSABA, G.; KARABÉLYOS, C. The effect of a single neonatal treatment (hormonal imprinting) with the antihormones, tamoxifen and mifepristone on the sexual behavior of adult rats. **Pharmacology Research**, v. 43, n. 6, p. 531–3. 2001.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D.; RIBEIRO, T. M.; SETIAN, N.; Sexo cerebral: um caminho que começa a ser percorrido. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 49, n. 1, 2005.

DOHLER, K. D.; HANCKE, J. L.; SRIVASTAVA, S. S.; HOFMANN, C.; SHRYNE, J. E.; GORSKI, R. A.; Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain: neuroanatomical, neuroendocrine, and behavioral evidence. In: **Progress in Brain Research**. Sex differences in the brain p Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 99–117, v. 61.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 469 – 477.

FARABOLLINI, F.; PORRINI, S.; DESS`I-FULGHERI, F. Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol a affects behavior in male and female rats. **Pharmacology. Biochemistry. Behavior**, v. 64, p. 687–694, 1999.

FILIPPI, S.; VIGNOZZI, L.; VANNELLI, G. B.; LEDDA, F.; FORTI, G.; MAGGI, M. Role of oxytocin in the ejaculatory process. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, p. 82-6, 2003.

FITCH, R. H.; DENENBERG, V. H. A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain. **Behavior Brain Science**, v. 21, p. 311–327, 1998.

GERARDIN, D. C. C.; BERNARDI, M. M.; MOREIRA, E. G.; ODUVALDO, C. M.; PEREIRA, O. C. M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 618–623, 2006.

GERARDIN, D. C. C.; PEREIRA, O. C. M. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 309–313, 2002.

GERARDIN, D. C. C.; PEREIRA, O. C. M.; KEMPINASB, W. G.; FLORIOC, J. C.; MOREIRA, E. G.; BERNARDI, M. M. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiology and Behavior**, v. 84, p. 97–104, 2005.

GERMAIN, B. J.; CAMPBELL, P. S.; ANDERSON, J. N. Role of the serum estrogen binding protein in the control of tissue estradiol levels during postnatal development of the female rat. **Endocrinology**, v. 103, p. 1401–1410, 1978.

GIANNAKOPOULOU, M.; BOZAS, E.; PHILIPPIDIS, H.; STYLIANOPOULOU, F. Protooncogene c-fos involvement in the molecular mechanism of rat brain sexual differentiation. **Neuroendocrinology**, v. 73, p. 387–96. 2001.

GRAY, JR. L. E.; OSTBY, J. S.; KELCE, W. R. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 129, p. 46–52, 1994.

GUYTON, A. G.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1969 / 2006.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARY, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACKZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop. **Environment, Health Perspective**, v. 104, p. 715-40, 1996.

KONKLE, A. T. M.; MCCARTHY, M. M. Developmental Time Course of Estradiol, Testosterone, and Dihydrotestosterone Levels in Discrete Regions of Male and Female Rat Brain. **Endocrinology**, v. 152, p. 223–235, 2011.

MACK, C. M.; FITCH, R. H.; COWELL, P. E.; SCHROTT, L. M.; DENENBERG, V. H. Ovarian estrogen acts to feminize the female rat's corpus callosum. **Brain Research Developmental Brain Research**, v. 71, p. 115–119, 1993

MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v. 211, p. 1294-303, 1981.

MAHARJAN, R.; NAGAR, P. S.; NAMPOOTHIRI, L. Effect of Aloe barbadensis Mill. formulation on Letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 1, n. 4, p. 273-279, 2010.

MCCARTHY, M. M.; DAVIS, A. L.; MONG, J. A.; Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. **Brain Research Bulletin**, v. 4, p. 487–495, 1997.

MEISEL, R. L.; SACHS, B. D. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBILL, E.; NEWILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. P. 3-105, v. 2, Cap. 35.

MOURÃO, C. A. J.; ABRAMOV, D. M. **Fisiologia essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. P. 352 – 360.

MONIZ, A. C.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; SALZGEBER, S. A.; VAROLI, F. M. F.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. 2005. Behavioral and endocrine changes induced by perinatal fenvalerate exposure in female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 609 – 614, 2005.

MCCORMICK, C. M.; FUREY, B. F.; CHILD, M.; SAWYER, M. J.; DONOHUE, S. M. Neonatal sex hormones have 'organizational' effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. **Brain Research**, v. 105, p. 295–307, 1998.

MENDELSON, S. D. A review and reevaluation of the role of serotonin in the modulation of lordosis behavior in female rat. **Neuroscience Bio Behav Reviews**, v. 16, p. 309–50, 1992.

MERMELSTEIN, P. G.; BECKER, J. B. Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens and striatum of the female rat during paced copulatory behavior. **Behavior Neuroscience**, v. 109, p. 354–65, 1995.

Nunez, E. A.; Benassayag, C.; Savu, L.; Vallette, G.; Delorme, J. Oestrogen binding function of alpha 1-fetoprotein. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 11, p. 237–243, 1979

OLIVEIRA, A. C.; ZHOU, Q.; CARNES, K.; NIE, R.; KUEHL, D. E.; JACKSON, G. L.; ER function in the adult male rat: short- and long-term effects of the antiestrogen ICI182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. **Endocrinology**, v.143, p.2399–409. 2002.

PEREIRA, O. C. M.; CONEGLIAN-MARISE, M. S. P.; GERARDIN, D. C. C. Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in male rats. **Comparative Biochemistry And Physiology**, v. 134, p. 545-550, 2003. Part A.

PEREIRA, O. C. M.; BERNARDI, M. M.; GERARDIN D. C. C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life Sciences**, v. 78, p. 2767 – 2771, 2006.

PFAUS, J. G.; EVERITT, B. J. The psychopharmacology of sexual behavior. In: BLOOM, R. E.; KUPFER, D. J. (Eds). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. **New York Raven Press**, p. 743–58. 1995.

PHOENIX, C. H.; GOY, R. W.; GERALL, A. A.; YOUNG, W. C. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinology**, v. 65, p. 369–382, 1959.

RAYNAUD, J. P. Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. **Steroids**, v. 21, p.249–258, 1973.

ROSELLI, C. E.; KLOSTERMAN, S. A.; Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. **Endocrinology**, v. 139, p. 3193–3201, 1998.

SAKUMA, Y. Gonadal Steroid Action and Brain Sex Differentiation in the Rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, p. 410–414, 2009.

SCHLINGER, B. A.; ARNOLD, A. P. Estrogen synthesis *in vivo* in the adult zebra finch: additional evidence that circulating estrogens can originate in brain. **Endocrinology**, v. 133, p. 2610–2616, 1993.

SILVA, M. R. P.; OLIVEIRA, C. A.; FELICIO, L. F.; NASELLO, A. G.; BERNARDI, M. M. Perinatal treatment with picrotoxin induces sexual, behavioral and neuroendocrine changes in male rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 60, p. 203– 8, 1998.

SIEMENS MEDICAL SOLUTIONS DIAGNOSTICS. PITKTT-5, Los Angeles, CA, 2006. P. 42.

SIEMENS MEDICAL SOLUTIONS DIAGNOSTICS. PITKE2-8, Los Angeles, CA, 2006. P. 42.

SOMA, K. K.; SINCHAK, K.; LAKHTER, A.; SCHLINGER, B. A.; MICEVYCH, P. E. Neurosteroids and female reproduction: estrogen increases 3beta-HSD mRNA and activity in rat hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, p. 4386–4390, 2005.

SULTAN, C., BALAGUER, P., TEROUANNE, B., GEORGET, V., PARIS, F., JEANDEL, C., LUMBROSO, S., NICOLAS, J. 2001. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 178, p. 99-105.

SUMIDA, K.; WALF, A. A.; FRYE, C. A. Progestin-facilitated lordosis of hamsters may involve dopamine-like type 1 receptors in the ventral tegmental area. **Behavior Brain Research**, v. 161, p. 1– 7, 2005.

TEODOROV, E. 2008. **Maternal behavior and the role of opioid receptors on periaqueductal gray in female lactating rats**. 2008. 190 f. Doctor thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TEODOROV, E.; MORAES, A. P.; FELICIO, L. F.; VAROLLI, F. M.; BERNARDI, M. M. Perinatal maternal exposure to picrotoxin: Effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 81, p. 935 – 942, 2005.

TEODOROV, E.; SALZGEBER, S. A.; FELICIO, L. F.; VAROLLI, F. M. F.; BERNARDI, M. M. Effects of perinatal picrotoxin and sexual experience on heterosexual and homosexual behavior in male rats. **Neurotoxicology Teratology**, v. 24, p. 235– 45, 2002.

TEODOROV, E. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 81 935– 942 development, square crossing and sexual behavior of rat offspring. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 75, p. 733– 40, 2005.

TORAN-ALLERAND, C. D. Neuronal uptake of fetoprotein (AFP) synthesized and secreted by hepatocytes in liver/brain co-cultures. **Neuroscience Letters**, v. 83, p. 35– 40, 1987.

TORAN-ALLERAND, C. D. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. **Brain Research**, v. 106, p. 407–412, 1976.

UPHOUSE, L. Female gonadal hormones, serotonin, and sexual receptivity. **Brain Research Reviews**, v. 33, p. 242– 57, 2000.

WENIGER, J. P. Estrogen production by fetal rat gonads. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 44, p.459–462, 1993.

VANNIER, B.; RAYNAUD, J. P. Effect of estrogen plasma binding on sexual differentiation of the rat fetus. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 3, p. 323–337, 1975.

WHALEN, R. E.; EDWARDS, D. A. Hormonal determinants of the development of masculine and feminine behavior in male and female rats. **Anatomy Recall**, v. 157, p. 173–180, 1967.

WILLIAMS, B.; BENCE, M.; EVEREST, H.; FORREST-OWEN, W.; LIGHTMAN, S. L.; MCARDLE, C. A. GABA_A receptor mediated elevation of CA²⁺ and modulation of gonadotropin-releasing hormone action in α T3-1 gonadotropes. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, p. 159-66, 2000.

ZWAIN, I. H.; YEN, S. S. Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. **Endocrinology**, v. 140, p.880–887, 1999.