



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EWERTON FYLIPE DE ARAÚJO SILVA

**ANÁLISE MORFOFISIOLOGICA DO TESTÍCULO E CÉREBRO DE RATOS
HIPERPROLACTINÊMICOS TRATADOS COM MELATONINA EXÓGENA**

Recife
2021

EWERTON FYLIPE DE ARAÚJO SILVA

**ANÁLISE MORFOFISIOLOGICA DO TESTÍCULO E CÉREBRO DE RATOS
HIPERPROLACTINÊMICOS TRATADOS COM MELATONINA EXÓGENA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Química para Saúde

Orientador: Prof^o. Dr. Marcelo Moraes Valença.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda das Chagas A. Mendes Tenório.

Recife

2021

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, Ewerton Fylype de Araújo

Análise morfofisiológica do testículo e cérebro de ratos hiperprolactinêmicos tratados com melatonina exógena / Ewerton Fylype de Araújo Silva – 2021.

112 f.: il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Moraes Valença

Coorientador: Fernanda das Chagas A. Mendes Tenório

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021. Inclui referências e anexo

1. 2. 3. I. Valença, Marcelo Moraes (orient.) II. Tenório, Fernanda das Chagas A. Mendes (coorient.) III. Título

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-082

EWERTON FYLIPE DE ARAÚJO SILVA

**ANÁLISE MORFOFISIOLOGICA DO TESTÍCULO E CÉREBRO DE RATOS
HIPERPROLACTINÊMICOS TRATADOS COM MELATONINA EXÓGENA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 12/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Fernanda das Chagas A. Mendes Tenório (Coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Carolina Peixoto Magalhães (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - CAV

Prof^a. Dr^a. Maria Juliana Gomes Arandas (Examinador Externo)
Faculdade Novo Horizonte - FNH

Dedico este trabalho a minha esposa, Adriane Silva e minha Filha, Alice Lior Silva. Pois, elas são o meu bem mais precioso e o grande motivo da minha inspiração e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as bênçãos derramadas sobre a minha vida. Por tanto amor por mim que me fez chegar onde eu nunca sonhei. Por tua voz sempre me encorajar a prosseguir, nunca desistir de mim e me fazer atravessar todos os obstáculos. Gratidão por ter muito mais que eu mereço.

À minha família amada, minha esposa Adriane Silva e minha filha Alice Lior Silva, por serem o meu porto seguro, minha fortaleza em todo o tempo. Por serem minha inspiração e motivação diária de nunca desistir e sempre persistir. Agradeço à minha esposa pelas noites de conversas motivadoras, por sempre me dizer que eu iria conseguir, por ser a principal auxiliadora desse sonho realizado.

Agradeço aos meus pais Edivan e Sônia por me mostrarem que a educação muda primeiro a vida e depois muda o mundo. Agradeço pelo caráter formado através da educação que recebi, os incentivos incansáveis e por sempre acreditarem no meu potencial. Agradeço aos meus irmãos Tiago, Claudeane e Clarysse, por me ajudarem a esquecer um pouco o lado profissional e aprender que o amor da família é maior do que qualquer coisa.

Agradeço ao professor Dr. Marcelo Valença por todas as conversas reflexivas, momentos de aprendizado e por aceitar realizar esse sonho junto comigo. Por conversar e sempre mostrar que devemos ser melhores que nós mesmos, buscando sempre crescer, buscando sempre ser um excelente pesquisador para quem sabe “ganhar um prêmio Nobel” que tanto escutei como incentivo.

Agradeço à professora Dra. Fernanda Tenório que me incentivou, ajudou, me levantou nos momentos difíceis e me mostrou que um excelente profissional é aquele que consegue lidar com as dificuldades e mostrar o seu potencial mesmo que não consiga enxergar os resultados. Agradeço por me falar inúmeras vezes que eu chegaria lá com excelência.

Agradeço a minha amiga, professora e eterna orientadora, a Dr^a. Carolina Peixoto por todos os anos me moldando profissionalmente, o qual pude me espelhar e me tornar um profissional da área. Pelas cobranças, incentivos, reclamações, porém, muito mais do que isso. Por me ensinar que o ser humano vem antes do ser profissional.

Agradeço ao amigo, colaborador e professor Dr. Bruno Tenório pelas incríveis aulas e contribuições que fizeram com que eu pudesse realizar esse sonho.

Agradeço aos amigos e colaboradores Técnicos Vinicius, Juliette que não mediram esforços para ajudar a cuidar dos animais de estudo e me ensinar os procedimentos de maneira eficiente.

Agradeço à André e Rosane por serem fundamentais na minha profissão, como amigos de trabalho. Por me ensinarem a ter amor pela profissão que escolhemos trilhar juntos. Muito obrigado pelas várias contribuições, ensinamentos, e por me acolherem como uma família.

Agradeço à Joao Victor, Henrique, Anny, Bianca e Alessandra por serem os meus pés e mãos durante todo esse grande projeto. Por abdicarem de muitas coisas, finais de semana, feriados, para me auxiliarem nas análises de estudo. Tenho certeza dos excelentes profissionais que vocês se tornarão.

Agradeço à Maria Luísa (Malu), Arthur, Anderson e ao professor Rubem Guedes, pelos longos dias no laboratório de fisiologia, pela grande contribuição como o nosso trabalho e por todos os ensinamentos adquiridos ao longo dessa jornada.

Agradeço a todos os Professores e Monitores de anatomia humana do CAV por fazerem do nosso ambiente, o melhor que eu conheço. Por mostrarem que a anatomia não é apenas uma disciplina básica da graduação, mas sim uma casa, onde crescemos como família, e também por me ajudarem diretamente nas pesquisas e desafios.

Agradeço ao TAE's do CAV pela excelência como profissionais o qual aprendo diariamente afim de me tornar um profissional melhor.

Agradeço à Adenilda, excelente secretária da pós-graduação, que com bastante afinho, sempre me auxiliou durante o tempo de estudo.

Agradeço a todos os meus Amigos que são fundamentais na minha vida. Pelos momentos de risadas, brincadeira, e de grande crescimento. Muito obrigado por fazerem da minha vida a melhor.

Aos meus animais, a quem tanto cuidei com dedicação e zelo pela vida de cada um. Sou grato por fazerem parte da minha experiência no campo da ciência, guardo cada momento no meu coração e na memória.

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo”.

Colossenses 3:23-24

RESUMO

A reprodução de vários animais depende diretamente nos níveis de hormônios relacionados à reprodução, circulantes no organismo. No entanto, existem hormônios que tem demonstrado ser fundamental na reprodução como a prolactina (PRL) hormônio produzido pelos lactótrofos da adenohipófise e melatonina (MEL), hormônio produzido pela glândula pineal. Além de atuarem na reprodução, estudos relatam que estes hormônios podem influenciar na fisiologia do sistema nervoso bem como em reparos do mesmo durante lesões provocadas por doenças neurodegenerativas. Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo analisar a morfofisiologia do testículo e encéfalo de ratos hiperprolactinêmicos e tratados com melatonina exógena. Foram utilizados 64 ratos Wistar. A indução à hiperprolactinemia foi feita com Domperidona, na dose 4mg/kg com injeção subcutânea (SC). O tratamento com melatonina foi realizado na dose 200µg/100g com injeção SC, durante 30 e 60 dias. Os animais foram anestesiados para a realização da análise da depressão alastrante cortical (DAC) encefálica e posterior coleta de sangue para dosagens hormonais por meio de Kit's comerciais, prosseguindo com a eutanásia para obtenção dos testículos e encéfalos para posterior análise histomorfométrica. Os resultados observados no estudo demonstraram haver alterações no parênquima testicular de ratos hiperprolactinêmicos, com lesões celulares como aumento de células em processo degenerativo, aumento de compartimento intertubular, além de redução área e comprimento tubular, epitélio seminífero, morfológica das estruturas gonadais. Esses danos foram reduzidos nos grupos hiperprolactinêmicos tratados com melatonina demonstrando seu papel protetor. Os resultados da DAC demonstraram uma diminuição do grupo tratado com melatonina em relação aos outros grupos e um aumento significativo na velocidade de propagação nos animais hiperprolactinêmicos. Dessa forma, conclui-se que a hiperprolactinemia provocou degeneração testicular, além tornar o córtex mais susceptível à propagação da DAC. E que dosagens exógenas de melatonina demonstraram diminuir a velocidade da DAC tornando-o menos susceptível a propagação, evidenciando sua propriedade antioxidativa e neuroprotetora. Além de causar efeitos benéficos na proteção das estruturas morfológicas e fisiológicas nas gônadas masculina.

Palavras-chave: Reprodução. Gônadas. Prolactina. Melatonina. Sistema nervoso.

ABSTRACT

The reproduction of various animals depends directly on the levels of hormones related to reproduction, circulating in the body. However, there are hormones that have been shown to be fundamental in reproduction, such as the prolactin (PRL) hormone produced by the adenohypophysis lactotrophs and melatonin (MEL), a hormone produced by the pineal gland. In addition to acting on reproduction, studies report that these hormones can influence the physiology of the nervous system as well as its repair during injuries caused by neurodegenerative diseases. Thus, this research aimed to analyze the morphophysiology of the testis and brain of hyperprolactinemic rats treated with exogenous melatonin. 64 Wistar rats were used. Induction of hyperprolactinemia was performed with Domperidone, at a dose of 4mg / kg with subcutaneous injection (SC). Treatment with melatonin was carried out at a dose of 200µg / 100g with SC injection, for 30 and 60 days. The animals were anesthetized for the analysis of the spreading cortical depression (CAD) in the brain and subsequent blood collection for hormonal dosages by means of commercial Kit's, proceeding with euthanasia to obtain the testicles and brains for later histomorphometric analysis. The results observed in the study demonstrated changes in the testicular parenchyma of hyperprolactinemic rats, with cellular lesions such as increased cells in a degenerative process, increased intertubular compartment, in addition to reduced tubular area and length, seminiferous epithelium, and morphological gonadal structures. These damages were reduced in the hyperprolactinemic groups treated with melatonin, demonstrating their protective role. The results of CAD demonstrated a decrease in the group treated with melatonin in relation to the other groups and a significant increase in the speed of propagation in hyperprolactinemic animals. Thus, it is concluded that hyperprolactinemia caused testicular degeneration, in addition to making the cortex more susceptible to the spread of CAD. And that exogenous dosages of melatonin have been shown to decrease the speed of CAD making it less susceptible to spread, showing its antioxidant and neuroprotective properties. In addition to causing beneficial effects on the protection of morphological and physiological structures in male gonads.

Keywords: Reproduction. Gonads. Prolactin. Melatonin. Nervous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Regulação hormonal da espermatogênese.....	19
Figura 2 –	Imagem esquemática de uma secção transversal de túbulo seminífero fértil demonstrando a espermatogênese nos vários estágios de diferenciação.....	20
Figura 3 –	Composição do parênquima testicular.....	24
Figura 4 –	Visão tridimensional da melatonina (MEL).....	39
Figura 5 –	Sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC).....	45

Artigo 1

Figura 1 –	Fotomicrografia de testículo de ratos tratados por 30 dias (Controle: A e B), (Hiper: C e D) e (Hiper+Mel: E e F).....	70
Figura 2 -	Fotomicrografia de testículo de ratos tratados por 60 dias (Veículo: A e B), (Hiper: C e D) e (Hiper+Mel: E e F).....	71
Figura 3 –	Análise de peso dos animais experimentais.....	72
Figura 4 –	Dosagens hormonais dos ratos wistar experimentais.....	77

Artigo 2

Figura 1 –	Esquema do registro eletrofisiológico da DAC.....	95
Figura 2 –	Velocidade (mm/min) de propagação da depressão alastrante cortical (DAC) nos grupos de ratos experimentais tratados por 30 e 60 dias.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Causas da Hiperprolactinemia.....	29
------------	-----------------------------------	----

Artigo 1

Tabela 1 –	Avaliações Histopatológicas dos grupos tratados por 30 e 60 dias representado pelo percentual de animais com lesões (%).....	69
Tabela 2 –	Parâmetros biométricos e histomorfométricos do testículo de ratos controle e tratados por 30 e 60 dias.....	73
Tabela 3 –	Volume (µL) dos componentes testiculares de ratos controle e tratados por 30 e 60 dias.....	74
Tabela 4 –	População celular por secção transversal dos túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero em ratos experimentais tratados por 30 e 60 dias.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	micrometro
µm ²	Micrometro ao quadrado
AANAT	aril-aquil-n-acetiltransferase
ABP	proteínas ligadoras de andrógenos
ANOVA	Análise de Variância
BC	Biblioteca Central
Ca ²⁺	Cálcio na forma Iônica
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CSD	<i>Cortical Spreading Depression</i>
CFG	cromatografia de filtração em gel
D2Rs	Receptor de dopamina D2
DAC	Depressão Alastrante Cortical
dL	decilitro
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Dr.	doutor
Dr ^a	doutora
ECLIA	Eletroquimioluminescência
EcoG	Eletrocorticograma
ed.	edição
ERO	espécies reativas de oxigênio
et al.	e outro
etc.	etecetera
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	gramas
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GH	hormônio do crescimento
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	hora
HE	Hematoxilina e eosina
HI	hiperprolactinemia idiopática
HIOMT	hidroxi-indol-oxi-metiltransferase
Hiper	Animais hiperprolactinemicos
Hiper+Mel	Animais hiperprolactinemicos tratados com melatonina
hPRL	Prolactina Humana
IGS	Índice gonadossomático
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Kilodalton
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
m	metro
MEL	melatonina
mg	miligramas

min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetros
MT1	Receptor de membrana da melatonina 1
MT2	Receptor de membrana da melatonina 2
mv	milivolt
ng	nanograma
nm	nanometro
NSQ	núcleo supraquiasmático hipotalâmico
núm.	número
°C	Graus Celsius
OH-	Radical hidroxila
p.	página
PAS	Ácido periódico de Shiff
PEG	precipitação sérica de polietilenoglicol
pg	picograma
PIF	Principais fatores de inibição
PL	lactogênios placentários
PLPs	proteínas semelhantes ao PRL
PRF	principais fatores de liberação
PRL	prolactina
Prof ^a	professora
Prof ^o	professor
PRPs	proteínas relacionadas a PRL
RNA	Ácido ribonucleico
ROO-	Radical peroxila
SNC	Sistema nervoso central
SOP	pacientes com ovários policísticos
SPD Ar	Espermátides arredondadas
SPT I P	Espermatócitos I, na fase de paquíteno
SPT I PI/L	Espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno
T	Testosterona
TC	Tomografia computadorizada
TFH	tireotrofina
TRH	hormônio liberador de tirotropina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
v.	volume
VIP	Peptídeo vasoativo
VLV	Variação lenta de voltagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE.....	18
2.2	PROLACTINA.....	24
2.2.1	Síntese e secreção da prolactina.....	26
2.2.2	Regulação da secreção da prolactina.....	27
2.2.3	Níveis anormais de prolactina.....	27
2.2.3.1	Hipoprolactinemia.....	27
2.2.3.2	Hiperprolactinemia.....	28
2.3	DOMPERIDONA.....	37
2.3.1	Efeitos adversos do uso da domperidona no sistema nervoso.....	38
2.4	MELATONINA.....	38
2.4.1	Mecanismo de ação da melatonina.....	41
2.4.2	Melatonina e reprodução.....	42
2.5	FENÔMENO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC).....	44
	REFERÊNCIAS.....	47
3	ARTIGO 1 - EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA NA HISTOPATOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA TESTÍCULAR DE RATOS ADULTOS COM HIPERPROLACTINEMA INDUZIDA POR DOMPERIDONA.....	60
4	ARTIGO 2 - ANÁLISE DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL DE RATOS INDUZIDOS À HIPERPROLACTINEMIA E TRATADOS COM MELATONINA.....	89
APÊNDICE A	ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT.....	103
ANEXO A	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	112

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as taxas globais de fertilidade têm caído em decorrência a vários fatores. As estimativas globais indicam que entre 48,5 a 74,2 milhões de casais sofrem com infertilidade (LOTTI; MAGGI, 2018; STARC et al., 2019).

Estudos populacionais sugerem que a infertilidade afeta entre 9,3% e 16,7% dos casais provenientes em países em desenvolvimento e países desenvolvidos, respectivamente (BOIVIN et al., 2007; LOTTI; MAGGI, 2018; STARC et al., 2019). Grande parte dos problemas relacionados à fertilidade em casais com idade reprodutiva são geralmente acometidos por problemas de infertilidade masculina.

Dados indicam que a subfertilidade masculina desempenha um papel contributivo em até 50% dos casos. Segundo Lotti e Maggi (2018) até 12% dos homens são afetados pela infertilidade e o problema de azoospermia (não produção de espermatozóide) apresenta os maiores índices de distúrbios gerais de saúde, associados a um aumento da prevalência de disfunção sexual (LOTTI; MAGGI, 2018). Do percentual de homens inférteis, 10% deles apresentavam problemas de produção espermática, além de danos testiculares reversíveis (ESTEVES; MIYAOKA; ASHOK, 2011; TENORIO et al., 2014; STARC et al., 2019).

Os testículos de mamíferos são componentes vitais à sua reprodução e por consequência à perpetuação destes espécimes. As funções desse órgão são controladas por hormônios sintetizados nos próprios órgãos ou em outras glândulas. A prolactina (PRL) e a melatonina (MEL) são hormônios importantes que influenciam no desenvolvimento e controle das funções gonadais.

A PRL é um hormônio produzido pelos lactótrofos da adenohipófise e possui um controle neuroendócrino exclusivo, onde está predominantemente sob inibição hipotalâmica devido aos efeitos da dopamina (GRATTAN; KOKAY, 2008; VILAR et al., 2019). Esse hormônio influencia várias funções gonadais, dentre elas a modulação dos receptores FSH e LH nas células de Sertoli e Leydig. (STOCCO et al., 2005; YU et al., 2018; RAUT et al., 2019).

O aumento nos níveis séricos de PRL desencadeia uma condição patológica chamada de hiperprolactinemia que está relacionado diretamente ao aparecimento de implicações clínicas de fertilidade de grande relevância, como hipogonadismo hipogonadotrófico adquirido (VILAR et al., 2018; VILAR et al., 2019), estando presente em 1,5% de pacientes com disfunção erétil (GLEZER; BRONSTEIN, 2012;

VILAR et al., 2019). Estudos relataram que a hiperprolactinemia interrompe a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina, inibe a liberação dos hormônios luteinizante, folículo estimulante, e reduz diretamente a esteroidogênese gonadal (BRASIL, 2015; VILAR et al., 2019).

Além dos efeitos gonadais, a hiperprolactinemia tem demonstrado afetar o sistema nervoso. Segundo Montalvo *et al.* (2018) o aumento dos níveis de prolactina está diretamente relacionado à diminuição nos scores cognitivos. Estudos realizados por Sobrinho (1993), demonstraram que em mamíferos, a prolactina está associada com aumento da secreção de glicocorticoides, como a corticosterona. Sabe-se que os glicocorticoides estão relacionados a respostas ao estresse. E que o tratamento com glicocorticoides aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em cultura de hipocampo e córtex cerebral (MCINTOSH; SAPOLSKY, 1996), e diminui a atividade de enzimas antioxidantes cerebrais (MCINTOSH; HONG; SAPOLSKY, 1998).

No entanto, além da prolactina, a melatonina (MEL) tem demonstrado ser fundamental na reprodução e no sistema nervoso. É um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal e é encontrado no tecido testicular, líquido folicular e plasma seminal, sendo crucial para o funcionamento eficiente da reprodução (SOARES JR. et al., 2003; IWASAKI et al., 2005; GONZALEZ-ARTO et al., 2017; MURATOĞLU; DIZAKAR; AKTAN, 2019). A MEL atua diretamente nos testículos, decorrente da sua propriedade lipofílicas e hidrofílicas, atravessando a barreira hematotesticular. As funções mais conhecidas referentes a MEL são referentes ao efeito antienvelhecimento (TAMURA et al., 2017), antioxidante (LI et al., 2016), antiinflamatório (CARLONI et al., 2016) e antiapoptótico (CHEN et al., 2019), etc.

A MEL apresenta propriedades importantes na proteção neuronal, decorrente de sua ação antioxidante (LI et al., 2016), a qual auxilia na limpeza de radicais livres, estimulando a transcrição e atividades de enzimas antioxidantes, ligação a metais de transição que inibem a formação de radical hidroxila (RODRIGUEZ et al., 2004). Além de proteger lipídios, proteínas (participando do sistema ubiquitina-proteassoma) e DNA de danos oxidativos. Estudos demonstraram que a melatonina é secretada nas mitocôndrias do cérebro de camundongos e age através de um receptor de melatonina da membrana externa mitocondrial 1 (MT1), com capacidade de prevenir o vazamento do citocromo C e apoptose subsequente (SUOFU et al., 2017).

A compreensão das implicações negativas que a hiperprolactinemia pode causar nas gônadas e os efeitos protetores da melatonina em vários sistemas, dentre eles, no sistema nervoso e reprodutor, pode trazer novas informações acerca da atuação da melatonina frente a hiperprolactinemia, podendo tornar-se viável a utilização destes procedimentos na profilaxia e/ou cura do processo de degeneração testicular e de novos adventos acerca das condições patológicas no sistema nervoso.(VILAR et al., 2019)

Devido a importância dos temas abordados e a escassez de estudos nesta área, a presente pesquisa teve como objetivo analisar a morfofisiologia do testículo e encéfalo de ratos induzidos a hiperprolactinemia e tratados com melatonina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a morfofisiologia do testículo e encéfalo de ratos induzidos a hiperprolactinemia e tratados com melatonina.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.1.2.1 Artigo 1

- Avaliar histopatológica e histomorfometricamente o testículo dos animais experimentais;
- Analisar os níveis hormonais de testosterona e prolactina no sangue dos animais experimentais.

1.1.2.2 Artigo 2

- Avaliar o fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC) nos encéfalos dos animais experimentais;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE

Nos mamíferos as gônadas sexuais masculinas são chamadas de testículos e constituem um órgão par. Esses órgãos são protegidos por um tecido tênue, chamado de escroto, o qual é responsável por manter a temperatura ideal para a produção de espermatozoides viáveis (SCANLON; SANDERS, 2007). Histologicamente, os testículos estão revestidos por um tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. O parênquima testicular apresenta dois compartimentos: o compartimento intertubular, que é constituído por células de Leydig, células do tecido conjuntivo e alguns vasos sanguíneos e linfáticos, e o compartimento tubular, constituído pelos túbulos seminíferos, que apresenta todas as células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides) e as células de Sertoli. A proporção e a quantificação destes elementos podem ser obtidas a partir das medidas morfométricas (RUSSEL et al., 1990).

O espermatozoide é a estrutura celular da reprodução nos machos. Essa célula se desenvolve a partir de células tronco testiculares através da proliferação e diferenciação celular, processo chamado de espermatogênese (SCHULZ; MIURA, 2002). As células germinativas masculinas iniciam o seu desenvolvimento a partir de um reservatório renovável de células tronco no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, desde a puberdade até a vida senil (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003; NETO et al., 2016). Todo o processo espermatogênico normalmente requer aproximadamente um tempo médio de 42 a 76 dias. E a estimativa diária de espermatozoide varia de 150 a 275 milhões (NETO et al., 2016). Esse processo é complexo e depende do código genético das células germinativas, de uma rede de comunicação com as células somáticas do testículo e de uma complexa e interligada rede de interação endócrina, parácrina e autócrina (VERHOEVEN et al., 2007; ROSER, 2008; NETO et al., 2016).

A espermatogênese dos mamíferos depende da atuação de vários peptídeos e hormônios esteroides, necessários para o desenvolvimento e funcionamento das células germinativas e somáticas do testículo (Figura 1). A glândula pineal secreta a melatonina (MEL), que age no hipotálamo regulando a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), este age na hipófise regulando o hormônio luteinizante (LH)

e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH se liga aos receptores nas células de Leydig estimulando a produção de andrógenos e estrógenos, enquanto que o FSH se liga as células de Sertoli para estimular qualitativamente a espermatogênese e modular a produção de estrógenos, inibina e activina (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; ROSER, 2008; NETO et al., 2016).

O LH (via testosterona) e o FSH são os principais hormônios que regulam a espermatogênese (VERHOEVEN et al., 2007a). O LH é modulado pela ação da testosterona no hipotálamo (inibindo o GnRH) e hipófise (inibindo o LH). A modulação do FSH é realizada pela inibina (que atua inibindo) e activina (que atua estimulando) na hipófise (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; ROSER, 2008). Nos machos, a expressão dos receptores para FSH é limitada às células de Sertoli e os receptores para LH são encontrados principalmente nas células de Leydig, apesar de também serem observados em células germinativas (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004).

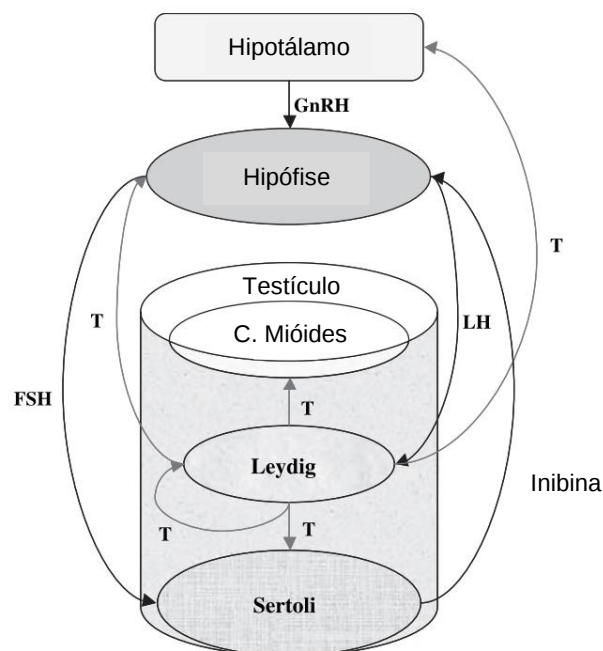


Figura 1. Regulação hormonal da espermatogênese. A maioria dos hormônios mostrados pode ter efeitos positivos e negativos, tanto no nível de ativação / dessensibilização do receptor, quanto através da ativação e repressão de alvos a jusante. GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; T, testosterona. FONTE: (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004).

A espermatogênese (Figura 2) é funcional e morfologicamente dividida em 3 fases: espermatogonial, espermatocitária e espermiogênica; cada fase é controlada por mecanismos reguladores específicos (NETO et al., 2016).

1. Fase espermatogonial: Essa fase é caracterizada pela proliferação das células germinativas. As espermatogônias são os progenitores diploides de todos os outros tipos de células germinativas. Elas se multiplicam continuamente em sucessivas mitoses e as células filhas permanecem interconectadas por pontes citoplasmáticas (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003; NETO et al., 2016). As espermatogônias são classificadas em quatro tipos: Espermatogônia indiferenciada tipo A (única, pareada, alinhada), espermatogônia diferenciada tipo A (A1, A2, A3, A4), espermatogônia intermediária e espermatogônia tipo B. As do tipo A são o reservatório de células tronco da espermatogênese e as espermatogônias tipo B dão início ao desenvolvimento das células germinativas (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

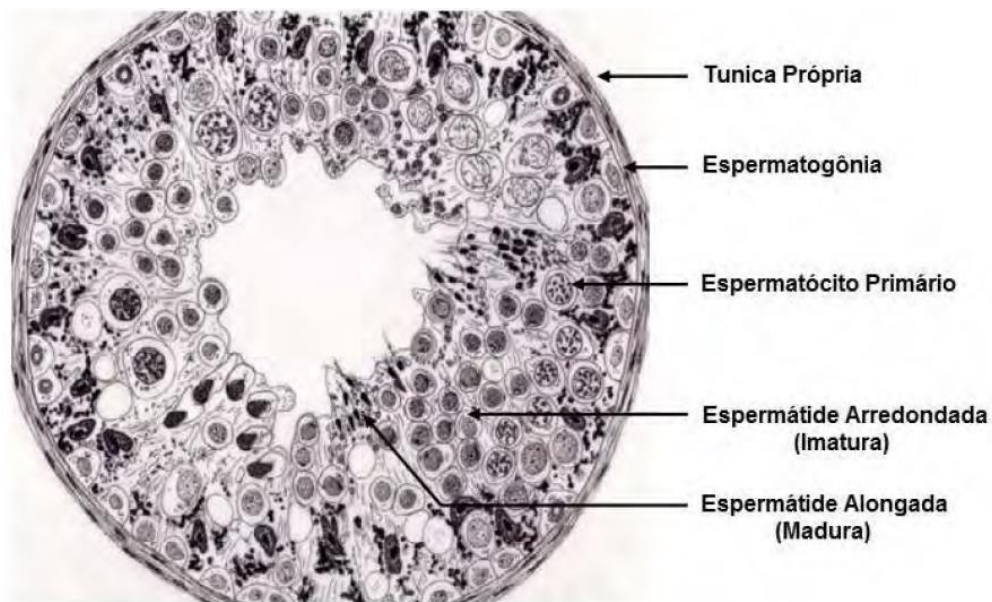


Figura 2. Imagem esquemática de uma seção transversal de túbulo seminífero fértil demonstrando a espermatogênese nos vários estágios de diferenciação. FONTE: Adaptado de Holstein, Schulze e Davidoff (2003).

2. Fase espermatocitária: Essa fase é caracterizada pela presença dos espermatócitos, células formadas por duas meioses das células germinativas. Antes da primeira divisão, denominada espermatócito primário e antes da segunda divisão, espermatócito secundário (SCHULZ; MIURA, 2002). A primeira meiose é caracterizada pela separação dos cromossomos paternos e maternos, que ocorre durante a fase espermiogênica. A meiose dos espermatócitos começa com a fase de

leptóteno da prófase no compartimento basal do epitélio seminífero. Após passar a junção de oclusão das células de Sertoli, os espermatócitos continuam as fases de zigóteno, paquíteno e diplóteno, ocorrendo a reduplicação do DNA, condensação da cromatina, pareamento dos cromossomos homólogos e “*crossing over*” (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003b).

3. Fase espermiogênica: Nessa fase acontece a formação de espermatozoides a partir da diferenciação das espermatídes. Esse processo acontece sem divisão celular, é apenas caracterizado pela perda de 80-90% do volume celular (SCHULZ; MIURA, 2002) e 98% do volume nuclear (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005; NETO et al., 2016). Essa diferenciação celular acontece decorrente da condensação da cromatina nuclear, formação do capuz acrossômico pelo Golgi e seu ajuste ao núcleo, desenvolvimento do flagelo e sua implantação no núcleo. Posteriormente ocorre a espermição, quando as espermatídes alongadas são liberadas no lúmen dos túbulos seminíferos. A liberação dos espermatozoides no lúmen ocorre através da movimentação das espermatídes pelos filamentos intermediários e os túbulos citoplasmáticos das células de Sertoli. As espermatídes alongadas aproximam suas pontes intercelulares, se desconectam do epitélio seminífero e se tornam espermatozoides livres (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005; HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003b; NETO et al., 2016).

Os túbulos seminíferos são formados por células germinativas que formam arranjos dos estágios do ciclo do epitélio seminífero. Esses estágios podem ser segmentados (um estágio por secção transversal do túbulo) como acontece em ratos, ou helicoidais como ocorre na espécie humana (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

O ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie-específica sob controle do genótipo de cada célula germinativa (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Como esse ciclo é formado por associações celulares, as mesmas podem ser classificadas através de características morfológicas do núcleo das espermatídes ou através do método do desenvolvimento do sistema acrossômico. No primeiro, são observados oito estágios para todas as espécies, e no segundo, o número de estágios é variado entre espécies (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

As células de Sertoli são consideradas indispensáveis para a espermatogênese e ocupam de 17 a 20% do epitélio dos túbulos seminíferos no adulto (Figura 3) (NETO et al., 2016). Essas células apresentam um formato irregular, alinhamento polarizado com sua base voltada para a membrana basal e o ápice voltado para o lúmen do

túbulo. Outra característica distinta são os nucléolos proeminentes, que são facilmente identificados nas lâminas histológicas (NETO et al., 2016). Essas células formam as junções de oclusão (barreira hemato-testicular), constituídas de desmossomos, junções do tipo “gap” e junções à base de actina. Essa barreira hemato-testicular regula a passagem de proteínas e outras biomoléculas, mantém a polaridade celular e separa as células germinativas pós-meióticas da circulação sistêmica, promovendo um microambiente adequado para o desenvolvimento das células germinativas, e evitando uma resposta autoimune (LUI; CHENG, 2007).

As células de Sertoli também desempenham funções como o fornecimento de nutrientes, suporte físico (sustentação) para as células germinativas, mediação do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona na espermatogênese, participação ativa no processo de espermiacção, fagocitose das células germinativas em apoptose e incorporação e digestão de pequenos fragmentos das espermátides contendo grânulos de RNA, mitocôndrias, gotículas de lipídeos e membranas liberados durante a espermiacção (corpos residuais) (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; NETO et al., 2016).

As células de Sertoli secretam fluidos no lúmen tubular que tem a função de servir como veículo para o transporte dos espermatozoides, maturação espermática e possui importante função no epidídimo. A secreção de fluidos também ocorre em direção ao compartimento intertubular, participando de mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares, como as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, células peritubulares mióides e as células de Leydig (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005; NETO et al., 2016).

As glicoproteínas inibina e activina também são produzidas pelas células de Sertoli, ambas apresentam atividades endócrinas, parácrinas e autócrinas, influenciando a folostatina, o FSH da hipófise, a esteroidogênese nas células de Leydig e a espermatogênese. As células de Sertoli também produzem a transferrina, uma proteína que fornece ferro como componente nutricional para células germinativas, a ausência de transferrina reduz a quantidade de células germinativas e a espermiacção (ROSER, 2008; NETO et al., 2016).

As células de Leydig (Figura 3) são localizadas no compartimento intertubular em posições estratégicas, próximas a vasos sanguíneos e túbulos seminíferos. Essas células tem formato poligonal e apresentam características consistentes com sua função como fonte primária de testosterona em homens, principal andrógeno

responsável pela função reprodutiva (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; NETO et al., 2016). As células de Leydig sintetizam e secretam testosterona em resposta ao acoplamento do hormônio luteinizante (LH) ao seu receptor na membrana (SVECHNIKOV et al., 2010). A produção de testosterona é estimulada pelo LH e inibida através de um processo de retroalimentação negativa realizada pela própria testosterona na adenohipófise e no hipotálamo. Esse hormônio pode ser armazenado no compartimento intratesticular ou liberado na corrente sanguínea. (ROSER, 2008; NETO et al., 2016). Os testículos secretam entre 3-10 mg / dia de testosterona, representando mais de 95% do total de testosterona circulante em homens pós-púbere (NETO et al., 2016).

A diferenciação das células de Leydig ocorre em três ondas, a primeira é entre 8 a 18 semanas de gestação, sendo responsável pela diferenciação sexual secundária masculina. A segunda onda ocorre nos primeiros 2-3 meses após o nascimento, em resposta ao aumento simultâneo do LH. Essa onda é responsável pela impressão hormonal do hipotálamo, fígado e próstata. A terceira ocorre por conta da maturação do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, durante a puberdade (NETO et al., 2016). Além dessas funções, essas células participam da masculinização do cérebro, comportamento sexual, início, processamento e manutenção quantitativa da espermatogênese, diferenciação dos órgãos genitais masculinos, características sexuais secundárias, manutenção funcional do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias. Originadas de células precursoras e células de Leydig neonatais regredidas, as células de Leydig adultas persistem ativas ao longo da vida. (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003; HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005; NETO et al., 2016).

O testículo apresenta outros tipos celulares, tais como células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células que compõem fibras nervosas, vasos linfáticos e vasos sanguíneos (Figura 3). Os linfócitos normalmente estão ausentes no testículo, podendo ser encontrados na forma de infiltrados em casos de lesões patológicas (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003; FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005; NETO et al., 2016).

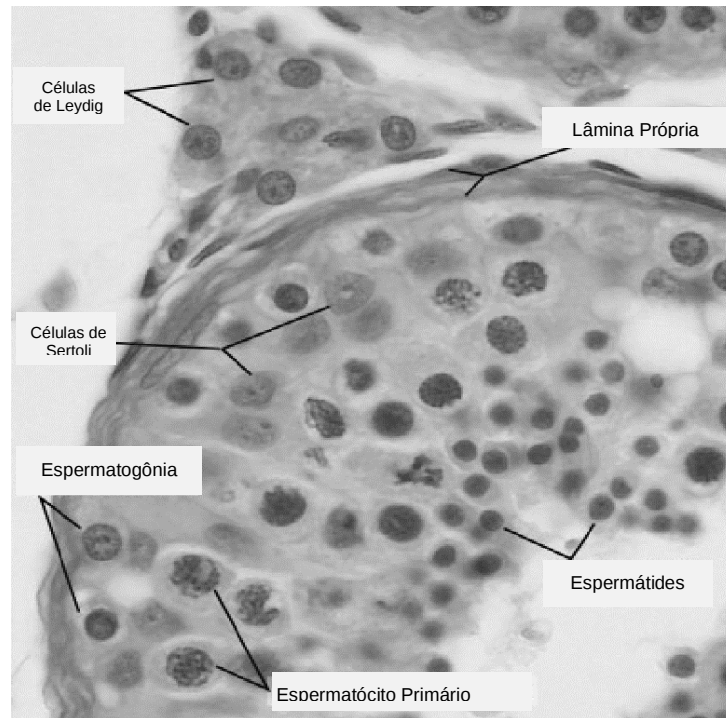


Figura 3. Composição do parênquima testicular. FONTE: Modificado de (YOUNG et al., 2007).

2.2 PROLACTINA

A prolactina (PRL) foi descrita primeiramente por Striker e Gueter (1928) como um hormônio sintetizado principalmente pelas células lactotróficas da hipófise anterior (adenohipófise), sendo a sua principal função nos mamíferos, a estimulação da lactação (STRICKER; GUETER, 1928). Posteriormente, observou-se que esse hormônio polipeptídico, composto por 199 aminoácidos e três pontes bissulfídicas é atuante também na formação do lóbulo-alveolar dos ductos lactíferos durante a gestação e na proliferação e diferenciação das células mamárias relacionadas a lactação (ORMANDY et al., 2003).

Atualmente já se tem o conhecimento de mais de 300 funções da prolactina, através de estudos realizados com vários modelos animais. Portanto, a ação da PRL é muito mais ampla, age tanto em processos reprodutivos como não reprodutivos (BERNARD; YOUNG; BINART, 2019).

A PRL tem papel importante na regulação das funções gonadais, participando da esteroidogênese e diminuição dos níveis de esteroides sexuais durante o ciclo menstrual, além da produção e imunorregulação de esteroides ovarianos, formação e

degradação do corpo lúteo e modulação dos efeitos das gonadotrofinas, estimulando também o processo de ovulação, implantação e desenvolvimento placentário (TENORIO et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a PRL pode regular genes em múltiplos eventos ovarianos, estimular o crescimento, desenvolvimento e o metabolismo do feto, além de participar do transporte de água pela membrana fetal. Possuindo também, efeito antiapoptótico em várias células, incluindo células epiteliais mamárias e linfomas (TENORIO et al., 2015).

As ações da PRL nas gônadas masculinas ainda são pouco conhecidas, ultimamente vários estudos realizados em animais e humanos tem mostrado que a PRL modula positivamente vários aspectos da função testicular, o qual sugere um importante fator na fisiologia do aparelho reprodutor masculino (RAUT et al., 2019). Experimentos realizados com camundongos nocautes PRL-R machos, implicaram em infertilidade, propondo um papel importante da PRL na espermatogênese (RASTRELLI; CORONA; MAGGI, 2015). Pesquisas iniciais em gônadas masculinas evidenciaram que a PRL modula os receptores FSH e LH nas células de Sertoli e Leydig, e está envolvido na meiose de células germinativas, regulando várias funções dos testículos, porém não havia clareza se a PRL era secretada, produzida ou apenas armazenada nos testículos (DOMBROWICZ et al., 1992; GUILLAUMOT; TABONE; BENAHMED, 1996). Em outros estudos mais atuais com camundongos pré-púberes e adultos, observou-se que havia transcrição da PRL nas células de Leydig, espermatogônia, espermatozoides de paquíteno e preleptoteno (ISHIDA et al., 2010).

Estudos atuais sobre atuações da PRL têm evidenciado o seu importante papel na manutenção do equilíbrio hídrico, homeostase metabólica, incluindo controle do peso corpóreo, atuação no tecido adiposo, além da estimulação e proliferação de células secretoras de insulina no pâncreas. Atua também na glândula lacrimal, pele, folículos pilosos, metabolismo fosfocálcico, além de comportamento materno e resposta adrenal ao estresse, sendo presente na atividade normal e de tumores da próstata (FERRARIS et al., 2013; TENORIO et al., 2015; HYSLOP et al., 2016; BERNARD; YOUNG; BINART, 2019).

A PRL apresenta consideravelmente, uma estrutura homologa aos lactogênios placentários (PL), ao hormônio do crescimento (GH), proteínas semelhantes ao PRL (PLPs) e proteínas relacionadas a PRL (PRPs). Todos originários de uma família comum de genes, compartilhando características biológicas relacionadas com suas propriedades funcionais. Isso faz com que a PRL participe com eles de algumas

atividades biológicas (TRIEBEL et al., 2015). Essas proteínas, dependendo da espécie, apresentam cadeias com 190 a 199 aminoácidos, contendo um resíduo de triptofano e duas pontes dissulfetos homologas (ORMANDY et al., 2003).

As prolactinas já identificadas apresentam cadeias com 197 a 199 aminoácidos, contendo 6 cisteínas formando 3 ligações dissulfetos intramoleculares (Cys 4-11, 58-174 e 191-199 na hPRL). Entretanto, a prolactina humana (hPRL) é predominantemente hipofisária, representando cerca de 90% do hormônio secretado. Esse hormônio apresenta uma isoforma com cadeia com 199 aminoácidos com peso molecular de 23 KDa, tendo uma estrutura primária conservada entre diversas espécies, compartilhando por exemplo, 74% da identidade entre a prolactina humana e bovina, (DIAKONOVA, 2015). Todas essas proteínas são expressas na hipófise ou região não hipofisária.

Em humanos, no cromossomo 6, apenas um único gene de PRL é expresso. Entretanto, em roedores, muitos genes relacionados a PRL são agrupados no cromossomo 13 e 17 de ratos e camundongos. (DIAKONOVA, 2015). Outras isoformas da PRL incluem uma com peso molecular de 56 KDa e uma macroprolactina de 150-170 KDa. Essa última é constituída por um complexo de prolactina monomérica, e apresenta uma menor atividade biológica quando comparado com as de menor peso molecular (COSTANZA et al., 2015).

2.2.1 Síntese e secreção da prolactina

A PRL é sintetizada e secretada principalmente por células especializadas, localizadas na adenohipófise, chamadas de lactótrofos (HYSLOP et al., 2016; BERNARD; YOUNG; BINART, 2019). Entretanto, esse hormônio é produzido por vários outros órgãos, como o olho, células decíduais uterinas e placentárias, linfócitos, e células epiteliais de câncer de mama (TENORIO et al., 2015). Além de função hormonal, a PRL tem propriedades de fator de crescimento, neurotransmissor ou imunomodulador (DIAKONOVA, 2015), sendo assim, a PRL pode atuar paracrinamente sobre as células adjacentes, ou como função autócrina, atuando sobre a própria célula secretora (HYSLOP et al., 2016); BERNARD; YOUNG; BINART, 2019).

2.2.2 Regulação da secreção da prolactina

A secreção e proliferação das células lactotróficas é controlada pelo hipotálamo, pois a mesma contém os principais fatores de liberação (PRF) e inibição (PIF), sendo o hormônio liberador de tireotrofina (TFH), peptídeo vasoativo (VIP), a β 1-endorfina e o peptídeo isoleucina histidina, as principais substâncias estimulantes da liberação de PRL (COSTANZA et al., 2015; BERNARD; YOUNG; BINART, 2019). O principal PIF aceito é a dopamina, que é sintetizada pelos neurônios TIDA (tuberoinfundibular dopaminérgicos) e secretado na corrente sanguínea através do sistema porta-hipofisário. Porém o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a somatostatina também foram descritos como outros PIFs (BERNARD; YOUNG; BINART, 2019; SAMPERI; LITHGOW; KARAVITAKI, 2019).

Os receptores de dopamina (D2Rs) localizados na superfície das células lactotróficas, realizam a função inibitória da dopamina sobre a secreção da PRL. Entretanto, a PRL exerce uma função de retroalimentação negativa sobre sua própria secreção, pois a mesma estimula a secreção de dopamina hipotalâmica via PRL-Rs, localizada nas membranas dos neurônios TIDA (BERNARD; YOUNG; BINART, 2019).

Existem outros sistemas que atuam na regulação da secreção da PRL. Ela pode ser secretada mediante a resposta ao estresse, entretanto esse mecanismo pelo qual se tem a secreção e as células alvo afetadas, ainda não é eficientemente elucidado (BERNARD; YOUNG; BINART, 2019).

Estudos realizados com camundongos que sofreram período curto de estresse de restrição, demonstraram um aumento na concentração da PRL circulante (KIRK et al., 2017; BERNARD; YOUNG; BINART, 2019). Esse aumento nos níveis da PRL decorrente da indução ao estresse, interage tanto com os alvos centrais (núcleo arqueado e eminência mediana) quanto com os alvos periféricos (zona fasciculada do córtex da suprarrenal). Entretanto, a restrição do estresse resultou na diminuição da secreção da prolactina, sugerindo um fator inibitório (KIRK et al., 2017).

2.2.3 Níveis anormais de prolactina

2.2.3.1 Hipoprolactinemia

Os níveis de prolactina no organismo podem ser alterados, podendo causar várias consequências ao organismo. A deficiência de prolactina no organismo é uma condição muito rara, com poucos casos descritos. Essa condição é chamada de

hipoprolactinemia e sabe-se que está associada alterações anormais das células lactotróficas hipofisárias. Podendo ser por fatores de anormalidades genéticas, impedindo o desenvolvimento normal das células lactotróficas, destruição das células hipofisárias ocasionadas pela síndrome de Sheehan, hipofisite, dano lactotrófico autoimune ou infecções como a tuberculose. Além de pseudo-hipoparatiroidismo, deficiência idiopática de prolactina ou medicamentos agonistas dopaminérgicos que inibem a produção da PRL (BERNARD; YOUNG; BINART, 2019). Em humanos a deficiência grave de PRL foi diagnosticado devido a alactogênese puerperal (ausência de lactação após o parto), entretanto, com o tratamento através de administração de prolactina recombinante humana, obteve-se aumento nos níveis de prolactina e consequente lactação. (POWE et al., 2010).

A hipoprolactinemia tem consequências médicas, incluindo diminuição da motilidade e contagem de espermatozoides e morfologia espermática anormal nos homens (SOGAWA et al., 2016). Além disso, decorrente da função imunológica da PRL, os níveis baixos ou ausentes de PRL mostraram causar disfunção imunológica em estudos realizados com camundongos e ratos (SOGAWA et al., 2016). Em mulheres não lactantes, não grávidas e em homens, não se tem relatos clínicos acerca da deficiência de prolactina (BERNARD; YOUNG; BINART, 2019).

2.2.3.2 Hiperprolactinemia

A hiperprolactinemia é um termo utilizado para definir um aumento dos níveis séricos de PRL acima do limite normal. Essa condição interrompe a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (através da redução da kisspeptina nos neurônios arcados hipotalâmicos e periventriculares), inibe a liberação dos hormônios luteinizante, folículo-estimulante, e reduz diretamente a esteroidogênese gonadal. (BRASIL, 2015; VILAR et al., 2019) Favorecendo ao aparecimento de implicações clínicas de grande relevância, como hipogonadismo hipogonadotrófico adquirido (VILAR et al., 2018; VILAR et al., 2019), estando presente em 1,5% de pacientes com disfunção erétil, em 25% de mulheres com amenorreia secundária ou oligomenorreia, em cerca de 30% de mulheres com infertilidade e em 75% das pacientes com amenorreia e galactorréia (GLEZER; BRONSTEIN, 2012; VILAR et al., 2019). Em alguns casos, quando o soro do paciente contém macroprolactina (isoforma com peso molecular > 150 kDa), a condição patológica é denominada de macroprolactinemia (CEHI; SUNJ; LILA, 2017; VILAR et al., 2019)

Estudos já mostraram que hiperprolactinemia têm sido associada a vários efeitos de antifertilidade tanto em ratos como humanos, dentre eles: anormalidades estruturais nos espermatozoides, alterações testiculares como desorganização do epitélio seminífero, esfoliação de células germinativas, aumento da espessura da parede tubular, conteúdo lipídico anormal das células Leydig, distorção estrutural das junções comunicantes das células Sertoli-germinativas e degeneração citoplasmática das células de Sertoli apicais, além de aumento da porcentagem de túbulos contorcidos com espermatogônia e espermátócitos apoptóticos (ALEEM et al., 2005; VILAR et al., 2018; VILAR et al., 2019).

Os níveis séricos altos de PRL são decorrentes de vários fatores, que podem ser divididos em três causas, sendo elas: fisiológicas, patológicas e farmacológicas (Tabela 1) (VILAR et al., 2019).

Tabela 1. Causas da Hiperprolactinemia

Fisiológica

Gravidez, Lactação, Estresse, coito, exercício, dormir, etc.

Patológica

Doenças sistêmicas

Hipotireoidismo primário; insuficiência adrenal; síndrome dos ovários policísticos; insuficiência renal; cirrose; pseudocirose; convulsões epiléticas.

Doenças hipotalâmicas

Tumores (craniofaringiomas, disgerminomas, meningiomas, etc.); distúrbios infiltrativos (histiocitose, sarcoidose, etc.), metástase; radiação craniana; Cistos de fenda de Rathke, etc.

Doenças hipofisárias

Prolactinomas; acromegalia; tirotropinomas; Doença de Cushing; distúrbios infiltrativos; metástase; hipofisite; síndrome de sella vazia, etc. • Transtornos do pedúnculo - Hastite; seccion; traumatismo crâniano.

Neurogênicas

Lesões na parede torácica (queimaduras; cirurgia mamária; toracotomia; anéis nos mamilos; herpes zoster; etc.); lesão medular (ependimoma cervical; tabes dorsalis; tumores extrínsecos; etc.), estimulação mamária, etc.

Idiopático

Produção de prolactina ectópica

Carcinoma de células renais; teratomas ovarianos; gonadoblastoma; linfoma não-Hodgkin; carcinoma cervical uterino; adenocarcinoma colorretal, etc.).

Macroprolactinemia

Farmacológica (Induzida por drogas)

Antipsicóticos

Típico - Haloperidol, tirosidazina clopromazina, tiotixeno, flupentixol

Atípico - Risperidona; paliperidona; molindona; amisulprida; quetiapina; olanzapina; aripiprazol (raramente)

Antidepressivos

Tricíclico - Clomipramina; amoxapina; amitriptilina; desipramina

ISRS - Fluoxetina; fluvoxamina; paroxetina; citalopram; escitalopram; sertralina

ISRSN - Venlafaxina; duloxetina; reboxetina

IMAO - Pargilina; clorgilina

Drogas Antihipertensivas

Verapamil; α -metildopa; reserpina; labetalol (intravenoso)

Agentes Procinéticos

Metoclopramida; domperidona

Agentes bloqueadores de receptor H₂

Cimetidina; ranitidina

Outros

Estrogênios; anestésicos; opiáceos; metadona; morfina; alprazolam; apomorfina; heroína; cocaína; maconha; abuso de álcool; etc

ISRS - Inibidores seletivos da recaptação da serotonina.

ISRSN - Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina.

IMAO - Inibidores da monoamina oxidase.

Adaptado de (VILAR et al., 2018; VILAR et al., 2019)

2.2.3.2.1 Causas Fisiológicas

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2015), as causas fisiológicas mais importantes da hiperprolactinemia são gravidez e amamentação. Durante a gravidez o tamanho de uma hipófise normal pode aumentar até 136% devido a hipertrofia induzida por estrogênio e hiperplasia dos lactótrofos hipofisários, aumentando

progressivamente a síntese de PRL e sua hipersecreção (BRONSTEIN, 2016). O estresse proveniente de qualquer fonte também é um elevador fisiológico dos níveis séricos de PRL, seja ele psicológico, induzido por exercícios ou devidos a outras doenças agudas. Outros fatores que pode elevar de maneira leve ($>40\text{-}60\text{ng/ml}$) os níveis de PRL são o estresse causado por punção venosa e a estimulação das mamas (VILAR et al., 2019).

2.2.3.2.2 Causas Patológicas

O fator patológico mais importante clinicamente, causador da hiperprolactinemia, está relacionado ao prolactinoma, tipo mais comum de adenoma hipofisário, estando presente na maioria dos casos (40%). Os adenomas expressam e secretam prolactina em vários graus dependendo do tamanho. Portanto, clinicamente, são classificados de acordo com o tamanho: microadenomas ($< 10\text{mm}$ de diâmetro) ou macroadenomas ($>10\text{mm}$ de diâmetro). Os microadenomas intraselares estão associados a cerca de 90% de casos de tumor hipofisário em mulheres, porém, em homens e crianças os macroadenomas são maioria dos casos (BRASIL, 2015); VILAR et al., 2019).

Outros tumores na região hipotálamo-hipófise também podem causar hiperprolactinemia, seja pelo aumento da síntese hormonal (adenomas hipofisários produtores de GH e PRL, TSH e PRL, ou ACTH e PRL) ou pela compressão do pedúnculo hipofisário, como craniofaringiomas. Cerca de 40% dos pacientes com acromegalia apresentam hiperprolactinemia, resultado da secreção em excesso de GH e PRL referente aos fatores supracitados (BRONSTEIN, 2016; VILAR et al., 2019).

A compressão do pedúnculo hipofisário é considerada como pseudoprolactinoma, pois não está associado a produção da PRL, mas interfere no suprimento de dopamina no eixo hipotálamo-hipófise. Fatores como a hipofisite, lesões infiltrantes, aneurismas intraselares, “sela vazia”, radioterapia, também influenciam no suprimento de dopamina nesse eixo, causado pela produção inadequada desse neurotransmissor pelo hipotálamo, ou pelo rompimento do infundíbulo hipofisário, promovendo a hiperprolactinemia (BRONSTEIN, 2016); VILAR et al., 2019).

O hipotireoidismo primário e o subclínico (definido pelo aumento do TSH com hormônios tireoidianos séricos normais) também estão associados à hiperprolactinemia, sendo encontrado em 40% e 22% dos casos respectivamente.

Essa associação é devido aos altos níveis do hormônio liberador de tirotropina que estimulam a liberação de PRL e reduz a depuração metabólica da prolactina, além da concomitância ocasional entre hipotireoidismo primário e prolactinomas (BRASIL, 2015; BRONSTEIN, 2016; VILAR et al., 2019).

Estudos realizados em pacientes com insuficiência adrenal primária, evidenciaram que ocasionalmente, os mesmos apresentaram hiperprolactinemia. Esse fator está associado, visto que os glicocorticoides têm um efeito supressivo na expressão do gene da PRL e na liberação do hormônio (STRYKER; MOLITCH, 1985; VILAR et al., 2019).

Segundo o ministério de saúde (BRASIL, 2015), o hiperprolactinemia também está associada a cerca de 30% de pacientes com ovários policísticos (SOP), enfatizando uma das causas mais recorrentes de infertilidade em mulheres. Ao mesmo tempo, há discrepâncias essenciais da literatura médica sobre as relações mutuas entre SOP e hiperprolactinemia. (ROBIN et al., 2011; SZOSLAND; PAWŁOWICZ; LEWIŃSKI, 2015; VILAR et al., 2019).

A insuficiência renal crônica também demonstra correlação com hiperprolactinemia, visto que cerca de 30% de pacientes crônicos e 80% de pacientes na hemodiálise têm níveis elevados de PRL. Estudos evidenciaram que a uremia está diretamente relacionada ao aumento nos níveis de PRL, principalmente em pacientes renais terminais. O mecanismo provavelmente está relacionado à redução da depuração da PRL e a um tônus dopaminérgico presumivelmente reduzido. Portanto, com utilização de drogas com efeito bloqueador de dopamina a elevação dos níveis passa de moderado para elevado (BRONSTEIN, 2016).

Além disso, há associação da hiperprolactinemia com lesões da parede torácica (por exemplo, mastectomia, mamoplastia de aumento, toracotomia), ou distúrbios irritativos da parede torácica (como herpes zoster, queimaduras, piercings nos mamilos, etc.) e a cirrose hepática alcóolica (16 a 100%) e não alcóolica (5 a 13%). Essa última se dá, provavelmente devido a uma relação desequilibrada entre estrógeno e andrógeno e a um tônus dopaminérgico alterado (BRONSTEIN, 2016; VILAR et al., 2019). Finalmente, quando todas as causas acima mencionadas são descartadas, a hiperprolactinemia é considerada idiopática ou funcional.

O termo hiperprolactinemia idiopática (HI) têm sido utilizado para pacientes sem causa óbvia para a patologia. Esse assunto tem sido discutido por diversos autores e possivelmente esses pacientes podem apresentar prolactinomas muito pequenos

(<3mm), que não são detectados pela tecnologia de imagem utilizado atualmente como a polidomografia hipocíclica e a tomografia computadorizada (TC) e até mesmo a ressonância magnética. Um outro fator relacionado a HI é uma provável disfunção regulatória hipotalâmica, ou até mesmo mutações que ocasionaram perda da função do gene receptor de PRL (BELLIS et al., 2007). Estudos também evidenciaram uma possível etiologia autoimune para um subgrupo de casos de hiperprolactinêmicos (BELLIS et al., 2007). Todos esses casos ainda necessitam de estudos mais aprofundados, pois ainda há pacientes que inicialmente foram diagnosticados com HI, tendo uma confirmação posteriormente, como tendo macroprolactinemia (VILAR et al., 2019).

A macroprolactinemia é uma condição no qual mais de 60% da PRL circulante é composta por macroprolactina (>150 kDa). Já se tem o conhecimento que a atividade biológica desse tipo de PRL é muito baixo, corroborando com vários estudos com pacientes, já que os mesmos, quando apresentam essa condição, são na sua maioria assintomáticos. Essa condição da hiperprolactinemia relacionada à macroprolactina pode ser devida a sua menor depuração renal, maior meia-vida e menor capacidade de ativar o tônus dopaminérgico hipotalâmico, que regula negativamente a secreção de prolactina na hipófise (VILAR et al., 2018; VILAR et al., 2019).

A macroprolactinemia tem sido descrita por vários autores em todo o mundo, e a média sua prevalência em indivíduos com hiperprolactinemia é de 20% em estudos feitos com pacientes europeus. No Brasil a prevalência tem sido de aproximadamente 16%, ficando em terceiro lugar como a causa mais comum de hiperprolactinemia. Essa condição é muito comum na área endocrinológica e na sua maioria não necessita de tratamento. Embora muitos pacientes sejam assintomáticos, ainda é possível apresentarem galactorréia e/ou hipogonadismo muitas vezes relacionados a outros distúrbios, entretanto, (VILAR et al., 2019).

Para um diagnóstico eficiente da macroprolactinemia é utilizado o método de precipitação sérica de polietilenoglicol (PEG), pois é uma técnica rápida e mais barata que o padrão ouro utilizando cromatografia de filtração em gel (CFG), que é mais caro, demorado e trabalhoso. O primeiro tem uma eficiência de 80% na detecção correta dos casos de macroprolactinemia (MOLITCH, 2001; VILAR et al., 2019). Estudos recentes com 222 pacientes analisaram a combinação do PEG com dois ensaios de PRL (RIA e ensaio quimioluminescente (ECLIA) afim de diminuir a necessidade dos

custos com CFG, e observou-se que foi eficiente, e o uso do CFG foi essencial apenas para avaliar a concentração monomérica de PRL (ROUCHER et al., 2015).

2.2.3.2.3 Causas Farmacológicas

A causa mais comum da hiperprolactinemia não fisiológica é através do uso de medicamentos que atuam através de vários mecanismos neuroendócrinos como: antagonismo ao receptor de dopamina (neurolépticos, metoclopramida, sulpirida, domperidona, etc.), inibição da produção central de dopamina (verapamil, heroína, morfina, análogos da encefalina), inibição da recaptação de dopamina (antidepressivos tricíclicos, cocaína, anfetamina, inibidores da monoamino oxidase), drogas que melhoram a neurotransmissão serotoninérgica, tais como precursores serotoninérgicos, agonistas de serotonina diretos e indiretos, bloqueadores de recaptação de serotonina (opiáceos, fenfluramina, fluoxetina) e antagonistas do receptor de histamina H2 (TORRE, 2007; VILAR et al., 2019).

Os antagonistas ao receptor da dopamina como os neurolépticos, particularmente os antipsicóticos clássicos (por exemplo, butirofenonas, tioxantenos e fenotiazinas) e alguns antipsicóticos atípicos (por exemplo, amisulpirida, risperidona e paliperidona) são os medicamentos mais envolvidos, pois utilizando essas drogas de maneira crônica, cerca de 40 a 90% dos pacientes mantêm os níveis de PRL elevados, entretanto, pacientes tratados com aripiprazol raramente apresentam hiperprolactinemia, pois esse medicamento é parcialmente agonista dopaminérgico (TORRE, 2007; AJMAL; JOFFE; NACHTIGALL, 2014; VILAR et al., 2019). Normalmente os níveis de PRL séricos voltam ao normal entre 48 a 96h após a paralização do uso de antipsicóticos. Entretanto, em outros estudos o tempo pode chegar até 4 dias após o término do uso (VILAR et al., 2019). Em estudos feitos com ratos, observou-se que o clorpromazina (CPZ) aumentou significativamente os níveis de PRL, causando galactorréia, causando também diminuição na concentração sérica de LH, FSH e estradiol (ZAMANI et al., 2015). Em estudos feitos em ratos induzidos a hiperprolactinemia com flufenazina, sugeriram que a hiperprolactinemia causa redução nos níveis de FSH sem nenhuma alteração nos níveis de testosterona. Essa redução no FSH pode ter levado à desregulação dos genes relacionados à espermiogênese a jusante, envolvidos na condensação da cromatina (M. ALEEM, J. CHOUDHARI, V. PADWAL, N. BALASINOR, 2005).

Diferentemente dos neurolépticos, a ação dos antidepressivos no sistema neuroendócrino é muito variável e não está estritamente relacionada à sua eficácia terapêutica, portanto, não se tem um eficiente conhecimento do efeito de drogas antidepressivas sobre a secreção de prolactina (TORRE, 2007; VILAR et al., 2019). Entretanto, os medicamentos antidepressivos com atividades serotoninérgicas são em quase sua totalidade, associados à hiperprolactinemia, incluindo inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da monoamina oxidase (IMAO) e alguns tricíclicos, podendo causar hiperprolactinemia modesta e geralmente assintomática (TORRE, 2007; COKER; TAYLOR, 2010). A maioria dos inibidores de recaptação de serotonina pode elevar levemente a prolactina, com exceção da sertralina. Em pacientes tratados com fluoxetina por 12 semanas, observou-se uma hiperprolactinemia leve em 4,5 dos homens e 22,2% das mulheres (GEORGE I. PAPAKOSTAS et al., 2006). Em estudos com 55 pacientes a hiperprolactinemia leve foi encontrada em 10,9% dos pacientes tratados com escitalopram, paroxetina ou sertralina (PACCHIAROTTI et al., 2015). Já os antidepressivos atípicos (mirtazapina e bupropiona), são prolactamente neutros, apresentando este último, atividade inversa, diminuindo a PRL, talvez através de um bloqueio de recaptação de dopamina. (FOLEY et al., 2006; TORRE, 2007). Entre os antidepressivos tricíclicos, um dos que provavelmente tem associação com hiperprolactinemia é o clomipramina (LA TORRE; FALORNI, 2007).

Os medicamentos anti-hipertensivos também estão associados ao aumento nos níveis séricos de PRL, os quais atuam como um falso neurotransmissor e inibindo a conversão enzimática da L-dopa em dopamina catalisada pela descarboxilase aromática do L-aminoácido, como é o caso da alfa-metildopa que é um inibidor alfa-adrenérgico (LA TORRE; FALORNI, 2007).

Outros medicamentos também atuam na depleção de aminas biogênicas simpáticas como a dopamina, inibindo seu armazenamento hipotalâmico em grânulos de secreção, sendo o caso da reserpina. O medicamento verapamil, bloqueador de canais de cálcio, também teve associação com a hiperprolactinemia. Entretanto, não se sabe ao certo o mecanismo de sustentação, porém se tem uma hipótese que causa uma redução na geração de dopamina hipotalâmica, possivelmente através dos canais de cálcio do tipo N (KAMAL et al., 1996). Já o efeito do labetalol, um betabloqueador anti-hipertensivo, apresenta discrepância quanto ao meio de administração. Quando administrado por via intravenosa, aumenta os níveis de PRL,

o mesmo não acontece quando por via oral. Esse efeito parece estar relacionado a uma ação central, o qual, os medicamentos utilizados para atenuar as respostas da prolactina a estímulos centrais, evita a resposta da prolactina (LA TORRE; FALORNI, 2007).

É de conhecimento que os antagonistas competitivos dos receptores H2 da histamina cimetidina e ranitidina, usados em úlceras ativas, tenham efeito excitatório sobre a secreção de prolactina, entretanto, de acordo com um padrão regulador da prolactina dependente de histamina, o antagonista competitivo dos receptores H2 da histamina cimetidina pode ter um efeito inibitório (após administração central) ou excitatório (após administração sistêmica) na secreção de prolactina (LA TORRE; FALORNI, 2007).

A relação da hiperprolactinemia com utilização de contraceptivos contendo estrogênio e terapia hormonal da menopausa ainda apresentam controvérsias quanto aos publicados. Contudo, na maioria dos estudos publicados acerca do uso de contraceptivos, foi possível identificar um aumento significativo dos níveis de macroprolactina (ROBERT et al., 2015).

Há várias evidências de que os peptídeos opióides endógenos participam da regulação da secreção hipofisária, embora com papéis fisiológicos desfocados, morfina e drogas relacionadas têm efeitos endócrinos por meio de interações com vias hipotalâmicas dopaminérgicas e serotoninérgicas e consequente modulação da hipófise na secreção do hormônio hipofisário (LA TORRE; FALORNI, 2007). O abuso no uso de opiáceos, cocaína, maconha ou álcool também pode aumentar os níveis de PRL e essa informação pode ser omitida pelo paciente durante a anamnese (VILAR et al., 2019). Além disso deve-se levar em consideração a concomitância do uso com alguma patologia em casos de hiperprolactinemia grave (>50 ng/ml).

Os medicamentos procinéticos como a metoclopramida e domperidona são associados a hiperprolactinemia em mais de 50% dos casos (VILAR et al., 2019). Esses fármacos são comumente utilizados para distúrbios gastrointestinais, entretanto atuam como antagonistas dopaminérgicos, induzindo a elevação dos níveis de PRL. A metoclopramida bloqueia a dopamina e, em doses altas, atua bloqueando os receptores de serotonina. Já a domperidona é antagonista periférico seletivo dos receptores D2 da dopamina, pois não atravessa a barreira hematoencefálica (LA TORRE; FALORNI, 2007).

2.3 DOMPERIDONA

A domperidona é um medicamento utilizado vulgarmente para distúrbios da motilidade gastrointestinal como: Síndromes dispépticas frequentemente associadas a um retardo de esvaziamento gástrico, refluxo gastroesofágico e esofagite, e para a prevenção de sintomas gastrointestinais associados ao tratamento dopaminérgico da doença de Parkinson utilizando principalmente L-dopa e bromocriptina (LA TORRE; FALORNI, 2007). Tem vários efeitos inibitórios sobre a motilidade, incluindo redução do esfíncter esofágico inferior e pressões intragástricas. Esses efeitos resultam da supressão da liberação de acetilcolina dos neurônios motores mioentéricos, antagonizando o efeito inibitório da dopamina sobre esses neurônios (POOVATHINGAL; BHAT; POOVATHINGAL, 2013).

Essa droga têm um tempo de meia vida em torno de 7-12h, sendo primordialmente um antagonista dos receptores D2, não apresentando envolvimento importante de outros receptores. Além disso, não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica para causar efeitos colaterais piramidais extras, contudo, exerce efeitos nas partes do sistema nervoso central que não possuem essa barreira, tais como aquelas que regulam a emese (zona de ativação dos quimiorreceptores), temperatura, etc. (POOVATHINGAL; BHAT; POOVATHINGAL, 2013).

O metabolismo hepático da domperidona é rápido e extenso, decorrente da hidroxilação e N-dealquilação. Experimentos do metabolismo in vitro com inibidores diagnósticos revelaram que o CYP3A4 é a principal forma do citocromo P-450 envolvida na N-dealquilação da domperidona, enquanto que o CYP3A4, o CYP1A2 e o CYP3E1 estão envolvidos na hidroxilação aromática da domperidona. (ANVISA)

Observou-se que este medicamento é um importante indutor da hiperprolactinemia, já que está associado a via dopaminérgica, atuando sobre a glândula hipófise, aumentando os níveis de PRL, sendo utilizado como medicamento no modelo experimental de indução e sustentação da hiperprolactinemia em algumas espécies de animais (OCHOA-AMAYA et al., 2010; OCHOA-AMAYA et al., 2015; FARMER; MATHEWS; HOVEY, 2019). E em alguns estudos realizados em pacientes em tratamento contra desordens gastrointestinais, observando que apenas 1% apresentam sintomas provenientes da hiperprolactinemia como: galactorreia, ginecomastia e irregularidades menstruais. Entretanto, o uso de domperidona 10mg com administração intravenosa induziu um aumento agudo na concentração de PRL

em mais de 50% de pacientes saudáveis, em um tempo de 15 min após a utilização (TORRE, 2007; VILAR et al., 2019).

2.3.1 Efeitos adversos do uso da domperidona no sistema nervoso

Embora já se tenha indícios que a domperidona dificilmente atravessa à barreira hematoencefálica, alguns estudos evidenciaram efeitos adversos no sistema nervoso provocados pelo uso desse medicamento na dosagem padrão (10mg) ou mais altas. Além de arritmia cardíaca, efeito adverso cardíaco mais comum do uso do medicamento, observou-se que o uso desse medicamento em pacientes com histórico cardíaco pode causar tonturas, palpitações, síncope e/ou convulsões. Além disso, alguns paciente que fizeram tratamento com domperidona apresentaram cefaleia e irritabilidade, sendo mais frequente em pacientes que tomaram doses acima de 30mg/dia (JANTARASAENGARAM; SREEWAPA, 2012; KNOPPERT et al., 2013; SEWELL et al., 2017; WAN et al., 2008).

Uma paciente que tomava 80mg/dia de domperidona durante 8 meses apresentou um quadro de abstinência de drogas ao parar abruptamente o uso, consistindo em insônia e ansiedade (PAPASTERGIOU et al., 2013). Em outro estudo, um paciente que tomou domperidona em uma dose de 10mg três vezes ao dia, durante 10 meses, ao parar o uso, consistiu em relato de insônia severa, ansiedade severa, problemas cognitivos graves e até depressão (SEEMAN, 2015). Um outro estudo sobre uso de doses altas de domperidona por pacientes, também foi relatado efeitos no sistema nervoso como insônia, rigores, agitação psicomotora severa e ataques de pânico (DOYLE; GROSSMAN, 2018).

2.4 MELATONINA

A melatonina (MEL) é uma indolamina anfifílica derivada do triptofano que apresenta peso molecular de 232,3 g/mol (Figura 4). Essa molécula onipresente em quase todos os seres vivos, desde bactérias até seres humanos, foi isolada em 1958 por Aaron Lerner, e recebeu este nome devido a sua capacidade de agregar grânulos de melanina dentro dos melanócitos (LERNER et al., 1958; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

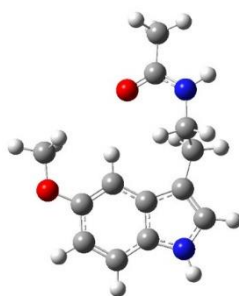


Figura 4. Visão tridimensional da melatonina (MEL) (REITER et al., 2013).

Na literatura, a função primária da MEL descrita, foi relacionada com a sua ação antioxidante, pois foi observado por ser eficiente na eliminação de radicais livres, estimulando essa atividade em vários tecidos diferentes. Após 60 anos desse trabalho pioneiro, observou-se em mais de 23.000 publicações que a melatonina apresenta inúmeras funções que abrangem todo organismo vivo em que sua presença foi atestada (CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

A MEL foi encontrada em numerosos organismos vivos de diferentes grupos taxonômicos, incluindo cianobactérias, dinoflagelados, fungos, vermes chatos, moluscos, estrelas do mar, insetos, leveduras, plantas, peixes, anfíbios e répteis e aves e mamíferos. A síntese da MEL foi descrita em todos os organismos supracitados, apresentando ações autócrinas e parácrinas. Além disso, observou-se que tecidos de diversos organismos multicelulares como: retina, trato gastrointestinal, medula óssea, linfócitos e pele apresentam produção dessa substância. (TENORIO et al., 2015). Em organismos filogeneticamente mais evoluídos como nos vertebrados, além dessas estruturas teciduais, essa molécula é sintetizada principalmente por uma glândula especializada, a glândula pineal, que tem a capacidade de produzir a MEL, a qual atua como hormônio de maneira endócrina (CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

A glândula pineal é um pequeno órgão piriforme, medindo cerca de 8x4mm de comprimento em adultos e pesando aproximadamente 0,1 a 0,18g. Sua coloração é de cor cinza-avermelhado e sua principal função é sintetizar a melatonina (FILGUEIRAS, 2006; MOORE, 2014). Está localizada no epitélamo, em uma depressão entre os colículos superiores do tronco encefálico, inferiormente ao esplênio do corpo caloso, separado deste pela tela corióidea do terceiro ventrículo. Um pequeno recesso endependimial do terceiro ventrículo estende uma haste curta, que permite a conexão do corpo pineal ao teto do diencéfalo e é quase completamente

cercado pela pia-máter. Histologicamente o parênquima da glândula pineal é dividido em dois tipos de células: pinealócitos e células da neuroglia entre as quais se ramificam muitos vasos sanguíneos e nervos (TENORIO et al., 2015).

A síntese da melatonina pela glândula pineal em mamíferos acontece através da luz externa regulando a pineal através de uma via neural, sendo controlada pelo núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ). Esse núcleo recebe estimulação direta do nervo da retina (trato retino-hipotalâmico), que transmite informações sobre a luz e a escuridão, independentemente da percepção consciente (TENORIO et al., 2015).

Os axônios descem do NSQ que fazem sinapses com neurônios autônomos da coluna intermediolateral da coluna torácica superior. A partir daí, os axônios pré-ganglionares deixam a medula espinhal, fazendo sinapses com os neurônios do gânglio cervical superior, onde emergem os neurônios pós-ganglionares que finalmente terminam na pineal, liberando norepinefrina exclusivamente durante a fase escura da noite, desencadeando a conversão enzimática do triptofano em MEL (CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

O triptofano hidroxilase converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano, que é convertido em serotonina pela ação da descarboxilase. A serotonina, por sua vez, é acetilada em N-acetilserotonina pela enzima aril-aquil-n-acetiltransferase (AANAT) que por fim sofre a ação da hidroxí-indol-oxi-metiltransferase (HIOMT) que a transforma em melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

Durante a fase claro (dia), normalmente a luz (faixa azul de 460 a 480nm) inibe a síntese de melatonina produzida pela pineal, em contrapartida, sua secreção é estimulada durante a fase escura (noite). (CANTERAS et al., 2011; TENORIO et al., 2015; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018). Portanto, a secção da inervação simpática ou o uso de bloqueadores α -adrenérgicos inibem a atividade metabólica das células da pineal, o qual pode incluir substância que a mesma sintetiza ou apenas armazena como: aminas biogênicas (norepinefrina, serotonina, histamina, melatonina e indoleaminas relacionadas, dopamina e octopamina), peptídeos (hormônio liberador de hormônio luteinizante - LHRH, hormônio liberador de tirotropina - TRH, somatostatina e vasotocina) e ácido gama-aminobutírico (GABA) (TENORIO et al., 2015; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

Dentre as substâncias sintetizadas e/ou armazenadas pela glândula pineal, a melatonina é a mais estudada, visto que ela apresenta inúmeras ações tanto no

sistema nervoso central (SNC) quanto em órgãos periféricos, desempenhando um papel importante em uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a regulação dos ritmos circadianos associados a atividades visuais, reprodutivas, cerebrovasculares, neuroendócrinas, neuroimunes e neuroproterores. Além de atuar no sistema cardiovascular, metabolismo energético, peso corpóreo e interagir na diabetes (LIMA; CABRAL; CAVALHEIRO, 2006; TENORIO et al., 2015; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

Há hipóteses de que a melatonina tem um papel importante na determinação das alterações fisiológicas associadas ao ciclo de vida (crescimento, maturação e envelhecimento). Esse fator é evidenciado já que as concentrações séricas de MEL também variam consideravelmente de acordo com a idade, sendo máxima no início da vida, diminuindo imediatamente antes da puberdade e se tornando mínima com a velhice (MARKUS et al., 2003).

2.4.1 Mecanismo de ação da melatonina

A MEL é uma substância anfifílica, capaz de atravessar as células, organelas e membranas nucleares e interagir diretamente com moléculas intracelulares não mediadas por receptores. Ela também apresenta ações mediadas por receptores que resultam da MEL com os receptores de membrana e nucleares (CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

Uma das propriedades de maior eficiência da melatonina é a capacidade antioxidante muito bem conhecida, o qual atua na limpeza de radicais livres, estimulando a transcrição e atividades de enzimas antioxidantes, ligação a metais de transição que inibem a formação de radical hidroxila (RODRIGUEZ et al., 2004). Além disso, essa substância protege lipídios, proteínas (participando do sistema ubiquitina-proteassoma) e DNA de danos oxidativos, sendo encontrado abundantemente nas mitocôndrias, obtendo uma função primordial, pois é o local onde os radicais livres são formados naturalmente como resultado da respiração celular, protegendo também o DNA mitocondrial contra mutações e deleções (JOU et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2004; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018). Além disso, estudos recentes demonstraram que a melatonina é secretada nas mitocôndrias do cérebro de camundongos e age através de um receptor de melatonina da membrana externa mitocondrial 1 (MT1), com capacidade de prevenir o vazamento do citocromo C e apoptose subsequente (SUOFU et al., 2017).

No final dos anos 80 foi realizada a descoberta, clonagem e caracterização dos receptores de membrana da melatonina. O MT1 e MT2, anteriormente denominados de Mel1a e Mel1b, são receptores acoplados a proteína G específicos de alta afinidade, codificado pelos genes MTNR1A (cromossomo humano 4q35.1) e MTNR1B (cromossomo humano 11q21 – q22) (CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018). O MT1 e MT2 humano são proteínas com 350 e 362 aminoácidos, e massas molares 39.374 e 40.188 Da, respectivamente. Esses receptores são encontrados no SNC incluindo o núcleo supraquiasmático hipotalâmico, o hipotálamo, tálamo, córtex temporal, parietal e frontal, hipocampo, área pré-óptica, gânglios da base, retina, cerebelo, etc. (JOCKERS et al., 2016). E também em órgãos periféricos, como tecido adiposo (BRYDON et al., 2001), rim (DREW et al., 1998), ilhotas pancreáticas (ZIBOLKA et al., 2018), glândulas parótidas (ISOLA et al., 2016), glândulas adrenais (VERGARA et al., 2003), fígado (VENEGAS et al., 2013), osso (SUZUKI et al., 2008), pele (SLOMINSKI et al., 2007), órgãos reprodutivos (SOARES JR. et al., 2003; IWASAKI et al., 2005), células imunes (LOPEZ-GONZALEZ et al., 1992) e sistema cardiovascular (SLOMINSKI et al., 2013), entre outros.

As vias de sinalização da MT1 envolvem ativação dos canais iônicos de potássio Kir3.1/3.2 que medeiam a inibição do disparo neuronal no núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ), além disso, atua na vasoconstrição, modulação da proteína quinase C e fosfolipase A2, modulação de canais iônicos específicos pelo acoplamento MT1 a proteínas Gq / 11, principalmente (MCARTHUR; HUNT; GILLETTE, 2015). As vias de sinalização da MT2 estão relacionados com vasodilatação, também atuando na inibição da formação do GMPc e estimulação da atividade da proteína cinase C no núcleo supraquiasmático, sendo recentemente observado que esses receptores de MT2 no NQS podem canal de potássio retificado internamente pela proteína G (HABLITZ et al., 2015; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

2.4.2 Melatonina e reprodução

O papel que a melatonina desempenha na reprodução animal é crucial para manter o sistema saudável. Sabe-se que esse hormônio é encontrado no tecido testicular, líquido folicular e plasma seminal (SOARES JR. et al., 2003; IWASAKI et al., 2005; GONZALEZ-ARTO et al., 2017; MURATOĞLU; DIZAKAR; AKTAN, 2019). Entretanto, a correlação entre intensidades endógenas de melatonina e

funcionamento reprodutivo animal ainda não é totalmente e suficientemente conhecida (TALPUR et al., 2018).

A espermatogênese é um processo de diferenciação e maturação dos gametas masculinos, o qual é regulado por vários hormônios. Os hormônios mais comuns na regulação são: o hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e a testosterona produzida pelas células de Leydig do interstício testicular. Essa produção de testosterona é regulada pela ligação do FHS ao seu receptor específico nas células de Sertoli, o que aumenta a concentração de cAMP e estimula a síntese de proteínas ligantes de andrógenos (PBA) e a liberação de LH (STOCCO et al., 2005; YU et al., 2018).

O processo de espermatogênese é totalmente dependente da testosterona. Quando o mesmo ou o receptor de andrógeno está ausente, o processo falha e não prossegue além do estágio de meiose (STOCCO et al., 2005; CHEN; LIU, 2014).

A melatonina atua diretamente nos testículos, decorrente da sua propriedade lipofílicas e hidrofílicas, atravessando a barreira hematotesticualr, entrando nas células testiculares. A MEL atua através de vários receptores específicos, como os seus receptores de membrana MT1 e MT2. Esses receptores se acoplam a proteína G regulando as cataratas de transdução de sinal cAMP, regulando a síntese de testosterona (SOARES JR. et al., 2003; IWASAKI et al., 2005; CIPOLLA-NETO et al., 2014). Estudos atuais também revelaram que a MEL também exerce efeitos através da ligação a receptores nucleares órfãos (o receptor de hormônio nuclear órfão relacionado a retinóide RZR/ROR α e o receptor órfão relacionado a melatonina ligada ao X GPR50) e proteínas intracelulares como a calmodulina (JOCKERS et al., 2016).

Estudos realizados em camundongo demonstraram que os receptores de melatonina de mamífero MT1 e MT2 estão envolvidos na síntese de testosterona, já que o colapso dos receptores de melatonina, especialmente o MTNR1A, levou a uma redução óbvia (> 60%) do nível de testosterona (GAO et al., 2019). No entanto, poucos estudos relatam com clareza o papel da melatonina no desenvolvimento embriológico dos testículos.

Sabe-se que a Melatonina é um importante antioxidante, pois protege as células contra o radical OH e outros produtos da peroxidação lipídica. Em estudos realizados por Muratoğlu, Dizakar e Aktan (2019) sobre a melatonina na proteção de espermatozoides envelhecidos pela idade, causados por formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Observou-se que esse hormônio reduziu

significativamente a apoptose celular, evitou diminuição do diâmetro e altura do centro germinativo dos túbulos seminíferos, não sendo observado histologicamente, alterações atróficas, os quais são comumente encontrados em tecido de animais envelhecidos (MURATOĞLU; DIZAKAR; AKTAN, 2019).

2.5 FENÔMENO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC)

A “Depressão Alastrante da Atividade Elétrica Cortical” ou simplesmente “Depressão Alastrante Cortical” (DAC) é um fenômeno eletrofisiológico, descrito pela primeira vez pelo neurocientista brasileiro Aristides Azevedo Pacheco Leão. O mesmo se referiu à DAC como uma “onda” reversível e propagável de redução (depressão) da atividade elétrica cerebral, em resposta a estímulos elétricos, químicos ou mecânicos. A DAC é acompanhada do aparecimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno (LEÃO, 1947). Durante a ocorrência do fenômeno, a variação lenta negativa de voltagem atinge amplitudes entre -5 e -20mV.

A VLV, que é a “marca registrada” da DAC, possui uma “forma de onda” bem definida, com início e fim identificados facilmente. Por isso, é muito utilizada para se calcular a velocidade com que o fenômeno se propaga pelo tecido nervoso. Essas características clássicas têm sido tradicionalmente analisadas por técnicas óticas e eletrofisiológicas (EIKERMANN-HAERTER; MOSKOWITZ, 2008), assim como por ressonância magnética funcional (AUTIO et al., 2014). Ambas têm revelado, além do padrão concêntrico e circular desta atividade, uma taxa de propagação notavelmente lenta (alguns mm/min) em comparação com a ordem de grandeza da propagação dos impulsos nervosos em axônios (até dezenas de m/s).

A DAC se propaga lentamente, a uma velocidade de 2 a 5mm/min, de forma concêntrica e partir do ponto de estimulação. Quando o estímulo atinge regiões do córtex mais distantes, a área que foi inicialmente estimulada (deprimida) começa a se recuperar. Após um tempo entre 10 a 15 minutos, todo o tecido cortical se recupera (GUEDES, 2011a). A figura 5 ilustra o fenômeno.

Alguns estudos relataram que o fenômeno da DAC era propagado através de um mecanismo humoral. O qual, seria baseado na liberação de um ou mais fatores químicos pelas células neurais, no momento em que elas fossem submetidas à DAC. Portanto, à medida que acontecesse a difusão dos compostos através do espaço

extracelular, eles acionariam as células vizinhas, como consequência da DAC, deflagrando assim, o fenômeno. Uma vez “deprimidas” eletricamente, estas células também passariam a liberar os mesmos fatores que acionariam as demais células, dando lugar a uma propagação automantida e sustentada (LEHMENKUEHLER et al., 1993). Além disso, durante a DAC várias outras modificações reversíveis ocorrem no tecido neural, como dilatação dos vasos sanguíneos da pia-máter (LEÃO, 1944), mudanças dramáticas em gradientes iônicos e fluxo sanguíneo (SMITH et al., 2006) e alterações extracelulares das concentrações de certos aminoácidos (ZHOU et al., 2013).

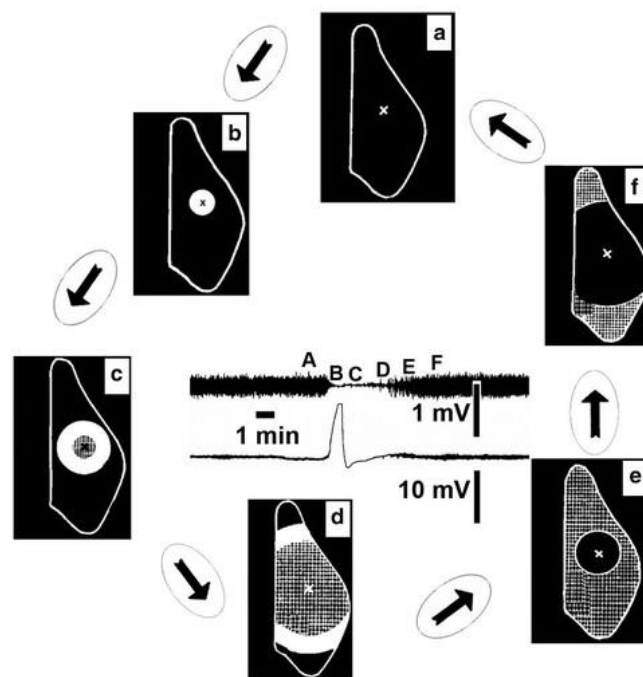


Figura 5. Sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC). Adaptado de (GUEDES, 2011). Em “a”, um córtex normal e nele um ponto (x) é estimulado, iniciando a DAC. Na sequência, indicada pelas setas, “b” a “d”, a propagação concêntrica do fenômeno da DAC está ilustrada. As áreas em branco representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas, “c” a “f” indicam regiões que sofreram a DAC e agora estão se recuperando (áreas refratárias a uma nova estimulação). De “b” a “f”, observa-se que propagação (área branca) e recuperação (área escura) dão-se de forma concêntrica, sendo o ponto inicialmente estimulado o primeiro a se recuperar totalmente. Finalmente em “a” todo o tecido se mostra completamente recuperado, retornando à condição inicial. No centro da figura, um traçado de registro demonstrando o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV), a qual sempre aparece durante a DAC, quando o ECoG diminui sua amplitude. As letras “A” a “F” correspondem a sequência das etapas representadas nos desenhos externos.

Os estudos sobre o fenômeno da DAC deram início com modelos animais, porém, devido a sua relação com a excitabilidade neural, e sua eficiência para avaliar o funcionamento e desenvolvimento do sistema nervoso central (GUEDES, 2011a), a DAC atualmente, tem sido investigada em humanos para diversos contextos clínicos como: epilepsia (COSTA-CRUZ; ARA, 2006), a enxaqueca com aura (CHARLES; BACA, 2013), esclerose múltipla (PUSIC et al., 2015), isquemia cerebral (WAINSTEIN; LUCCI, 2017), e injúria traumática cerebral, dentre outras.

Estudos nessa área têm comprovado que a susceptibilidade cortical ao fenômeno da DAC pode ser influenciada pelas condições em que se encontra o tecido cerebral (GUEDES, 2011a). Condições farmacológicas, hormonais, nutricionais e comportamentais podem tornar o córtex mais vulnerável ou mais resistente à propagação da DAC, expressando velocidades de propagação respectivamente mais altas ou mais baixas (GUEDES, 2011a). Abaixo seguem exemplos de condições que facilitam e dificultam a propagação da DAC.

2.5.1 Fatores de Facilitam a Propagação da DAC

Os fatores que facilitam a propagação da DAC são: redução do cloreto extracelular (GUEDES; DO CARMO, 1980), diazepam (GUEDES; CABRAL-FILHO; TEODOSIO, 1992), hipoglicemia (COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001), privação do sono paradoxal (CARVALHO DE VASCONCELOS et al., 2004), condição desfavorável de lactação (ROCHA-DE-MELO et al., 2006), etanol (crônico) (ABADIE-GUEDES et al., 2008), arginina durante o desenvolvimento (MAIA et al., 2009), hipertermia ambiental (FARIAS-SANTOS et al., 2009), glutamina durante o desenvolvimento (DE LIMA et al., 2009), uso de dipirona no início da vida (DO AMARAL et al., 2009), lipídeos do leite de cabra adicionados à dieta materna (SOARES et al., 2012), tratamento crônico com ácido ascórbico (60 ou 120 mg/Kg/d) (MENDES-DA-SILVA et al., 2014; MONTE-GUEDES et al., 2011), tratamento com o antagonista serotoninérgico tianeptina (AMANCIO-DOS-SANTOS et al., 2013) tratamento com glutamato monossódico dexametasona (LOPES-DE-MORAIS et al., 2014).

2.5.2 Fatores que dificultam a propagação da DAC

Os fatores que dificultam a propagação da DAC são: hiperglicemia (COSTA-CRUZ; ARA, 2006; XIMENES-DA-SILVA; GUEDES, 1991), anestésicos (GUEDES; BARRETO, 1992), envelhecimento (GUEDES; AMORIM; TEODÓSIO, 1996a),

epilepsia crônica provocada pela pilocarpina (COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-SANTOS; GUEDES, 2006), estimulação ambiental (SANTOS-MONTEIRO; TEODÓSIO; GUEDES, 2000), ativação do sistema serotoninérgico (DOS SANTOS et al., 2006) condições favoráveis de aleitamento (ROCHA-DE-MELO et al., 2006), tratamento de ratos adultos com triptofano (precursor da serotonina) (TRINDADE-FILHO; VASCONCELOS; GUEDES, 2009), deficiência, na dieta, de ácidos graxos essenciais (BORBA et al., 2010), dieta hiperlipídica (DA SILVA GERMANO et al., 2013), tratamento com o antagonista de opioides Naloxona (GUEDES et al., 2013) tratamento crônico com 30mg/Kg/d de ácido ascórbico (MENDES-DA-SILVA et al., 2014), tratamento com taurina (FRANCISCO; GUEDES, 2015).

A medição da velocidade de propagação da DAC ao longo do córtex de animais experimentais é uma maneira fácil e útil de avaliar a suscetibilidade do cérebro a DAC. Esse parâmetro ajuda a entender os fenômenos fisiológicos dependentes da excitabilidade cerebral, bem como as doenças neurológicas relacionadas à excitabilidade cerebral. Portanto, a utilização da DAC tem demonstrado ser de grande utilidade como um modelo experimental (GUEDES, 2011a).

Alguns autores relataram que a hiperprolactinemia têm efeitos adversos na reprodução (VILAR et al., 2018; VILAR et al., 2019), entretanto, mesmo com o conhecimento da via dopaminérgica que desencadeia a hiperprolactinemia através de utilização de fármacos bloqueadores dopaminérgicos, associado também ao sistema nervoso, eventos acerca de associados a alterações neurológicas relacionadas à propagação da DAC ainda são pouco relatados na literatura. Além disto, já se tem relatos de várias funções importantes da melatonina, como importante atuador no sistema nervoso central (SNC) quanto em órgãos periféricos, desempenhando um papel importante em uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a regulação dos ritmos circadianos associados a atividades visuais, reprodutivas, cerebrovasculares, neuroendócrinas, neuroimunes e neuroprotetores (LIMA; CABRAL; CAVALHEIRO, 2006; TENORIO et al., 2015; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES, R. et al. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 32, n. 8, p. 1417–1421, 2008.

AJMAL, A.; JOFFE, H.; NACHTIGALL, L. B. Psychotropic-induced hyperprolactinemia: a clinical review. *Psychosomatics*. **Psychosomatics**, v. 55, n. 1, p. 29–36, 2014.

AMANCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, n. 1–3, p. 70–75, 2013.

AUTIO, J. A. et al. Parenchymal spin-lock fMRI signals associated with cortical spreading depression. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 34, n. 5, p. 768–775, 2014.

BELLIS, A. D. E. et al. Antipituitary Antibodies in Idiopathic Hyperprolactinemic Patients. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 135, p. 129–135, 2007.

BERNARD, V.; YOUNG, J.; BINART, N. Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, 2019.

BOIVIN, J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking : potential need and demand for infertility medical care. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1506–1512, 2007.

BORBA, J. M. C. et al. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: A two-generation study. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 144–150, 2010.

BRASIL. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS - HIPERPROLACTINEMIA. **Portaria SAS/MS nº 1160, de 18 de novembro de 2015.**, 2015.

BRONSTEIN, M. D. **Disorders of prolactin secretion and Prolactinomas**. Seventh Ed ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

BRYDON, L. et al. Receptors in Human PAZ6 Adipocytes. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4264–4271, 2001.

CANTERAS, N. S. et al. The Retinohypothalamic tract: Comparison of axonal projection patterns from four major targets. **Brain Research Reviews**, v. 65, n. 2, p. 150–183, 2011.

CARLONI, S. et al. Melatonin modulates neonatal brain inflammation through endoplasmic reticulum stress , autophagy , and miR- - 34a / silent information regulator 1 pathway. **Journal of Pineal Research**, n. June, p. 370–380, 2016.

CARVALHO DE VASCONCELOS, C. A. et al. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 163–170, 2004.

CEHI, E.; SUNJ, M.; LILA, A. Laboratory and clinical significance of macroprolactinemia in women with hyperprolactinemia. v. 56, p. 719–724, 2017.

CHARLES, A. C.; BACA, S. M. Cortical spreading depression and migraine. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 11, p. 637–644, 2013.

CHEN, S.; LIU, Y. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. **Reproduction**, v. 149, p. 159–167, 2014.

CHEN, Z. et al. Melatonin attenuates palmitic acid-induced mouse granulosa cells apoptosis via endoplasmic reticulum stress. **Journal of ovarian Research**, p. 1–12, 2019.

CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of Pineal Research**, p. 371–381, 2014.

CIPOLLA-NETO, J.; DO AMARAL, F. G. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. **Endocrine Reviews**, p. 990–1028, 2018.

COKER, F.; TAYLOR, D. Antidepressant-Induced Hyperprolactinaemia Incidence , Mechanisms and Management. **CNS Drugs**, v. 24, n. 7, p. 563–574, 2010.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â.; GUEDES, R. C. A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 3, p. 271–275, 2006.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; ARA, R. C. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia ^ . **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 271–275, 2006.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; GUEDES, R. C. A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 303, n. 3, p. 177–180, 2001.

COSTANZA, M. et al. Prolactin: A versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 3, p. 223–230, 2015.

DA SILVA GERMANO, P. C. P. et al. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 275–281, 2013.

DE LIMA, D. S. C. et al. L-Glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats.

Life Sciences, v. 85, n. 5–6, p. 241–247, 2009.

DIAKONOVA, M. Recent Advances in Prolactin Research. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 846, p. 1–286, 2015.

DO AMARAL, A. P. B. et al. Drug/nutrition interaction in the developing brain: Dipyrone enhances spreading depression in rats. **Experimental Neurology**, v. 219, n. 2, p. 492–498, 2009.

DOMBROWICZ, D. et al. Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. **Endocrinology**, v. 130, n. 2, p. 695–700, 1992.

DOS SANTOS, Â. A. et al. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, n. 2, p. 275–282, 2006.

DOYLE, M.; GROSSMAN, M. Case report: domperidone use as a galactagogue resulting in withdrawal symptoms upon discontinuation. **Archives of Women's Mental Health**, v. 21, n. 4, p. 461–463, 2018.

DREW, J. E. et al. Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2- [125 I] iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. **Journal of Endocrinology**, p. 261–267, 1998.

EIKERMANN-HAERTER, K.; MOSKOWITZ, M. A. Animal models of migraine headache and aura. **Current Opinion in Neurology**, v. 21, n. 3, p. 294–300, 2008.

ESTEVEZ, S. C.; MIYAOKA, R.; AGARWAL, A. An update on the clinical assessment of the infertile male. **Clinics**, v. 66, n. 4, p. 691–700, 2011.

FARIAS-SANTOS, R. DE C. et al. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. **Neuroscience Letters**, v. 454, n. 3, p. 218–222, 2009.

FARMER, C.; MATHEWS, A. T.; HOVEY, R. C. Using domperidone to induce and sustain hyperprolactinemia in late-pregnant gilts. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 66, p. 14–20, 2019.

FERRARIS, J. et al. Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. **Neuroendocrinology**, v. 98, n. 3, p. 171–179, 2013.

FILGUEIRAS, M. Q. Glândula Pineal: revisão da anatomia e correlações entre os marca-passos e fotoperíodos na sincronização dos ritmos circadianos. **HU Revista**, v. 32, n. 2, p. 47–50, 2006.

FOLEY, K. F. et al. Review of evidence that posttransplantation psychiatric treatment commonly affects prolactin levels and thereby influences graft fate. **General Hospital Psychiatry**, v. 28, p. 230–233, 2006.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300–318, 2005.

FRANCISCO, E. D. S.; GUEDES, R. C. A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**, v. 47, n. 11, p. 2437–2445, 2015.

GAO, Y. et al. Melatonin receptor depletion suppressed hCG-induced testosterone expression in mouse Leydig cells. **Cellular & Molecular Biology Letters**, p. 1–14, 2019.

GEORGE I. PAPAKOSTAS et al. Serum Prolactin Levels Among Outpatients With Major Depressive Disorder During the Acute Phase of Treatment With Fluoxetine. **THE JOURNAL OF CLINICAL PSYCHIATRY**, v. 67, n. 6, p. 952–957, 2006.

GLEZER, A.; BRONSTEIN, M. D. Approach to the patient with persistent hyperprolactinemia and negative sellar imaging. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 7, p. 2211–2216, 2012.

GONZALEZ-ARTO, M. et al. Melatonin MT 1 and MT 2 Receptors in the Ram Reproductive Tract. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, p. 1–15, 2017.

GRATTAN, D. R.; KOKAY, I. C. Prolactin: A pleiotropic neuroendocrine hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 752–763, 2008.

GUEDES, R. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. Em: **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. [s.l: s.n.]. p. 2343–2355.

GUEDES, R. C. A. et al. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 142–146, 2013.

GUEDES, R. C. A.; AMORIM, L. F.; TEODÓSIO, N. R. Effect of aging on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 10, p. 1407–1412, 1996.

GUEDES, R. C. A.; BARRETO, J. M. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 4, p. 393–397, 1992.

GUEDES, R. C. A.; CABRAL-FILHO, J. E.; TEODOSIO, N. R. GABAergic Mechanisms

Involved in Cortical Spreading Depression in Normal and Early Malnourished Rats. **Spreading Depression**, n. December 2015, p. 17–26, 1992.

GUEDES, R. C. A.; DO CARMO, R. J. Influence of Ionic Disturbances Produced by Gastric Washing on Cortical Spreading Depression. **Experimental Brain Research**, v. 473, p. 468–473, 1980.

GUILLAUMOT, P.; TABONE, E.; BENAHMED, M. Sertoli cells as potential targets of prolactin action in the testis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 122, p. 199–206, 1996.

HABLITZ, L. M. et al. GIRK Channels Mediate the Nonphotic Effects of Exogenous Melatonin. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 45, p. 14957–14965, 2015.

HOLDCRAFT, R. W.; BRAUN, R. E. Hormonal regulation of spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 6, p. 335–342, 2004.

HOLSTEIN, A.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p. 1–16, 2003.

HYSLOP, C. M. et al. Prolactin as an adjunct for type 1 diabetes immunotherapy. **Endocrinology**, v. 157, n. 1, p. 150–165, 2016.

ISHIDA, M. et al. Analysis of Prolactin Gene Expression and Cleaved Prolactin Variants in. **Development & Reproduction**, v. 56, n. 6, 2010.

ISOLA, M. et al. Dynamics of the melatonin mt1 receptor in the rat parotid gland upon melatonin administration. **Journal of physiology and pharmacology**, p. 111–119, 2016.

IWASAKI, S. et al. Melatonin as a local regulator of human placental function. **Journal of Pineal Research**, p. 261–265, 2005.

JANTARASAENGARAM, S.; SREEWAPA, P. Effects of domperidone on augmentation of lactation following cesarean delivery at full term. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 116, n. 3, p. 240–243, 2012.

JOCKERS, C. R. et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Tables of Links. **British Journal of Pharmacology**, 2016.

JOU, M. et al. Critical Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Formation in Visible Laser Irradiation-Induced Apoptosis in Rat Brain Astrocytes (RBA-1). **Journal of Biomedical Science**, v. 3283016, p. 507–516, 2002.

KAMAL, J. A. N. et al. Mechanism of verapamil calcium channel blockade-induced

hyperprolactinemia. **Mechanism of verapamil calcium channel blockade-induced hyperprolactinemia**, v. 270, n. 1, p. 96–100, 1996.

KIRK, S. E. et al. Restraint stress increases prolactin-mediated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 in the hypothalamus and adrenal cortex in the male mouse. **Journal of Neuroendocrinology**, 2017.

KNOPPERT, D. C. et al. The effect of two different domperidone doses on maternal milk production. **Journal of Human Lactation**, v. 29, n. 1, p. 38–44, 2013.

LA TORRE, D.; FALORNI, A. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 929–951, 2007.

LEÃO, A. A. P. Spreading Depression of Activity in the Cerebral Cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, n. 6, p. 359–390, 1944.

LEÃO, A. A. P. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 10, n. 6, p. 409–414, 1947.

LEHMENKUEHLER, A. et al. Extracellular space parameter in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. **Neuroscience**, v. 55, n. 2, p. 339–351, 1993.

LI, R. et al. The Protective Effects of Melatonin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced by Acute Cadmium Exposure in Mice Testis. **Biological Trace Element Research**, v. 170, p. 152–164, 2016.

LIMA, E. DE; CABRAL, F. R.; CAVALHEIRO, E. A. Efeito Neuroprotetor da Melatonina e N-Acetilserotonina na Epileptogênese e no Controle de Crises em Animais Submetidos. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 2, p. 75–78, 2006.

LOPES-DE-MORAIS, A. A. C. et al. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain Research**, v. 1591, n. 1, p. 93–101, 2014.

LOPEZ-GONZALEZ, M. et al. Interaction of melatonin with human lymphocytes: Evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. **Journal of Pineal Research**, p. 97–104, 1992.

LOTTI, F.; MAGGI, M. Sexual dysfunction and male infertility. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 5, p. 287–307, 2018.

LUI, W.-Y.; CHENG, C. Y. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis – a molecular and biochemical perspective. **National Institutes of Health**, v. 18, n. 3–4, p. 299–311, 2007.

M. ALEEM, J. CHOUDHARI, V. PADWAL, N. BALASINOR, P. P. & M. K. G.-S. Hyperprolactinemia affects spermiogenesis in adult male rats. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 28, p. 39–48, 2005.

MAIA, L. M. S. S. et al. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: Evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. **Nutritional Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73–80, 2009.

MARKUS, R. P. et al. Glândula pineal e melatonina. Em: EDUSP (Ed.). . **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: [s.n.].

MCARTHUR, A. J.; HUNT, A. E.; GILLETTE, M. U. Melatonin Action and Signal Transduction in the Rat Suprachiasmatic Circadian Clock: Activation of Protein Kinase C at Dusk and Dawn. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 627–634, 2015.

MCINTOSH, L. J.; HONG, K. E.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: Baseline studies. **Brain Research**, v. 791, n. 1–2, p. 209–214, 1998.

MCINTOSH, L. J.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Experimental Neurology**, v. 141, n. 2, p. 201–206, 1996.

MENDES-DA-SILVA, R. F. et al. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 155–160, 2014.

MOLITCH, M. E. DISORDERS OF PROLACTIN SECRETION. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 30, n. 3, 2001.

MONTALVO, I. et al. Improvement in cognitive abilities following cabergoline treatment in patients with a prolactin-secreting pituitary adenoma. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 33, n. 2, p. 98–102, 2018.

MONTE-GUEDES, C. K. R. et al. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, n. 3, p. 191–194, 2011.

MOORE, K. L. **Anatomia orientada para a clínica**. Rio de Janeiro: [s.n.].

MURATOĞLU, S.; DIZAKAR, O. S. A.; AKTAN, A. K. The protective role of melatonin and curcumin in the testis of young and aged rats. **Andrologia**, n. October 2018, p. 1–10, 2019.

NETO, F. T. L. et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 59, p. 10–26, 2016.

OCHOA-AMAYA, J. E. et al. Acute and chronic stress and the inflammatory response in hyperprolactinemic rats. **NeuroImmunoModulation**, v. 17, n. 6, p. 386–395, 2010.

OCHOA-AMAYA, J. E. et al. Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. **Life Sciences**, v. 142, p. 66–75, 2015.

ORMANDY, C. J. et al. Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice. **Recent progress in hormone research**, v. 58, p. 297–323, 2003.

PACCHIAROTTI, I. et al. Hyperprolactinemia and medications for bipolar disorder: Systematic review of a neglected issue in clinical practice. **European Neuropsychopharmacology**, 2015.

PAPASTERGIOU, J. et al. Domperidone withdrawal in a breastfeeding woman. **Canadian Pharmacists Journal**, v. 146, n. 4, p. 210–212, 2013.

POOVATHINGAL, M. A.; BHAT, R.; POOVATHINGAL, M. A. Domperidone induced galactorrhea: An unusual presentation of a common drug. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 3, p. 307–309, 2013.

POWE, C. E. et al. Recombinant human prolactin for the treatment of lactation insufficiency. **Clinical Endocrinology**, v. 73, n. 5, p. 645–653, 2010.

PUSIC, A. D. et al. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Experimental Neurology**, v. 264, p. 43–54, 2015.

RASTRELLI, G.; CORONA, G.; MAGGI, M. The role of prolactin in andrology: what is new? **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 3, p. 233–248, 2015.

RAUT, S. et al. Unveiling the Role of Prolactin and its Receptor in Male Reproduction Prolactin and Receptor Localization. **Hormone and Metabolic Research**, p. 215–219, 2019.

REITER, R. J. et al. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 7231–7272, 2013.

ROBERT, K. et al. The effect of oral contraception on macroprolactin levels in women with macroprolactinemia : A pilot study. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 854–857, 2015.

ROBIN, G. et al. Physiopathological link between polycystic ovary syndrome and hyperprolactinemia: Myth or reality? **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 39, p. 141–145, 2011.

ROCHA-DE-MELO, A. P. et al. Manipulation of rat litter size during suckling influences

cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, n. 3–4, p. 155–160, 2006.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, p. 1–9, 2004.

ROSER, J. F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 179–196, 2008.

ROUCHER, F. et al. Macroprolactinaemia : a biological diagnostic strategy from the study of 222 patients. **European journal of Endocrinology**, v. 172, n. 11, p. 687–695, 2015.

RUSSEL, L. D. et al. Mammalian spermatogenesis. Em: **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. [s.l: s.n.]. p. 1–40.

SAMPERI, I.; LITHGOW, K.; KARAVITAKI, N. Clinical Medicine Hyperprolactinaemia. **Journal of Clinical Medicine**, p. 1–24, 2019.

SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N. R.; GUEDES, R. C. A. Long-lasting Effects of Early Environmental Stimulation on Cortical Spreading Depression in Normal and Early Malnourished Adult Rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 29–40, 2000.

SCANLON, V. .; SANDERS, T. **Essentials of anatomy and physiology**. 5ª Edição ed. [s.l: s.n.].

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43–56, 2002.

SEEMAN, M. V. Transient psychosis in women on clomiphene, bromocriptine, domperidone and related endocrine drugs. **Gynecological Endocrinology**, v. 31, n. 10, p. 751–754, 2015.

SEWELL, C. A. et al. Domperidone for Lactation: What Health Care Providers Need to Know. **Obstetrics and Gynecology**, v. 129, n. 6, p. 1054–1058, 2017.

SLOMINSKI, A. et al. Melatonin in the skin : synthesis , metabolism and functions. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 1, 2007.

SLOMINSKI, R. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152–166, 2013.

SMITH, J. M. et al. Physiological studies of cortical spreading depression. **Biological Reviews**, v. 44, n. July, p. 457–481, 2006.

SOARES, J. K. B. et al. Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 10, p. 1490–1495, 2012.

SOARES JR., J. M. et al. Functional Melatonin Receptors in Rat Ovaries at Various Stages of the Estrous Cycle. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 694–702, 2003.

SOBRINHO, L. G. The psychogenic effects of prolactin. **Acta Endocrinologica**, v. 129, n. 1, p. 38–40, 1993.

SOGAWA, R. et al. Aripiprazole-associated hypoprolactinemia in the clinical setting. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 385–387, 2016.

STARC, A. et al. INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. **Acta Clin Croat**, v. 58, n. 3, p. 508–515, 2019.

STOCCO, D. M. et al. Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression: More Complicated than We Thought. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 11, p. 2647–2659, 2005.

STRICKER, P.; GUETER, F. Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montee laiteuse. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales**, v. 99, p. 1978–1980, 1928.

STRYKER, T. D.; MOLITCH, M. E. Reversible hyperthyrotropinemia, hyperthyroxinemia, and hyperprolactinemia due to adrenal insufficiency. **The American Journal of Medicine**, v. 79, p. 271–276, 1985.

SUOFU, Y. et al. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 18, p. 7997–8006, 2017.

SUZUKI, N. et al. Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: implications for the treatment of bone diseases. **Journal of Pineal Research**, p. 326–334, 2008.

SVECHNIKOV, K. et al. Endocrine disruptors and leydig cell function. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

SZOSLAND, K.; PAWŁOWICZ, P.; LEWIŃSKI, A. Prolactin secretion in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Neuro Endocrinology Letters**, v. 36, n. 1, p. 53–58, 2015.

TALPUR, H. et al. Research progress on the role of melatonin and its receptors in animal reproduction: A comprehensive review. **Reproduction in Domestic Animals**, n. October 2017, p. 831–849, 2018.

TAMURA, H. et al. term melatonin treatment delays ovarian aging. **Journal of Pineal Research**, n. October 2016, p. 1–14, 2017.

TENORIO, B. M. et al. Extremely low-frequency magnetic fields can impair spermatogenesis recovery after reversible testicular damage induced by heat. **Eletromagnetic biology and medicine**, v. 8378, n. 2, p. 139–146, 2014.

TENORIO, F. DAS C. A. M. et al. Effects of melatonin and prolactin in reproduction: review of literature. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 3, p. 269–274, 2015.

TRIEBEL, J. et al. Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 10, p. R1193–R1203, 2015.

TRINDADE-FILHO, E. M.; VASCONCELOS, C. A. C. DE; GUEDES, R. C. A. Acute tryptophan administration impairs cortical spreading depression propagation in REM sleep deprived and non-deprived adult rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 235–241, 2009.

VENEGAS, C. et al. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. **Journal of Pineal Research**, p. 313–321, 2013.

VERGARA, M. et al. mt1 Melatonin Receptor in the Primate Adrenal Gland : Inhibition of Adrenocorticotropin-Stimulated Cortisol Production by Melatonin. **The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism**, v. 88, n. 1, p. 450–458, 2003.

VERHOEVEN, G. et al. The role of androgens in the control of spermatogenesis : lessons from transgenic models involving a Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor. **Animal Reproduction**, p. 3–14, 2007.

VILAR, L. et al. Controversial issues in the management of hyperprolactinemia and prolactinomas – An overview by the Neuroendocrinology Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 236–263, 2018.

VILAR, L. et al. Pitfalls in the Diagnostic Evaluation of Hyperprolactinemia. **Neuroendocrinology**, 2019.

WAINSZTEIN, N.; LUCCI, F. R. M. D. Cortical Spreading Depression and Ischemia in Neurocritical Patients. **Neurologic Clinics of NA**, v. 35, n. 4, p. 655–664, 2017.

WAN, E. W. X. et al. Dose-effect study of domperidone as a galactagogue in preterm mothers with insufficient milk supply, and its transfer into milk. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 283–289, 2008.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R. C. Differential effect of changes in blood

glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 24, n. 12, p. 1277–1281, 1991.

YOUNG, B. et al. **Wheater Histologia Funcional - Texto e Atlas em Cores**. [s.l: s.n.].

YU, K. et al. Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 447, 2018.

ZAMANI, Z. et al. Chlorpromazine-Induced Hyperprolactinemia on Rat's Uterus. **Iranian Biomedical Journal**, v. 19, n. October, p. 226–232, 2015.

ZHOU, N. et al. Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 10, p. 1582–1594, 2013.

ZIBOLKA, J. et al. Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. **Journal of Pineal Research**, n. November 2017, p. 1–15, 2018.

3 ARTIGO 1

**EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA NA HISTOPATOLOGIA E
HISTOMORFOMETRIA TESTÍCULAR DE RATOS ADULTOS COM
HIPERPROLACTINEMA INDUZIDA POR DOMPERIDONA**

RESUMO

A hiperprolactinemia é uma condição patológica decorrente do aumento da prolactina que afeta diretamente a reprodução, pois essa condição inibe a liberação dos hormônios luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH), e reduz diretamente a esteroidogênese gonadal, trazendo várias associações clínicas negativas na reprodução. Em contrapartida, evidências afirmam que a melatonina (MEL) desempenha um papel importante na regulação da esteroidogênese e regeneração de danos que afetam a espermatogênese. Objetivou-se analisar os efeitos proterores da melatonina exógena na histopatologia e histomorfometria do testículo de ratos adultos hiperprolactinêmicos. Foram utilizados 48 ratos machos, divididos em dois períodos de tratamento: 30 e 60 dias, cada grupo de tratamento foi subdividido em três grupos: Veículo, Hiper (ratos induzidos a hiperprolactinemia) e Hiper+mel (ratos induzidos a hiperprolactinemia e tratados com melatonina). O tratamento com melatonina foi de 200µg/100g, via subcutânea (SC). A indução à hiperprolactinemia foi obtida com dose de 4mg/kg de domperidona, via SC. Os resultados da histopatologia, demonstraram que os animais do grupo Hiper apresentaram danos no parênquima testicular, quando comparado ao veículo. Além disso, as degenerações se apresentaram em menor quantidade no grupo Hiper+mel, em ambos os períodos de tratamento, evidenciando os benefícios do composto na regeneração gonadal. Quanto a histomorfometria, o grupo Hiper de ambos os períodos de tratamento apresentaram diminuição de diâmetro tubular, altura de epitélio, área tubular, além de diminuição de células de Sertoli, quando comparado ao veículo e o grupo Hiper+mel. Influenciando diretamente na eficiência gonadal na produção espermática. Dessa forma, pode-se concluir que a indução a hiperprolactinemia pode afetar o desenvolvimento do epitélio germinativo, além do fato de a melatonina possuir efeito regenerativo e protetor frente à hiperprolactinemia reduzindo danos nos testículos.

Palavra-chave: reprodução, testículo, hiperprolactinemia, melatonina

INTRODUÇÃO

Atualmente, a infertilidade têm afetado cerca de 16,7% dos casais provenientes de países desenvolvidos (BOIVIN et al., 2007; STARC et al., 2019), e a maior parte desse problema está associado à infertilidade masculina, acometendo cerca de 8% dos homens. Dados indicam que problemas de infertilidade masculina desempenha um papel contributivo em até 50% dos casos. Cerca de 10% dos casos de infertilidade são associados a danos testiculares reversíveis, como problemas de produção espermática. (ESTEVES; MIYAOKA; ASHOK, 2011; TENORIO et al., 2014; STARC et al., 2019).

Os testículos de mamíferos sexualmente maduros são componentes vitais à sua reprodução e por consequência à perpetuação destes espécimes. Esses órgãos produzem os gametas masculinos através do processo de espermatogênese. Esse processo é regulado principalmente por níveis hormonais circulantes como o hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, testosterona, etc. (NETO et al., 2016).

A prolactina (PRL) tem se mostrado como importante hormônio na atividade reprodutiva em animais, em resposta ao fotoperíodo (NOTTER; CHEMINEAU, 2001). O aumento nos níveis séricos de PRL pode desencadear uma condição patológica chamada de hiperprolactinemia, o qual interrompe a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina, inibe a liberação dos hormônios luteinizante, folículo-estimulante, e reduz diretamente a esteroidogênese gonadal. Essa condição traz várias associações clínicas negativas na reprodução. (ALEEM et al., 2005; VILAR et al., 2018; VILAR et al., 2019).

A melatonina (MEL) é outro hormônio que está relacionado a alterações reprodutivas. É o principal hormônio da glândula pineal, o qual corresponde como fonte de 75% de sua produção (DJERIDANE et al., 2000; LANOIX; OUELLETTE; VAILLANCOURT, 2006). Esse hormônio é amplamente aceito como regulador da reprodução em mamíferos, pela capacidade de influenciar a função gonadal e promover a ciclicidade estral.

A MEL regula as adaptações fisiológicas da reprodução em mamíferos sazonais em resposta a mudanças no comprimento do dia, mas seu papel na reprodução de mamíferos não sazonais não é bem estabelecido (WOO et al., 2001).

Nos mamíferos, os sítios de ligação da melatonina foram detectados tanto no testículo quanto nas células granulo-luteínicas, ao passo que a melatonina pode ter

um efeito direto na esteroidogênese através de um processo mediado por receptor de membrana, onde as gonadotrofinas, LH e FSH, o hormônio estrógeno, desempenham um papel central na regulação da função dos testículos bem como no desenvolvimento placentário (WOO et al., 2001).

Visando-se trazer informações inovadoras que auxiliem no tratamento de patologias que culminem com baixa fertilidade ou infertilidade de indivíduos, torna-se de fundamental importância a análise dos efeitos de novos adventos tecnológicos sobre o sistema reprodutor masculino. Embora a relação fisiológica entre MEL, hiperprolactinemia e testículo dependa das espécies de animais estudados, poucos estudos têm associado à hiperprolactinemia e os níveis circulantes de MEL com desenvolvimento de alterações morfofisiológicas testiculares em animais não sazonais.

Diante das condições gonadais causadas pela hiperprolactinemia e da atividade protetora e reguladora da MEL nos testículos. Essa presente pesquisa teve como objetivo analisar os efeitos da indução à hiperprolactinemia e administração de melatonina exógena em testículos de ratos adultos.

MATERIAIS E MÉTODO

Animais Experimentais

O presente trabalho foi submetido a comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco sob número nº. 23076/011943/2018-17. Foram utilizados 48 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 90 dias de idade, procedentes do Biotério do Centro Acadêmico de Vitória, da Universidade Federal de Pernambuco. Esses animais foram mantidos no Biotério de experimentação da mesma instituição, dentro de gaiolas individuais de polipropileno, armazenadas em salas sob condições padronizadas de laboratório com luminosidade de 60 lux e ciclo circadiano de 12/12 claro-escuro, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($45\% \pm 5\%$) e sistema de exaustão com renovação de ar. Todos os animais foram alimentados com água e ração padrão do biotério (Labina, Presence®, *ad libitum*).

Os ratos adultos machos foram divididos, ao acaso, em dois grupos de período de tratamento (30 e 60 dias) cada grupo foi subdividido três subgrupos, cada um constituído por 8 animais, a saber:

Formação dos grupos experimentais com 30 e 60 dias de tratamento:

Grupo Veículo - tratamento placebo;

Grupo Hiper – ratos induzidos a hiperprolactinemia (domperidona);

Grupo Hiper+Mel - ratos induzidos a hiperprolactinemia (domperidona) e tratados com melatonina.

Indução à Hiperprolactinemia

A indução à hiperprolactinemia foi obtida com a injeção subcutânea de domperidona (DOMP) na dose de 4mg/kg de peso corporal diária, sempre no horário das 11:00h da manhã. A DOMP foi dissolvida em 1mL de solução salina (NaCl 0,9%). Os animais do grupo placebo receberam apenas solução salina na mesma via e volume.

Tratamento com Melatonina

O tratamento com melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Prata Lima, Baracat e Simões (2004). Foi administrada na dose de 200µg de melatonina por 100g de peso corporal do animal, por meio de injeções subcutânea no início da noite (18:00h). A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída em solução salina (NaCl a 0,9%). Os animais do grupo veículos receberam, respectivamente, solução NaCl 0,9% e 0,02 mL de etanol.

Análise Histopatológica

Após o período de tratamento de cada grupo (30 e 60 dias), os animais foram anestesiados utilizando uma solução de uretana a 10% e cloralose a 0,4%, na dose de 10 ml/Kg de peso corporal (1g/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose) por via intraperitoneal. Em seguida, foram eutanasiados utilizando a dosagem letal para remoção das gônadas, a qual foi imediatamente pesada e em seguida imersa em líquido de Bouin, permanecendo no mesmo por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram clivadas e submetidas à técnica histológica de impregnação e inclusão em parafina. Foram realizados cortes transversais com espessura de 2mm nos testículos, os quais foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, absoluto), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Em sequência, foi realizado cortes de 5 µm para posterior

técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E), analisados em microscópio de luz, da marca NIS Elements Nikon® e fotografados em fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i. As patologias mais comuns foram descritas na tabela 1 com os percentuais de lesões acometidas em cada grupo amostral.

Avaliação de peso dos animais e testículo

O peso dos animais foi realizado diariamente durante o tratamento. O peso dos testículos foi realizado na coleta do órgão. Ambos foram realizados por meio de balança analítica de precisão Celtac FA2104N. O valor do peso líquido testicular foi obtido subtraindo 6,5% (em relação à albugínea) do peso bruto testicular (RUSSELL; FRANÇA, 1995). O índice Gonadossomático ($IGS = \{\text{peso líquido testicular} / \text{peso corporal}\} \times 100$) foi calculado a partir do peso obtido no dia da eutanásia.

Análise histomorfométrica

O diâmetro e área tubular, altura do epitélio, diâmetro e área do lúmen foram medidas a partir do software computacional NIS Elements Nikon® utilizando câmera digital acoplada ao microscópio Nikon Eclipse 80i em aumento de 100X. O diâmetro e área dos túbulos e do lúmen para cada rato, foi obtido a partir da mensuração de 15 túbulos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados (TENORIO et al., 2014a).

A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, tomou-se duas medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lume e epitélio germinativo, determinando-se desta forma, a altura média do epitélio seminífero (TENORIO et al., 2014a).

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de grátula no software PowerPoint com 441 pontos de intersecção sobre a fotomicrografia do parênquima em aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro foram avaliadas a túnica própria, o epitélio seminífero e o lúmen, enquanto no segundo foram investigadas as células de Leydig, células e fibras

do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04, o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo, expresso em μL foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido do testículo (mg). O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo expresso em metros foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada: $CT = VTS / \pi R^2$, onde VTS = Volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio 7 do ciclo, classificado de acordo com o método acrossômico (RUSSEL et al., 1990) foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados: espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno (SPT I PI/L); espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P); espermátides arredondadas (SPD Ar); nucléolo de células de Sertoli.

Dosagem Hormonal

Foi coletado 1mL de sangue por punção cardíaca (RICHTER; HANSELL; RAUT, 2009), sendo acondicionados em tubos secos e heparinizados, para coleta de soro e plasma, respectivamente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas sob refrigeração e o sobrenadante acondicionado em eppendorfs, sempre em duplicata, e congelado a -80°C até o momento das dosagens hormonais. As amostras foram colhidas em triplicatas. Os níveis dos hormônios testosterona e prolactina foram dosados utilizando-se o método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de KIT's comerciais.

Análise Estatística

Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov. Dependendo da tendência normal dos resultados, foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos. Para dados paramétricos, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de um teste *post hoc* de Tukey-

Kramer. Para dados não paramétricos, foi realizado Kruskal – Wallis seguido do teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes ao nível de probabilidade de 5% ($P < 0,05$). As análises foram feitas em um software computacional *GraphPad Prism8®*.

RESULTADOS

Análise Histopatológica

As gônadas dos animais do grupo veículo de ambos os períodos de tratamento (30 e 60 dias) apresentaram todas as características normais quanto às estruturas histomorfológicas testiculares. Sabe-se, que o parênquima testicular é dividido em compartimento tubular e intertubular. O compartimento tubular apresenta uma túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. Os animais veículo apresentaram túnica própria normal, formada por uma matriz fibrilar e pelas células mioides peritubulares. Assim como as todas as células germinativas nos diferentes estágios de desenvolvimento e diferenciação. Observou-se também o processo de espermição normal, assim como a presença de espermatozoides no lúmen tubular.

Os animais dos grupos veículo de ambos os períodos de tratamento (figuras 2A e B; 3A e B) apresentaram epitélio seminífero com diâmetro e espessura normais, células do epitélio germinativo em processo de diferenciação e divisão mitótica e meiótica. O processo de espermição também foi observado no lúmen tubular.

O espaço intertubular é preenchido por células de Leydig, células grandes de forma poligonal ou arredondada responsáveis pela secreção de testosterona. Essas células ficam próximas a vasos sanguíneos. Além dessas estruturas, esse espaço também apresenta vasos linfáticos, além de outras células do tecido conjuntivo. Nos animais veículos foi possível observar os parâmetros de normalidade no conteúdo intertubular, assim como descrito acima. Não foi observado nenhuma condição patológica no parênquima testicular desses animais.

Com relação as evidências encontradas na histopatologia do testículo dos animais experimentais, observou-se a presença de várias lesões acometidas no grupo Hiper principalmente do período de 30 dias de tratamento, os quais estão expressos percentualmente na tabela 1 e na figura 2C e 2D. Todos os animais (100%) referentes ao grupo Hiper tratado por 30 dias apresentaram edema de espermatídes alongadas, vacuolizações nas células de Sertoli e uma grande quantidade de degeneração de

células germinativas característico de picnócitos (Figura 2D). Essas mesmas lesões se apresentaram reduzidas no grupo tratado com melatonina (Hiper+mel) de 30 dias (Figura 2E e F) e ausentes no grupo veículo do mesmo período de tratamento (Figura 2A e B).

Nos animais do grupo Hiper+mel, o edema de espermatídes alongadas apresentou-se em apenas 50% dos animais (Tabela 1). A vacuolizações nas células de Sertoli e a degeneração de células germinativas (Figura 2F) também foram observadas em quantidade reduzida, e em apenas 25% dos animais (Tabela 1).

Dentre os animais do grupo Hiper tratados por 30 dias, 75% apresentaram atrofia dos túbulos seminíferos, redução do epitélio seminífero, espessamento da túnica própria, descamação do epitélio seminífero e aumento do tecido intertubular. Os quais não foram observados no grupo veículo nem no grupo Hiper+mel. A presença de células sinciciais gigantes e de restos celulares também foi observado apenas no grupo Hiper (25%).

Histopatologicamente, foi observado que os animais tratados por 60 dias apresentaram menos lesões no parênquima testicular do que os animais de 30 dias. Dentre as lesões acometidas observou-se que 100% dos animais do grupo Hiper apresentaram diminuição do epitélio germinativo, e um aumento exacerbado do espaço intertubular (Figura 3C), sendo este último, uma condição que também foi observado nos animais de 30 dias de tratamento. Alguns túbulos seminíferos (25%) dos animais Hiper apresentaram presença de vacúolos (Figura 3D) no epitélio seminífero e células em processo de degeneração, característico de picnócitos, assim como os animais tratados por 30 dias. Todos os animais estudados (48 espécimes) apresentaram espermição e espermatídes no lúmen testicular, entretanto, observou-se uma redução dessas características apenas no grupo Hiper tratado por 30 dias (Tabela 1).

Os animais Hiper+mel tratados por 60 dias apresentaram condições do parênquima testicular, semelhante aos animais veículo. Com todos os aspectos morfológicos celulares normais, assim como espermição e presença de espermatozoides no lúmen tubular (Figura 3E e F).

Tabela 1. Avaliações Histopatológicas dos grupos tratados por 30 e 60 dias representado pelo percentual de animais com lesões (%).

Grupos	30 dias			60 dias		
	Veículo (n=8)	Hiper (n=8)	Hiper+Mel (n=8)	Veículo (n=8)	Hiper (n=8)	Hiper+Mel (n=8)
Atrofia dos túbulos seminíferos	-	75	-	-	-	-
Redução do epitélio seminífero	-	75	-	-	100	-
Espessamento da túnica própria	-	75	-	-	-	-
Descamação do epitélio seminífero	-	75	-	-	-	-
Vacuolização em células germinativas	-	-	-	-	25	-
Edema de espermatídes alongadas	-	100	50	-	-	-
Vacuolização em células de Sertoli	-	100	25	-	-	-
Células Sinciciais Gigantes	-	25	-	-	-	-
Degeneração de células germinativas	-	100	25*	-	25*	-
Degeneração de células de Sertoli	-	-	-	-	-	-
Degeneração de células de Leydig	-	-	-	-	-	-
Aumento no tamanho das células de Leydig	-	-	-	-	-	-
Redução no tamanho das células de Leydig	-	-	-	-	-	-
Aumento do tecido intertubular	-	75	-	-	100	-
Presença de restos celulares	-	25	-	-	-	-
Presença de Espermiação	100	100*	100	100	100	100
Espermatozoides no lúmen tubular	100	100*	100	100	100	100
Fibrose	-	-	-	-	-	-
Congestão	-	-	-	-	-	-
Inflamação	-	-	-	-	-	-
Infiltrado leucocitário	-	-	-	-	-	-

(-) Ausência; (*) Presença reduzida.

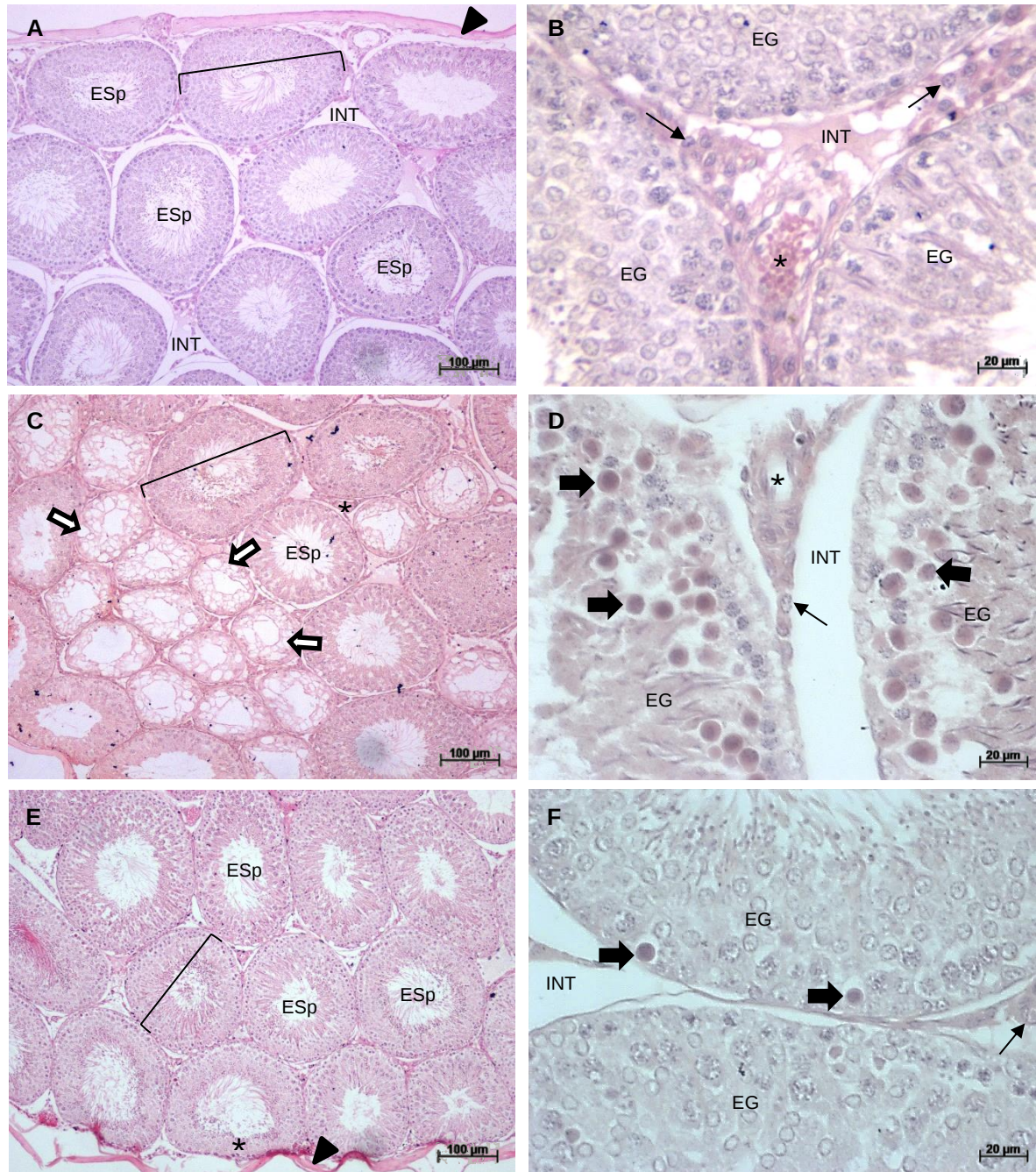


Figura 1: Fotomicrografia de testículo de ratos tratados por 30 dias (Veículo: A e B), (Hiper: C e D) e (Hiper+Mel: E e F). A: Túbulos seminíferos (colchete) arredondados com presença de espermição no lúmen (ESp); Espaço intersticial (INT) preenchido por células e linfa; Túnica albugínea (seta sem cabeça) estruturas morfológicas com aspecto normal. Aumento de 100x HE. B: Epitélio germinativo (EG) com células em duplicação e diferenciação celular; grande quantidade de Células de Leydig (seta) no interstício (INT) próximos à Vasos sanguíneos (*). Aumento de 400x HE. C: Atrofia de túbulos seminíferos (Seta Branca) em grande quantidade; Túbulos seminíferos com espermição (ESp) reduzida. Aumento de 100X HE. D: Epitélio germinativo (EG) com presença de grande quantidade de células germinativas em degeneração (seta preta); Espaço Intersticial aumentado (INT) com presença de Células de Leydig (seta) e vasos sanguíneos (*). Aumento de 400x HE. E: Túbulos seminíferos (colchete) com presença de espermição normal (ESp); Vasos Sanguíneos (*); Túnica albugínea (seta sem cabeça). Aumento de 100X HE. F: Epitélio germinativo (EG) com diminuição de células em processo degenerativo (seta preta); Células de Leydig (seta) no espaço intersticial (INT). Aumento de 400X HE.

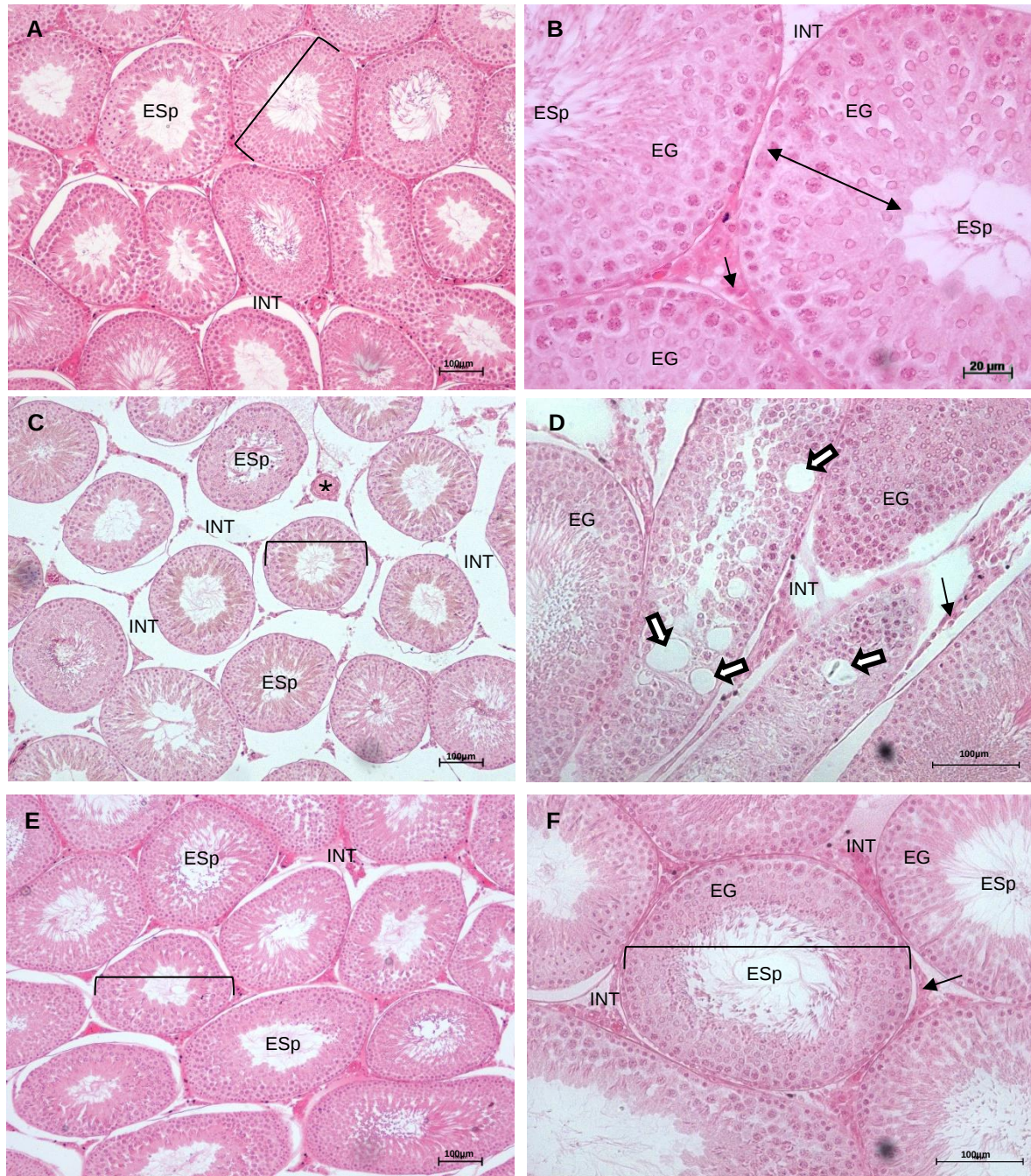


Figura 2: Fotomicrografia de testículo de ratos tratados por 60 dias (Veículo: A e B), (Hiper: C e D) e (Hiper+Mel: E e F). A: Túbulos seminíferos (colchete) arredondados com presença de espermiacção no lúmen (ESp); Espaço intersticial (INT) normal e preenchido por células e linfa; estruturas morfológicas com aspecto normal. Aumento de 100x HE. B: Epitélio germinativo (EG) com espessura normal (seta dupla), com células em duplicação e diferenciação celular; espaço intersticial (INT) normal; células de Leydig na região intertubular (seta). Aumento de 400x HE. C: Túbulos seminíferos (colchete) com diâmetro reduzido; Espaço intersticial (INT) significativamente aumentado; Túbulos seminíferos com espermiacção (ESp) normal; presença de vasos sanguíneos (*). Aumento de 100X HE. D: Epitélio germinativo (EG) com presença vacuolização (seta branca); Epitélio germinativo (EG) com espessamento normal; Espaço intersticial (INT) com presença de Células de Leydig normais (seta). Aumento de 200x HE. E: Túbulos seminíferos (colchete) com diâmetro normal e presença de espermiacção normal (ESp). Espaço intersticial (INT) normal. Aumento de 100X HE. F: Túbulo seminífero (colchete) com diâmetro normal; Epitélio germinativo (EG) com espessura normal com células em duplicação e diferenciação celular; Células de Leydig (seta) no espaço intersticial (INT). Aumento de 200X HE.

Análise Histomorfométrica

Com base nas análises histomorfométricas dos animais, não foi observado diferenças significativas no peso dos animais experimentais, em ambos os períodos de tratamento (Figura 3).

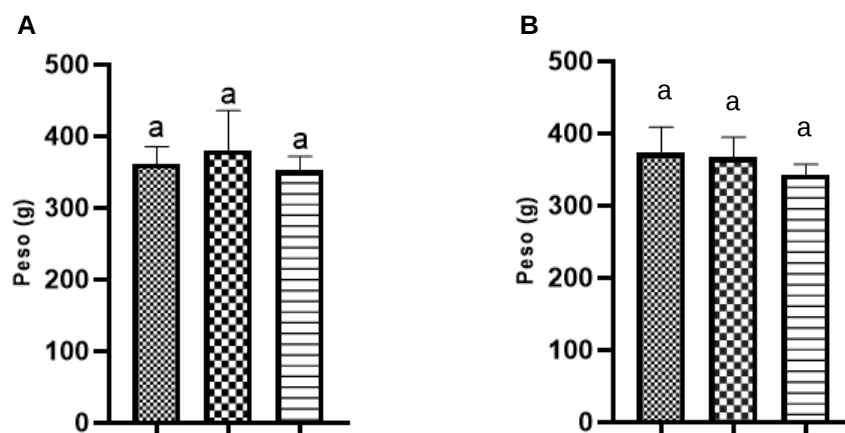


Figura 3: Análise de peso dos animais experimentais. A) Tratamento de 30 dias B) Tratamento de 60 dias. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem significativamente entre si. ($p < 0,05$).

ANOVA.

Os parâmetros biométricos e histomorfométricos do testículo de ratos tratados por 30 e 60 dias estão expressos na tabela 2. O peso bruto e líquido dos testículos demonstraram diminuição significativa do grupo Hiper+mel com relação ao Hiper tanto no período de 30 quanto de 60 dias. Não foi observado alterações significativas desse aspecto, entre o grupo veículo e os demais (Tabela 2), entretanto pôde-se observar que o grupo Hiper+mel apresentou resultados mais próximos do observado no grupo veículo, evidenciando que o aumento do peso testicular pode estar diretamente relacionado ao tratamento com domperidona para induzir a hiperprolactinemia. Com relação ao índice gonadossomático, não foi observado alterações significativas entre nenhum dos grupos experimentais.

A análise histomorfométrica dos componentes do parênquima testicular dos animais experimentais de ambos os períodos de tratamento (30 e 60 dias) foi expresso na tabela 2. Foram mensurados o diâmetro e área tubular, altura do epitélio seminífero, diâmetro e área do lúmen. Os resultados revelaram uma diminuição significativa do diâmetro do túbulo seminífero e na altura do epitélio do grupo Hiper, quando comparados com os demais grupos (Tabela 2). O grupo Hiper+Mel comparado ao veículo não apresentou alterações significativas para esses

parâmetros. Com relação à área do túbulo seminífero dos dois períodos de tratamento, também foi observado uma diminuição significativa no grupo Hiper quando comparado principalmente ao veículo. A diminuição dos valores de Hiper comparada ao grupo Hiper+Mel também apresentou-se significativa nos dois períodos de tratamento. Os animais Hiper+Mel apresentaram valores de área do túbulo seminífero mais próximo ao grupo veículo.

Os valores de diâmetro e área do lúmen apresentaram uma diminuição significativa entre os grupos tratados e o veículo no período de 30 dias, não sendo observado diferenças significativas para esses parâmetros entre os grupos tratados. Não foi observado diferenças significativas no tratamento de 60 dias.

Tabela 2. Parâmetros biométricos e histomorfométricos do testículo de ratos veículo e tratados por 30 e 60 dias.

Parâmetros/Grupos	Dias	Veículo (n=8)	Hiper (n=8)	Hiper+Mel (n=8)
Peso bruto testicular (g)	30	1,53 ± 0,07ab	1,61 ± 0,19a	1,36 ± 0,19b
	60	1,42 ± 0,09ab	1,59 ± 0,25a	1,30 ± 0,25b
Índice gonadossomático (%)	30	0,85 ± 0,05a	0,85 ± 0,05a	0,78 ± 0,08a
	60	0,77 ± 0,12a	0,87 ± 0,13a	0,76 ± 0,15a
Peso líquido testicular (g)	30	1,39 ± 0,06ab	1,46 ± 0,18a	1,23 ± 0,17b
	60	1,33 ± 0,08ab	1,49 ± 0,23a	1,21 ± 0,23b
Diâmetro tubular (µm)	30	308,81 ± 47,93a	229,84 ± 38,53b	303,01 ± 52,62a
	60	291,15 ± 14,96a	261,34 ± 22,05b	311,90 ± 10,26a
Altura do epitélio (µm)	30	91,72 ± 19,01a	71,31 ± 13,55b	91,67 ± 13,69a
	60	96,59 ± 7,52a	66,30 ± 4,19b	103,70 ± 7,18a
Área do túbulo seminífero (µm ²)	30	75011,90 ± 21875,39a	48912,67 ± 14786,06b	61625,65 ± 11928,90c
	60	67160,19 ± 6878,96a	54325,82 ± 8728,88b	81151,60 ± 11085,11c
Diâmetro do lúmen (µm)	30	148,97 ± 44,89a	106,45 ± 28,82b	106,37 ± 28,15b
	60	116,79 ± 8,37a	120,36 ± 10,59a	113,74 ± 9,40a
Área do lúmen (µm ²)	30	15209,89 ± 8349,64a	9982,11 ± 3879,46b	10635,02 ± 4164,91b

	60	11155,37 ± 1577,11a	11872,30 ± 2186,70a	10593,56 ± 1613,07a
Comprimento Total de Túbulos	30	17,0 ± 1,69ab	30,3 ± 4,79a	16,3 ± 2,60b
(m)	60	17,87 ± 2,50ab	22,16 ± 4,05a	14,87 ± 2,25b

*Médias ± desvio padrão. *Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem significativamente entre si. (p<0,05).

Os valores referentes ao volume dos componentes testiculares dos animais experimentais estão expressos na tabela 3. Foi avaliado os volumes dos componentes tubulares (epitélio seminífero, lâmina própria e lúmen) e intertubulares (células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos e espaço linfático). Dentre todos os parâmetros analisados, os únicos que apresentaram diferença significativa foi o volume dos túbulos seminíferos, o volume do espaço intertubular e espaço linfático. Quanto ao volume de túbulos seminíferos observou-se uma diminuição gradativa entre os grupos apenas no tratamento de 30 dias, entretanto, a diferença apenas se apresentou significativa quando comparado o grupo Hiper+mel com o grupo veículo, tendo este último, o maior volume. Com relação ao volume do espaço intertubular pôde-se observar que o grupo Hiper apresentou um maior volume nesse parâmetro em ambos os grupos de tempo de tratamento, porém, a diferença significativa ocorreu apenas no grupo de 60 dias de tratamento. O mesmo fator ocorreu no volume do espaço linfático do grupo de 60 dias de tratamento, estando o grupo Hiper com um volume aumentado com relação aos demais grupos. Observou-se uma diminuição significativa no grupo Hiper+Mel quando comparado ao grupo veículo. Quanto aos demais dados, nenhum apresentou diferença significativa. Os demais parâmetros relatados na tabela abaixo não apresentaram diferenças significativas quanto os grupos de estudo.

Tabela 3. Volume (µL) dos componentes testiculares de ratos veículo e tratados por 30 e 60 dias.

Parâmetros/Grupos	Dias	Veículo (n=8)	Hiper (n=8)	Hiper+Mel (n=8)
Túbulos seminíferos	30	1235,40 ± 40,80a	1156,59 ± 32,49ab	1051,77 ± 79,85b
	60	1160,28 ± 114,09a	1180,71 ± 190,04a	1128,99 ± 177,64a
Epitélio seminífero	30	1081,25 ± 33,59a	1068,91 ± 152,35a	941,74 ± 142,87a
	60	769,97 ± 192,81a	839,53 ± 251,64a	803,29 ± 197,87a

Lúmen	30	148,00 ± 52,68a	124,31 ± 36,55a	141,23 ± 45,77a
	60	356,83 ± 205,37a	308,76 ± 216,71a	303,47 ± 175,10a
Túnica própria	30	6,15 ± 7,49a	14,82 ± 16,18a	12,24 ± 11,62a
	60	33,48 ± 18,95a	32,09 ± 16,39a	20,34 ± 16,56a
Espaço intertubular	30	154,60 ± 61,60a	191,71 ± 32,36a	140,44 ± 75,54a
	60	160,80 ± 47,75a	302,26 ± 107,57b	150,10 ± 44,89a
Células de Leydig	30	12,70 ± 7,00a	11,53 ± 8,58a	9,26 ± 2,42a
	60	34,59 ± 13,30a	33,26 ± 11,75a	30,26 ± 12,41a
Células do tecido conjuntivo	30	6,15 ± 5,43a	6,91 ± 7,33a	8,09 ± 4,18a
	60	30,45 ± 20,82a	15,95 ± 8,81a	15,20 ± 9,47a
Vasos sanguíneos	30	15,77 ± 8,01a	18,88 ± 9,14a	19,75 ± 6,88a
	60	6,89 ± 2,97a	6,96 ± 3,35a	6,93 ± 3,41a
Espaço linfático	30	125,24 ± 68,89a	159,11 ± 40,09a	107,30 ± 72,67a
	60	88,87 ± 46,13a	246,10 ± 112,06b	97,71 ± 35,80a

*Médias ± desvio padrão. *Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem significativamente entre si. (p<0,05).

Diante dos resultados relacionados a contagem de células germinativas dos túbulos seminíferos do estágio VII, foi realizado tanto com as células germinativas quanto as somáticas presentes nos túbulos. Quanto as células germinativas foi feito a contagem de espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno (SPT I PI/L), espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P), espermátides arredondadas (SPD Ar) e células de Sertoli. Os resultados mostraram uma diminuição significativa de células SPT I PI/L no grupo Hiper de 30 dias de tratamento, com relação ao grupo Hiper+mel, redução que não foi significativo com o veículo do mesmo período. Os resultados da contagem das células SPT I P se apresentaram diferentes quanto aos grupos de período de tratamento. Os animais tratados por 30 dias apresentaram uma redução dessas células no grupo Hiper quando comparado ao grupo Hiper+Mel, não tendo diferença de ambos com o grupo veículo. Os animais tratados por 60 dias não apresentaram uma redução significativa do grupo Hiper com os demais, entretanto, observou-se que o grupo Hiper+Mel teve uma redução quando comparado ao grupo

veículo do mesmo período. As espermátides arredondadas (SPD Ar) se apresentaram reduzidas no grupo Hiper de ambos os períodos de tratamento, entretanto a diferença significativa apenas foi observada nos animais de 30 dias. Os animais desse período, tratados com melatonina foram os que apresentaram maior quantidade dessas células germinativas.

O resultado acerca da contagem celular com relação ao número de células de Sertoli, demonstrou uma redução significativa desse tipo celular nos animais Hiper de ambos os períodos de tratamento, quando comparado com os animais veículo. Os animais Hiper+mel de 60 dias não demonstraram diferenças significativas comparado ao Hiper do mesmo período, diferença encontrada nos animais dos respectivos grupos tratados por 30 dias.

Tabela 4. População celular por secção transversal dos túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero em ratos experimentais tratados por 30 e 60 dias.

Parâmetros/Grupos	Dias	Veículo (n=8)	Hiper (n=8)	Hiper+Mel (n=8)
SPT I PI/L	30	34,04±4,83a	32,76±1,33a	38,69±1,42b
	60	34,41±9,98a	35,84±3,86a	33,11±2,63a
SPT I P	30	50,33±4,04ab	45,51±4,25a	53,81±6,14b
	60	59,18±5,81a	53,10±5,91ab	50,26±4,54b
SPD Ar	30	179,02±23,19ab	170,13±9,11a	194,44±14,85b
	60	177,58±24,93a	175,80±21,26a	176,35±29,04a
Sertoli	30	7,75±0,65a	3,45±0,27b	8,16±1,42a
	60	7,66±0,98a	4,44±0,83b	5,48±0,66ab

SPT I PI/L: espermátocitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno; SPT I P: espermátocitos I, na fase de paquíteno; SPD Ar: espermátides arredondadas. *Médias ± desvio padrão. *Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem significativamente entre si. ($p < 0,05$).

Dosagem hormonal

Os resultados referentes às dosagens dos níveis hormonais de testosterona e prolactina dos ratos com 30 e 60 dias de tratamento estão descritos na Figura 4.

Com base nos resultados obtidos pôde-se observar que os grupos Hiper apresentaram uma redução dos níveis de testosterona total quando comparado aos

grupos veículo de ambos os períodos de tratamento. Essa redução foi significativa apenas no período de 60 dias de tratamento. Os animais hiperprolactinêmicos que foram tratados com melatonina (Hiper+Mel) apresentaram um aumento significativo no período de 30 dias, quando comparado aos grupos veículo e Hiper. Entretanto, no período de 60 dias, não foi observado diferença significativa nos níveis de testosterona total entre o grupo Hiper+mel e Hiper, sendo apenas menor significativamente, quando comparado ao grupo veículo do mesmo período de tratamento.

Com relação aos resultados da análise dos níveis de prolactina sérica, foi identificado que os animais Hiper de ambos os períodos de tratamento apresentaram um aumento significativo quando comparado aos grupos veículo. No período de 30 dias os níveis de prolactina do grupo Hiper+mel não apresentou diferença estatística quando comparado aos demais, entretanto, se mostrou reduzido em comparação ao grupo hiper. Já no período de 60 dias, os níveis de prolactina do grupo Hiper+mel foram maiores significativamente quando comparado ao grupo veículo, porém, não apresentou diferenças com relação ao grupo Hiper, entretanto se apresentou mais reduzido que este último.

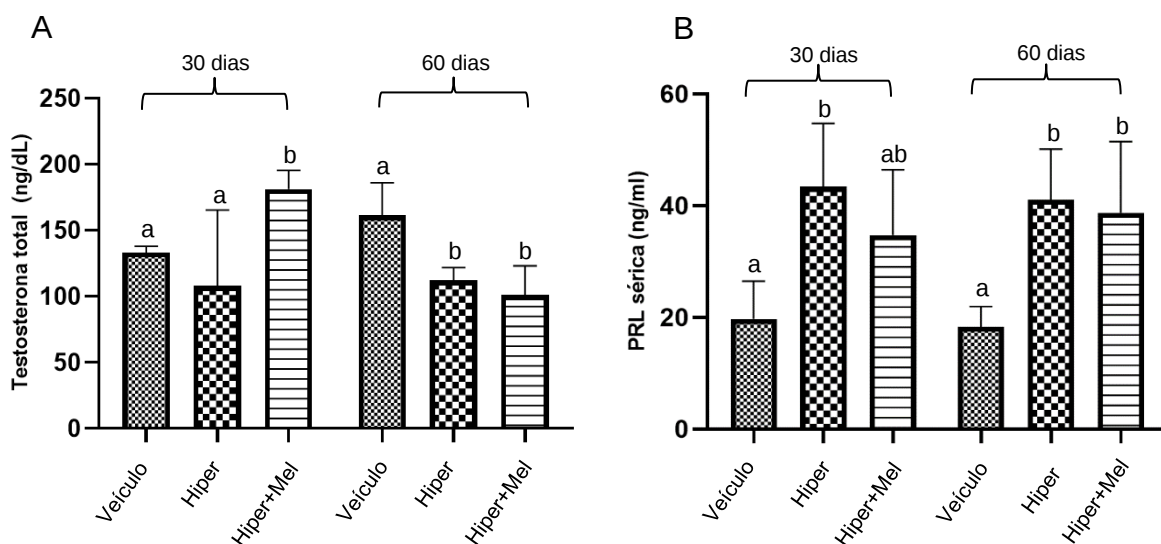


Figura 4. Dosagens hormonais dos ratos wistar experimentais. A) Dosagens dos níveis de testosterona total dos ratos com 30 e 60 dias de tratamento. B) Dosagens dos níveis de prolactina sérica dos ratos com 30 e 60 dias de tratamento. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem significativamente entre si. ($p < 0,05$). ANOVA.

DISCUSSÃO

Segundo Turner (2007), os danos que podem causar uma degeneração testicular, podem ser induzidos por administração exógena de andrógenos, toxinas,

trauma testicular, exposição ao frio, isquemia, deficiências nutricionais, calor, infecções, doenças autoimunes, obstrução do fluxo espermático, câncer e radiação ionizante.

As lesões presentes no parênquima testicular, dos animais tratados com domperidona (Hiper) revelam a importância clínica que a indução da hiperprolactinemia induzida pela domperidona, acarreta em um certo período de tempo. Entretanto, os efeitos benéficos da melatonina no sistema reprodutor masculino podem ser evidenciados através dos resultados obtidos (grupo Hiper+mel) no presente estudo. O qual, foi possível observar características protetoras e regenerativas da MEL com relação as estruturas testiculares. Pois a melatonina além de suas propriedades protetoras, antioxidantes, atua no testículo através de vários receptores específicos, regulando a síntese de testosterona (SOARES JR. et al., 2003; IWASAKI et al., 2005; CIPOLLA-NETO et al., 2014).

Os resultados observados nesse estudo sugerem que a hiperprolactinemia causou efeitos patológicos degenerativos no testículo, principalmente nas células germinativas presentes nos túbulos seminíferos além de descamação do epitélio seminífero, edemas de espermátides alongadas, vacuolização de células de Sertoli. Esses resultados corroboram com estudos já realizados por Vilar et al. (2018, 2019), o qual enfatiza que a hiperprolactinemia reduz diretamente a esteroidogênese gonadal, interrompendo a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina, inibindo a liberação dos hormônios luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH). Portanto, já que a domperidona realiza uma função inibitória sobre os receptores de dopamina (D2Rs) localizados na superfície das células lactotróficas, causando a hiperprolactinemia, os resultados confirmam a hipótese inicial, que esse fármaco causa alterações diretas no parênquima das gônadas masculinas, decorrente da desregulação hormonal que controla o ciclo espermátogênico (OCHOA-AMAYA et al., 2010; OCHOA-AMAYA et al., 2015; FARMER; MATHEWS; HOVEY, 2019).

Acerca da análise histopatológica, foi observado um aumento de células germinativas em processo de degeneração, sugerindo que seja apoptose. Já se sabe que o processo de apoptose ocorre comumente nas células germinativas testiculares, visto que são células em constante processo de divisão. Assim, a degeneração celular parece atuar como um mecanismo regulador para prevenir células germinativas

anormais se tornem maduras e levem a produção de espermatozoides defeituosos. (RUSSEL et al., 1990; TENORIO et al., 2011a).

O aumento exacerbado da quantidade de células em processo degenerativo que foi observado com maior intensidade no grupo Hiper tratado por 30 dias, é justificada pela lesão ocasionada pela hiperprolactinemia induzida por domperidona nessas células. Estudos realizados por Katovich et al. (1985), utilizando a hiperprolactinemia induzida em ratos implantados com células de adenoma lactotrófico (MtTW15) produziu lesões patológicas na espermatogênese semelhantes às observadas nesse estudo. De igual forma, Laszczyńska et al. (2002) com indução de hiperprolactinemia em ratos usando metoclopramida promoveu uma apoptose específica de estágio das células germinativas relacionada também a uma diminuição nos níveis de testosterona.

A melatonina, em contrapartida, tem demonstrado ser eficiente na atenuação de células em apoptose, além de apresentar ação protetora muito eficiente nas células reprodutoras (CHEN et al., 2019; MURATOĞLU; DIZAKAR; AKTAN, 2019; REITER et al., 2013).

O processo de espermição é uma das últimas etapas do ciclo espermatogênico, e essa característica pôde ser observada em todos os grupos experimentais estudados. Porém, o grupo Hiper de 30 dias (Tabela 1) ter apresentado uma redução dessa característica, sendo revertido no grupo Hiper+Mel. Para que o processo de espermição obtenha uma diminuição, o processo de divisão e diferenciação celular de espermatogônias até as espermátides alongadas, precisa ser danificado em algum ponto. Esse resultado corrobora estudos de Pascual-Mathey et al. (2015) com o esperado da hiperprolactinemia, a qual desregula funções hormonais cruciais para a eficiência do processo.

O peso corporal dos animais experimentais não apresentou diferenças significativas. Corroborando com outros estudos utilizando domperidona e até mesmo outros medicamentos como antidepressivos (fluoxetina), também demonstraram não apresentar diferenças entre os pesos entre os grupos de animais estudados (DA SILVA JUNIOR et al., 2013; FARMER; MATHEWS; HOVEY, 2019).

O peso bruto e líquido dos testículos apresentou-se maior no grupo Hiper de ambos os períodos de tratamento quando comparado ao veículo e Hiper+Mel. Embora o peso corporal dos grupos de animais não tenha apresentado diferenças significativas, pôde-se observar a média de peso por animais foi maior nos grupos

Hiper de ambos períodos. Esse resultado sugere que a domperidona e a melatonina possa influenciar divergentemente na ingestão. Estudos realizados por Deiró et al. (2004) e Mendes da Silva et al. (2002), com medicamentos antidepressivos como a fluoxetina e citalopram, por meio de administração cutânea, relataram que houve uma diminuição no peso corporal dos animais, o que consequentemente causa diminuição do peso testicular. Esses resultados se justificam, tendo em vista que a estudos anteriores já mostraram que a serotonina causa uma ação inibitória na ingestão de alimentos (SIMANSKY, 1996).

A serotonina e a melatonina são provenientes de um mesmo precursor, o triptofano. Isso sugere que a melatonina também apresente um efeito parecido com a serotonina no sistema digestório, justificando o baixo peso testicular nesses grupos de animais, além disso, vários estudos com roedores já evidenciaram que a melatonina tende a diminuir o peso gonadal (ELLIS, 1972; GUNDUZ; STETSON, 1994; MURATOĞLU; DIZAKAR; AKTAN, 2019). Já a domperidona é um medicamento procinético que melhora consideravelmente a motricidade gastrointestinal, e consequentemente a ingestão e digestão de alimentos (FARMER; MATHEWS; HOVEY, 2019; OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2015a). Esse fator incide diretamente no peso corporal dos animais e consequentemente no peso testicular, o qual corrobora com os resultados obtidos nesse estudo. Essa justificativa ainda se torna mais plausível, já que não houve diferença significativa quanto ao índice gonadossomático em nenhum grupo estudado.

O peso testicular pode incidir em outros parâmetros analisados em nosso estudo, como o comprimento total dos túbulos seminíferos. O grupo que apresentou maior média foi o Hiper, a e menor foi o grupo hiper+mel. Diante do exposto acima, esses resultados são diretamente proporcionais ao volume testicular, que por sua vez, faz referência ao peso testicular, e ao peso do animal.

Ao analisar todos os parâmetros histopatológicos e histomorfométricos do presente estudo, pôde-se observar que os animais Hiper de ambos os períodos de tratamento, foram os mais afetados negativamente. O diâmetro do túbulo seminífero e a altura do epitélio são usados como parâmetros relevantes para avaliação da atividade da espermatogênese em ensaios experimentais e toxicológicos (FRANÇA; RUSSELL, 1998). De acordo com nossos resultados, há uma redução significativa no diâmetro tubular, na altura do epitélio, área tubular nos animais Hiper em comparação com os veículos e os animais hiperprolactinêmicos tratados com melatonina

(Hiper+Mel), indicando um efeito adverso da domperidona na espermatogênese e uma consequente regeneração tecidual decorrente do efeito da melatonina no tratamento. (ALEEM, CHOUDHARI, PADWAL, BALASINOR, 2005).

O espaço intertubular (Tabela 3) se apresentou maior nos grupos Hiper, com relação aos demais. Esse resultado se baseou na análise histopatológica e histomorfométrica do volume dos componentes testiculares. Embora nos animais de 30 dias, o resultado não tenha se mostrado significativo, fica evidente que o tratamento em um maior tempo, causou um aumento significativo desse parâmetro. Esse resultado é consequência dos danos causados nos túbulos seminíferos desses animais, ocasionando diminuição de diâmetro tubular, altura de epitélio e área tubular. O que consequentemente resultou no aumento do espaço intertubular desses animais. Estudos que demonstraram efeitos nocivos no parênquima testicular, também observaram um aumento do espaço intertubular (TENORIO et al., 2011a, 2011b, 2014b)

A contagem populacional das células germinativas do estágio VII é fundamental para a compreensão de efeitos que incidem sobre produção efetiva de espermatozoides. O presente estudo observou uma diminuição na população dos espermatócitos no pré-leptóteno/leptóteno e paquíteno, bem como nas espermátides arredondadas nos animais Hiper tratados por 30 dias. Fato que não ocorreu no grupo 60. Ao observar esses parâmetros obtidos, juntamente com os resultados histopatológicos e histomorfométricos, como: diâmetro tubular, e altura de epitélio, o resultado sugere que os animais tratados por 30 dias apresentaram um maior dano testicular quando comparado com grupo de 60 dias, indicando redução da atividade espermatogênica (BRINGEL et al., 2013).

A indiferença entre os animais Hiper+Mel e o veículo no resultado de contagem populacional corrobora com o esperado no estudo. Pois, diferente da hiperprolactinemia que causa danos no testículo decorrente de uma desregulação nos hormônios reguladores das gônadas, a melatonina já tem demonstrado apresentar eficiente na proteção gonadal assim como de outros órgãos. Pois esse hormônio apresenta receptores específicos nas gônadas, atuando diretamente nas células de Leydig e germinativas, tornando e/ou restaurando o processo de espermatogênese (SOARES JR. et al., 2003; IWASAKI et al., 2005).

A população das células de Sertoli em ratos já é definida após o nascimento e tende a permanecer estável até a fase adulta (SILVA JUNIOR et al., 2006). Essas

células somáticas são fundamentais para a eficiência reprodutiva, pois os índices relacionados as células de Sertoli refletem a sua eficiência funcional e também a capacidade de produção de espermatozoide por grama de testículo (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Estudos realizados por Silva Júnior et al. (2008) com administração de fluoxetina em ratos jovens, demonstraram reduzir a população de células de Sertoli. Outros estudos em ratos utilizando temperatura elevada, e tratamento com pentoxifilina (vasodilatador periférico), (QUEIROZ et al., 2013) divergiram dos resultados observados no presente estudo, pois demonstraram haver uma certa resistência dessa célula, pois a sua população não sofreu alteração. Fato que também ocorreu em estudos feitos por Bringel et al. (2013) utilizando olanzapina.

No presente estudo foi observado uma redução na população de células de Sertoli do grupo Hiper de ambos períodos de tratamento quando comparado aos demais, sendo significativo no grupo de 30 dias. Através desse resultado sugere-se que a hiperprolactinemia induzida por domperidona tende a causar um efeito adverso nessa célula, pois segundo França (1995) e Silva júnior et al. (2008) qualquer desequilíbrio hormonal ou interferência farmacológica pode modificar a atividade espermatogênica no adulto. Portanto, o aumento nos níveis de prolactina influenciado pela hiperprolactinemia induzida pela domperidona, alterou o eixo Hipotálamo-hipófise, interrompendo a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (através da redução de kisspeptina nos neurônios arcados hipotalâmicos e periventriculares), inibindo consequentemente a liberação dos hormônios luteinizante, folículo estimulante e reduzindo a esteroidogênese gonadal (VILAR et al., 2019).

Foi observado também, que a melatonina reverteu consideravelmente a redução na população de células de Sertoli, principalmente no grupo de 30 dias de tratamento, já que os grupos Hiper+mel não apresentaram diferenças quanto ao grupo veículo. Essa reversão produzida através da tratamento com melatonina na grande maioria dos aspectos analisados nesse estudo, são baseados principalmente na sua propriedade antioxidante, muito bem conhecida, o qual atua na limpeza de radicais livres como: radicais hidroxila (OH⁻), peroxila (ROO⁻), superóxidos e a oxidação da cardiolipina nas mitocôndrias, estimulando a transcrição e atividades de enzimas antioxidantes, ligação a metais de transição que inibem a formação de radical hidroxila, evitando também o processo de apoptose (CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018; RODRIGUEZ et al., 2004).

Os níveis baixos de testosterona observados corroboram com o esperado, já que a domperidona causando hiperprolactinemia, tende a diminuir a liberação de hormônios esteroides, como já citado anteriormente. Entretanto, o tratamento com melatonina influenciou no aumento os níveis de testosterona em tratamento por 30 dias, porém, nos tratados por 60 dias observou-se uma redução comparado aos demais grupos. Relatos já têm demonstrado que a melatonina tem uma interação direta com as células de Leydig, as quais apresentam receptores para esse hormônio (ELLIS, 1972; REDINS; REDINS; NOVAES, 2002; TENORIO et al., 2015; YU et al., 2018).

Estudos evidenciam que a melatonina pode suprimir a esteroidogênese por meio de sítios de ligação específicos, bloqueando a expressão de proteínas regulatórias agudas esteroidogênicas (LI; ZHOU, 2015). Além disso, existem evidências que o GnRH pode aumentar as concentrações citosólicas de Ca^{2+} e ativar a proteína quinase C, que está provavelmente associada à produção de testosterona (LI; ZHOU, 2015; SOARES JR. et al., 2003; VALENTI et al., 1999). Já que em estudos realizados por Valenti et al. (1999) usando um indicador fluorescente de Ca^{2+} mostraram que a melatonina reduziu a secreção de testosterona induzida por GnRH, suprimindo a liberação de Ca^{2+} dependente de GnRH das reservas intracelulares. Portanto, essa análise corrobora com os resultados observados nos animais de 60 dias de tratamento. Com base no elevado nível de testosterona nos animais tratados com melatonina por um tempo mais curto (30 dias), cabe uma investigação mais aprofundada acerca das vias de regulação realizadas pela melatonina na produção e liberação dos hormônios andrógenos, sugerindo que o tempo de tratamento tenha uma influência direta na inibição ou atenuação dessa função.

A hiperprolactinemia induzida pela domperidona é confirmada diante do aumento nos níveis de prolactina dos animais tratados comparados ao veículo. Além disso, sabe-se que o aumento induzido pela domperidona nos níveis séricos de prolactina dura pelo menos 72h, não havendo uma tolerância desenvolvida pelo sistema dopaminérgico tuberoinfundibular, o qual controla a síntese e liberação de PRL (DONATO; FRAZÃO, 2016). Assim, os danos testiculares evidenciados, provenientes de alterações hormonais, estão diretamente relacionados com a condição patológica de Hiperprolactinemia, os quais se apresentaram elevados nos animais Hiper quando comparado ao veículo de cada período estudado.

CONCLUSÃO

A indução à hiperprolactinemia proveniente do tratamento com domperidona causou danos no parênquima testicular de ratos adultos, principalmente nos animais tratados em um período de tempo mais curto. Além dos danos histopatológicos e histomorfométricos, a diminuição da população de células germinativas, assim como alterações nos hormônios andrógenos, sugere que esse tratamento influencia negativamente na espermatogênese. Em contrapartida, o tratamento com melatonina exógena se mostrou eficiente na reversão dos danos ocasionados pela hiperprolactinemia induzida, evidenciando sua propriedade protetora diante dos órgãos reprodutivos masculinos. Porém, ainda são necessárias investigações mais aprofundadas acerca do tema abordado, ainda mais com alterações divergentes pontuais observadas no estudo, afim de estabelecer com maior afinco a relação da domperidona e melatonina com a reprodução.

REFERÊNCIAS

- BOIVIN, J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking : potential need and demand for infertility medical care. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1506–1512, 2007.
- BRINGEL, S. DE S. et al. Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult wistar rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 24–31, 2013.
- CHEN, Z. et al. Melatonin attenuates palmitic acid-induced mouse granulosa cells apoptosis via endoplasmic reticulum stress. **journal of ovarian Research**, p. 1–12, 2019.
- CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of Pineal Research**, p. 371–381, 2014.
- CIPOLLA-NETO, J.; DO AMARAL, F. G. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. **Endocrine Reviews**, p. 990–1028, 2018.
- DA SILVA JUNIOR, V. A. et al. Testis evaluation of adult Wistar rats after neonatal treatment with fluoxetine. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 35, n. 1, p. 115–122, 2013.
- DEIRÓ, T. C. B. J. et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n.

10, p. 1503–1509, 2004.

DJERIDANE, Y. et al. Long-term daily melatonin infusion induces a large increase in N -acetyltransferase activity , hydroxyindole- O -methyltransferase activity , and melatonin content in the Harderian gland and eye of pinealectomized male Siberian hamsters (Phodopus sungoru. **Journal of Pineal Research**, v. 29, p. 65–73, 2000.

DONATO, J.; FRAZÃO, R. Interactions between prolactin and kisspeptin to control reproduction. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 6, p. 587–595, 2016.

ELLIS, L. C. Inhibition of rat testicular androgen synthesis in vitro by melatonin and serotonin. **Endocrinology**, v. 90, n. 1, p. 17–28, 1972.

ESTEVEES, S. C.; MIYAOKA, R.; AGARWAL, A. An update on the clinical assessment of the infertile male. **Clinics**, v. 66, n. 4, p. 691–700, 2011.

FARMER, C.; MATHEWS, A. T.; HOVEY, R. C. Using domperidone to induce and sustain hyperprolactinemia in late-pregnant gilts. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 66, p. 14–20, 2019.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300–318, 2005.

FRANÇA, L.; RUSSELL, L. The testis of domestic mammals. Em: ESPAÑA, C. C. E. (Ed.). **Male Reproduction: a Multidisciplinary Overview**. [s.l: s.n.]. p. 198–209.

FRANÇA, R. L. Neonatal hypothyroidism: a model system for increasing testis size and sperm production. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, p. 141–151, 1995.

GUNDUZ, B.; STETSON, M. H. Effects of photoperiod, pinealectomy, and melatonin implants on testicular development in juvenile Siberian hamster (Phodopus sungorus). **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1181–1187, 1994.

IWASAKI, S. et al. Melatonin as a local regulator of human placental function. **Journal of Pineal Research**, p. 261–265, 2005.

KATOVICH, M. J. et al. Alterations of Testicular Function Induced by Hyperprolactinemia in the Rat. **Journal of Andrology**, v. 6, n. 3, p. 179–189, 1985.

LANOIX, D.; OUELLETTE, R.; VAILLANCOURT, C. Expression of melatonergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 1981–1989, 2006.

LASZCZYŃSKA, M. et al. Germ cells with nuclear DNA fragmentation related to apoptotic cells in rat testis in experimental hyperprolactinemia induced by metoclopramide. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 40, n. 2, p. 163–164, 2002.

LI, C.; ZHOU, X. Melatonin and male reproduction. **Clinica Chimica Acta**, v. 446, p. 175–180, 2015.

M. ALEEM, J. CHOUDHARI, V. PADWAL, N. BALASINOR, P. P. & M. K. G.-S. Hyperprolactinemia affects spermiogenesis in adult male rats. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 28, p. 39–48, 2005.

MENDES-DA-SILVA, C. et al. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, n. 4, p. 928–931, 2002.

MURATOĞLU, S.; DIZAKAR, O. S. A.; AKTAN, A. K. The protective role of melatonin and curcumin in the testis of young and aged rats. **Andrologia**, n. October 2018, p. 1–10, 2019.

NETO, F. T. L. et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 59, p. 10–26, 2016.

NOTTER, D. R.; CHEMINEAU, P. Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentrations in sheep selected for fertility in autumn lambing 1. **Journal of Animal Science**, n. 79, p. 2895–2901, 2001.

OCHOA-AMAYA, J. E. et al. Acute and chronic stress and the inflammatory response in hyperprolactinemic rats. **NeuroImmunoModulation**, v. 17, n. 6, p. 386–395, 2010.

OCHOA-AMAYA, J. E. et al. Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. **Life Sciences**, v. 142, p. 66–75, 2015.

PASCUAL-MATHEY, L. I. et al. Effect of the induction of moderate hyperprolactinemia on sexual behavior in wistar male rats. **Journal of Behavior, Health & Social Issues**, v. 7, n. 1, p. 9–17, 2015.

PRATA LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: Similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 7, p. 987–995, 2004.

QUEIROZ, G. C. D. et al. Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. **Animal Reproduction**, v. 55, n. 81, p. 45–54, 2013.

REDINS, C. A.; REDINS, G. M.; NOVAES, J. C. The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse leydig cells: a quantitative study. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 3, p. 517–523, 2002.

REITER, R. J. et al. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 7231–7272, 2013.

RICHTER, H. G.; HANSELL, A.; RAUT, S. Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. **Journal of Pineal Research**, v. 46, p. 357–364, 2009.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, p. 1–9, 2004.

RUSSEL, L. D. et al. Mammalian spermatogenesis. Em: **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. [s.l: s.n.]. p. 1–40.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue & Cell**, v. 27, n. 2, p. 129–147, 1995.

SILVA JUNIOR, V. A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, n. 2, p. 157–166, 2006.

SILVA JÚNIOR, V. A. et al. Neonatal administration of fluoxetine decreased final sertoli cell number in Wistar rats. **International Journal of Morphology**, v. 26, n. 1, p. 51–62, 2008.

SIMANSKY, K. J. Serotonergic control of organization of feeding and satiety. v. 73, p. 37–42, 1996.

SOARES JR., J. M. et al. Functional Melatonin Receptors in Rat Ovaries at Various Stages of the Estrous Cycle. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 694–702, 2003.

STARC, A. et al. INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. **Acta Clin Croat**, v. 58, n. 3, p. 508–515, 2019.

TENORIO, B. M. et al. Evaluation of testicular degeneration induced by low-frequency electromagnetic fields. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 210–218, 2011a.

TENORIO, B. M. et al. Testicular development evaluation in rats exposed to 60Hz and 1mT electromagnetic field. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 223–230, 2011b.

TENORIO, B. M. et al. Extremely low-frequency magnetic fields can impair spermatogenesis recovery after reversible testicular damage induced by heat. **Eletromagnetic biology and medicine**, v. 8378, n. 2, p. 139–146, 2014a.

TENORIO, B. M. et al. Extremely low-frequency magnetic fields can impair spermatogenesis recovery after reversible testicular damage induced by heat. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 139–146, 2014b.

TENORIO, F. DAS C. A. M. et al. Effects of melatonin and prolactin in reproduction: review of literature. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 3, p. 269–274, 2015.

TURNER, O. R. M. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 278–284, 2007.

VALENTI, S. et al. A novel mechanism for the melatonin inhibition of testosterone secretion by rat leydig cells: Reduction of GnRH-induced increase in cytosolic Ca²⁺. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 3, p. 299–306, 1999.

VILAR, L. et al. Controversial issues in the management of hyperprolactinemia and prolactinomas – An overview by the Neuroendocrinology Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 236–263, 2018a.

VILAR, L. et al. Controversial issues in the management of hyperprolactinemia and prolactinomas – An overview by the neuroendocrinology department of the Brazilian society of endocrinology and metabolism. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 236–263, 2018b.

VILAR, L. et al. Pitfalls in the Diagnostic Evaluation of Hyperprolactinemia. **Neuroendocrinology**, 2019.

WOO, M. M. M. et al. Direct Action of Melatonin in Human Granulosa-Luteal Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789–4797, 2001.

YU, K. et al. Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 447, 2018.

4 ARTIGO 2

**ANÁLISE DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL DE RATOS INDUZIDOS À
HIPERPROLACTINEMIA E TRATADOS COM MELATONINA**

RESUMO

A depressão alastrante cortical (DAC) é um fenômeno eletrofisiológico utilizado experimentalmente para analisar a modulação direta da atividade elétrica dos neurônios corticais, podendo a disseminação dessa onda, estar associada a vários fatores patológicos. A hiperprolactinemia é uma condição patológica relacionada a altos níveis plasmáticos de prolactina, a qual, em níveis normais apresenta influência sob funções cerebrais. Entretanto, os níveis altos desse hormônio podem atuar distintamente no córtex cerebral. A melatonina é um hormônio influente no sistema nervoso, central e periférico, desempenhando um papel regulador cerebrovascular, neuroendócrino, neuroimune e neuroprotetor. Objetivou-se analisar a DAC em ratos induzidos à hiperprolactinemia e tratados com melatonina. Foram utilizados 64 ratos, os quais foram divididos em dois períodos de tratamento (30 e 60 dias), subdivididos em 4 grupos cada: Controle, Veículo, Hiper (ratos induzidos à hiperprolactinemia) e Hiper+Mel (ratos induzidos à hiperprolactinemia e tratados com melatonina). Após o tratamento, os animais foram anestesiados para análise da velocidade de propagação da DAC, que foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores, e no tempo gasto pela DAC para percorrer essa distância. O registro foi realizado nos dois pontos parietais do hemisfério cerebral direito, por um período contínuo de 4 horas. Os resultados da ANOVA dos animais tratados por 30 dias demonstraram que o grupo controle apresentou uma velocidade média de $3,43 \pm 0,11$ mm/min e o veículo $3,10 \pm 0,04$ mm/min. No grupo Hiper a velocidade média foi de $3,38 \pm 0,16$ mm/min, enquanto o grupo Hiper+Mel teve uma velocidade de $2,21 \pm 0,02$ mm/min. Quanto aos animais tratados por 60 dias, o grupo controle obteve uma velocidade de $3,21 \pm 0,22$ mm/min, enquanto o veículo $3,06 \pm 0,17$ mm/min. O grupo hiper $4,65 \pm 0,16$ mm/min e o hiper+mel $2,34 \pm 0,19$ mm/min. Observou-se um aumento significativo do grupo hiper comparados aos demais, e uma diminuição significativa no grupo hiper+mel com relação aos outros grupos. Conclui-se que a hiperprolactinemia tem efeito direto no aumento da velocidade da DAC, em contrapartida os efeitos neuroprotetores da melatonina foram suficientes para estabelecer eficiência frente à hiperprolactinemia.

Palavra-chave: neurofisiologia, prolactina, melatonina, córtex

INTRODUÇÃO

A depressão alastrante cortical é um fenômeno eletrofisiológico que corresponde a uma resposta a estímulos elétricos, químicos ou mecânicos, a qual produz uma “onda” reversível e propagável de redução (depressão) da atividade elétrica cerebral (LEÃO, 1947). A modulação direta da atividade elétrica dos neurônios corticais pela onda que se espalha localmente podendo levar a sintomas neurológicos como, por exemplo, a fase da aura da enxaqueca. (LEÃO, 1947).

Além disso, vários processos semelhantes à disseminação da depressão alastrante no córtex animal ocorrem em várias condições neuropatológicas em humanos. Essas condições incluem traumatismo craniano, isquemia, enxaqueca, epilepsia, hemorragia e amnésia global transitória (GORJI, 2001).

A melatonina (MEL) é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, esse hormônio têm sido bastante estudado, visto que ele apresenta inúmeras ações tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto em órgãos periféricos, desempenhando um papel importante em uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a regulação dos ritmos circadianos associados a atividades visuais, reprodutivas, cerebrovasculares, neuroendócrinas, neuroimunes e neuroproterores. Além de atuar no sistema cardiovascular, metabolismo energético, peso corpóreo e interagir na diabetes (LIMA; CABRAL; CAVALHEIRO, 2006; TENORIO et al., 2015; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

A capacidade antioxidante da MEL é a mais conhecida, estudos demonstraram que esse hormônio atua na limpeza de radicais livres, estimulando a transcrição e atividades de enzimas antioxidantes, ligação a metais de transição que inibem a formação de radical hidroxila (RODRIGUEZ et al., 2004). Além disso, essa substância protege lipídios, proteínas (participando do sistema ubiquitina-proteassoma) e DNA de danos oxidativos, sendo encontrado abundantemente nas mitocôndrias (JOU et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2004; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018). Estudos demonstraram que a MEL têm a capacidade de prevenir o vazamento do citocromo C e apoptose subsequente (SUOFU et al., 2017).

Além da MEL, a prolactina (PRL) é um hormônio que apresenta influencia uma ampla gama de outras funções cerebrais. Houveram poucas tentativas de racionalizar por que um único hormônio pode exercer uma gama de funções neuroendócrinas

distintas e aparentemente não relacionadas. (ALEEM, CHOUDHARI, PADWAL, BALASINOR, 2005). Sabe-se que o controle neuroendócrino da secreção de prolactina é diferente de qualquer outro hormônio da hipófise. É predominantemente inibida pelo hipotálamo e, na ausência de um hormônio regulador de feedback, atua diretamente no cérebro para suprimir sua própria secreção.

Em estudos experimentais, a indução e a sustentação à hiperprolactinemia é realizada muitas vezes, por meio de uso de medicamentos, os quais podem atuar na hipófise, aumentando os níveis plasmáticos da prolactina. A Domperidona é um medicamento utilizado vulgarmente para distúrbios da motilidade gastrointestinal. Entretanto, essa droga é um importante indutor da hiperprolactinemia, já que está associado a via dopaminérgica, sendo primordialmente um antagonista dos receptores D2 (OCHOA-AMAYA et al., 2010; OCHOA-AMAYA et al., 2015; FARMER; MATHEWS; HOVEY, 2019). Esse fármaco causa efeitos em regiões do sistema nervoso central que não possuem barreira hematoencefálica, tais como aquelas que regulam a emese (zona de ativação dos quimiorreceptores), temperatura, etc (POOVATHINGAL; BHAT; POOVATHINGAL, 2013).

Esse medicamento pode causar efeitos adversos no sistema nervoso central como: tonturas, palpitações, síncope e/ou convulsões, cefaleia e irritabilidade, sendo mais frequente em pacientes que tomaram doses acima de 30mg/dia (JANTARASAENGARAM; SREEWAPA, 2012; KNOPPERT et al., 2013; SEWELL et al., 2017; WAN et al., 2008). Insônia e ansiedade foram observados em paciente com uso de 80mg/dia (PAPASTERGIOU et al., 2013). Insônia severa, ansiedade severa, problemas cognitivos graves, rigores, agitação psicomotora severa, ataques de pânico e até depressão também foram observadas pós utilização de doses altas de domperidona (SEEMAN, 2015; DOYLE; GROSSMAN, 2018).

Já se tem elucidado, o conhecimento que o disparo de neurônios da dopamina estão sob o a regulação cortical (GARIANO; GROVES, 1988; MURASE et al., 1993). O bloqueio desse neurotransmissor promove aumento dos níveis plasmáticos de prolactina, levando o indivíduo ao estado patológico da hiperprolactinemia. Portanto, a análise da depressão alastrante cortical pode evidenciar possíveis alterações da atividade neuronal decorrente desse quadro patológico.

Relatos bibliográficos acerca da análise da depressão alastrante cortical em animais hiperprolactinêmicos ainda são escassos na literatura. Visando trazer informações importantes acerca das causas desse quadro patológico no sistema

nervoso, como também compreender os efeitos da melatonina utilizada para tratamento desses animais, o objetivo deste trabalho foi analisar a DAC em ratos induzidos à hiperprolactinemia e tratados com melatonina exógena.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais Experimentais

O presente projeto foi submetido ao comitê de ética do uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco sob número nº. 23076/011943/2018-17. Foram utilizados 64 ratos machos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), procedentes do Biotério do Centro Acadêmico de Vitória, da Universidade Federal de Pernambuco. Esses animais foram mantidos no Biotério de experimentação dentro de gaiolas individuais de polipropileno, armazenadas em salas sob condições padronizadas de laboratório luminosidade de 60 lux e ciclo circadiano de 12 horas em período claro e 12 horas em período escuro, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($45\% \pm 5\%$) e sistema de exaustão com renovação de ar. Todos os animais foram alimentados com água e ração padrão do biotério (Labina, Presence®, *ad libitum*).

Os animais foram divididos, ao acaso, em dois grupos de período de tratamento (30 e 60 dias). Cada grupo de período de tratamento foi subdividido em 4 categorias, constituído por 8 animais cada, a saber:

Animais tratados por 30 e 60 dias:

Grupo Controle – Ratos sem nenhum tratamento;

Grupo Veículo – Ratos com tratamento placebo;

Grupo Hiper – Ratos induzidos a hiperprolactinemia;

Grupo Hiper+Mel - Ratos induzidos a hiperprolactinemia e tratados com melatonina;

Indução à Hiperprolactinemia

A indução à hiperprolactinemia foi obtida com a injeção subcutânea diária de domperidona (DOMP) na dose de 4mg/kg de peso corporal. A DOMP foi dissolvida em 1mL de solução salina (NaCl 0,9%). Os animais do grupo veículo e Hiper+mel receberam apenas solução salina.

Tratamento com Melatonina

O tratamento com melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por (PRATA LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004). Foi administrada na dose de 200 µg de melatonina por 100g de peso corporal do animal por meio de injeções por via subcutânea durante os dias experimentais. A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída em solução salina (NaCl a 0,9%). Os animais do grupo veículo e Hiper receberam, respectivamente, solução NaCl 0,9% e 0,02 mL de etanol.

Registro da Depressão Alastrante Cortical (DAC)

Ao completares 30 e 60 dias, os animais foram anestesiados com uma solução de uretana a 10% e cloralose a 0,4%, na dose de 10 ml/Kg de peso corporal (1g/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose) via intraperitoneal. Foram trepanados três orifícios no lado direito do crânio, sendo um frontal (2-3 mm de diâmetro) para aplicação do estímulo que deflagrou a DAC, e dois parietais (3-4 mm de diâmetro) para colocação dos dois eletrodos registradores. Os orifícios foram alinhados paralelamente à linha médiana.

O registro foi feito nos dois pontos parietais do hemisfério cerebral direito, por um período contínuo de 4 horas, em um sistema digitalizador (EMG Systems) que permitiu visualizar e armazenar os dados em computador. O fenômeno foi deflagrado a cada 20 minutos por estimulação química na região frontal, sendo utilizado uma bola de algodão (1-2 mm de diâmetro) embebida em solução de cloreto de potássio (KCl) a 2% (2 g de KCl dissolvidos em 100 ml de água destilada; aproximadamente 270 mM), aplicada durante 1 minuto sobre a dura-máter intacta. Durante o registro, a temperatura retal do animal foi mantida estável ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por meio de um aquecedor elétrico. A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores, e no tempo gasto pela DAC para percorrer essa distância. A figura 1 demonstra o esquema do registro eletrofisiológico da DAC.

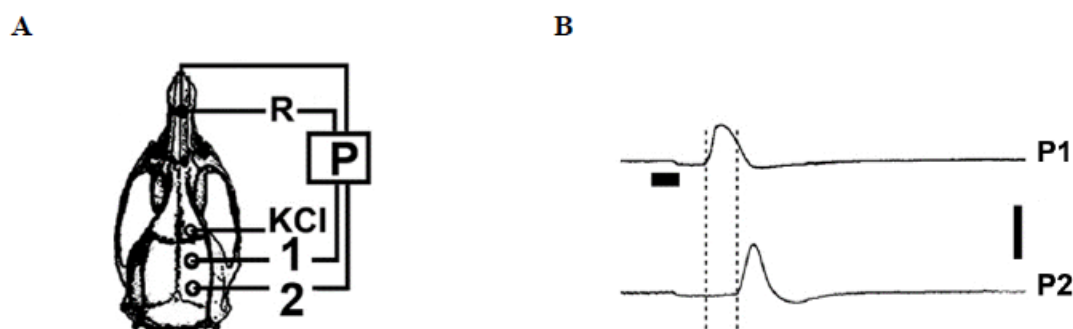


Figura 1. Esquema do registro eletrofisiológico da DAC. Em “A”, desenho do crânio de um rato com a identificação dos três orifícios necessários ao experimento. O orifício “KCl” corresponde ao local de estimulação (na região frontal); os pontos “1” e “2” correspondem aos dois pontos de registro da DAC na região parietal. Os eletrodos registradores colocados nos pontos 1 e 2 mediam as variações lentas de voltagem (VLV) da DAC, em relação a um eletrodo de referência comum (R), colocado nos ossos nasais. Em “B”, um traçado de registro (VLV) da DAC, em que a barra horizontal representa o tempo de 1 minuto (referente à presença do estímulo, KCl a 2%) e “P1” e “P2” correspondem ao registro da VLV nos pontos “1” e “2” respectivamente. A barra vertical corresponde a -10mV. (GUEDES, 2011b)

RESULTADOS

O estímulo realizado provocou uma onda de despolarização que se espalhou por todo o córtex. Primeiro ele apareceu na área mais próxima do local da aplicação (eletrodo 1). Posteriormente, o potencial sob o segundo eletrodo também foi registrado pelo eletrodo 2. Ao medir o tempo entre o aparecimento da onda de despolarização nos eletrodos 1 e 2, a velocidade do processo foi determinada como a velocidade de propagação da DAC.

Os resultados da ANOVA dos animais tratados por 30 dias (Figura 2) demonstraram haver um aumento significativo na velocidade média da DAC no grupo Hiper ($3,38 \pm 0,16$ mm/min), quando comparado ao grupo Veículo ($3,10 \pm 0,04$ mm/min) e Hiper+mel ($2,21 \pm 0,02$ mm/min). Este último, apresentou a menor velocidade média, sendo essa, uma diferença significativa quando comparado aos demais grupos desse período de tratamento. Não foi observado uma diferença significativa entre o grupo Hiper e o Controle ($3,43 \pm 0,11$ mm/min) (Figura 2).

Com base na análise dos resultados dos animais tratados por 60 dias (Figura 2), foi observado que o grupo Hiper ($4,65 \pm 0,16$ mm/min) apresentou maior velocidade média da DAC quando comparado aos demais grupos do mesmo período de tratamento. Resultado que se apresentou significativo quando comparado aos grupos Controle ($3,21 \pm 0,22$ mm/min), Veículo ($3,06 \pm 0,17$ mm/min) e principalmente o grupo Hiper+mel ($2,34 \pm 0,19$ mm/min). Este último foi o grupo que apresentou significativamente, a menor velocidade média da DAC quando comparados aos

demais grupos do período de tratamento. Não foi observado diferenças significativas entre a velocidade média da DAC dos grupos controle e veículos (Figura 2).

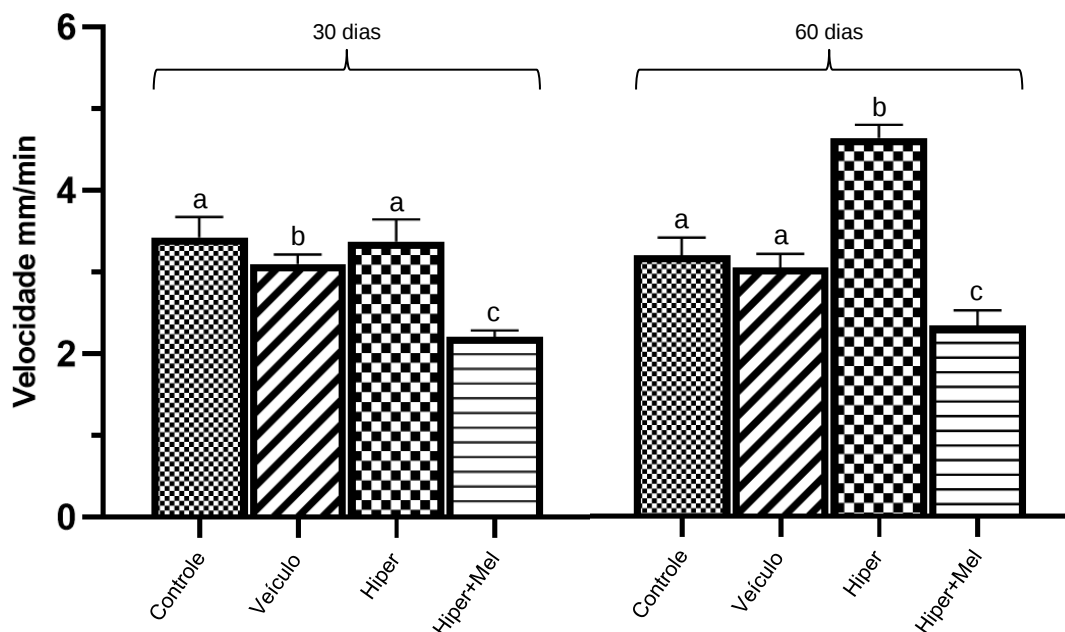


Figura 2: Velocidade (mm/min) de propagação da depressão alastrante cortical (DAC) nos grupos de ratos experimentais tratados por 30 e 60 dias.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi demonstrado pela primeira vez que a hiperprolactinemia induzida pelo fármaco domperidona, em ratos machos adultos, tratados por 30 e 60 dias, claramente acelera a propagação do fenômeno da DAC, e a coadministração de melatonina, causou um efeito reverso, diminuindo essa velocidade de propagação.

Os efeitos da domperidona resultam da supressão da liberação de acetilcolina dos neurônios motores mioentéricos, antagonizando o efeito inibitório da dopamina sobre esses neurônios. E como está envolvido na via dopaminérgica, é um importante indutor da hiperprolactinemia. (FARMER; MATHEWS; HOVEY, 2019; OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2015a; POOVATHINGAL; BHAT; POOVATHINGAL, 2013).

Entretanto, essa droga não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, contudo, têm demonstrado causar efeitos no sistema nervoso central que também apresentam a barreira hematoencefálica. Sintomas como: tonturas, palpitações, síncope e/ou convulsões em paciente cardiopata (JANTARASAENGARAM; SREEWAPA, 2012; KNOPPERT et al., 2013; SEWELL et al., 2017; WAN et al., 2008), insônia e ansiedade (PAPASTERGIOU et al., 2013), problemas cognitivos graves e

até depressão (SEEMAN, 2015), rigores, agitações psicomotora severa e ataques de pânico (DOYLE; GROSSMAN, 2018).

Segundo Montalvo *et al.* (2018) o aumento dos níveis de prolactina está diretamente relacionado à diminuição nos scores cognitivos. Esse mesmo estudo ainda mostrou que a velocidade de processamento, a memória de trabalho, o aprendizado visual e o desempenho do raciocínio melhoraram após uma diminuição dos níveis de prolactina em pacientes com prolactinomas após o tratamento com cabergolina.

Relatos acerca da hiperprolactinemia induzida pela domperidona e os seus efeitos na propagação da DAC, ainda são desconhecidos. Entretanto, os resultados observados no presente estudo sugerem que a hipótese mais plausível da relação da hiperprolactinemia com o aumento na velocidade da DAC é o estresse oxidativo causado pela condição patológica. Segundo Sobrinho (1993), em mamíferos, a prolactina está associada com a resposta imune, diminuição da temperatura corpórea e aumento da secreção de glicocorticoides, como a corticosterona. Sabe-se que os glicocorticoides estão relacionados a respostas ao estresse. E evidências sugerem que o tratamento com glicocorticoides aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em cultura de hipocampo e córtex cerebral (MCINTOSH; SAPOLSKY, 1996), e diminui a atividade de enzimas antioxidantes cerebrais (MCINTOSH; HONG; SAPOLSKY, 1998). Fator que justifica o aumento da velocidade da DAC decorrente de uma possível ação pro-oxidante da hiperprolactinemia, corroborando e justificando os resultados observados.

Vale salientar que nesse estudo foi observado que as animais Hiper tratados por 60 dias ($4,65 \pm 0,16$ mm/min), apresentaram uma maior velocidade de propagação da DAC quando comparado ao mesmo grupo tratado por 30 dias ($3,38 \pm 0,16$ mm/min). Segundo Guedes, Amorim e Teodósio (1996) o envelhecimento tende a dificultar a velocidade de propagação do fenômeno. No caso desse estudo, observou-se o contrário. Esse resultado justifica ainda mais que o aumento foi ocasionado não pela diferença de idade, mas sim, pelos efeitos que a hiperprolactinemia induzida pela domperidona causou no córtex cerebral dos animais.

Diante do resultado observado na análise da DAC nos animais hiperprolactinêmicos tratados com melatonina, observou-se o esperado, uma redução da velocidade de propagação da DAC, pois a melatonina apresenta propriedades antioxidantes, dentre as quais, causa efeito protetor tanto no sistema nervoso, quanto

em vários outros sistemas do corpo (CARLONI et al., 2016; MARKUS et al., 2003; SLOMINSKI AT, KLESZCZYŃSKI K, SEMAK I, JANJETOVIC Z, ZMIJEWSKI MA, KIM TK, SLOMINSKI RM, REITER RJ, 2013; SLOMINSKI et al., 2013).

A melatonina apresenta uma relação direta com a serotonina, já que ambos são provenientes do triptofano (YU et al., 2017). Estudos realizados por Guedes et al., (2017) evidenciaram a importância da serotonina na propagação do fenômeno da DAC, tendo em vista que esse neuromodulador diminuiu a velocidade média desse fenômeno. Os estudos farmacológicos formaram as primeiras evidências de que a atividade serotoninérgica pode alterar a propagação da DAC. Tratamentos utilizando ferfluramina (CABRAL-FILHO; TRINDADE-FILHO; GUEDES, 1995), fluoxetina (GUEDES et al., 2002) causaram diminuição na velocidade da DAC. Outros estudos em ratos adultos e juvenis com antidepressivos (Citalopram) também demonstraram uma propagação mais lenta da DAC, sugerindo que o efeito não está relacionado significativamente pela idade (GUEDES et al., 2002, 2017). Em contrapartida, o aumento da propagação da DAC foi observado em vários estudos com animais submetidos a uma dieta com baixo teor de triptofano durante o período de amamentação e idade adulta (FERNSTROM, 2013; SANCHEZ et al., 2015).

Diante da proximidade entre melatonina e serotonina, e da atuação do precursor em comum (triptofano) desses dois neuromoduladores, as evidências observadas nesse estudo, levam a considerar que a atuação da melatonina exógena tende a causar os efeitos observados nos estudos de atividade serotoninérgica e do triptofano. Essa sugestão se torna ainda mais válida diante da enorme atividade profilática da melatonina já descrita na literatura. Pois, sua propriedade antioxidante muito bem conhecida, atua na limpeza de radicais livres, estimulando a transcrição e atividades de enzimas antioxidantes, ligação a metais de transição que inibem a formação de radical hidroxila (RODRIGUEZ et al., 2004). Além disso, essa substância protege lipídios, proteínas (participando do sistema ubiquitina-proteassoma) e DNA de danos oxidativos, protegendo também o DNA mitocondrial contra mutações e deleções (JOU et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2004; CIPOLLA-NETO; DO AMARAL, 2018).

Estudos demonstraram que a melatonina é secretada nas mitocôndrias do cérebro de camundongos e age através de um receptor de melatonina da membrana externa mitocondrial 1 (MT1), com capacidade de prevenir o vazamento do citocromo C e apoptose subsequente (SUOFU et al., 2017).

É evidente que a atuação da domperidona e melatonina nas condições experimentais realizadas no córtex cerebral, se apresentaram de forma antagônica, porém é necessária uma investigação mais aprofundada acerca dos mecanismos centrais e da interação concomitante dessas substâncias no sistema nervoso.

CONCLUSÃO

A indução à hiperprolactinemia proveniente do tratamento com domperidona causou um aumento significativo na velocidade da propagação da DAC, característica evidenciada pela capacidade que a condição patológica tem de aumentar a síntese de corticosteroides, o que promove diminuição de atividade antioxidante no sistema nervoso. Em contrapartida, o tratamento com melatonina exógena se mostrou eficiente na reversão, diminuindo significativamente a velocidade da propagação da DAC, comprovado pela sua propriedade antioxidante e neuroprotetora. Entretanto, ainda há a necessidade de um aprofundamento acerca dos mecanismos de atuação da domperidona e consequente hiperprolactinemia, assim como da melatonina na condução elétrica no córtex cerebral.

REFERÊNCIAS

CABRAL-FILHO, J.; TRINDADE-FILHO, E.; GUEDES, R. Effect of d-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 3, p. 347–350, 1995.

CARLONI, S. et al. Melatonin modulates neonatal brain inflammation through endoplasmic reticulum stress , autophagy , and miR- 34a / silent information regulator 1 pathway. **Journal of Pineal Research**, n. June, p. 370–380, 2016.

CIPOLLA-NETO, J.; DO AMARAL, F. G. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. **Endocrine Reviews**, p. 990–1028, 2018.

DOYLE, M.; GROSSMAN, M. Case report: domperidone use as a galactagogue resulting in withdrawal symptoms upon discontinuation. **Archives of Women's Mental Health**, v. 21, n. 4, p. 461–463, 2018.

FARMER, C.; MATHEWS, A. T.; HOVEY, R. C. Using domperidone to induce and sustain hyperprolactinemia in late-pregnant gilts. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 66, p. 14–20, 2019.

FERNSTROM, J. D. Large neutral amino acids: Dietary effects on brain

neurochemistry and function. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 419–430, 2013.

GARIANO, R. F.; GROVES, P. M. Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices. **Brain Research**, v. 462, n. 1, p. 194–198, 1988.

GORJI, A. Spreading depression: A review of the clinical relevance. **Brain Research Reviews**, v. 38, n. 1–2, p. 33–60, 2001.

GUEDES, R. Handbook of Behavior, Food and Nutrition. **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**, n. October, 2011.

GUEDES, R. C. A. et al. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 115–123, 2002.

GUEDES, R. C. A. et al. Evidence of an inverse correlation between serotonergic activity and spreading depression propagation in the rat cortex. **Brain Research**, v. 1672, p. 29–34, 2017.

GUEDES, R. C.; AMORIM, L. F.; TEODÓSIO, N. R. Effect of aging on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 10, p. 1407–12, 1996.

JANTARASAENGARAM, S.; SREEWAPA, P. Effects of domperidone on augmentation of lactation following cesarean delivery at full term. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 116, n. 3, p. 240–243, 2012.

JOU, M. et al. Critical Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Formation in Visible Laser Irradiation-Induced Apoptosis in Rat Brain Astrocytes (RBA-1). **Journal of Biomedical Science**, v. 3283016, p. 507–516, 2002.

KNOPPERT, D. C. et al. The effect of two different domperidone doses on maternal milk production. **Journal of Human Lactation**, v. 29, n. 1, p. 38–44, 2013.

LEÃO, A. A. P. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 10, n. 6, p. 409–414, 1947.

LIMA, E. DE; CABRAL, F. R.; CAVALHEIRO, E. A. Efeito Neuroprotetor da Melatonina e N-Acetilserotonina na Epileptogênese e no Controle de Crises em Animais Submetidos. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 2, p. 75–78, 2006.

M. ALEEM, J. CHOUDHARI, V. PADWAL, N. BALASINOR, P. P. & M. K. G.-S. Hyperprolactinemia affects spermiogenesis in adult male rats. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 28, p. 39–48, 2005.

MARKUS, R. P. et al. Glândula pineal e melatonina. Em: EDUSP (Ed.). . **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: [s.n.].

MCINTOSH, L. J.; HONG, K. E.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: Baseline studies. **Brain Research**, v. 791, n. 1–2, p. 209–214, 1998.

MCINTOSH, L. J.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Experimental Neurology**, v. 141, n. 2, p. 201–206, 1996.

MONTALVO, I. et al. Improvement in cognitive abilities following cabergoline treatment in patients with a prolactin-secreting pituitary adenoma. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 33, n. 2, p. 98–102, 2018.

MURASE, S. et al. Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 157, n. 1, p. 53–56, 1993.

OCHOA-AMAYA, J. E. et al. Acute and chronic stress and the inflammatory response in hyperprolactinemic rats. **NeuroImmunoModulation**, v. 17, n. 6, p. 386–395, 2010.

OCHOA-AMAYA, J. E. et al. Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. **Life Sciences**, v. 142, p. 66–75, 2015.

PAPASTERGIOU, J. et al. Domperidone withdrawal in a breastfeeding woman. **Canadian Pharmacists Journal**, v. 146, n. 4, p. 210–212, 2013.

POOVATHINGAL, M. A.; BHAT, R.; POOVATHINGAL, M. A. Domperidone induced galactorrhea: An unusual presentation of a common drug. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 3, p. 307–309, 2013.

PRATA LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: Similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 7, p. 987–995, 2004.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, p. 1–9, 2004.

SANCHEZ, C. L. et al. Simplified dietary acute tryptophan depletion: effects of a novel amino acid mixture on the neurochemistry of C57BL/6J mice. v. 1, p. 1–10, 2015.

SEEMAN, M. V. Transient psychosis in women on clomiphene, bromocriptine, domperidone and related endocrine drugs. **Gynecological Endocrinology**, v. 31, n. 10, p. 751–754, 2015.

SEWELL, C. A. et al. Domperidone for Lactation: What Health Care Providers Need to Know. **Obstetrics and Gynecology**, v. 129, n. 6, p. 1054–1058, 2017.

SLOMINSKI AT, KLESZCZYŃSKI K, SEMAK I, JANJETOVIC Z, ZMIJEWSKI MA, KIM TK, SLOMINSKI RM, REITER RJ, F. T. Melatonin receptors in peripheral tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152–166, 2013.

SLOMINSKI, R. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152–166, 2013.

SOBRINHO, L. G. The psychogenic effects of prolactin. **Acta Endocrinologica**, v. 129, n. 1, p. 38–40, 1993.

SUOFU, Y. et al. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 18, p. 7997–8006, 2017.

TENORIO, F. DAS C. A. M. et al. Effects of melatonin and prolactin in reproduction: review of literature. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 3, p. 269–274, 2015.

WAN, E. W. X. et al. Dose-effect study of domperidone as a galactagogue in preterm mothers with insufficient milk supply, and its transfer into milk. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 283–289, 2008.

YU, X. et al. Protective roles of melatonin in central nervous system diseases by regulation of neural stem cells. **Cell Proliferation**, v. 50, n. 2, p. 1–5, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT

INFLUÊNCIA DA DOMPERIDONA NA REPRODUÇÃO MASCULINA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA INFLUENCE OF DOMPERIDONE IN MALE REPRODUCTION: A BIBLIOGRAPHIC REVIEW

EWERTON FYLIPE DE ARAÚJO SILVA^{1,2*}; ANDRÉ PUKEY OLIVEIRA GALVÃO^{1,2};
ADRIANE BASBOSA FERNANDES SILVA²; BRUNO MENDES TENÓRIO¹; MARIA
LUISA FIGUEIRA DE OLIVEIRA¹; FERNANDA DAS CHAGAS ANGELO MENDES
TENÓRIO¹; MARCELO MORAES VALENÇA¹

1. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; 2. Centro Universitário FACOL - UNIFACOL

RESUMO

Atualmente problemas como a subfertilidade e a infertilidade tem afetado casais em cerca de 50% e 16,7%, respectivamente. Desses, a maior parte está associado à infertilidade masculina, o qual abrange cerca de 8% dos homens. Objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica sobre a influência da domperidona na reprodução masculina. Para o estudo buscou-se referenciais relacionados ao tema abordado nas bases de dados do Google Acadêmico, Pubmed, Scielo, Lilacs e Bireme, sendo selecionados trabalhos no período de 1996 a 2020. A domperidona é um medicamento procinético bloqueador da dopamina D2 comumente utilizado para tratar distúrbios da motilidade gastrointestinal. Estudos mostraram que esse medicamento pode causar disfunções na reprodução masculina, pois seu uso causa aumento excessivo nos níveis de prolactina (PRL), observado em 50% dos casos. A PRL modula os receptores FSH e LH nas células de Sertoli e Leydig, e está envolvido na meiose de células germinativas, regulando várias funções dos testículos. O aumento nos níveis de PRL interrompe a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina, inibe a liberação de LH, FSH, e reduz diretamente a esteroidogênese gonadal, causando efeitos expressivos na espermatogênese, assim como afeitos clínicos como hipogonadismo hipogonadotrófico adquirido e até infertilidade. Diante do exposto, pode-se considerar que a domperidona é um possível indutor a disfunções reprodutivas no homem, devido ao seu potencial de causar desregulação no hormônio que regula as gônadas masculinas.

Palavras-chave: Domperidona; Hiperprolactinemia; Testículo; Infertilidade;

ABSTRACT

Currently, problems such as subfertility and infertility have affected couples by about 50% and 16.7%, respectively. Of these, most are associated with male infertility, which covers about 8% of men. The objective was to carry out a literature review on the influence of domperidone on male reproduction. For the study, references were sought related to the topic addressed in the Google Scholar databases, Pubmed, Scielo, Lilacs and Bireme, with papers selected from 1996

to 2020. Domperidone is a prokinetic dopamine D2 blocker drug commonly used for treat gastrointestinal motility disorders. Studies have shown that this drug can cause dysfunctions in male reproduction, as its use causes an excessive increase in prolactin (PRL) levels, observed in 50% of cases. PRL modulates the FSH and LH receptors in S ertoli and Leydig cells, and is involved in germ cell meiosis, regulating various functions of the testicles. The increase in PRL levels interrupts the pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone, inhibits the release of LH, FSH, and directly reduces gonadal steroidogenesis, causing significant effects on spermatogenesis, as well as clinical effects such as acquired hypogonadotrophic hypogonadism and even infertility. Given the above, it can be considered that domperidone is a possible inducer of reproductive dysfunctions in men, due to its potential to cause deregulation in the hormone that regulates male gonads.

Keywords: Domperidone; Hyperprolactinemia; Testicles; Infertility

INTRODUÇÃO

Atualmente, as taxas globais de fertilidade t em caído em decorrência a vários fatores. As estimativas globais indicam que entre 48,5 a 74,2 milhões de casais sofrem com infertilidade (LOTTI; MAGGI, 2018; STARC et al., 2019). Estudos populacionais sugerem que a infertilidade afeta entre 9,3% e 16,7% dos casais provenientes em países em desenvolvimento e países desenvolvidos, respectivamente (BOIVIN et al., 2007; LOTTI; MAGGI, 2018; STARC et al., 2019). Grande parte dos problemas relacionados à fertilidade em casais com idade reprodutiva são geralmente acometidos por problemas de infertilidade masculina.

Dados indicam que a subfertilidade masculina desempenha um papel contributivo em até 50% dos casos. Segundo Lotti e Maggi (2018) até 12% dos homens são afetados pela infertilidade e o problema de azoospermia (não produção de

espermatozoide) apresenta os maiores índices de distúrbios gerais de saúde, associados a um aumento da prevalência de disfunção sexual (LOTTI; MAGGI, 2018). Do percentual de homens inférteis, 10% deles apresentavam fatores de fertilidade associados a danos testiculares reversíveis, como problemas de produção de espermatozoide, afetando potencialmente a fertilidade (ESTEVES; MIYAOKA; ASHOK, 2011; TENORIO et al., 2014; STARC et al., 2019).

Nos mamíferos as gônadas sexuais masculinas são chamadas de testículos e constituem um órgão par, e componentes vitais   sua reprodução e por consequência   perpetuação destes espécimes. As funções desse órgão são controladas por hormônios sintetizados no próprio órgão ou em outras glândulas. Problemas no controle hormonal dos testículos podem causar danos morfológicos ao órgão, promovendo problemas na espermatogênese (formação dos espermatozoide) afetando

potencialmente a fertilidade (TENORIO et al., 2014; STARC et al., 2019).

A domperidona é um medicamento procinético antagonista da dopamina muito utilizado para distúrbios da motilidade gastrointestinal no tratamento sintomático de náuseas e vômitos (RHEW; HAN; OH, 2019). Vários estudos têm evidenciado que esse medicamento tem demonstrado influenciar também na regulação gonadal, alterando níveis hormonais importantes na manutenção e controle da espermatogênese. Estudos mostram que a domperidona têm a capacidade de promover o aumento da produção de prolactina, causando a hiperprolactinemia em mais de 50% dos casos (VILAR et al., 2019). Com base nisso, esse trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura acerca da influência da domperidona na reprodução masculina.

METODOLOGIA

Utilizou-se como metodologia a revisão bibliográfica que consiste na procura de materiais com referencial teórico para análise do tema sobre a influência do medicamento domperidona na reprodução masculina. O levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados do Google Acadêmico, Pubmed, Scielo, Lilacs e Bireme. Foram selecionados trabalhos no período de 1996 a 2020. Tendo a finalidade

de realizar as contribuições científicas ao assunto abordado.

Importância das gônadas masculinas na reprodução

Os testículos são órgãos pares, protegidos por um tecido tênue, chamado de escroto, o qual é responsável por manter a temperatura ideal para a produção de espermatozoides viáveis (SCANLON; SANDERS, 2007). Histologicamente, os testículos estão revestidos por um tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. O parênquima testicular apresenta dois compartimentos: o compartimento intertubular, que é constituído por células de Leydig, células do tecido conjuntivo e alguns vasos sanguíneos e linfáticos, e o compartimento tubular, constituído pelos túbulos seminíferos, que apresenta todas as células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides) e as células de Sertoli (QUEIROZ et al., 2013).

O espermatozoide é a estrutura celular da reprodução nos machos. Essa célula se desenvolve a partir de células tronco testiculares através da proliferação e diferenciação celular, processo chamado de espermatogênese (SCHULZ; MIURA, 2002). As células germinativas masculinas iniciam o seu desenvolvimento a partir de um reservatório renovável de células tronco no interior dos túbulos seminíferos dos

testículos, desde a puberdade até a vida senil (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003a; NETO et al., 2016). Todo o processo espermatogênico normalmente requer aproximadamente um tempo médio de 42 a 76 dias. E a estimativa diária de espermatozoide varia de 150 a 275 milhões (NETO et al., 2016). Esse processo é complexo e depende do código genético das células germinativas, de uma rede de comunicação com as células somáticas do testículo e de uma complexa e interligada rede de interação endócrina, parácrina e autócrina (NETO et al., 2016; ROSER, 2008; VERHOEVEN et al., 2007b).

A espermatogênese dos mamíferos depende da atuação de vários peptídeos e hormônios esteroides, necessários para o desenvolvimento e funcionamento das células germinativas e somáticas do testículo. O hipotálamo regula a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), este age na hipófise regulando o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH se liga aos receptores nas células de Leydig estimulando a produção de andrógenos e estrógenos, enquanto que o FSH se liga as células de Sertoli para estimular qualitativamente a espermatogênese e modular a produção de estrógenos, inibina e activina (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; NETO et al., 2016; ROSER, 2008).

O LH (via testosterona) e o FSH são os principais hormônios que regulam a espermatogênese (VERHOEVEN et al., 2007b). O LH é modulado pela ação da testosterona no hipotálamo (inibindo o GnRH) e hipófise (inibindo o LH). A modulação do FSH é realizada pela inibina (que atua inibindo) e activina (que atua estimulando) na hipófise (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004; ROSER, 2008). Nos machos, a expressão dos receptores para FSH é limitada às células de Sertoli e os receptores para LH são encontrados principalmente nas células de Leydig, apesar de também serem observados em células germinativas (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004).

Utilização geral da domperidona

A domperidona é um medicamento utilizado vulgarmente para distúrbios da motilidade gastrointestinal como: Síndromes dispépticas frequentemente associadas a um retardo de esvaziamento gástrico, refluxo gastroesofágico e esofagite, e para a prevenção de sintomas gastrointestinais associados ao tratamento dopaminérgico da doença de Parkinson utilizando principalmente L-dopa e bromocriptina (LA TORRE; FALORNI, 2007). Esse medicamento tem vários efeitos inibitórios sobre a motilidade, incluindo redução do esfíncter esofágico inferior e pressões intragástricas. Esses efeitos

resultam da supressão da liberação de acetilcolina dos neurônios motores mioentéricos, antagonizando o efeito inibitório da dopamina sobre esses neurônios (POOVATHINGAL; BHAT; RAMAMOORTHY, 2013).

Essa droga tem um tempo de meia vida em torno de 7-12h, sendo primordialmente um antagonista dos receptores D2, não apresentando envolvimento importante de outros receptores. Além disso, não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica para causar efeitos colaterais piramidais extras, contudo, exerce efeitos nas partes do sistema nervoso central que não possuem essa barreira, tais como aquelas que regulam a emese (zona de ativação dos quimiorreceptores), temperatura, etc. (POOVATHINGAL; BHAT; RAMAMOORTHY, 2013)

Relações fisiopatológicas da domperidona na reprodução masculina

Estudos atuais têm evidenciado alguns cuidados acerca do uso da domperidona, pois esses relatos mostraram que este medicamento é um importante indutor da hiperprolactinemia, já que está associado a via dopaminérgica, atuando sobre a glândula hipófise, aumentando os níveis de prolactina, sendo utilizado como medicamento no modelo experimental de indução e sustentação da hiperprolactinemia em algumas espécies de

animais (OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2015; FARMER; MATHEWS; HOVEY, 2019). E em alguns estudos realizados em pacientes em tratamento contra desordens gastrointestinais, observando que apenas 1% apresentam sintomas provenientes da hiperprolactinemia como: galactorreia, ginecomastia e irregularidades menstruais. Entretanto, estudos mostraram que o uso de domperidona 10mg com administração intravenosa induziu um aumento agudo na concentração de PRL em mais de 50% de pacientes saudáveis, em um tempo de 15 min após a utilização (LA TORRE; FALORNI, 2007; VILAR et al., 2019). Outro estudo também evidenciou uma índice de hiperprolactinemia em 50% de pacientes tratados com medicamentos procinético que são bloqueadores dos receptores da dopamina D2 (MOLITCH, 2008).

Geralmente a alteração dos níveis de prolactina induzidos pelo uso de drogas é leve (25 – 100 ng/ml), entretanto há muita variação dependendo do medicamento. Podendo variar de 28 a 380 ng/ml, como no estudo feito com 1234 pacientes. 64% dos pacientes apresentaram aumento nos níveis de prolactina <100 ng/mL e 5% níveis $\geq$ 250 ng/mL (VILAR et al., 2008). Os níveis mais altos de hiperprolactinemia foram ocasionados pelo uso de antipsicóticos clássicos e risperidona. Em estudos feitos com uma paciente que fez tratamento com

domperidona por 3 meses, observou-se níveis muito altos, entre (720 e 712 ng/mL), decorrente de um microadenoma hipofisário não funcional. O qual após a descontinuação do medicamento, os níveis caíram para a faixa normal (VILAR; VILAR, 2018). Esse estudo concluiu que a domperidona deve ser incluída na lista de medicamentos que podem estar associados a níveis muito altos de PRL.

As ações da Prolactina (PRL) nas gônadas masculinas ainda são pouco conhecidas, ultimamente vários estudos realizados em animais e humanos tem mostrado que a PRL modula positivamente vários aspectos da função testicular, o qual sugere um importante fator na fisiologia do aparelho reprodutor masculino (RAUT et al., 2019). Pesquisas iniciais em gônadas masculinas evidenciaram que a PRL modula os receptores FSH e LH nas células de Sertoli e Leydig, e está envolvido na meiose de células germinativas, regulando várias funções dos testículos, porém não havia clareza se a PRL era secretada, produzida ou apenas armazenada nos testículos (GUILLAUMOT; TABONE; BENAHMED, 1996). Em outros estudos mais atuais com camundongos pré-púberes e adultos, observou-se que havia transcrição da PRL nas células de Leydig, espermatogônia, espermatozoides de paquíteno e preleptoteno (ISHIDA et al., 2010).

A condição de hiperprolactinemia, causa uma diminuição na produção de kisspeptina no nível hipotalâmico e interrompe a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina, inibindo consequentemente a liberação dos hormônios luteinizante, folículo-estimulante, e reduz diretamente a esteroidogênese gonadal. Isso resulta em efeitos marcantes na espermatogênese, variando da alteração na qualidade dos espermatozoides até a parada espermatogênica completa (BRASIL, 2015; TSUTSUMI; WEBSTER, 2009; VILAR et al., 2019). Além disso, a hiperprolactinemia favorece ao aparecimento de implicações clínicas de grande relevância, como hipogonadismo hipogonadotrófico adquirido (VILAR et al., 2018a, 2019), estando presente em 1,5% de pacientes com disfunção erétil (GLEZER; BRONSTEIN, 2012; VILAR et al., 2019).

Nos homens, a hiperprolactinemia além de causar distúrbios sexuais e até infertilidade, pode também causar ginecomastia, apresentando casos raros de galactorreia. A diminuição do libido sexual também é um fator comum a essa condição (RIZZO et al., 2020).

Estudos já mostraram que hiperprolactinemia têm sido associada a vários efeitos de antifertilidade tanto em ratos como humanos, dentre eles: anormalidades estruturais nos

espermatozoides, alterações testiculares como desorganização do epitélio seminífero, esfoliação de células germinativas, aumento da espessura da parede tubular, conteúdo lipídico anormal das células leydig, distorção estrutural das junções comunicantes das células sertoli-germinativas e degeneração citoplasmática das células de Sertoli apicais, além de aumento da porcentagem de túbulos contorcidos com espermatogônia e espermatócitos apoptóticos (M. ALEEM, J. CHOUDHARI, V. PADWAL, N. BALASINOR, 2005; VILAR et al., 2018a, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testículos como órgãos masculinos fundamentais para a perpetuação das espécies, é controlado de várias maneiras por hormônios produzidos intrínseca e extrinsecamente. Qualquer alteração ocasionada nas vias hormonais, sejam elas por fatores fisiológicos, patológicos ou farmacológicos, podem promover as implicações na espermatogênese. A domperidona, tem a capacidade de aumentar os níveis de prolactina, hormônio esse que tem controle sobre as funções gonadais, inibindo a liberação pulsátil de FSH, LH e testosterona. O aumento desse hormônio causa alterações testiculares, promovendo anormalidades estruturais nos

espermatozoides e consequentemente efeitos de subfertilidade e/ou infertilidade para o homem.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS - HIPERPROLACTINEMIA. **Portaria SAS/MS nº 1160, de 18 de novembro de 2015.**, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/19/MINUTA-de-Portaria-SAS-PCDT-Hiperprolactinemia-10-11-2015.pdf>>.
- FARMER, C.; MATHEWS, A. T.; HOVEY, R. C. Using domperidone to induce and sustain hyperprolactinemia in late-pregnant gilts. **Domestic Animal Endocrinology**, 2019. v. 66, p. 14–20. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.05.004>>.
- FUJINO, T. *et al.* Effects of Domperidone on Serum Prolactin Levels in Human Beings. **Endocrinologia Japonica**, 1980. v. 27, n. 4, p. 521–525.
- GLEZER, Andrea; BRONSTEIN, Marcello D. Approach to the patient with persistent hyperprolactinemia and negative sellar imaging. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2012. v. 97, n. 7, p. 2211–2216.
- HOLDCRAFT, R. W.; BRAUN, R. E. Hormonal regulation of spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, 2004. v. 27, n. 6, p. 335–342.
- HOLSTEIN, A. F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2003. v. 1, p. 1–16.
- KELLEY, S. R.; KAMAL, T. J.; MOLITCH, M. E. Mechanism of verapamil calcium channel blockade-induced hyperprolactinemia. **American Journal of Physiology - Endocrinology**

- and Metabolism**, 1996. v. 270, n. 1 33-1.
- M. ALEEM, J. CHOUDHARI, V. PADWAL, N. BALASINOR, P. P. & M. K. G.-S. Hyperprolactinemia affects spermiogenesis in adult male rats. **Journal of Endocrinological Investigation**, 2005. v. 28, p. 39–48.
- MOLITCH, M. E. Drugs and prolactin. **Pituitary**, 2008. v. 11, n. 2, p. 209–218.
- NETO, F. T. L. *et al.* Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2016. v. 59, p. 10–26. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>>.
- OCHOA-AMAYA, J. E. *et al.* Acute and chronic stress and the inflammatory response in hyperprolactinemic rats. **NeuroImmunoModulation**, 2010. v. 17, n. 6, p. 386–395.
- OCHOA-AMAYA, Julieta E. *et al.* Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. **Life Sciences**, 2015. v. 142, p. 66–75. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.016>>.
- POOVATHINGAL, M. A.; BHAT, R.; RAMAMOORTHY. Domperidone induced galactorrhea: An unusual presentation of a common drug. **Indian Journal of Pharmacology**, 2013. v. 45, n. 3, p. 307–308.
- QUEIROZ, G. C. D. *et al.* Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. **Animal Reproduction**, 2013. v. 55, n. 81, p. 45–54.
- RHEW, K.; HAN, N.; OH, J. M. Impact of safety warning on domperidone prescribing for geriatric patients in South Korea: Analysis of national insurance claim data. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2019. v. 16, n. 16.
- RIZZO, L. F. L. *et al.* SPECIAL ARTICLE - REVIEW HYPERPROLACTINEMIA ASSOCIATED WITH PSYCHIATRIC DISORDERS Prolactin physiology Hyperprolactinemia Hyperprolactinemia secondary to the treatment of psychiatric disorders. **Medicina**, 2020. p. 670–680.
- ROSER, J. F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**, 2008. v. 107, n. 3–4, p. 179–196.
- SCANLON, V. .; SANDERS, T. **Essentials of anatomy and physiology**. 5ª Edição ed. [S.l.]: [s.n.], 2007.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2002. v. 26, n. 1, p. 43–56.
- STARC, A. *et al.* INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. **Acta Clin Croat**, 2019. v. 58, n. 3, p. 508–515.
- TENORIO, Bruno Mendes *et al.* Extremely low-frequency magnetic fields can impair spermatogenesis recovery after reversible testicular damage induced by heat. **Eletromagnetic biology and medicine**, 2014. v. 8378, n. 2, p. 139–146.
- TORRE, D. LA; FALORNI, A. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, 2007. v. 3, n. 5, p. 929–951.
- TSUTSUMI, R.; WEBSTER, N. J. G. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. **Endocrine Journal**, 2009. v. 56, n. 6, p. 729–737.
- VERHOEVEN, G. *et al.* The role of androgens in the control of spermatogenesis: lessons from transgenic models involving a Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor. **Anim. Reprod.**, 2007. v. 4, n. 1/2, p. 3–14.
- VILAR, L. *et al.* Diagnosis and management of hyperprolactinemia: Results of a Brazilian multicenter study

- with 1234 patients. **Journal of Endocrinological Investigation**, 2008. v. 31, n. 5, p. 436–444.
- VILAR, Lucio *et al.* Controversial issues in the management of hyperprolactinemia and prolactinomas – An overview by the Neuroendocrinology Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 2018. v. 62, n. 2, p. 236–263.
- _____. *et al.* Pitfalls in the Diagnostic Evaluation of Hyperprolactinemia. **Neuroendocrinology**, 2019. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/499694>.
- _____.; VILAR, C. Very high prolactin levels associated to domperidone therapy. **Endocrine Abstracts**, 2018. v. 56, p. P88

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones 2126 8840 | 2126 8351
www.ccb.ufpe.br

Recife, 19 de junho de 2018.

Ofício nº 46/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Marcelo Moraes Valença**
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.011943/2018-17**

Certificamos que a proposta intitulada "**Análise morfogenética de gônadas e cérebro de ratos induzidos a hiperprolactinemia e tratados com melatonina.**", Registrada com o nº **23076/011943/2018-17** sob a responsabilidade de **Prof. Marcelo Moraes Valença** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 06/06/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/06/2018 a 30/06/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	36
Peso/Idade	90 dias
Sexo	Macho (24) e fêmea (12)
Origem	Bioterio do CAV- UFPE

Atenciosamente,

Pedro V. Carelli

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584