

Efeito da administração do citrato de clomifeno durante o período perinatal no comportamento sexual, peso dos órgãos e concentração hormonal de ratos Wistar machos e fêmeas

Effects of perinatal period administration of clomiphene citrate in sexual behavior, organ weights and hormone concentration of Wistar male and female rats

Andrea Lucia Natali OLIANI^{1,2}; Lilian Mara Kirsch DIAS²; Jeanete Lopes NAVES³; Maria Martha BERNARDI²; Claudio Alvarenga OLIVEIRA²

¹ Universidade Paulista, São Paulo – SP, Brasil

² Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo – SP, Brasil

³ Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo – SP, Brasil

Resumo

Foram investigados os efeitos da exposição perinatal ao citrato de clomifeno no comportamento sexual, peso dos órgãos e concentração hormonal de ratos machos e fêmeas. Os animais receberam quatro doses de 2 mg/mL de citrato de clomifeno, no período perinatal (21 dias de gestação – DG21), nos dias 1 (DN1), 2 (DN2) e 3 (DN3) após o nascimento dos filhotes. O tratamento causou desenvolvimento de ovário policístico em 70% das fêmeas, masculinização do comportamento sexual das fêmeas e alteração do comportamento sexual dos machos evidenciado pela redução no número de ejaculações. Em relação aos níveis hormonais, observou-se diminuição de FSH na prole masculina. Concluiu-se que o citrato de clomifeno interfere na capacidade reprodutiva de ratos machos e fêmeas, e na orientação sexual de fêmeas, quando administrado perinatalmente.

Palavras-chave: Desruptores endócrinos. Antiestrogênio. Comportamento homossexual. Ejaculação.

Abstract

The effects of prenatal exposure to clomiphene citrate in sexual behavior, organ weight and hormone concentrations of male and female rats was evaluated. The animals received four doses of clomiphene citrate 2 mg/mL each during the prenatal period (21 days of gestation – DG21) on days 1 (DN1), 2 (DN2) and 3 (DN3) after the birth of the puppies. The treatment led to the development of polycystic ovaries in 70% of the females, masculinization of female sexual behavior and changes in sexual behavior of males evidenced by the reduction in the number of ejaculations. In regards to hormone levels, a decrease in the FSH levels in male offspring was observed. It was concluded that clomiphene citrate interferes with the reproductive capacity of male and female rats and female sexual orientation when prenatally administered.

Keywords: Endocrine disruptors. Antiestrogen. Homosexual behavior. Ejaculation.

Introdução

Alterações hormonais observadas durante a diferenciação sexual e suas consequências no comportamento sexual de animais é um assunto que tem despertado a atenção de pesquisadores. Algumas drogas e/ou agentes químicos são implicados como causadores de distúrbios reprodutivos, por atuarem como desruptores endócrinos (KAVLOCK et al., 1996; MONIZ et al., 2005) em humanos (SULTAN et al., 2001) e animais (GERARDIN et al., 2006), tanto pela contaminação ambiental (HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2014)

como por sua aplicação em protocolos reprodutivos (SAKHAVAR; KAVEH; SADEGI, 2014).

O citrato de clomifeno tem atividade agonista e antagonista de receptores de estrógeno, atuando como modulador e foi utilizado como um bloqueador de receptor de estrógeno no estudo de mecanismos

Correspondência para:

Andrea Lucia Natali Oliani
R. Dr. José Benedito Viana de Moraes, 265, bl. 02, Apto. 14
CEP 05351-005, São Paulo, SP, Brasil
e-mail: andrea.natali@gmail.com

Recebido: 24/07/2014

Aprovado: 13/04/2015

moleculares da diferenciação sexual do cérebro de ratos (GIANNAKOPOULOU et al., 2001). Essa droga vem sendo utilizada em programas reprodutivos para tratamento de mulheres (LEANZA et al., 2014) e homens (ROTH; RYAN; MEACHAM, 2013) com infertilidade. Investigação realizada com tamoxifeno, outro fármaco antiestrogênico, no período perinatal, relatou a ausência de atividade sexual em ratos machos adultos devido ao atraso nas latências para primeira monta e intromissão, demonstrando a extrema sensibilidade dos receptores nos núcleos hipotalâmicos sexuais durante este período inicial da vida. Além disso, foi constatado que a aplicação de drogas inibidoras da aromatase durante esse período de diferenciação sexual provocou inatividade sexual em 70% dos ratos machos tratados (CSABA; KARABÉLYOS, 2001) e que 25% apresentaram comportamento sexual feminino (receptividade e aceitação de monta) (GERARDIN et al., 2006), demonstrando a necessidade da presença de estrógeno durante esse período crítico. Ademais, quando os ratos machos que receberam o citrato de clomifeno foram castrados e tratados com estradiol, 60% apresentaram comportamento feminino (PEREIRA; CONEGLIAN-MARISE; GERARDIN, 2003). Esses estudos ressaltam a extrema sensibilidade do sistema de transdução entre receptor-sinal nos núcleos hipotalâmicos sexuais, em mamíferos, durante o período inicial da vida, ocasionando alterações comportamentais sexuais que se manifestam na fase adulta.

O efeito da aplicação do citrato de clomifeno durante o período perinatal na atividade reprodutiva, tanto de ratos machos como fêmeas, ainda não foi investigado. Essas informações seriam importantes para melhor compreensão do mecanismo de ação e efeito dessa droga na reprodução de mamíferos de ambos os gêneros. Devido ao papel modulador de receptores de estrógeno, a investigação do efeito do emprego do citrato de clomifeno permitirá o maior entendimento da função do estrógeno na fisiologia reprodutiva do macho.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos tardios da exposição perinatal ao citrato de clomifeno no comportamento sexual, peso dos órgãos e concentração hormonal de ratos machos e fêmeas de forma a contribuir com o conhecimento sobre o mecanismo de ação de drogas antiestrogênicas, na fisiologia cerebral nessa fase crítica do desenvolvimento e no comportamento sexual de ratos.

Material e Métodos

Animais e Instalações

Os experimentos com animais foram realizados nas instalações do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de São Paulo (23°34'10"S; 46°44'20"O). Foram utilizados 40 ratos fêmeas, da linhagem Wistar, prenhes, com aproximadamente 90 dias de idade, alojadas em caixas de polipropileno com tampa metálica medindo 40 x 50 x 20 cm, em número de três por caixa e mantidos em biotério com luz controlada com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Água e comida (ração comercial balanceada) foram fornecidas aos animais *ad libitum*.

Tratamento

As 40 ratas mães foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos: Grupo Experimental (GE) e Grupo Controle (GC). Os tratamentos foram divididos em quatro doses iguais: de 2 mg/mL de citrato de clomifeno (SHUGHRUE; LANE; MERCHENTHALER, 1997) e solução salina intraperitoniais nos GE e GC, respectivamente. A primeira e todas as outras aplicações foram realizadas na mãe no período perinatal (21 dias de gestação – DG21) e as outras três doses subsequentes, nos dias 1 (DN1), 2 (DN2) e 3 (DN3) após o nascimento dos filhotes (DN0). Ao nascimento da prole, foi efetuada a padronização das ninhadas em oito filhotes por rata-mãe, sendo, quando possível, quatro filhotes fêmeas (f1) e quatro filhotes machos (f1).

O período de amamentação foi de 21 dias. Após o desmame, os filhotes foram separados por sexo e tra-

tamento, e alojados em gaiolas de polipropileno, sendo mantidos nas mesmas condições laboratoriais de seus pais. As ratas que não pariram no DG21 foram descartadas do experimento. Os animais foram monitorados, avaliados e classificados na fase do ciclo estral diariamente e pesados a cada dois dias. Todos os animais foram mantidos de acordo com os princípios éticos de pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pelo comitê de ética da “Comissão de Ética para Uso dos Animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (número de protocolo: 1837/2009), para que a pesquisa fosse realizada dentro dos padrões de ética estabelecidos pelo comitê.

Avaliação Comportamental

As observações comportamentais foram realizadas na Sala de Ciclo Invertido, iluminada com duas lâmpadas vermelhas (20 w), entre 12h e 18h. Foram utilizadas ratas fêmeas e ratos machos, conforme metodologia para cada animal. A idade mínima dos animais foi de 100 dias e foram utilizados somente em um experimento e sem repetições, eliminando possibilidades de “vícios” ou “aprendizagem” individual.

As ratas fêmeas experimentais estavam necessariamente na fase de estro do ciclo estral. Após as avaliações comportamentais, todos os animais foram decapitados para posterior análise de peso dos órgãos e concentração hormonal sérica.

Avaliação do comportamento sexual de Ratas Fêmeas

Da prole feminina, foram utilizados 16 animais, GE (n = 10) e GC (n = 6). Após a detecção da fêmea em estro, esta foi colocada na gaiola de comportamento junto com um macho experiente por um período de 15 minutos. Os parâmetros observados foram: 1) latência para primeira monta sem intromissão; 2) número total de montas sem intromissão; 3) número total de lordoses (GERARDIN; PEREIRA, 2002; GERARDIN et al., 2005, 2006).

Avaliação do comportamento sexual de Ratos Machos

Da prole masculina, foram utilizados 18 animais, GE (n = 10) e GC (n = 8). Para a avaliação do comportamento sexual, cada rato foi colocado individualmente na gaiola de comportamento com uma fêmea sexualmente receptiva (ARTECHE et al., 1997), por um período de 30 minutos. Os parâmetros observados foram: 1) latência para a primeira monta com intromissão; 2) número total de montas com intromissão; 3) latência para primeira monta sem intromissão; 4) número Total de montas sem intromissão; 5) latência para a primeira ejaculação; 6) número total de ejaculações e 7) número de montas pós-ejaculatórias (GERARDIN; PEREIRA, 2002; GERARDIN et al., 2005, 2006).

Avaliação do comportamento Homossexual de Ratas Fêmeas

Da prole feminina, foram utilizadas 22 ratas filhas, sendo do GE (n = 14) e GC (n = 8). Após a detecção da fêmea em cio, esta foi colocada na gaiola de comportamento junto com uma rata isca por um período de 15 minutos. Os parâmetros observados foram: 1) latência para primeira monta e 2) número total de lordoses (GERARDIN; PEREIRA, 2002; GERARDIN et al., 2005, 2006).

Avaliação do comportamento Homossexual de Ratos Machos

Da prole masculina, foram utilizados 20 ratos filhos, sendo GE (n=10) e GC (n=10). Para a avaliação do comportamento sexual, cada macho experimental foi colocado individualmente na gaiola de comportamento com um macho viril, por um período de 30 minutos. Os parâmetros observados foram: 1) latência para a primeira monta; 2) número total de montas; 3) latência para a primeira lordose; 4) número total de lordoses (GERARDIN; PEREIRA, 2002; GERARDIN et al., 2005, 2006).

Análises Hormonais

As análises dos hormônios estrógeno e testosterona foram realizadas pelo método “Coat-A-Count”, tecno-

logia *Siemens Medical Solutions Diagnostics* no laboratório LDH da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal. As análises dos hormônios FSH e LH foram realizadas pelo laboratório GENESE – Produtos e Diagnósticos Ltda., que forneceu a tecnologia Luminex™ xMAP, a qual possui a capacidade de detectar vários analitos em um único teste (multiplex) com elevada sensibilidade e especificidade dos resultados. Essa tecnologia consegue executar grande variedade de bioensaios de forma rápida, precisa e econômica.

Análise estatística

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

Resultados

Todas as fêmeas foram monitoradas e avaliadas diariamente quanto à fase do ciclo estral; as fêmeas tratadas com clomifeno apresentaram, a partir da primeira semana, células compatíveis com fase de estro, sendo que 70% destas fêmeas apresentaram ovário policístico e 80% apresentaram útero edemaciado, avaliadas no final dos experimentos no momento da eutanásia. Todas as fêmeas do grupo controle apresentaram ciclo estral normal até o final do experimento.

Em relação ao comportamento sexual das fêmeas, foi constatada uma masculinização evidenciada pelo aumento da latência para primeira lordose e menor número de lordose nos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle (Tabela 1).

Observou-se alteração do comportamento sexual dos machos tratados evidenciado pela redução significativa no número de ejaculações ($p = 0,021$) e na latência para a primeira ejaculação ($p = 0,028$) nos animais do GE quando comparado ao GC (Tabela 2).

Tabela 1 – Comportamento sexual de fêmeas oriundas de mães tratadas no período perinatal com citrato de clomifeno – FMVZ-USP, Departamento de Patologia – 2011

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

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

Tabela 2 – Avaliação do comportamento sexual da prole masculina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno – FMVZ-USP, Departamento de Patologia – 2011

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

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

Na avaliação do comportamento homossexual das fêmeas, a latência para primeira monta foi menor ($p = 0,029$) no GE quando comparada ao GC. Observou-se, também, que o número de lordoses executadas pelas fêmeas do GE foi maior ($p = 0,035$) do que do GC (Tabela 3).

Na avaliação do comportamento homossexual dos machos, não houve nenhuma diferença entre os grupos nos parâmetros avaliados.

Na prole masculina exposta ao citrato de clomifeno, observou-se que o peso do fígado e do aparelho repro-

ductor foram significativamente menores que daqueles do grupo controle; nas fêmeas ocorreu o contrário em relação ao peso do fígado (Gráfico 1).

Em relação aos níveis séricos de estrógeno, testosterona, FSH e LH da prole masculina e feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno observou-se diferença significativa apenas nos níveis de FSH da prole masculina, sendo menor em ratos do GE em relação àqueles do GC (Gráfico 2).

Tabela 3 – Comportamento homossexual de fêmeas oriundas de mães tratadas no período perinatal com citrato de clomifeno – FMVZ-USP, Departamento de Patologia – 2011

	GC (n = 8)	GE (n = 14)	p
Latência para 1ª monta (min)	13,13 ± 1,26	8,32 ± 1,65*	0,029
Número de lordoses	0,75 ± 0,62	7,14 ± 2,48*	0,035

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

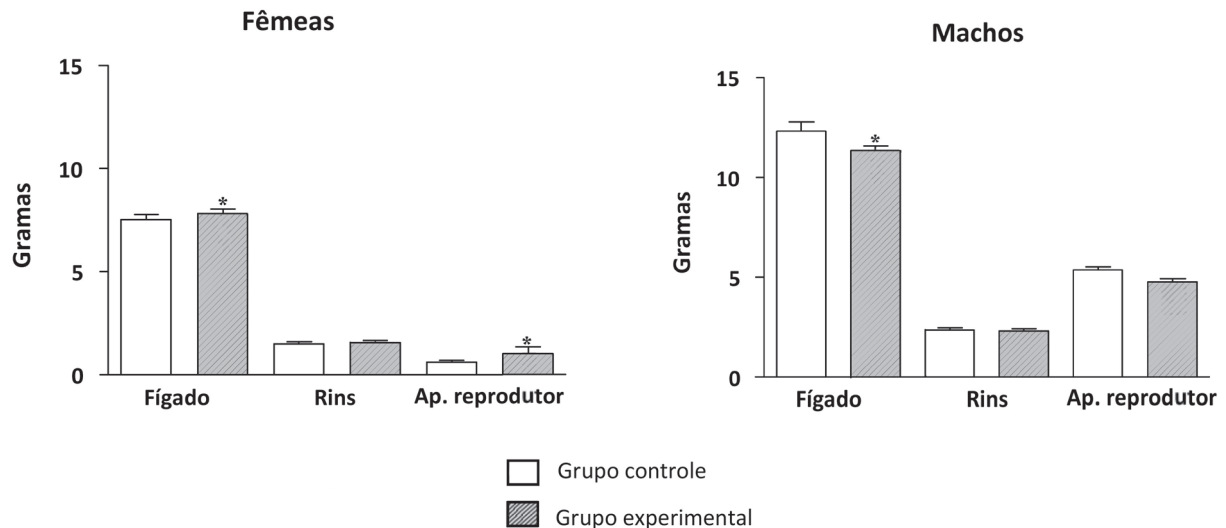


Gráfico 1 – Peso de órgãos da prole masculina e feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno. Os dados são apresentados em médias e seus respectivos erros-padrão. Ratas (grupo controle – $n = 21$; grupo experimental – $n = 22$) e ratos (grupo controle – $n = 8$; grupo experimental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

Fonte: (OLIANI, 2011)

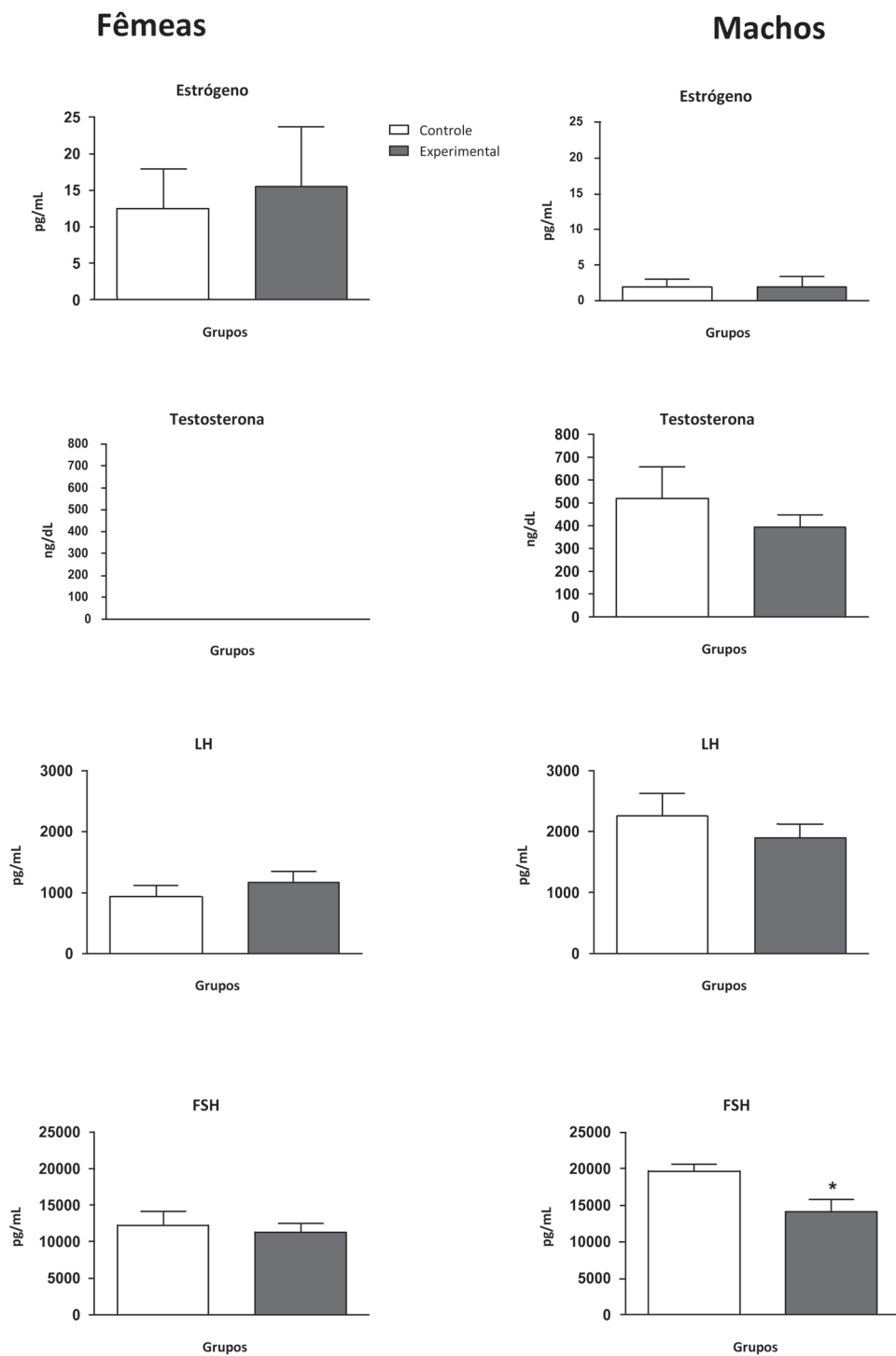


Gráfico 2 – Níveis séricos de estrógeno, testosterona, FSH e LH da prole masculina e feminina de ratas expostas no período perinatal ao citrato de clomifeno. Os dados são apresentados em médias e seus respectivos erros-padrão. Ratos (grupo controle – n = 8; grupo experimental – n = 13) e ratas (grupo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

Fonte: (OLIANI, 2011)

Discussão

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

A aplicação do clomifeno causou o desenvolvimento de ovário policístico e útero edemaciado em 70 e 80% das fêmeas, respectivamente. Dados semelhantes foram observados por Maharjan, Nagar e Nampoothiri (2010) após administração de letrozol, um inibidor da aromatase, em ratas adultas. O letrozol é empregado para indução do modelo de síndrome do ovário policístico (SOP), pois o bloqueio da aromatase aumenta a produção de andrógenos ovarianos levando ao hiperandrogenismo, uma característica da síndrome. Diante desses resultados, o citrato de clomifeno pode ser uma alternativa para indução da síndrome do ovário policístico utilizando o rato Wistar como modelo experimental.

Investigações realizadas em ratos “knockout” para o gene (ARKO) aromatase (deficientes na atividade da enzima aromatase) e, por conseguinte, incapaz para aromatizar andrógenos em estrogênio, mostraram reduzidos níveis de lordose após o tratamento de ratos adultos com estradiol e progesterona, o que sugere que o estradiol é necessário para o desenvolvimento dos mecanismos neurais que controlam este

comportamento (MONIZ et al., 2005). A exposição ao citrato de clomifeno no período perinatal levou à masculinização comportamental das fêmeas neste presente estudo, evidenciado pela redução no comportamento heterossexual das fêmeas expresso pelo menor número de lordoses e maior latência para este reflexo. Observou-se, também, que as fêmeas do grupo experimental apresentaram maior comportamento homossexual evidenciado pela menor latência para a primeira monta e maior número de lordoses. Essas alterações do comportamento sexual das fêmeas podem ter sido causadas pela redução nos níveis de estrógeno decorrentes da aplicação do citrato de clomifeno. Esses resultados concordam com Döhler et al. (1984), que verificaram que o tratamento pós-natal de ratas com o tamoxifeno, outro antagonista de receptores de estrógeno, defeminiza tanto o controle de gonadotrofinas como o comportamento sexual das fêmeas, enquanto a administração concomitante de doses baixas de estradiol impede estes efeitos.

A importância dos hormônios sexuais para a diferenciação fisiológica e comportamental foi estabelecida desde a década de 1950 (PHOENIX et al., 1959; WHALEN; EDWARDS, 1967). Contudo, a redução do comportamento sexual de fêmeas expostas perinatalmente ao inibidor de aromatase e o concomitante aumento do seu comportamento homossexual provavelmente se devem às alterações no ambiente hormonal durante o processo de diferenciação sexual no início da vida dos animais neste estudo.

O tratamento com clomifeno, no período perinatal, não causou diferenças significativas na maturação sexual, mas houve efeito negativo no comportamento sexual dos machos. Resultados semelhantes foram observados por Pereira, Coneglian-Marise e Gerardin (2003), que avaliaram a aplicação de uma dose de clomifeno no dia do nascimento dos ratos.

Ratos machos expostos ao citrato de clomifeno no último dia da gestação e nos três primeiros dias da lactação não ejacularam. Esse resultado está de acordo com os obtidos por Gerardin et al. (2006) e por

Csaba e Karabélyos (2001), que demonstraram ausência de atividade sexual em ratos machos tratados com tamoxifeno, outro antiestrogênio, logo após o nascimento. A diferença constatada com as observações de Gerardin et al. (2006) é que no presente trabalho os ratos machos efetuaram a monta, ou seja, não houve alteração no comportamento sexual de motivação e a não ejaculação decorreu da ausência da ereção, pois o número de montas com intromissão não foi modificado. O tratamento reduziu o processo ejaculatório, mas os animais mantiveram o comportamento heterossexual. Avaliou-se, também, o comportamento homossexual desses ratos, observando-se a ausência de diferenças significativas entre os dados de animais do grupo controle e experimental. Parece que o momento e/ou período de inibição da aromatase atinge diferentes aspectos do comportamento sexual de ratos machos. Apesar de ter sido observada redução total na ejaculação dos ratos expostos ao inibidor da enzima, não foi observada feminilização comportamental dos animais. Além disso, não houve redução nos níveis de testosterona, assim como nos níveis séricos de LH, porém com diferenças nos níveis séricos de FSH. A análise desses dados parece bastante complexa. De fato, os parâmetros ligados à motivação sexual, também dito apetitivo, como as latências para monta e intromissão, não foram alterados, sugerindo que os animais apresentaram orientação heterossexual. No entanto, verificou-se queda na potência do comportamento sexual, ou seja, em parâmetros consumatórios, no caso do número de ejaculações.

É fato conhecido que o GnRH – hormônio liberador do hormônio luteinizante – no hipotálamo estimula tanto a liberação de LH como a de FSH da hipófise, porém mais de LH. A proporção de FSH para LH liberado pelo GnRH aumenta quando a frequência de pulsos de secreção de GnRH diminui. O LH está envolvido com a produção de andrógenos, enquanto o FSH estimula as células de Sertoli a produzir estrógeno. O FSH estimula o gene de transcrição da aromatase, enzima específica para a síntese do estradiol (BER-

NE et al., 2006). A observação de redução nos níveis de FSH e não de LH, no presente trabalho, explicaria a ausência de alterações nos níveis de testosterona. No entanto, não se esperaria ausência da ejaculação dos ratos expostos ao citrato de clomifeno uma vez que esta depende, em parte, de níveis séricos normais de testosterona. Neste sentido, muitos estudos indicam que a ocitocina tem um papel-chave na regulação da ereção peniana. Filippi et al. (2003), comentam em sua revisão que a ereção peniana depende tanto da presença de testosterona como de estrógeno para ativar receptores da ocitocina a liberar um potente estimulante da contração do epidídimo, a endotelina-1 que, por sua vez, potencializa o efeito da ocitocina. Os esteroides sexuais regulam a densidade dos receptores da ocitocina no epidídimo. A privação de estrógenos endógenos pelo bloqueador da aromatase, o letrozol, induz hiporesponsividade dos receptores de ocitocina, prejudicando a ejaculação. Contudo, a hipótese é que a exposição perinatal ao citrato de clomifeno tenha alterado as relações ocitocina-estrógeno e, com isto, a ejaculação dos animais.

A redução do peso dos órgãos reprodutivos masculinos, observada no presente trabalho, não concorda com os achados de Oliveira et al. (2002) e Gerardin et al. (2006). Provavelmente, porque nesses estudos foi realizada uma única aplicação de clomifeno no período neonatal, o que pode não ter sido suficiente para causar alterações no trato reprodutivo.

Neste presente trabalho também foi observada redução dos níveis de FSH da prole masculina, na idade adulta, de animais tratados. Dessa maneira, é possível que a prole masculina de ratas expostas perinatalmente ao citrato de clomifeno possa também ter tido comprometimento dos túbulos seminíferos, levando à redução no peso dos órgãos reprodutivos. Mais ainda, o comprometimento da função dos túbulos seminíferos pode ter contribuído para a ausência de ejaculações. Portanto, a exposição perinatal ao citrato de clomifeno em ratos machos não alterou a orientação sexual dos mesmos, mas reduziu o pro-

cesso ejaculatório. Bharti, Misro e Rai (2013) observaram um efeito adverso do tratamento com citrato de clomifeno na espermatogênese de ratos adultos e ainda destacam a necessidade de uma abordagem mais cuidadosa quando do emprego do protocolo de tratamento reprodutivo com o citrato de clomifeno em homens com infertilidade. Não há dúvidas que o estrógeno afeta a espermatogênese, mas os efeitos são complexos e o seu papel na fisiologia normal do macho adulto e no homem ainda não são conhecidos (O'SHAUGHNESSY, 2014). Contudo, são necessários mais estudos sobre os efeitos e mecanismo de ação do citrato de clomifeno na reprodução dos mamíferos. O que o presente trabalho indica é que essa droga causa efeitos adversos no comportamento sexual de ratos machos e fêmeas.

Referências

- ARTECHE, E.; STRIPPOLI, G.; LOIRAND, G.; PACAUD, P.; CANDENAS, L.; MOLTÓ, J. C.; SOUTO, L.; FERNANDEZ, J.; NORTE, M.; MARTÍN, J. D.; SAVINEAU, J. P. An analysis of the mechanisms involved in the okadaic acid-induced contraction of the estrogen-primed rat uterus. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 1, p. 201-207, 1997. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/282/1/201.full.pdf+html>>. Acesso em: 14 abr. 2015.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; BRUCE, A. S.; BRUCE, M. K. Visão geral da função reprodutiva. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; BRUCE, A. S.; BRUCE, M. K. **Fundamentos de fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 49, p. 699-711.
- BHARTI, S.; MISRO, M. M.; RAI, U. Clomiphene citrate potentiates the adverse effects of estrogen on rat testis and down-regulates the expression of steroidogenic enzyme genes. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 1, p. 140-148, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028212021383>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.050>.
- CSABA, G.; KARABÉLYOS, C. The effect of a single neonatal treatment (hormonal imprinting) with the antihormones, tamoxifen and mifepristone on the sexual behavior of adult rats. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 6, p. 531-534, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661801908187>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/phrs.2001.0818>.
- DÖHLER, K. D.; HANCKE, J. L.; SRIVASTAVA, S. S.; HOFMANN, C.; SHRYNE, J. E.; GORSKI, R. A. Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. **Progress in Brain Research**, v. 61, p. 99-117, 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308644301>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)64430-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64430-1).
- FILIPPI, S.; VIGNOZZI, L.; VANNELLI, G. B.; LEDDA, F.; FORTI, G.; MAGGI, M. Role of oxytocin in the ejaculatory

Conclusões

O citrato de clomifeno influenciou o comportamento reprodutivo de ratos machos e fêmeas. Nas fêmeas essa alteração foi evidenciada pelo aumento da latência para primeira lordose e menor número de lordoses, e nos machos, pela redução no número de ejaculações e na latência para a primeira ejaculação. Também houve influência do citrato de clomifeno no comportamento homossexual das fêmeas, evidenciado pela menor latência para primeira monta e maior número de lordoses. Em relação ao peso dos órgãos, na prole masculina ocorreu diminuição do peso do fígado e do aparelho reprodutor, e na prole feminina ocorreu o aumento do peso do fígado. Adicionalmente, o citrato de clomifeno causou diminuição dos níveis de FSH da prole masculina.

process. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, p. 82-86, 2003.

GERARDIN, D. C. C.; BERNARDI, M. M.; MOREIRA, E. G.; PEREIRA, O. C. M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 618-623, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305706000980>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.026>.

GERARDIN, D. C. C.; PEREIRA, O. C. M. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 301-305, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305701006670>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00667-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00667-0).

GERARDIN, D. C. C.; PEREIRA, O. C. M.; KEMPINAS, W. G.; FLORIO, J. C.; MOREIRA, E. G.; BERNARDI, M. M. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiology & Behavior**, v. 84, n. 1, p. 97-104, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938404004640>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.10.014>.

GIANNAKOPOULOU, M.; BOZAS, E.; PHILIPPIDIS, H.; STYLIANOPOULOU, F. Protooncogene c-fos involvement in the molecular mechanism of rat brain sexual differentiation. **Neuroendocrinology**, v. 73, n. 6, p. 387-396, 2001. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/FullText/54657>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000054657>.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors – history, recent state of art and open questions. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076014000995>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.013>.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC,

- M. J.; MACKZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspective**, v. 104, p. 715-740, 1996. Supplement 4. Disponível em: <<http://www.epa.gov/edrlupvx/Pubs/kavlock.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2015.
- LEANZA, V.; COCO, L.; GRASSO, F.; LEANZA, G.; ZARBO, G.; PALUMBO, M. Ovulation induction with clomiphene citrate for infertile couple. **Minerva Ginecologica**, v. 66, n. 3, p. 309-312, 2014. Disponível em: <<http://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-ginecologica/article.php?cod=R09Y2014N03A0309>>. Acesso em: 14 abr. 2015.
- MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v. 211, n. 4488, p. 1294-1303, 1981. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/211/4488/1294>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1126/science.6163211>.
- MAHARJAN, R.; NAGAR, P. S.; NAMPOOTHIRI, L. Effect of Aloe barbadensis Mill. formulation on Letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 1, n. 4, p. 273-279, 2010. Disponível em: <<http://www.jaim.in/article.asp?issn=0975-9476;year=2010;volume=1;issue=4;spage=273;epage=279;aulast=Maharjan>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4103/0975-9476.74090>.
- MONIZ, A. C.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; SALZGEBER, S. A.; VAROLI, F. M. E.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Behavioral and endocrine changes induced by perinatal fenvalerate exposure in female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, n. 4, p. 609-614, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036205000760>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2005.05.005>.
- OLIVEIRA, A. C.; ZHOU, Q.; CARNES, K.; NIE, R.; KUEHL, D. E.; JACKSON, G. L. FRANCA, L. R.; NAKAI, M. HESS, R. A. ER function in the adult male rat: short- and long- term effects of the antiestrogen ICI 182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2399-2409, 2002. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/full/10.1210/endo.143.6.8873>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.143.6.8873>.
- O'SHAUGHNESSY, P. J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 29, p. 55-65, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952114000226>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semdcb.2014.02.010>.
- PEREIRA, O. C. M.; CONEGLIAN-MARISE, M. S. P.; GERARDIN, D. C. C. Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in male rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology**, v. 134, n. 3, p. 545-550, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643302003550>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00355-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00355-0).
- PHOENIX, C. H.; GOY, R. W.; GERALL, A. A.; YOUNG, W. C. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinology**, v. 65, n. 3, p. 369-382, 1959. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-65-3-369>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/endo-65-3-369>.
- ROTH, L. W.; RYAN, A. R.; MEACHAM, R. B. Clomiphene citrate in the management of male infertility. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 31, n. 4, p. 245-250, 2013. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1345271>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1345271>.
- SAKHAVAR, N.; KAVEH, M.; SADEGI, K. The impact of letrozole versus clomiphene citrate on uterine blood flow in patients with unexplained infertility. **Journal of Family and Reproductive Health**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2014.
- SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5476-5484, 1997.
- SULTAN, C.; BALAGUER, P.; TEROUANNE, B.; GEORGET, V.; PARIS, F.; JEANDEL, C.; LUMBROSO, S.; NICOLAS, J. C. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 99-105, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720701004300>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00430-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00430-0).
- WHALEN, R. E.; EDWARDS, D. A. Hormonal determinants of the development of masculine and feminine behavior in male and female rats. **The Anatomical Record**, v. 157, n. 2, p. 173-180, 1967. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1091570208/abstract>>. Acesso em: 14 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1091570208>.