

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Gabriela Nascimento da Silva

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PATERNA A CARBAMAZEPINA SOBRE ASPECTOS
REPRODUTIVOS DE RATAS FÊMEAS DA GERAÇÃO F1**

SÃO PAULO
2022

Gabriela Nascimento da Silva

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PATERNA A CARBAMAZEPINA SOBRE ASPECTOS
REPRODUTIVOS DE RATAS FÊMEAS DA GERAÇÃO F1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Renato Borges Tesser, e coorientado pela Profa. Dra. Samara Urban de Oliva e pela Ms. Marina Nunes dos Santos como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Silva, Gabriela Nascimento da
Efeitos da exposição paterna a carbamazepina sobre aspectos reprodutivos de ratas fêmeas da geração F1 / Gabriela Nascimento da Silva. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.
59 p.

Orientação de Renato Borges Tesser.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. Carbamazepina 2. Cruzamento 3. Fertilidade 4. Prole 5. Toxicologia
I. Tesser, Renato Borges II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 615.9

Gabriela Nascimento da Silva

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PATERNA A CARBAMAZEPINA SOBRE ASPECTOS
REPRODUTIVOS DE RATAS FÊMEAS DA GERAÇÃO F1**

São Paulo, outubro de 2022

Professor Orientador (Dr. Renato Borges Tesser)

Professor (a) Examinador (a): (Ms. Rodrigo Alessandro Riemma Vela)

Professor (a) Examinador (a): (Dr^a. Fatima Kazue Okada)

São Paulo

2022

RESUMO

A Carbamazepina (CBZ) é um fármaco muito efetivo no tratamento de distúrbios neurológicos, tais como: crises epiléticas, transtornos bipolares e dores neuropáticas. Apesar de ser amplamente utilizada entre homens e mulheres, a CBZ pode promover alguns efeitos adversos relacionados ao sistema masculino, incluindo alterações quantitativas e qualitativas, níveis baixos de testosterona sérica, além de prejudicar a função sexual. Entretanto, mudanças na qualidade espermática, nem sempre são associadas com problemas na fertilidade e podem potencialmente causar efeitos na prole a curto e longo prazo. Este estudo teve como objetivo investigar os possíveis impactos da exposição paterna à carbamazepina sobre parâmetros reprodutivos femininos da geração F1, aos 45 e 90 dias de idade. Para isso, foram utilizados 10 ratos machos da linhagem Wistar, os quais foram tratados com carbamazepina diluída em azeite de oliva, via gavagem, na dose de 20mg/Kg por 70 dias consecutivos (da pré-puberdade à vida adulta). O grupo controle recebeu o placebo, azeite de oliva, seguindo o mesmo protocolo do grupo experimental. Após o final do tratamento, os animais pertencentes aos grupos controles e tratados com CBZ foram pareados com fêmeas matrizes (n=10) para obtenção da geração F1. Aos 4 e 21 dias pós-natal (dpn) foi realizada a mensuração da distância anogenital e peso corporal. A avaliação do ciclo estral ocorreu a partir do 75 dpn até a eutanásia por esfregaço vaginal. Aos 45 e 90 dpn, ocorreu a eutanásia dos grupos. Amostras uterinas e ovarianas foram coletadas para análise da peroxidação lipídica. A análise estatística dos resultados demonstrou que a geração F1 de fêmeas do grupo tratado com CBZ apresentou redução na distância anogenital aos 4 e 21dpn. Os animais do grupo de tratados também levaram mais tempo para completar a abertura vaginal. Houve uma redução significativa na duração da fase de estro do ciclo estral, enquanto na fase de diestro a duração da fase foi prolongada indicando irregularidade no ciclo. A pesagem corporal e dos órgãos reprodutivos também foi afetada, ocorrendo uma redução na pesagem. Além disso, alterações nos níveis de peroxidação lipídica também ocorreu no útero e ovário, sugerindo que a CBZ pode estar associada a indução do estresse oxidativo. Os níveis de MDA nos grupos tratados, de 45 e 90 dias, quando comparados com os grupos controles, foram aumentados tanto no útero como no ovário. Em relação ao óxido nítrico, no ovário dos animais de 45dpp houve diminuição enquanto nos animais de 90 dias houve um aumento significativo. No útero, CBZF1-45 apresentou diminuição enquanto nos animais CBZF1-90 não houve alterações. Os resultados sugerem que a exposição paterna à CBZ pode trazer impactos na geração F1, podendo afetar parâmetros reprodutivos femininos.

Palavras-chave: Carbamazepina. Fertilidade feminina. Geração F1. Prole. Toxicologia.

ABSTRACT

Carbamazepine (CBZ) is a very effective drug in the treatment of neurological disorders such as epileptic seizures, bipolar disorders, and neuropathic pain. Although it is widely used among men and women, CBZ can promote some adverse effects related to the male system, including quantitative and qualitative changes, low levels of serum testosterone, and impaired sexual function. Changes in sperm quality, however, are not always associated with fertility problems and can potentially cause short- and long-term effects on offspring. This study aimed to investigate the possible impacts of paternal exposure to carbamazepine on female reproductive parameters in the F1 generation at 45 and 90 days of age. For this purpose, 10 male rats of the Wistar strain were used, which were treated with carbamazepine diluted in olive oil, via gavage, at a dose of 20mg/Kg for 70 consecutive days (from pre-puberty to adulthood). The control group received the placebo, olive oil, following the same protocol as the experimental group. After the end of treatment, the animals belonging to the control and CBZ-treated groups were paired with mother females (n=10) to obtain the F1 generation. At 4 and 21 days postnatal (dpm) the anogenital distance and body weight were measured. The estrous cycle evaluation occurred from 75 dpm until euthanasia by vaginal smear. At 45 and 90 dpm, euthanasia of the groups occurred. Uterine and ovarian samples were collected for lipid peroxidation analysis. Statistical analysis of the results showed that the F1 generation of females from the CBZ treated group showed a reduction in anogenital distance at 4 and 21dpm. Animals in the treated group also took longer to complete vaginal opening. There was a significant reduction in the duration of the estrus phase of the estrous cycle, while in the diestrus phase the duration of the phase was prolonged indicating irregularity in the cycle. Body and reproductive organ weighing was also affected, with a reduction in weighing occurring. In addition, changes in lipid peroxidation levels also occurred in the uterus and ovary, suggesting that CBZ may be associated with induction of oxidative stress. MDA levels in the treated, 45- and 90-day groups, when compared to the control groups, were increased in both the uterus and ovary. In the uterus, CBZF1-45 showed a decrease while in CBZF1-90 animals there was no change. The results suggest that paternal exposure to CBZ may impact the F1 generation, possibly affecting female reproductive parameters.

Keywords: Carbamazepine. Female fertility. F1 generation. Offspring. Toxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ganho de peso corporal dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	23
Figura 2 - Comprimento corporal dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	23
Figura 3 - Comprimento da cauda dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	24
Figura 4 - Distância anogenital dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	24
Figura 5 - Índice anogenital dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	25
Figura 6. Idade de ocorrência da abertura vaginal dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	25
Figura 7 - Porcentagem de ciclos estrais normais dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	26
Figura 8 - Duração média em dias do ciclo estral dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	26
Figura 9 - Número de dias nas fases de metaestro, diestro, proestro e estro do ciclo estral ao longo de 15 dias dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1)	27
Figura 10. Concentração de malondialdeído (nMol/g) no tecido ovariano de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade.....	29
Figura 11. Concentração de malondialdeído (nMol/g) no tecido uterino de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade.....	30
Figura 12. Concentração de óxido nítrico (µMol/g) no tecido ovariano de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade.....	30

Figura 13. Concentração de óxido nítrico ($\mu\text{Mol/g}$) no tecido uterino de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais da geração F1 em grupos e subgrupos de acordo com fase do desenvolvimento sexual pós-natal de eutanásia 19

Tabela 2 - Pesos absolutos (mg) e relativos (mg/Kg de peso corporal) do útero e ovário de ratas com 45 e 90 dias de idade, pertencentes aos subgrupos controle (CF1-45 e CF1-90) e tratado (CBZF1-45 e CBZF1-90) 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
CBZ	Carbamazepina
CBZF0	Grupo tratado com Carbamazepina (Geração parental F0)
CBZF1	Filhos de pais tratados com Carbamazepina (Geração F1)
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
CF0	Grupo Controle (geração parental)
CF1	Grupo Controle (geração F1)
DAE	Drogas Antiepilépticas
DPN	Dias pós-natal
DPP	Dia pós-parto
DG0	Dia zero de gestação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F0	Geração parental
FSH	Hormônio folículo estimulante
HE	Hematoxilina e Eosina
HPG	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal
LH	Hormônio Luteinizante
MDA	Malondialdeído
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato-salino
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
VOC	Canais de sódio voltagem dependentes
VPA	Valproato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Obtenção dos animais e distribuição dos grupos.....	17
3.2 Tratamento com CBZ durante 70 dias, a partir da pré-puberdade até a fase adulta (geração F0)	18
3.3 Obtenção da geração F1	18
3.4 Desenvolvimento físico dos filhotes do sexo feminino (geração F1)	19
3.5 Idade de início da puberdade e avaliação do ciclo estral	20
3.6 Coleta e processamento de amostras	21
3.7 Análise de estresse oxidativo por meio da dosagem de malondialdeído	21
3.8 Mensuração indireta de óxido nítrico pela avaliação da concentração de nitrito.....	21
3.9 Forma de análise dos resultados	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Desenvolvimento físico dos filhotes do sexo feminino (geração F1)	23
4.2 Distância e índice anogenital	24
4.3 Idade de ocorrência de abertura vaginal.....	25
4.4 Avaliação do ciclo estral.....	26
4.5 Parâmetros morfométricos.....	27
4.6 Avaliação do estresse oxidativo uterino e ovariano por meio da quantificação de malondialdeído e óxido nítrico, aos 45 e 90 dpn.....	29
4.6.1 Quantificação de malondialdeído aos 45 e 90 dpn.....	29
4.6.2 Quantificação de óxido nítrico aos 45 e 90 dpn.....	30
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A carbamazepina (CBZ) é considerada a droga de primeira linha no tratamento das convulsões parciais e tônico-clônicas (ROGAWSKI; PORTER, 1990; RICHERS; PERUCA, 1993; ULLAH et al., 2018), além de ser utilizada no tratamento de vários tipos de dores neuropáticas (BIALER, 2012), incluindo neuralgia do trigêmeo (SWERDLOW, 1984; SINDRUP; JENSEN, 1999; SÖDERPALM, 2002), na terapia de distúrbios afetivos e de transtornos de humor, tais como no distúrbio bipolar (BIALER et al., 2012) e na síndrome do pânico (ALBANI et al., 1995), em quadros de agressividade e de transtornos de ansiedade, bem como no tratamento dos sintomas da Síndrome de Abstinência Alcoólica (STUPPAECK et al., 1990).

Seu mecanismo de ação principal consiste em afetar a excitabilidade das membranas celulares, atuando sobre os canais de sódio voltagem-dependentes que transportam, para o interior das células, a corrente necessária para geração de um potencial de ação. Este fármaco bloqueia, preferencialmente, a excitação das células que estão deflagrando repetitivamente, de modo que quanto mais alta se mostrar a frequência de disparos, maior será o bloqueio produzido. Esta característica é relevante no que se refere à capacidade deste medicamento em bloquear a descarga de alta frequência que ocorre em uma crise epiléptica. Entretanto, a CBZ normalmente não interfere na deflagração de baixa frequência dos neurônios e diferencia os canais de sódio em seus estados de repouso, aberto e inativado. A despolarização de um neurônio aumenta a proporção de canais de sódio no estado inativado. Assim, a CBZ liga-se, preferencialmente, a estes canais em estado inativado, impedindo o seu retorno ao estado de repouso e reduzindo, desta forma, o número de canais funcionais disponíveis para gerar um potencial de ação (COURTNEY; ETTER, 1983; MACDONALD; KELLY, 1995; GIERBOLINI et al., 2016).

Entretanto, outros mecanismos de ação têm sido sugeridos, tais como: inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes (WALDEN et al., 1993; AMBROSIO et al., 1999), antagonismo sobre receptores de adenosina do tipo A1 (MARANGOS et al., 1983; VAN CALKER et al., 1991), liberação e inibição da recaptação de serotonina (DAILEY et al., 1998), aumento da transmissão dopaminérgica (OKADA et al., 1997; ICHIKAWA; MELTZER, 1999), inibição da liberação de glutamato (AMBROSIO et al.,

2001) e diminuição dos níveis de AMPc basal e estimulado (VAN CALKER et al., 1991; CHEN et al., 1996).

Alterações das características seminais, dos níveis de hormônios sexuais, da espermatogênese e da fertilidade de ratos têm sido referidas durante e após terapia prolongada com drogas anticonvulsivantes, incluindo a CBZ. Deste modo, os possíveis efeitos adversos de drogas anticonvulsivantes sobre a reprodução masculina apresentam grande relevância, já que estes medicamentos são utilizados, de modo crescente, por homens em idade fértil, não somente no tratamento da epilepsia, mas também no tratamento da dor e durante a terapia psiquiátrica. Ainda, deve-se considerar que os anticonvulsivantes são prescritos para crianças e adolescentes, fases em que o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é mais sensível à ação de agentes tóxicos, podendo acarretar danos no desenvolvimento puberal e, posteriormente, à qualidade seminal e fertilidade na vida adulta (SHARPE, 1988).

Em trabalho realizado por nosso grupo, observou-se que o tratamento crônico com CBZ, desde o desmame, por até 70 dias, causou alterações hormonais, testiculares, epididimárias e prostáticas, que se iniciaram na pré-puberdade e continuaram na puberdade tornando-se, entretanto, mais acentuadas na fase adulta. Estes resultados sugerem que os danos espermatogênicos e epididimários causados pelo fármaco podem envolver múltiplos alvos (OLIVA; MIRAGLIA, 2009; OLIVA et al., 2012). Especificamente, nos animais púberes tratados com CBZ (63 dias de idade), a redução na concentração de espermatozoides presentes na cauda epididimária, alterações da morfologia espermática e a presença de células epiteliais epididimárias *in situ* ou desprendendo-se do epitélio nas diversas regiões do ducto, associados a ausência de alteração da produção diária de espermatozoides e do tempo de trânsito espermático através do epidídimo, sugerem um efeito direto da CBZ sobre o epidídimo e o espermatozoide epididimário.

O mecanismo exato da toxicidade da CBZ sobre o espermatozoide não está bem definido, mas a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o desenvolvimento de estresse oxidativo têm sido propostos, por mediar alguns dos efeitos adversos desta droga. Níveis elevados de EROs podem acarretar danos no processo de compactação da cromatina, na peroxidação lipídica de membranas, no processo de fosforilação proteica e aumento na permeabilidade de membrana

(MURATORI et al., 2015a; MURATORI et al., 2015b; AITKEN, 2017; O'FLAHERTY; MATSUSHITA-FOURNIER, 2017; WAGNER et al., 2017; TVRDÁ et al., 2018; TOOR; SIKKA, 2019), além de alterações proteicas que acarretam ativação/ inativação de vias de sinalização intracelulares. Durante o trânsito pelo epidídimo, as EROs podem alterar a integridade do DNA espermático por interferir na compactação pós-testicular da cromatina, e/ou pela oxidação direta, que ocasiona a fragmentação do DNA espermático, comprometendo a fertilidade masculina e a viabilidade da prole. O alto teor de ácidos graxos poliinsaturados das membranas espermáticas as tornam, particularmente, mais suscetíveis às EROs, à peroxidação lipídica e ao dano oxidativo (TURNER; LYSIAK, 2008; FANAELI et al., 2014). Além disso, a insuficiência dos mecanismos de reparo do DNA do espermatozoide aumenta a sensibilidade deste ao estresse oxidativo (LEWIS et al., 2013). Portanto, os mecanismos de controle dos níveis de EROs durante maturação epididimária são importantes para evitar possíveis efeitos espermatotóxicos.

A maioria de estudos toxicológicos sobre o sistema reprodutor masculino investigaram primariamente os efeitos de agentes tóxicos sobre a fertilidade, dando menor importância aos possíveis efeitos sobre o desenvolvimento da progênie. Ainda, até recentemente, as investigações de distúrbios do desenvolvimento da exposição dos pais a agentes farmacológicos ou outros agentes químicos e físicos se concentravam em fatores maternos, sendo as pesquisas relacionadas à exposição paterna bastante escassas (TRASLER; DOERKSEN, 1999). Além disso, a ocorrência de anomalias congênitas na prole de ratos machos expostos a um determinado agente não é geralmente acompanhada por alterações na fertilidade ou de outro índice de sucesso reprodutivo (FRIEDLER, 1996).

Estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais demonstraram que a exposição paterna a drogas terapêuticas e recreativas, bem como a produtos químicos no local de trabalho e no ambiente, pode afetar a qualidade espermática, podendo também acarretar alterações no desenvolvimento da progênie, independentemente de fatores maternos. Estas alterações incluem aumento de perdas pré e pós-implantação, diminuição no peso fetal e no tamanho da ninhada, retardo no crescimento intrauterino, malformações congênitas e aumento na ocorrência de abortos espontâneos (JOFFE; SOYKA, 1981; FRIEDLER, 1985; DAVIS

et al., 1992; COLIE, 1993; OLSHAN; FAUSTMAN, 1993; FRIEDLER, 1996; LEWIS; AITKEN, 2005; CORDIER, 2008).

A exposição paterna pode influenciar no desenvolvimento embrionário principalmente devido a um efeito direto sobre o DNA espermático, ou indiretamente, pelo transporte de compostos tóxicos por meio do líquido seminal, os quais são absorvidos pelo trato reprodutivo feminino (LUTWAK-MANN, 1964; OLSHAN et al., 1991; DAVIS et al., 1992; COLIE, 1993; PICHINI et al., 1994; TRASLER; DOERKSEN, 1999; SPRITZER, 2001). Estudos experimentais correlacionaram a presença de algumas drogas no sêmen, como: talidomida, ciclofosfamida, tetraciclina, metadona, etanol, fenitoina e ácido valpróico, ao aumento na mortalidade perinatal, diminuição no peso fetal e malformações congênitas (LUTWAK-MANN, 1964; BLATT et al., 1980).

Alterações na integridade, estrutura e compactação da cromatina, além de proteínas associadas ao DNA, podem potencialmente levar a alterações adversas sobre o desenvolvimento da prole. Além disso, a fragmentação do DNA também afeta outras funções espermáticas, algumas das quais podem estar relacionadas ao efeito paterno adverso sobre o desenvolvimento pré-implantação. Em um estudo clínico, foi evidenciado que aumento na fragmentação do DNA espermático era frequentemente encontrado em casos de falhas repetidas, sem qualquer comprometimento aparente da morfologia do zigoto e do processo de clivagem embrionária *in vitro* (BENCHAIB et al., 2003).

Entretanto, fragmentação do DNA espermático também pode ocorrer independentemente da presença de alterações de outros parâmetros seminais qualitativos e quantitativos (SALEH et al., 2002; TANRIKUT et al., 2010; BEEDER & SAMPLASKI, 2020). Ainda, altos níveis de fragmentação do DNA espermático podem não estar necessariamente associados a uma diminuição nas taxas de fertilização (JANNY & MENEZO, 1994; SAKKAS et al., 1996; TWIGG et al., 1998; MORRIS et al., 2002; LARSON-COOK et al., 2003).

Neste contexto, pesquisas visando o entendimento dos efeitos das exposições paternas a agentes tóxicos sobre sua progênie também são importantes e necessárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar os possíveis impactos da exposição paterna a CBZ sobre o desenvolvimento pós-natal, a maturação sexual e parâmetros reprodutivos femininos na geração F1, aos 45 e 95 dias de idade.

2.2 Objetivos específicos

Foram avaliados(as):

- a) Peso corporal, distância e índice anogenital, aos 1 e 4 dias pós-natal (dpn);
- b) Idade de ocorrência de abertura vaginal, verificada a partir do 25º dpn;
- c) Sincronicidade e duração ciclo estral;
- d) Parâmetros morfométricos uterinos e ovarianos, aos 45 e 90 dpn;
- e) Estresse oxidativo uterino e ovariano, por meio da quantificação de malondialdeído e óxido nítrico, aos 45 e 90 dpn.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais e distribuição dos grupos

Para este estudo, foram utilizados 16 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), obtidos por meio do acasalamento de ratos machos e fêmeas matrizes, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que serão mantidos no Biotério da Disciplina de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP. Os ratos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno medindo 45x30x15cm, com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (21°C a 23°C); os animais obtiveram livre acesso à água filtrada e à ração comercial balanceada para ratos.

Os ratos utilizados como matrizes foram colocados para acasalar ao final da tarde, na proporção de um macho para duas fêmeas; na manhã seguinte ao acasalamento, foi obtido esfregaços vaginais; em caso de positividade, quando observada a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, as ratas foram consideradas prenhes. A idade da prole foi estabelecida considerando-se o dia do parto como dia zero.

No quarto dia após o nascimento, os filhotes do sexo masculino foram separados daqueles do sexo feminino, através do exame da genitália externa, já que ratos recém-nascidos do sexo masculino apresentam papila genital mais desenvolvida e uma distância anogenital maior, quando comparados a filhotes recém-nascidos do sexo feminino. Durante a amamentação, foram mantidos somente seis filhotes machos por mãe, de maneira a permitir uma equivalência de peso corpóreo entre os animais dos diferentes grupos utilizados neste experimento (OLIVA; MIRAGLIA, 2009). Desta forma, quando o número de machos pertencentes à mesma prole de uma determinada mãe foi superior a seis, os machos excedentes e os filhotes do sexo feminino foram excluídos deste experimento. Por outro lado, quando numa mesma prole o número de filhotes machos foi inferior a seis (número de filhotes pré-estabelecido, por mãe, para o período de amamentação), esta foi completada com fêmeas da mesma prole. O desmame foi realizado aos 23 dias de idade.

3.2 Tratamento com CBZ durante 70 dias, a partir da pré-puberdade até a fase adulta (Geração F0)

Os animais experimentais foram distribuídos em 2 grupos (n=8):

- Grupo Controle (CF0): os animais receberam azeite de oliva, via gavagem, durante 70 dias consecutivos, do 23^o ao 93^o dia de idade;
- Grupo Tratado com Carbamazepina (CBZF0): os animais receberam carbamazepina diluída em azeite de oliva, na dose 20mg/kg, via gavagem, durante 70 dias consecutivos, do 23^o ao 93^o dia de idade.

A dose de CBZ, utilizada em humanos, é efetiva na prevenção de convulsões estimuladas em ratos Wistar (LAHTINEN et al., 1996; OTSUKI et al., 1998). Para o estabelecimento da dose de CBZ e a via de administração da droga, utilizadas nesta pesquisa, tomaram-se como referência os estudos de COHN et al., 1982, LAHTINEN et al., 1996 e MCLEAN et al., 2004. A fim de possibilitar o cálculo do volume de CBZ a ser administrada e para determinar a evolução do peso corporal, os animais foram pesados diariamente.

3.3 Obtenção da geração F1

Os animais pertencentes aos grupos controle e tratado com CBZ (CF0 e CBZF0, respectivamente; n=8), aos 85dpn, foram pareados com fêmeas para obtenção da geração F1. Desta forma, os animais foram colocados para acasalar ao escurecer (após 18:00h), na proporção de um macho para uma fêmea. No início da manhã seguinte, até as 8:00h, foram obtidos esfregaços de células do epitélio vaginal para a detecção da presença de espermatozoides. O dia em que o teste se apresentou positivo (presença de espermatozoides) foi considerado o dia 0 de gestação (DG0) (CHAHOUUD; KWASIGROCH, 1977). As fêmeas prenhes foram separadas e tiveram a evolução da prenhes acompanhada. A idade da prole foi estabelecida considerando-se o dia do parto como dia zero.

No quarto dia pós-natal, os filhotes do sexo feminino (geração F1), resultantes de acasalamentos dos ratos machos da geração parental (F0), pertencentes aos grupos controle e tratado com CBZ, foram separados daqueles do sexo masculino.

Para garantir a confiabilidade das análises e evitar a interferência do fator consanguinidade, foram obtidas 8 ninhadas por grupo experimental, sendo cada ninhada padronizada para 6 filhotes escolhidos aleatoriamente (três machos e três fêmeas), para permitir uma equivalência de peso corporal e no tamanho do cérebro entre os animais dos diferentes subgrupos utilizados neste experimento. O desmame foi realizado aos 21 dias de idade.

A prole do sexo feminino foi dividida em 4 subgrupos, de acordo com a exposição paterna a CBZ (controle ou tratado com CBZ – CF1 e CBZF1, respectivamente) e a fase do desenvolvimento sexual pós-natal de eutanásia (45 e 95dpn), conforme detalhado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos animais da geração F1 em grupos e subgrupos de acordo com fase do desenvolvimento sexual pós-natal de eutanásia.

Grupos	Subgrupos	Idade e fase do desenvolvimento sexual pós-natal
Controle – CF1 (n=24)	CF1-45 (n=8)	45dpn – Fase de peripuberdade
	CF1-90 (n=16)	90dpn – Fase adulta
Tratado com CBZ – CBZF1 (n=24)	CBZF1-45 (n=8)	45dpn – Fase de peripuberdade
	CBZF1-90 (n=16)	90dpn – Fase adulta

3.4 Desenvolvimento físico dos filhotes do sexo feminino (Geração F1)

A avaliação do desenvolvimento dos filhotes foi realizada por meio da observação diária e registro do dia do aparecimento seguintes parâmetros físicos (DUBOVICKÝ et al., 2008):

- a) Peso corporal dos filhotes: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 21dpn;
- b) Comprimento do corpo e comprimento da cauda: 1dpn e 4dpn;
- c) Medidas das distâncias anogenitais e cálculo dos índices anogenitais (distância anogenital/peso corpóreo): 1º, 4º e 21º dpn.

3.5. Idade de início da puberdade e avaliação do ciclo estral

Os filhotes do sexo feminino da geração F1 foram observados quanto a idade de ocorrência da abertura vaginal, que representa o início da puberdade, a partir do 25º dpn, avaliada por inspeção visual e definida como uma separação completa da bainha membranosa que cobre o orifício vaginal (VETTER-O'HAGEN et al., 2012).

A regularidade das fases do ciclo estral foi acompanhada diariamente, a partir do 75º dpn, durante 15 dias (equivalente a 3 ciclos estrais) antes da eutanásia (aos 90dpn), por meio de análise da citologia vaginal. Este procedimento permitiu determinar o estágio do ciclo estral para cada fêmea no momento da coleta dos ovários e cornos uterinos (BOLON et al., 2013).

Desta forma, foram coletadas amostras do epitélio vaginal, com auxílio de uma haste flexível com extremidade de algodão umedecido com solução fisiológica 0,9%, que foi introduzida no orifício vaginal, seguido do preparo dos esfregaços em lâminas histológicas, os quais foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE).

A classificação da fase do ciclo estral foi realizada de acordo com a proporção de células epiteliais nucleadas, células cornificadas não nucleadas e de leucócitos (CORA et al., 2015; MARCONDES et al., 2002; LOVICK; ZANGROSSI, 2021; AJAYI; AKHIGBE, 2020):

- Fase de proestro: predominância de células epiteliais nucleadas;
- Fase de estro: predominância de células cornificadas não nucleadas;
- Fase de metaestro: caracterizada pela presença da mesma proporção entre leucócitos, células epiteliais cornificadas e nucleadas;
- Diestro: presença predominante de leucócitos.

A duração de cada ciclo estral foi determinada pelo número de dias requeridos para completar as quatro fases; quando uma determinada fase persistiu por mais de 10 dias, o ciclo foi considerado irregular.

3.6 Coleta e processamento de amostras

Os filhotes do sexo feminino da geração F1, pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado com CBZ (CBZF1), foram submetidos à eutanásia, aos 45 e 90dpn, por superdosagem de anestésico (tiopental sódico, na dose de 150mg/Kg de peso corpóreo, via intraperitoneal).

O útero e os ovários foram rapidamente removidos e pesados em balança semi-analítica; os pesos relativos desses órgãos (peso órgão/ 100 g de peso corpóreo) também foram calculados.

Para análise do estresse oxidativo, no dia da eutanásia, o ovário e o corno uterino esquerdos foram armazenados a -20°C para posterior avaliação do estresse oxidativo, por meio da quantificação de malondialdeído (MDA) e de óxido nítrico.

3.7 Análise de estresse oxidativo por meio da dosagem de malondialdeído (MDA)

O MDA, um dos produtos finais da peroxidação lipídica, é considerado um importante marcador do estresse oxidativo e é de fácil mensuração por meio da reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA et al., 1979; MARNETT, 1999; BENEDETTI et al., 2012).

As amostras uterinas e ovarianas foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato (PBS); em seguida, foi adicionado ao homogeneizado: 1,5mL ácido acético (20%, pH 3.5), 0,2mL de dodecilsulfato de sódio (8,1%), 1,5mL de TBA (0,8%) e 0,7mL de água. Os tubos foram então agitados e incubados em banho-maria a 95°C, por 60 minutos. A medida de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax Plus384, Sunnyvale, CA, USA), a 523nm. As concentrações foram expressas em nmolar de malondialdeído/g de tecido.

3.8 Mensuração indireta de óxido nítrico pela avaliação da concentração de nitrito

Os níveis de óxido nítrico (NO) ovariano e uterino foram mensurados conforme descrito por MIRANDA et al. (2001) e ABD-ALLAH et al. (2009), com pequenas adaptações. A partir das amostras previamente homogeneizadas, foram adicionados 0,5mL de etanol absoluto, com subsequente centrifugação a 2000g, durante 10

minutos. Em sequência, 300µL de sobrenadante foram adicionados a 300µL de cloreto de vanádio e 300µL de uma mistura 1:1 de Griess 1 (N- (1-naftil)-etilenodiamina) e Griess 2 (sulfanilamida, 2% em 5% HCl). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente, por 30 minutos. A medida de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax Plus384, Sunnyvale, CA, USA), a 540nm. As concentrações foram expressas em nmol de óxido nítrico/g de tecido.

3.9 Forma de Análise dos Resultados

Para a comparação dos resultados foi utilizado o teste paramétrico “t” de Student para os dados que apresentaram distribuição normal ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, caso a distribuição não fosse normal. As diferenças foram julgadas significantes quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento físico dos filhotes do sexo feminino (Geração F1)

Os pesos dos filhotes do sexo feminino pertencentes ao grupo tratado (CBZF1) apresentaram redução estatisticamente significativa no 1º, 4º e 7º dpn, em comparação aos animais do grupo controle. Entretanto, após o 10º dpn até o desmame (21º dpn) não houve alterações no ganho de peso corpóreo entre os grupos experimentais (Figura 1).

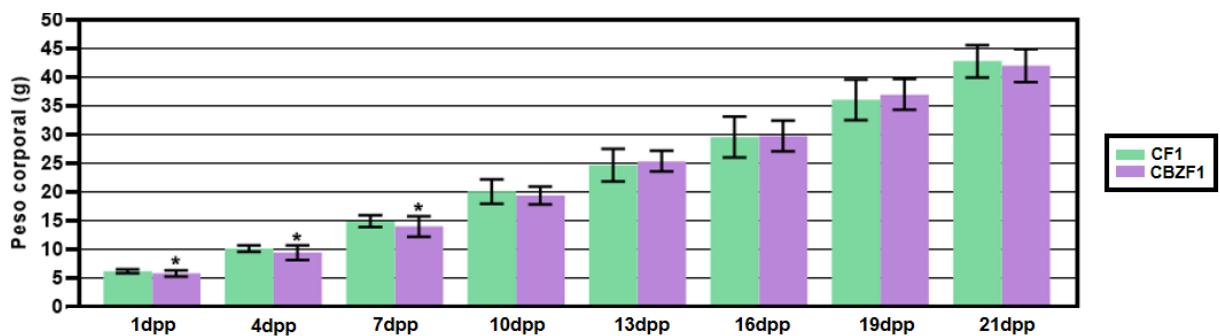


Figura 1. Ganho de peso corporal dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste "t" de Student; * $p \leq 0,05$. $n=24$.

Ainda, aos 1 e 4 dpn, o comprimento corporal apresentou diminuição estatisticamente significativa nos animais do grupo tratado (CBZF1) em relação aos animais controles (Figura 2).

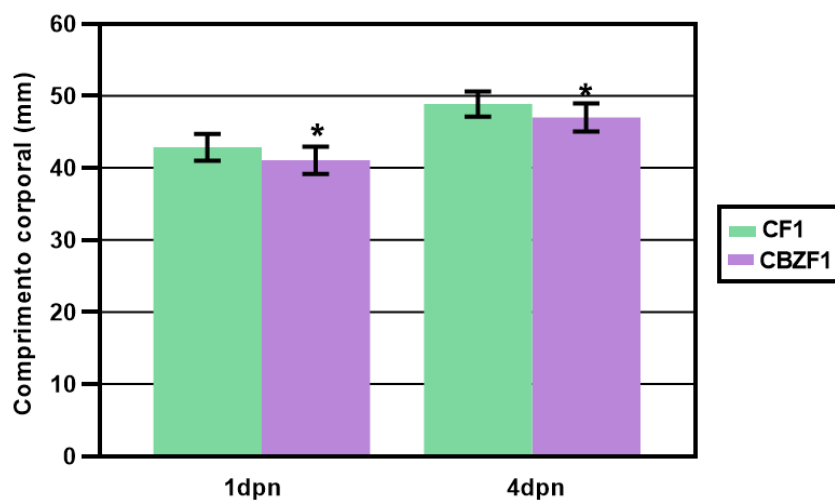


Figura 2. Comprimento corporal dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste "t" de Student; * $p \leq 0,05$. $n=24$.

Em relação ao comprimento da cauda, não houveram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em nenhuma das idades observadas (1 e 4dpn) (Figura 3).

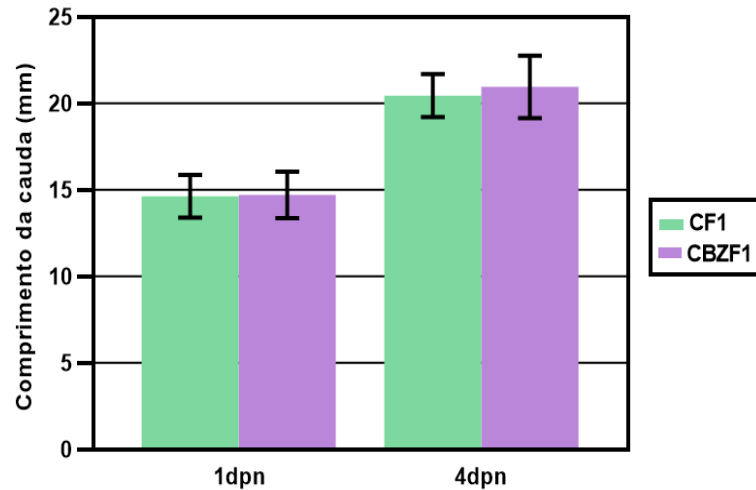


Figura 3. Comprimento da cauda dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student; * $p \leq 0,05$. $n=24$.

4.2 Distância e índice anogenital

A distância anogenital dos filhotes do sexo feminino, pertencentes ao grupo tratado (CBZF1), apresentou redução estatisticamente significativa no 1º, 4º e 21º dia pós-natal (dpn), em comparação aos animais do grupo controle (CF1) (Figura 4).

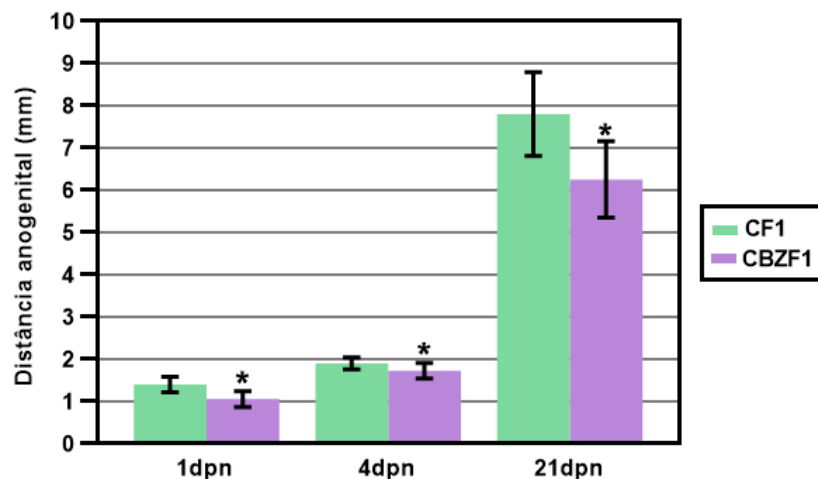


Figura 4. Distância anogenital dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student; * $p \leq 0,05$. $n=24$.

O mesmo foi observado no índice anogenital (distância anogenital/peso corporal), em que os animais do grupo tratado apresentaram diminuição estatisticamente significativa em todas as idades (Figura 5).

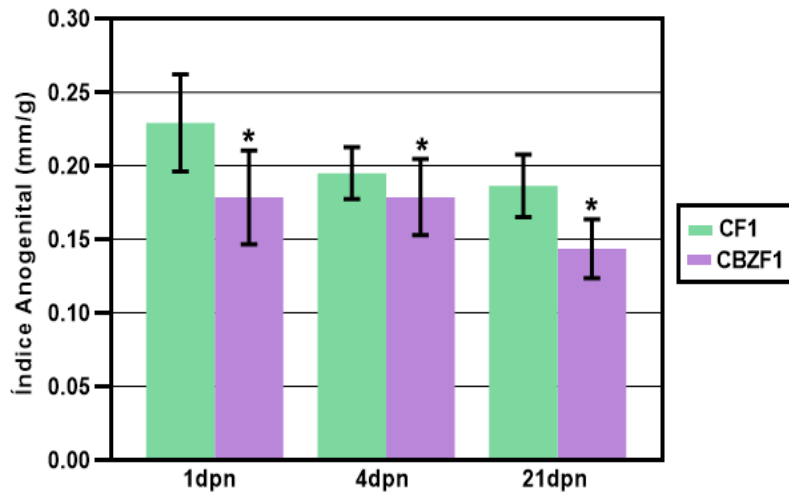


Figura 5. Índice anogenital dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de *Student*; * $p \leq 0,05$. $n=24$.

4.3 Idade de ocorrência de abertura vaginal

Os animais do grupo tratado (CBZF1) mostraram um aumento estatisticamente significativo na idade de ocorrência da abertura vaginal em relação ao seu respectivo grupo controle (CF1) (Figura 6).

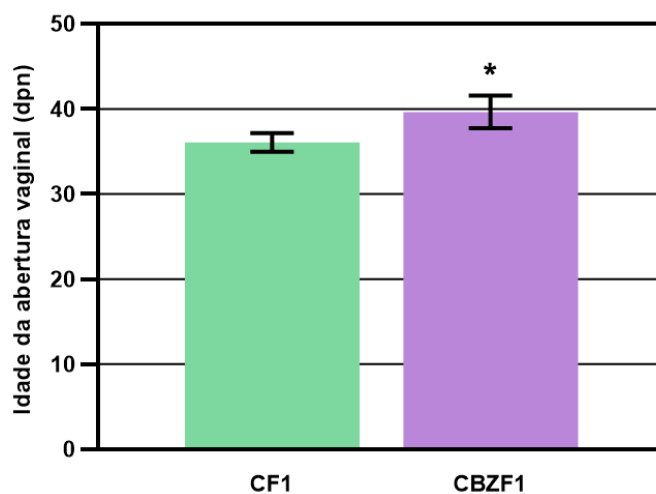


Figura 6. Idade de ocorrência da abertura vaginal dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de *Student*; * $p \leq 0,05$. $n=24$.

4.4 Avaliação do ciclo estral

Em relação ao ciclo estral, houve diminuição estatisticamente significativa na proporção de ciclos estrais regulares no grupo tratado (CBZF1) em relação ao grupo controle (CF1) (Figura 7). A duração média do ciclo estral, em dias, foi maior no grupo tratado em comparação ao grupo controle (Figura 8).

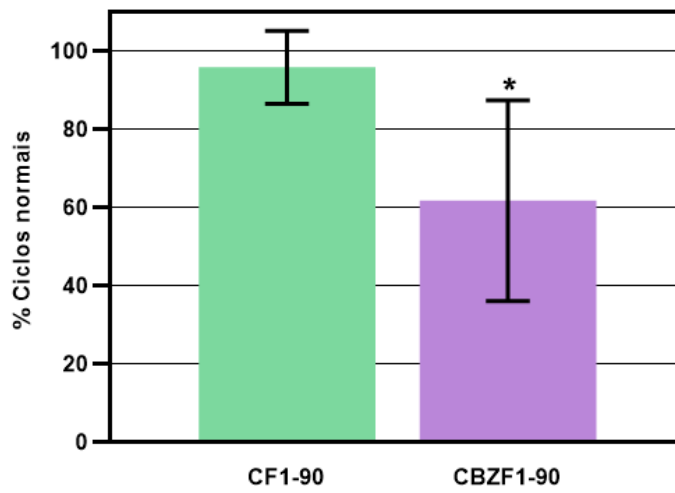


Figura 7. Porcentagem de ciclos estrais normais dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste "t" de Student; * $p \leq 0,05$. n=16

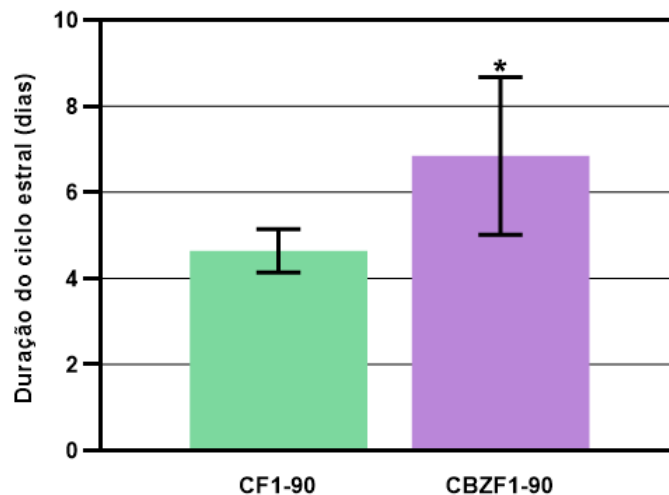


Figura 8. Duração média em dias do ciclo estral dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste "t" de Student; * $p \leq 0,05$. n=16.

Quando as fases do ciclo estral foram avaliadas durante 15 dias, foi observada uma redução no número de dias em que o epitélio vaginal das ratas pertencentes ao grupo tratado (CBZF1) permanecia nas fases de metaestro, de proestro e de estro, enquanto a duração da fase de diestro foi maior em relação ao grupo controle (CF1) (Figura 9).

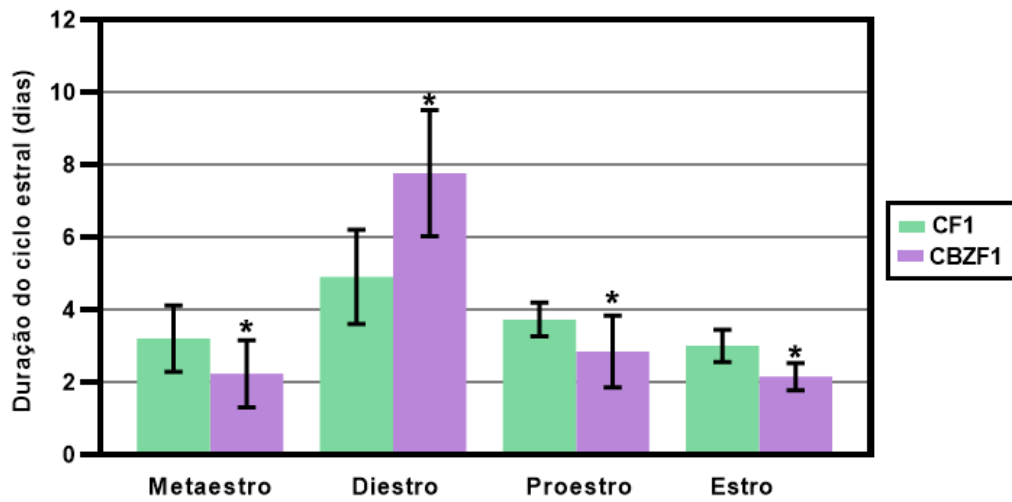


Figura 9. Número de dias nas fases de metaestro, diestro, proestro e estro do ciclo estral ao longo de 15 dias dos animais pertencentes aos grupos controle (CF1) e tratado (CBZF1). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Teste "t" de Student; * $p \leq 0,05$. $n=16$.

4.5 Parâmetros morfométricos

O peso corporal final, os pesos absolutos e relativos do útero e do ovário apresentaram diminuição estatisticamente significativa nos animais de 90 dias, pertencentes ao subgrupo tratado (CBZF1-90). Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças estatísticas entre os subgrupos experimentais, tanto aos 45dpn quanto aos 90 dpn (Tabela 2).

Tabela 2. Pesos absolutos (mg) e relativos (mg/Kg de peso corporal) do útero e ovário, de ratas com 45 e 90 dias de idade, pertencentes aos subgrupos controle (CF1-45 e CF1-90) e tratado (CBZF1-45 e CBZF1-90).

Parâmetros	Subgrupos			
	45 dias		90 dias	
	CF1-45	CBZF1-45	CF1-90	CBZF1-90
Peso corporal final (g)	141,625±3,44	140,715±6,855	229,18±14,53	211,21±14,19*
Útero				
Peso absoluto do útero (mg)	0,385±0,059	0,396±0,279	0,600±0,161	0,404±0,092*
Peso relativo do útero (mg/100g de peso corporal)	0,267±0,044	0,279±0,057	0,226±0,067	0,189±0,054*
Ovário				
Peso absoluto do ovário (mg)	0,040±0,017	0,042±0,012	0,084±0,01	0,059±0,005*
Peso relativo do ovário (mg/100g de peso corporal)	0,032±0,011	0,030±0,009	0,037±0,008	0,027±0,02*

Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste "t" de *Student*; *p≤0,05. Subgrupos 45 dias – n=6, Subgrupos 90 dias – n= 16.

4.6 Avaliação do Estresse oxidativo ovariano e uterino

4.6.1 Quantificação de malondialdeído aos 45 e 90 dpn

Os animais dos dois subgrupos tratados, aos 45 e 90dpn (CBZF1-45 e CBZF1-90, respectivamente) apresentaram aumento estatisticamente significativo da concentração de malondialdeído no tecido ovariano em comparação aos seus respectivos controles (CF1-45 e CF1-90) (Figura 10).

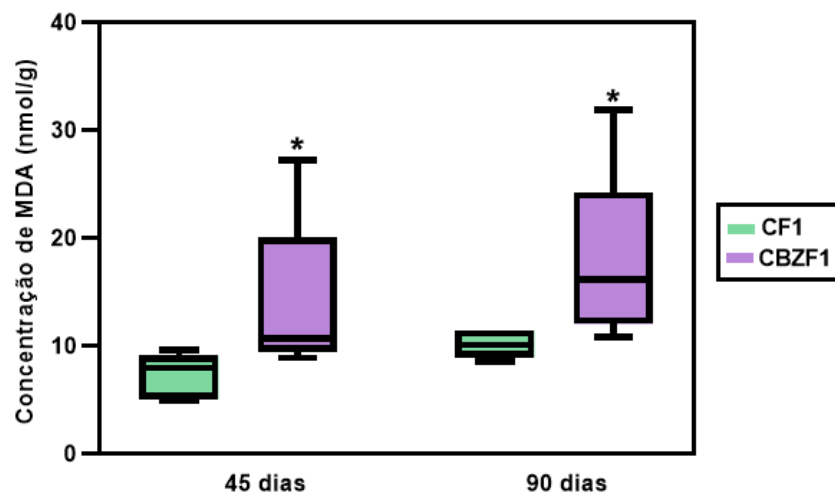


Figura 10. Concentração de malondialdeído (nMol/g) no tecido ovariano de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade. Dados representados em Box plot (valor mínimo, primeiro interquartil, mediana, terceiro interquartil e valor máximo). Teste não paramétrico de Mann-Whitney; *p ≤0,05. n=7.

O mesmo foi observado no tecido uterino, ocorrendo aumento estatisticamente significativo da concentração de malondialdeído nos grupos tratados, aos 45 e 90 dias de idade (CF1-45 e CF1-90) (Figura 11).

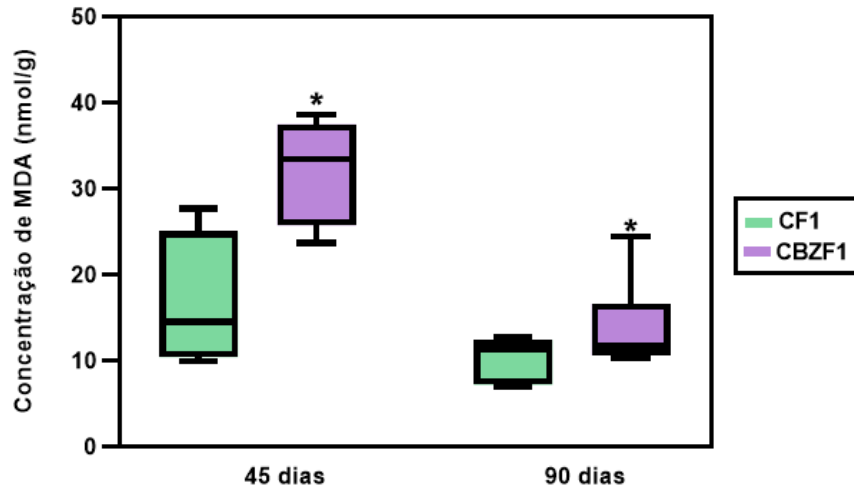


Figura 11. Concentração de malondialdeído (nMol/g) no tecido uterino de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade. Dados representados em Box plot (valor mínimo, primeiro interquartil, mediana, terceiro interquartil e valor máximo). Teste não paramétrico de Mann-Whitney; * $p \leq 0,05$. $n=7$.

4.6.2 Quantificação de óxido nítrico aos 45 e 90 dpn

Os animais dos subgrupos tratados, aos 45 e 90dpn (CBZF1-45 e CBZF1-90, respectivamente), apresentaram alterações estatisticamente significativas da concentração de óxido nítrico no tecido ovariano em comparação aos controles (CF1-45 e CF1-90), caracterizadas por diminuição dos níveis de oxido nítrico no ovário nos animais no subgrupo CBZF1-45, enquanto os animais do subgrupo CBZF1-90 tiveram um aumento na concentração de óxido nítrico ovariana (Figura 12).

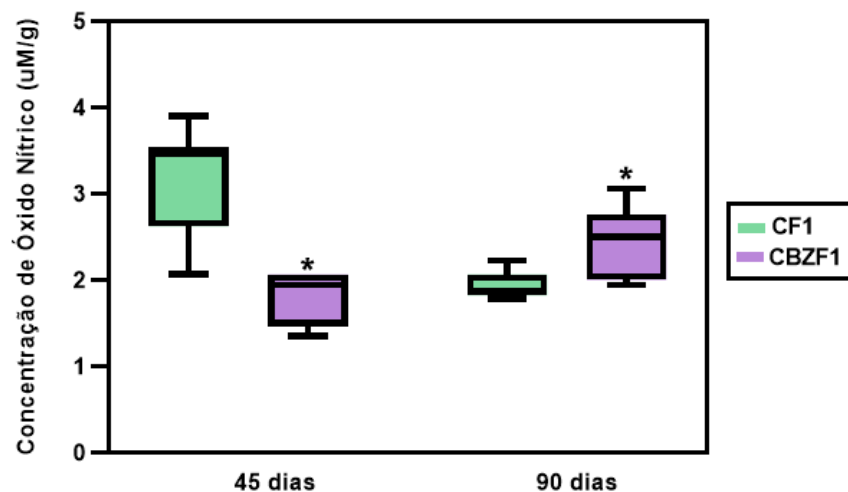


Figura 12. Concentração de óxido nítrico ($\mu\text{Mol/g}$) no tecido ovariano de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade. Dados representados em Box plot (valor mínimo, primeiro interquartil, mediana, terceiro interquartil e valor máximo). Teste não paramétrico de Mann-Whitney; * $p \leq 0,05$. $n=7$.

Da mesma forma, os animais de 45 dias de idade do subgrupo tratado (CBZF1-45) apresentaram diminuição estatisticamente significativa da concentração de óxido nítrico no tecido uterino em comparação aos controles (subgrupo CF1-45). Entretanto, aos 90 dias de idade, não foi evidenciada nenhuma alteração nos níveis de óxido nítrico entres os subgrupos controle e tratado (CF1-90 e CBZF1-90, respectivamente) (Figura 14).

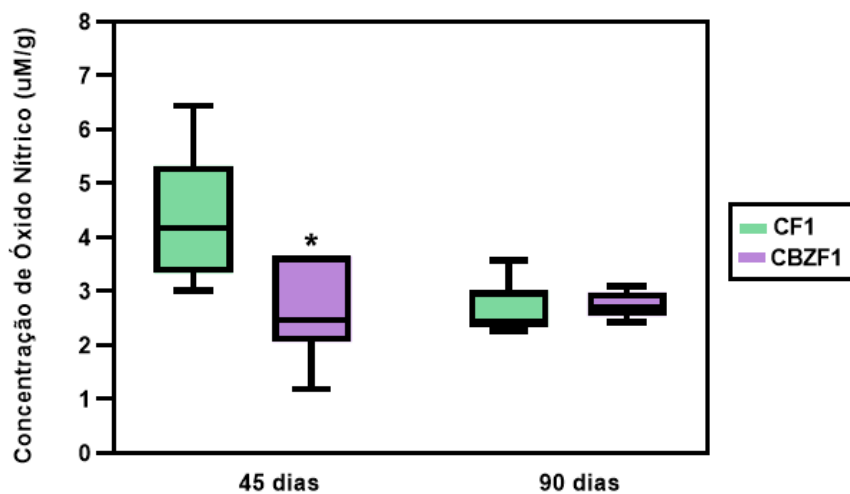


Figura 13. Concentração de óxido nítrico ($\mu\text{Mol/g}$) no tecido uterino de ratos pertencentes aos subgrupos controle (CF1) e tratado (CBZF1), aos 45 e 90 dias de idade. Dados representados em Box plot (valor mínimo, primeiro interquartil, mediana, terceiro interquartil e valor máximo). Teste não paramétrico de Mann-Whitney; * $p \leq 0,05$. $n=7$.

5 DISCUSSÃO

A CBZ é um fármaco amplamente utilizado por homens e mulheres, sendo efetivo no tratamento de crises epiléticas, transtornos bipolares, neuralgia do trigêmeo, dores neuropáticas, esquizofrenia, Síndrome de Abstinência Alcoólica, quadros de agressão, entre outros distúrbios neurológicos (ROGAWSKI; PORTER, 1990; RICHERS; PERUCA, 1993; KHALILI et al., 2022; YIP et al., 2020; STUPPAECK et al., 1990; BIALER, 2012; SWERDLOW, 1984; SINDRUP; JENSEN, 1999; SÖDERPALM, 2002; ULLAH et al., 2018). Apesar de ser uma droga frequentemente prescrita, a exposição paterna à CBZ e seus possíveis efeitos na geração F1 permanecem ainda pouco esclarecidos na literatura.

Os efeitos da exposição materna à CBZ durante o período de gestação e de lactação, sobre ratos machos da geração F1, foram demonstrados em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (ANDRETTA et al., 2014; OLIVA et al., 2020; 2021), e evidenciaram alterações da distância anogenital, da descida testicular e da separação prepucial, sugerindo prejuízo sobre o desenvolvimento sexual masculino pré e pós-natal.

Alterações das características seminais, dos níveis de hormônios sexuais, da espermatogênese e da fertilidade de ratos também têm sido referidas durante e após terapia prolongada com CBZ (SOLIMAN; ABLA ABD, 1999; OLIVA; MIRAGLIA, 2009). Ainda, ratos machos tratados com carbamazepina durante 70 dias consecutivos apresentaram alterações no espermatozoide epididimário, como redução da atividade mitocondrial, da integridade acrossômica, da vitalidade e da motilidade espermática, associadas com aumento da fragmentação do DNA nuclear e maior frequência de alterações morfológicas espermáticas (Dados ainda não publicados).

O mecanismo exato da toxicidade da CBZ sobre o espermatozoide não está bem definido, mas a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o desenvolvimento de estresse oxidativo têm sido propostos como mediadores de alguns dos efeitos adversos desta droga. A excessiva produção de EROs e o aumento do estresse oxidativo podem ocasionar danos aos componentes celulares, diminuição na motilidade espermática, na atividade mitocondrial e na habilidade de fertilização do oócito (AITKEN et al., 1985; YANAGIMACHI, 1994; DE LAMIRANDE; GAGNON,

1995; PATEL, 2002; 2004; CONRAD et al. 2005; EGHBAL et al., 2013; AITKEN et al., 2014; MORIELLI; O'FLAHERTY, 2015; BAYSAL et al., 2017; O'FLAHERTY; MATSUSHITA-FOURNIER, 2017). Além disso, a insuficiência dos mecanismos de reparo de DNA do espermatozoide aumenta a sensibilidade deste ao estresse oxidativo (LEWIS et al., 2013).

Níveis elevados de EROs também podem acarretar danos no processo de compactação da cromatina (AITKEN, 2017; WAGNER et al., 2017; TVRDÁ et al., 2018; TOOR; SIKKA, 2019) e alterar a integridade do DNA espermático por interferir nos processos de protaminação, durante a espermiogênese, de compactação pós-testicular da cromatina, e/ou pela oxidação direta, que ocasiona a fragmentação do DNA espermático, comprometendo a fertilidade masculina e a viabilidade da prole. Ainda, a atuação de EROs sobre as células da linhagem germinativa e, por fim, sobre os espermatozoides, pode impactar negativamente não somente na integridade do DNA, mas também na dinâmica da reprogramação genética e epigenética do gameta paterno, afetando o desenvolvimento e a qualidade do embrião.

Existe ampla literatura sobre alterações em diferentes eventos ocorridos durante a gestação, em razão de fatores adversos, incluindo a exposição a tratamentos medicamentosos. De fato, a associação entre saúde materna e bem-estar da prole tem sido bastante estudada e é relativamente bem definida. Por outro lado, estudos epidemiológicos e experimentais também sugerem a existência de diversos mecanismos pelos quais fatores paternos podem influenciar o desenvolvimento da prole (CURLEY; MASHOODG; CHAMPAGNE, 2011; FRIEDLER, 1996), estando associadas ao aumento de morte embrionária, natimortos, malformações congênitas, abortos espontâneos, câncer infantil e a alterações no desenvolvimento comportamental dos descendentes, sendo esses efeitos, em vários casos, transmissíveis para as próximas gerações (BONDE; TØTTENBORG; HOUGAARD, 2019; HALES;ROBAIRE, 2001; VERSTEGEN et al., 2020). Ainda, embora existam diferenças entre espécies, em geral, estudos experimentais fornecem fortes evidências de que a exposição paterna a drogas e outras toxinas pode ocasionar efeitos sobre prole por meio da linhagem germinativa paterna (CURLEY; MASHOODG; CHAMPAGNE, 2011; HALES; ROBAIRE, 2001).

Desta forma, a integridade do genoma paterno desempenha importante papel no estabelecimento, na manutenção e na viabilidade da gestação, quer seja em condições naturais ou por meios artificiais (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). O DNA do espermatozoide pode ser modificado por diferentes fatores, por meio de mecanismos ligados a alterações da integridade do DNA e do epigenoma do espermatozoide (níveis de metilação do DNA, modificações de histonas e perfis de RNA), como também por algumas respostas imunológicas, inflamatórias e vasculares maternas mediadas por alterações do plasma seminal.

Diante destas informações e considerando a inexistência, na literatura, de estudos que abordam os efeitos da exposição paterna à CBZ sobre a descendência, o presente trabalho foi proposto, com a finalidade de investigar os possíveis impactos da exposição crônica paterna à CBZ (geração F0), antes da concepção, sobre a prole do sexo feminino (geração F1).

Os resultados obtidos demonstraram que a prole do sexo feminino pertencente ao grupo CBZ (CBZF1) apresentou redução no peso corporal ao nascimento (1dpn), que permaneceu durante a primeira semana de vida, até os 7dpn. Possível atraso sobre o desenvolvimento embriofetal pode ter ocorrido, influenciado pela exposição paterna à CBZ, resultando em diminuição do peso corporal. Durante o período de lactação, houve recuperação no ganho de peso dos filhotes e não houve alterações significantes entre os grupos experimentais até a idade adulta, quando o ganho de peso corporal reduziu novamente. Estímulos ou insultos ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento pré-natal, podem ocasionar efeitos de longo prazo, que podem se manifestar somente na idade adulta (NYIRENDA, 2018; ARIMA; FUKUOKA, 2020).

Além disso, houve redução na distância anogenital (AGD) e no índice anogenital da prole feminina pertencente ao grupo tratado com CBZ (grupo CBZF1), aos 1, 4 e 21dpn. Geralmente, a distância e o índice anogenital refletem a diferenciação dimórfica influenciada por andrógenos nos dois sexos, sendo normalmente duas vezes maior em machos do que em fêmeas (ADIBI et al., 2015; CHRISTIANSEN et al., 2014). Porém, fatores não relacionados a atividade endócrina intrínseca de agentes exógenos podem influenciar a medida da AGD, como peso

corporal e comprimento dos filhotes, que podem variar amplamente em função do tamanho da ninhada e toxicidade neonatal (GALLAVAN et al., 1999).

Embora evidências de diminuição na AGD feminino sejam raras, a exposição materna ao cetoconazol e ao paracetamol, durante a gestação, também ocasionou redução na AGD da prole do sexo feminino (TAXVIG et al., 2007; HOLM et al., 2016; SCHWARTZ et al., 2019). No entanto, os mecanismos relacionados a esta ocorrência não são conhecidos e devem ser melhor investigados.

Em roedores, a idade da abertura vaginal e do primeiro estro são marcadores do início da puberdade nas fêmeas, que ocorre geralmente entre 32 e 36dpm (CUMMINGS; GRAY, 1987; GOLDMAN et al., 2007; KINSEY-JONES et al., 2010). No presente estudo, as ratas do grupo tratado (CBZF1) apresentaram aumento da idade de abertura vaginal, sugerindo que a exposição paterna à CBZ acarreta início tardio da puberdade na prole do sexo feminino. Geralmente, a abertura vaginal e a primeira ovulação estão relacionadas e ocorrem em resposta a um aumento dos níveis séricos de estradiol durante a puberdade (STUMP et al., 2012).

Além disso, o acompanhamento de regularidade e duração do ciclo estral, avaliado por meio dos esfregaços vaginais realizados entre o 75º e 90º dpm, revelou que ratas do subgrupo CBZF1-90 apresentaram aumento na proporção de ciclos irregulares e de duração de cada ciclo, com redução no tempo nas fases de proestro, estro e metaestro, enquanto a fase de diestro foi significativamente prolongada. Como o ciclo estral de ratas inicia-se imediatamente após a abertura vaginal, provavelmente o início tardio da puberdade possa ter interferido na sincronidade e na regularidade do ciclo estral dos animais deste grupo.

A avaliação de alterações nas células epiteliais vaginais é um método relativamente não invasivo útil para acompanhar os ciclos reprodutivos em roedores. No entanto, deve-se considerar que os primeiros ciclos estrais, após a ocorrência da abertura vaginal, podem normalmente ser irregulares antes do estabelecimento de um padrão cíclico de ovulação, que se inicia por volta dos 60 dpm (GOLDMAN et al., 2007).

O ciclo estral de ratas ocorre em um curto período de tempo, geralmente 5 dias, e apresenta 4 fases, caracterizadas pela combinação na proporção de diferentes tipos

celulares no esfregaço vaginal. Desta forma, a avaliação da sincronicidade do ciclo estral é utilizada com um índice indireto do estado funcional do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HPG) (MARCONDES et al., 2002; WHALEN et al., 2016 GEREZ et al., 2005; GOLDMAN et al., 2007). Em um ciclo regular, a fase de proestro normalmente dura cerca de 15 horas e é caracterizada pela predominância de células epiteliais nucleadas devido ao aumento dos níveis séricos de estradiol e da atividade proliferativa do epitélio vaginal. Nesta fase também ocorre o pico de LH. Em sequência, na fase de estro, com duração de 12 horas, ocorre a queda dos níveis de estrogênio, a ovulação e formação do corpo lúteo com consequente elevação nos níveis de progesterona, ocasionando diminuição da proliferação do epitélio vaginal e, portanto, o esfregaço vaginal é constituído pela presença de grande quantidade de células cornificadas (ou queratinizadas) (LONG; EVANS, 1922; GOLDMAN et al., 2007; BARHA; GALEA, 2010).

Entre as fases de estro e de diestro, um estágio intermediário que precede a infiltração leucocitária denominado metaestro ou diestro 1 é caracterizado pela presença de uma combinação de leucócitos, células cornificadas e de células epiteliais redondas no esfregaço vaginal, concomitante a altos níveis de progesterona. Em seguida, a fase de diestro (ou diestro 2) possui duração mais prolongada, de 48 a 62 horas, caracteriza-se pela presença predominante de leucócitos no esfregaço vaginal e, ao final dessa fase, ocorre novamente o aumento dos níveis de estrogênio (LONG; EVANS, 1922; GOLDMAN et al., 2007; BARHA; GALEA, 2010).

A citologia vaginal reflete alterações no hormônio ovariano circulantes de forma que, durante o ciclo estral de ratas, os níveis de estradiol estão elevados nas fases de proestro e estro, enquanto que altos níveis de progesterona ocorrem nas fases de metaestro e de diestro. Desta forma, o aumento na duração da fase de diestro indica o prolongamento da luteogênese e presença de altos níveis de progesterona secretados pelo corpo lúteo, resultando em inibição por *feedback* do hormônio folículo estimulante (FSH) e baixos níveis de estradiol, culminando em atraso no início de nova foliculogênese e na oocitação e, portanto, resultando em efeito adverso sobre a reprodução feminina (STUMP, 2012; COOPER et al., 1998). Ainda, a redução na duração da fase de proestro pode indicar que alterações nos níveis de FSH, assim como na ocorrência dos picos de estrógeno e LH, interferindo nos processos de dominância folicular, ovulação e formação do corpo lúteo.

A redução nos pesos relativo e absoluto do útero, observada em ratas pertencentes ao subgrupo CBZF1-90, pode estar relacionada, em parte, com o aumento de duração da fase de diestro, pois o útero apresenta maior peso na fase de estro, diminuindo durante fase de diestro (STUMP et al., 2012). Da mesma forma, a redução dos pesos absoluto e relativo do ovário neste mesmo subgrupo poderia ser consequência de redução do número de folículos ovarianos devido ao atraso na foliculogênese.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação de EROs e a atividade das enzimas antioxidantes, e pode ter um papel importante em diversos processos patológicos. Nesse contexto, o estresse oxidativo pode ocorrer pela redução dos níveis ou da ação de enzimas antioxidantes, produção excessiva de EROs ou de ambos os eventos. Muitos biomarcadores podem ser utilizados para avaliar o *status* oxidativo dos tecidos, dentre eles o Malondialdeído (MDA) e o óxido nítrico (NO) (CZERSKA et al., 2015). O MDA é um produto final da peroxidação lipídica, enquanto o NO, produzido pela enzima NO sintase, é responsável por vários processos fisiopatológicos, entre eles distúrbios neurológicos como a epilepsia (ARHAN et al., 2010).

Neste estudo, os tecidos uterino e ovariano dos subgrupos tratados com CBZ, aos 45 e 90dpn (subgrupos CBZF1-45 e CBZF1-90, respectivamente), demonstraram concentrações de MDA significativamente maiores quando comparado aos seus respectivos subgrupos controles, indicando ocorrência de peroxidação lipídica. No entanto, no subgrupo CBZF1-45, houve redução dos níveis de NO no tecido ovariano e uterino, enquanto que nas ratas do grupo tratado com CBZ, aos 90dpn (CBZF1-90), ocorreu aumento na concentração de NO somente no ovário.

Conforme abordado anteriormente, o estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre níveis de EROs e/ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) e a atividade enzimática antioxidantes. Existe uma relação complexa entre EROs e o sistema antioxidante endógeno no trato reprodutor feminino. EROs são normalmente produzidos por macrófagos, neutrófilos e células da granulosas presentes nos folículos maduros, células endometriais e pelo corpo lúteo (BURTON et al., 2010; RUDER et al., 2009; AGARWAL et al., 2016).

As EROs estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e desempenham papel importante no processo de foliculogênese, na indução da ovulação, na ocorrência de alterações cíclicas endometriais, na fertilização, implantação embrionária e manutenção da gravidez (NATH et al., 2021; DAS; ROYCHOUDHURY, 2022). EROs também influenciam a luteólise, a secreção de progesterona pelo corpo lúteo e a ocorrência de atresia folicular (BEHRMAN, 2001; AGARWAL et al., 2016; NATH et al., 2021; AL-GUBORY et al., 2012; RIZZO et al., 2012; SUGINO, 2005).

As EROs foliculares promovem apoptose enquanto o estrogênio estimula a produção da enzima catalase no folículo dominante, evitando a ocorrência de apoptose. No entanto, no útero, o aumento dos níveis de hormônios estrogênicos resultam no aumento significativo nos níveis de EROs e em peroxidação lipídica, com parte dos efeitos revertidos pela atividade da catalase. Ainda, a produção de superóxido dependente de NADPH ovariana e uterina parece ser induzível por LH (AGARWAL et al., 2016; MENDES et al., 2022; GUPTA et al., 2014; DESOUZA et al., 2005).

A geração de EROs pelo sistema P450 também é importante durante o processo metabólico de síntese de hormônios esteroides no ovário. A reação da monooxigenase, mediada pelo P450, é necessária para o processo esteroidogênico que, inevitavelmente, produz EROs como subprodutos. A geração de superóxido dependente de NADPH no ovário de camundongos aumenta durante a fase pré-ovulatória precoce e durante a fase lútea em animais prenhes (BEHRMAN, 2001; AGARWAL et al., 2016; NATH et al., 2021; AL-GUBORY et al., 2012; RIZZO et al., 2012; SUGINO, 2005; FUJII et al. 2005).

Entretanto, níveis excessivos de EROs, que levam ao estresse oxidativo, podem afetar folículos maduros e induzir dano tecidual no ovário, resultando em disfunção ovariana. Os leucócitos fagocitários expressam a enzima NADPH-oxidase e geram grandes quantidades de ânions superóxido. As EROs também tem sido correlacionada com complicações associadas à gravidez, particularmente perda gestacional recorrente, pré-eclâmpsia e mola hidatiforme, e à infertilidade, incluindo endometriose, hidrossalpinge, infertilidade e envelhecimento ovariano prematuro (GUPTA et al., 2009; NATH et al., 2021).

Por sua vez, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são derivadas principalmente do NO e também participam de diversos processos reprodutivos. O sistema enzimático óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a formação de NO a partir de O₂ e L-arginina, usando NADPH como doador de elétrons. Em geral, o NO produzido pela NOS neuronal e NOS endotelial regula funções fisiológicas, a maturação de oócitos e a ovulação (SHUKOVSKI, TSAFRIRI, 1994; JABLONKA-SHARIFF, OLSON LM, 2000; BUDANI; TIBONI, 2021), enquanto a produção de NO por NOS induzível, expressa principalmente em macrófagos após indução por vários estímulos, incluindo citocinas inflamatórias, está envolvido fisiopatológicas. Desta forma, o NO pode inibir a esteroidogênese em folículos periovulatórios e a secreção de estradiol e, conseqüentemente, de aromatase em células granulosas-lúteas. Ainda, o estradiol pode induzir a morte das células luteínicas por estimular a via de síntese de NO (VAN VOORHIS et al., 1994; AGARWAL et al., 2012; FUJII et al., 2005; DAVE et al., 1997; BUDANI, TIBONI, 2021).

A alta taxa metabólica do corpo lúteo resulta em grande consumo de substratos de oxigênio e energia, com conseqüente aumento na produção de EROs; portanto, as células lúteas são expostas a altas concentrações de EROs. É importante ressaltar que o controle das concentrações fisiológicas de EROs lúteas por enzimas antioxidantes é essencial para a produção de progesterona pelo corpo lúteo (BEHRMAN, 2001; NATH et al., 2021; AL-GUBORY et al., 2012; RIZZO et al., 2012; SUGINO, 2005). Durante a fase de regressão do corpo lúteo e redução nos níveis de progesterona, ocorre diminuição na concentração da enzima superóxido dismutase e o aumento na concentração de EROs, produzidos por macrófagos (DESOUZA et al., 2005). O NO inibe a síntese de estradiol e possivelmente também participe da regressão luteínicas, por meio da inibição da esteroidogênese (OLSON et al., 1996; SUGINO, 2005).

A produção excessiva de ERNs, assim como as EROs, pode afetar a estrutura e a função de proteínas e, portanto, causar alterações na atividade de enzima catalítica, alterar a organização do citoesqueleto e prejudicar a sinalização inter e intracelular (FUJII et al., 2005).

Em condições de baixo *status* antioxidante, a produção intracelular do ânion superóxido aumenta. A reação entre NO e o ânion superóxido resulta na formação de

peroxinitrito que é capaz de induzir peroxidação lipídica, citotoxicidade e nitrosação de moléculas de tirosina, que atuam como mediadores da função enzimática e da transdução de sinal. Portanto, uma vez que parte do NO é convertido em peroxinitrito por reação com EROs, o estresse nitrosativo ocorre simultaneamente com ao estresse oxidativo (FUJII et al., 2005).

Os níveis de EROs e/ ou ERNs e de enzimas antioxidantes endógenas estão intimamente relacionadas aos eventos do ciclo ovariano, ou seja, foliculogênese, ovulação e formação do corpo lúteo, bem como são influenciados pelas gonadotrofinas e hormônios ovarianos. Desta forma, as alterações apresentadas na irregularidade e na duração das fases do ciclo estral de ratas do subgrupo CBZF1-90, as quais sugerem alterações no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, possivelmente estejam associadas a ocorrência de peroxidação lipídica e de estresse oxidativo e nitrosativo observada neste subgrupo. Entretanto, não foram encontradas evidências que justificam a redução nos níveis de NO nos animais do subgrupo CBZF1-45.

Análises histopatológicas e estereológicas uterinas e ovarianas, além da realização de dosagens plasmáticas de gonadotrofinas e hormônios sexuais estrógeno e progesterona, nos animais de 45 e 90 dpn, deverão ser realizados para melhor esclarecimento dos resultados obtidos no presente estudo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a exposição paterna à carbamazepina acarreta impactos negativos sobre prole do sexo feminino, de forma mais intensa na fase adulta, evidenciados por alterações no desenvolvimento físico, estabelecimento de puberdade tardia, redução na morfometria ovariana e uterina, irregularidade e alterações na duração das fases do ciclo estral, bem como indução de estresse oxidativo no útero e ovário.

Demais estudos estão em andamento a fim de proporcionar mais informações em relação aos efeitos causados pela carbamazepina, tanto sobre o espermatozoide paterno, quanto sobre o desenvolvimento sexual, as gônadas e o trato genital e qualidade espermática na prole do sexo masculino, os quais não foram o objetivo deste trabalho, quanto nos diversos aspectos relacionados aos diferentes estágios do desenvolvimento da prole feminina.

REFERÊNCIAS

ABD-ALLAH, A.R *et al.* Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by Lcarnitine. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2, p. 73-81. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763248/>>. Acesso em: 19 dez. 2021

ADIBI, J. *et al.* Human Chorionic Gonadotropin Partially Mediates Phthalate Association with Male and Female Anogenital Distance. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**. v. 9, n. 100, p. 1216-24. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26200238/>> Acesso em: 28 out. 2022.

AGARWAL, A. *et al.* The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Springer Link**. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/1477-7827-10-49>> Acesso em: 2 nov. 2022.

AGARWAL A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3527168/>. Acesso em: 02 nov 2022

AITKEN, R.J. *et al.* Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**. v. 16, ed. 1, p. 31-38. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3901879/>> Acesso em: 19 dez. 2021.

AITKEN, R.J. *et al.* Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. **Journal of reproduction and fertility**. v. 73, ed. 2, p. 441-449. 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3989795/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

AITKEN, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction Development**. v. 84, n. 10, p. 1039-1052. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mrd.22871>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

AJAYI, A.F. *et al.* Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. **Fertility Research and Practice**. v. 6, ed. 5. 2020. Disponível em: <<https://fertilityresearchandpractice.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40738-020-00074-3#citeas>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

ALBANI, F. *et al.* Carbamazepine clinical pharmacology: a review. **Pharmacopsychiatry**. v. 28, ed. 6, p. 235-244. 1995. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-979609>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

AL-GUBORY, K. et al. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. **Reproductive Biomedicine Online**. p. 551-560. 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472648312005275>>.

Acesso em: 2 nov. 2022.

AMBROSIO, A.F. *et al.* Carbamazepine inhibits L-type Ca²⁺ channels in cultured rat hippocampal neurons stimulated with glutamate receptor

agonists. **Neuropharmacology**. v. 38, ed. 9, p. 1349-1359. 1999. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10471089/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

AMBROSIO, A.F.; *et al.* Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. **Biochemical Pharmacology**. v. 61, ed. 10, p. 1271-1275. 2001.

Disponível em: <<https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/4829>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

ANDRETTA, R.R. *et al.* Carbamazepine-exposure during gestation and lactation affects pubertal onset and spermatoc parameters in male pubertal offspring.

Reproductive Toxicology. v. 44, p. 52-62. 2014. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890623813003559>>.

Acesso em: 20 ago. 2022.

ARHAN, E. *et al.* Effects of epilepsy and antiepileptic drugs on nitric oxide, lipid peroxidation and xanthine oxidase system in children with idiopathic epilepsy.

Seizure. v. 20, ed. 2, p. 138-42. 2010. em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21112224/>>. Acesso em: 8 set. 2022.

ARIMA, Y. and FUKUOKA, H. Developmental origins of health and disease theory in cardiology. **Journal of Cardiology**. p. 14-17. 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0914508720300472>>. Acesso

em: 2 nov. 2022.

BARHA, C. K.; GALEA, L. A. M. Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. **Biochim Biophys Acta**. v. 1800, ed. 10, p. 1056-

1067, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20100545/>>. Acesso

em: 7 set. 2022

BAYSAL, M.; *et al.* Reproductive toxicity after levetiracetam administration in male rats: Evidence for role of hormonal status and oxidative stress. **PLoS One**. v. 12, ed. 4, p. 1-16. 2017. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175990>>. Acesso

em: 19 dez. 2021.

BEEDER, L. et al. Effect of antidepressant medications on semen parameters and male fertility. **International Journal of Urology**. 2019. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/iju.14111>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

BEHRMAN, H.R. *et al.* Oxidative stress and the ovary. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**. p. S40-2. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11223371/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

BENCHAIB, M *et al.* Sperm DNA Fragmentation Decreases the Pregnancy Rate in an Assisted Reproductive Technique. Scientific Research. **Human Reproduction**. p. 1023-1028. 2003. Disponível em: <<https://www.scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=3229395>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

BENEDETTI, S., *et al.* Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. **Reproduction Biomedicine Online**. v. 25, p. 300-306. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472648312003379>> Acesso em: 2 nov. 2022.

BIALER, M. Why are antiepileptic drugs used for nonepileptic conditions? **Epilepsia**. v. 53, ed. 7. p. 26-33. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23153207/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

BLATT, J. *et al.* Pregnancy outcome following cancer chemotherapy. **The American Journal of medicine**. v. 69, p. 828-832, 1980. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002934380800076>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

BOLON, B. *et al.* STP position paper: Recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve, and eye) during nonclinical general toxicity studies. **Toxicologic Pathology**. v. 41, ed. 7, p. 1028-1048. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23475559/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

BONDE, Jens *et al.* Paternal environmental exposure and offspring health. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, [s. l.], v. 7, p. 14-20, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.05.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2451965018300668?via%3Di> hub. Acesso em: 20 ago. 2022.

BUDANI, MC *et al.* Novel Insights on the Role of Nitric Oxide in the Ovary: A Review of the Literature. **Environmental Research and Public Health**.p. 980. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/18/3/980>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

BURTON, G. *et al.* Oxidative stress. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**. p. 287-99. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21130690/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

CHAHOUD, I. *et al.* **Methods in prenatal toxicology**. Berlin: Thieme Publ., 1997. p. 78–91.

CHEN, G. *et al.* Attenuation of cyclic AMP production by carbamazepine. **Journal of Neurochemistry**. v. 67, ed. 5, p. 2079-2086. 1996. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-4159.1996.67052079.x>> Acesso em: 19 dez. 2021.

COHN, D.F. *et al.* The effect of anticonvulsant drugs on the development of male rats and their fertility. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. v. 45, ed. 9. 1982. Disponível em: <<https://jnnp.bmj.com/content/45/9/844.short>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

COLIE, Christine F. Male mediated teratogenesis. **Reproductive Toxicology**. v. 7, ed. 1, p. 3-9. 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/089062389390003P#!>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

CONRAD, M. *et al.* The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. **Molecular and Cellular Biology**. v. 25, ed. 17, p. 7637-7644. 2005. <Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16107710/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

COOPER, R *et al.* MONITORING OF THE ESTROUS CYCLE IN THE LABORATORY RODENT BY VAGINAL LAVAGE. **Science Inventory**. 2002. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=NHEERL&dirEntryID=30256>. Acesso em: 2 nov. 2022.

CORA, M.C. *et al.* Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**. v. 43, ed. 6, p. 776-93, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25739587/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

CORDIER, S. Evidence for a role of paternal exposures in developmental toxicity. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s. l.], v. 102, ed. 2, p. 176-181, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-7843.2007.00162.x>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

COURTNEY, K.R.; *et al.* Modulated anticonvulsant block of sodium channels in nerve and muscle. **European journal of pharmacology**, Europe, v. 88, ed. 1, p. 1-9, 18 mar. 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6303804/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

CHRISTIANSEN, S. *et al.* Low-dose effects of bisphenol A on early sexual development in male and female rats. **Reproduction**. 2014, v. 4, 147, p. 477-87. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24298045/>>. Acesso em: 28 out. 2022.

CUMMINGS, A.M. *et al.* Methoxychlor affects the decidual cell response of the uterus but not other progestational parameters in female rats. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 90, n. 2, p. 330-6, 15 set. 1987. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3629607/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

CURLEY, J. P.; MASHOODH, R.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetics and the Origins of Paternal Effects. **Hormones and Behavior**.v. 59, ed. 3, p. 306-314, 8 jul. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2975825/>>. Acesso em: 16 set. 2022.

CZERSKA, M. *et al.* Today's oxidative stress markers. **Medycyna Pracy**, [s. l.], v. 66, ed. 3, p. 393–405, 2015. Disponível em: <<http://medpr.imp.lodz.pl/Today-s-oxidative-stress-markers,58310,0,2.html>>. Acesso em: 8 set. 2022.

DAILEY, J.W. *et al.* Carbamazepine-induced release of serotonin from rat hippocampus in vitro. **Epilepsia**. v. 39, ed. 10, p. 1054-1063, 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1528-1157.1998.tb01290.x>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

DAS, A. *et al.* Reactive Oxygen Species in the Reproductive System: Sources and Physiological Roles. **Advances in experimental medicine and biology**. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35641864/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

DAVE, S *et al.* Evidence that nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. **Clinical science**. p. 277-84, 1 mar. 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9093008/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

DAVIS, D.L. *et al.* Male-mediated teratogenesis and other reproductive effects: biologic and epidemiologic findings and a plea for clinical research. **Reproductive Toxicology**. v. 6, ed. 4, p. 289-292, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0890623892901905>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

DE LAMIRANDE, Eve; GAGNON, Claude. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**. v. 10, ed. Suppl1, p. 15-21, 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/10/suppl_1/15/720221>. Acesso em: 19 dez. 2021.

DESOUZA, L. Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: protein identification and differential protein expression. **Proteomics**. p. 270-81. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15602768/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

DUBOVICKÝ, M. *et al.* Evaluation of developmental neurotoxicity: some important issues focused on neurobehavioral development. **Interdiscip Toxicol**, [s. l.], v. 1, ed. 3-4, p. 206–210, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2994024/>. Acesso em: 19 dez. 2021.

EGHBAL, M.A. *et al.* Protective role of melatonin and taurine against carbamazepine-induced toxicity in freshly isolated rat hepatocytes. **International Journal of Morphology**. v. 31, n. 3, p. 1081–1089, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Mohammadreza-Sattari/publication/259677878_Protective_Role_of_Melatonin_and_Taurine_Against_Carbamazepine-

induced_Toxicity_in_Freshly_Isolated_Rat_Hepatocytes_Rol_Protector_de_la_Melatonina_y_Taurina_contra_la_Toxicidad_Inducida_por_la_Carbama/links/0046352d51395bbe69000000/Protective-Role-of-Melatonin-and-Taurine-Against-Carbamazepine-induced-Toxicity-in-Freshly-Isolated-Rat-Hepatocytes-Rol-Protector-de-la-Melatonina-y-Taurina-contra-la-Toxicidad-Inducida-por-la-Carbama.pdf> . Acesso em: 19 dez. 2021.

FANAELI, H. *et al.* Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. **Iran Journal of Reproductive Medicine**, Iran, v. 12, ed. 2, p. 133-138. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009562/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

FRIEDLER, G. Effects of limited paternal exposure to xenobiotic agents on the development of progeny. **Neurobehavioral Toxicology & Teratology**, Washington, DC, v. 7, ed. 6, p. 739-743, 1985. Disponível em: <<https://psycnet.apa.org/record/1987-18102-001>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

FRIEDLER, G. Paternal exposures: Impact on reproductive and developmental outcome. An overview. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 55, ed. 4, p. 691-700. 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0091305796002869>> . Acesso em: 19 dez. 2021.

FUJII, J. *et al.* Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 2005. Disponível em: <<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-3-43#citeas>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

GALLAVAN, RH Jr, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reprod Toxicol**. 1999. (5):383-90. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10560587/>>. Acesso em: 01/11/2022

GEREZ, J.R. *et al.* Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. **Contraception**. v. 72, p. 77-80, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15964297/>>. Acesso em: 1 set. 2022.

GIERBOLINI, Jaime; GIARRATANO, Melissa; BENBADIS, Selim R. Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy - a comparative review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v. 17, ed. 7, p. 885-888. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.2016.1168399>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

GOLDMAN, J. M. *et al.* The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**. v.

80, ed. 2, p. 84-97, 2007. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17342777/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

GUPTA, S. *et al.* Power of Proteomics in Linking Oxidative Stress and Female Infertility. **Biomed Research Internacional**. 2014. Disponível em:

<<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/916212/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

GUPTA S, Ghulmiyyah J, Sharma R, Halabi J, Agarwal A. Power of proteomics in linking oxidative stress and female infertility. **BioMed research international**. 2014.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24900998/>>. Acesso em 01 nov 2022

HALES, B *et al.* Paternal exposure to drugs and environmental chemicals: effects on progeny outcome. **Journal of Andrology**. v. 22, n. 6, p. 927. 2001. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11700855/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

HOLM J.B. *et al.* Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. **Toxicol Sci**.

150(1):178-89. 2016. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26732887/>>. Acesso em: 3 nov 2022

ICHIKAWA, J. MELTZER, H. Valproate and carbamazepine increase prefrontal dopamine release by 5-HT1A receptor activation. **European Journal of Pharmacology**. v. 380, ed. 1, p. R1-R3. 1999. <Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299999005178>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

JANNY, L; MENEZO, Y. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. **Molecular reproduction and development**. p. 36-42. 1994. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8049063/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

JABLONKA-SHARIFF, A. *et al.* Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. **Gamete Biology**. p. 412-421. 2000.

Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291098-2795%28200004%2955%3A4%3C412%3A%3AAID-MRD9%3E3.0.CO%3B2-W>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

JOFFE, J.M.; SOYKA, L.F. Effects of drug exposure on male reproductive processes and progeny. **Periodicum Biologorum**, [s. l.], v. 83, p. 351-362, 1981.

KHALILI, Y. A. *et al.* Carbamazepine Toxicity. *In*: KHALILI, Y. A. *et al.*

Carbamazepine Toxicity. Treasure Island (FL): **StatPearls**, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29939629/>>. Acesso em: 21 set. 2022.

KINSEY-JONES, J.S *et al.* Corticotrophin-releasing factor alters the timing of puberty in the female rat. **J Neuroendocrinol**. v. 22, n. 2, 2010. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20002962/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

LARSON-COOK et al. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **ScienceDirect**. v. 80, p. 895-902. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028203011166>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

LAHTINEN, H. Failure of carbamazepine to prevent behavioural and histopathological sequels of experimentally induced status epilepticus. **European Journal of Pharmacology**. v. 297, n. 3, p. 213-218. 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014299995007423>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

LEWIS, S.E. *et al.* The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 27, ed. 4, p. 325-337, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472648313003635>. Acesso em: 19 dez. 2021.

LEWIS, S.E.M.; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**. v. 322, p. 33-41. 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-005-1097-5>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. THE OESTROUS cycle in the rat and its associated phenomena. In: Long, J. A. **Memoirs of the University of California**. 1922. 148 p. Disponível em: <<https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-06120800R-bk>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

LOVICK, T. A.; ZANGROSSI, H. Jr. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. **Front Psychiatry**. v. 12:711065. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2021.711065/full>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

LUTWAK-MANN, C. Observations on progeny of thalidomide-treated male rabbits. **Br Med J**. v. 1, p. 1090-1091. 1964. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1814448/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MACDONALD, R.L.; KELLY, K.M. Antiepileptic drug mechanisms of action. **Epilepsia**. v. 36, ed. Suppl 2, p. S2-S12, 1995. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1528-1157.1995.tb05996.x>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MARANGOS, P.J. *et al.* Specific and potent interactions of carbamazepine with brain adenosine receptors. **European Journal of Pharmacology**. v. 93 (3-4), p. 175-182. 1983. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014299983901358>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**. v. 62, ed. 4A, p. 609-14, 2002. <Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12659010/>>. Acesso em: 1 set 2022.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat Res**. v. 424 (1-2), p. 83-95, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002751079900010X>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MENDES, S *et al.* The Role of ROS as a Double-Edged Sword in (In) Fertility: The Impact of Cancer Treatment. **Cancers**. p. 1585. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/14/6/1585>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

MCLEAN, K.J.; O'BRIEN, T.J.; COOK, M.J.; VAJDA, F.J. The influence of gender on the aggravation of absence seizures by carbamazepine in the low-dose pentylenetetrazol rat model. **Seizure**. v. 13, ed. 4, p. 208-216, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15121127/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide Biol Chem**. v. 5, p. 62-71. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1089860300903197>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MORIELLI, T.; O'FLAHERTY, C. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. **Reproduction**. v. 149, ed. 1, p. 113-123. 2015. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/149/1/113.xml>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MORRIS, I. *et al.* Sperm DNA damage and cancer treatment. **International Journal Andrology**. 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2605.2002.00372.x>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

MURATORI, M. *et al.* DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. **Fertil Steril**. v. 104, ed. 3, p. 582-590. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26151619/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MURATORI, M. *et al.* on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. **Mol Med**. v. 21, p. 109-122. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25786204/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

NATH, B *et al.* Antioxidants in Female Reproductive Biology. In: WAISUNDARA, Viduranga *et al.* Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action. **IntechOpen**. 2021. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/74927>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

NYIRENDA, M. et al. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. **International Health**. p. 66–70. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/inthealth/article/10/2/66/4924744?login=false>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

O'FLAHERTY, C.; MATSUSHITA-FOURNIER, D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. **Biol Reprod**. v. 97, ed. 4, p. 351-358. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/97/4/577/4157784?login=true>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 95, ed. 2, p. 351-358. 1979. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269779907383>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

OKADA, M. et al. Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. **Epilepsy Research**. v. 28, ed. 2, p. 143-153, 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0920121197000429>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

OLIVA, S.U. et al. Carbamazepine damage to rat spermatogenesis in different sexual developmental phases. **International Journal of Andrology**. v. 32, p. 563-74. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18637155/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

OLIVA, S.U. et al. Harmful effects of carbamazepine on the postnatal development of the rat ventral prostate. **Reproductive Biology and Endocrinology**. n. 22. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/1477-7827-10-22>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

OLIVA S.U. et al. Maternal CBZ exposure impairs testicular development, spermatogenesis and sperm parameters in male offspring at puberty. **Andrologia**. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32478927/>>. Acesso em: 01 nov 2022

OLIVA S.U. et al. Thyroid hormones, Sertoli cell proliferation and differentiation in progenies from carbamazepine-treated rat dams during pregnancy and lactation. **Andrologia**. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33433934/>>. Acesso em: 28 out 2022

OLSHAN, A.F.; FAUSTMAN, E.M. Male-mediated developmental toxicity. **Reproductive Toxicology**. v. 7, p. 191-202, 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/089062389390224U>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

OLSHAN, A.F.; TESCHKE, K.; BAIRD, P.A. Paternal occupational and congenital anomalies in offspring. **American Journal of Industrial Medicine**. v. 20, n. 4, p. 447-475, 1991. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajim.4700200403>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

OLSON, L *et al.* Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. **Endocrinology**. v. 137, p. 3531–3539. 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/137/8/3531/2498935?login=false>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

OTSUKI, K. *et al.* Effects of lamotrigine and conventional antiepileptic drugs on amygdala- and hippocampal-kindled seizures in rats. **Epilepsy Research**. v. 31, ed. 2, p. 101-112, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0920121198000187>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 37, n. 12, p. 1951-1962. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584904006823>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

PATEL, M. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 36, n. 11, p. 1139-1146. 2002. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1071576021000016391>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

PICHINI, S.; ZUCCARO, P.; PACIFICI, R. Drugs in Semen. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 26, p. 356–373. 1994. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.2165/00003088-199426050-00004>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

RICHERS, A.; PERUCCA, E. Clinical pharmacology and medical treatment. In: Laidlaw J, Richers A, Chadwick D (eds). **A textbook of epilepsy**, Edinburgh: Churchill Livingstone, ed. 4a, p. 495-560, 1993.

RIZZO, A. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. **Reproduction Domestic Anim**. p. 344-52, 1 abr. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22022825/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

ROGAWSKI, M.A.; PORTER, R.J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacological Reviews**. v. 42, p. 223-286, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2217531/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

RUDER, E. *et al.* Impact of oxidative stress on female fertility. **Curr Opin Obstetrics Gynecology**. p. 219-22, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19469044/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SAKKAS, D. *et al.* Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. **Oxford Academic**. v. 11, p. 837–843. 1996.

Disponível em:

<<https://academic.oup.com/humrep/article/11/4/837/624856?login=false>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SAKKAS, Denny et al. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **ScienceDirect**. v. 93, p. 1027-1036. 2010.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028209039661>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SALEH, R. *et al.* Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. **Fertility and Sterility**. p. 313-318, 2002. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028202032193>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SCHWARTZ C.L *et al.* Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders. **Archives of Toxicology**. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30430187/>>. Acesso em: 04 nov 2022

SHARPE, R.M. Endocrinology and paracrinology of the testis. *In*: LAMB, J. C.; FOSTER, P. M. D. **Physiology and Toxicology of Male Reproduction**. New York, NY: Academic Press, 1988. p. 71-102. Disponível em:

<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=xxUIBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Physiology+and+Toxicology+of+Male+Reproduction&ots=vaWr1o-aEn&sig=GLj7kjd_cx-mVgozD_S5fXVsfPM#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SHUKOVSKI, L *et al.* The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. **Endocrinology**. v. 135, p. 2287–2290, 1 nov. 1994. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/endo/article-abstract/135/5/2287/3036479?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SINDRUP, S; JENSEN, T. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. **Pain**. v. 83, n. 3, p. 389-400. 1999. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304395999001542>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

SÖDERPALM, B. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. **European Journal of Pain**. v. 6 Suppl A, p. 3-9. 2002. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090380101903155>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SOLIMAN, G.A. *et al.* Effects of antiepileptic drugs carbamazepine and sodium valproate on fertility of male rats. **DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**. v. 106, n. 3, p. 110-113. 1999. Disponível em:

<<https://europepmc.org/article/med/10220947>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SPRITZER, D.T. Exposição paterna. *In*: SANSEVERINO, M.T.V.; SPRITZER, D.T.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2001. p. 469-473.

STUPPAECK, C.H. *et al.* Carbamazepine monotherapy in the treatment of alcohol withdrawal. **International Clinical Psychopharmacology**. v. 5, n. 4, p. 273-278. 1990. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/2081898>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

STUMP, D.G. *et al.* Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. **Developmental and Reproductive Toxicology**. ed. 3. 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/291076202_Significance_reliability_and_interpretation_of_developmental_and_reproductive_toxicity_study_findings>. Acesso em: 1 nov. 2022.

SUGINO, N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. **National Library of Medicine**. p. 31-44, 7 mar. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29699208/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SWERDLOW, M. Anticonvulsant drugs and chronic pain. **Clinical Neuropharmacology**. v. 7, n. 1, p. 51-82, 1984. Disponível em: <https://journals.lww.com/clinicalneuropharm/citation/1984/03000/anticonvulsant_drugs_and_chronic_pain.3.aspx>. Acesso em: 19 dez. 2021.

TAXVIG, C. *et al.* Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. **International Journal of Andrology**. v. 31, ed. 2, p. 170-7. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2605.2007.00838.x>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

TOOR, J.S; SIKKA, S.C. Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction. *In*: HENKEL, R.; SAMANTA, L.; AGARWAL, A. **Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction**. London: Academic Press, 2019. cap. Human Spermatozoa and Interactions with Oxidative Stress, p. 45-53. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128125014000067>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

TRASLER, J.M.; DOERKSEN, T. Teratogen update: paternal exposures-reproductive risks. **Teratology**. v. 60, n. 3, p. 161-172. 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10471901/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

TURNER, T.T.; LYSIAK, J.J. Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. **Journal of Andrology**. v. 29, n. 5, p. 488-498, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2164/jandrol.108.005132>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

TANRIKUT, C *et al.* Adverse effect of paroxetine on sperm. **Fertility and sterility**. 2010. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Adverse-effect-of-paroxetine-on-sperm.-Tanrikut->

Feldman/7a7ab348e97635612aa726eab20a12c165506118>. Acesso em: 2 nov. 2022.

TVRDÁ, E.; MASSANYI, P.; LUKÁČ, N. Physiological and Pathological Roles of Free Radicals in Male Reproduction. *In*: MECCARIELLO, R.; CHIANESE, R. **Spermatozoa – Facts and Perspectives**. London: Intech Open, 2018.

TWIGG, J et al. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Oxford Academic**. v. 13, p. 1429–1436. 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article/13/6/1429/815784?login=false>. Acesso em: 2 nov. 2022.

ULLAH, S. *et al.* Epilepsy control with carbamazepine monotherapy from a genetic perspective. **BMC Pharmacology and Toxicology**. v. 19, n. 1. 2018. 73. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s40360-018-0261-y>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

VAN CALKER, D. *et al.* Carbamazepine distinguishes between adenosine receptors that mediate different second messenger responses. **European Journal of Pharmacology**. v. 206, n. 4, 25 abr. 1991. *Molecular Pharmacology*, p. 285-290. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/092241069190111T>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

VAN VOORHIS, B et al. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. **Endocrinology**. p. 1799-806. 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7525252/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

VERSTEGEN, Ruud et al. Paternal exposure to recreational drugs before conception and its effect on live-born offspring: A scoping review. **Birth Defects Research**. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bdr2.1702>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

VETTER-O'HAGEN, C.S.; SPEAR, L.P. Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. **Developmental Psychobiology**. v. 54, n. 5, p. 523-535. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dev.20610>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

WAGNER, H.; CHENG, J.W.; KO, E.Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. **Arab Journal of Urology**. v. 16, ed. 1, p. 35-43, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090598X17301316>> Acesso em: 18 dez. 2021.

WALDEN, J. *et al.* D. Calcium-antagonistic effects of carbamazepine in epilepsies and affective psychoses. **Neuropsychobiology**. v. 27, n. 3, p. 171-175, 1993.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8232834/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

WHALEN, Karen *et al.* **Farmacologia ilustrada**. 6. ed. rev. Porto Alegre: Artmed, 2016. 680 p. ISBN 978-85-8271-323-5.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. *In*: KNOBIL, K.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York, NY: Raven Press, 1994. p. 189-317.

YIP, V. L.M. *et al.* Evaluation of clinical and genetic factors in the population pharmacokinetics of carbamazepine. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 87, ed. 6, p. 2572–2588. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8247401/>. Acesso em: 21 set. 2022.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da carbamazepina sobre espermatozoides epididimários e a capacidade reprodutiva de ratos adultos e possíveis impactos sobre o desenvolvimento neurocomportamental e reprodutivo da prole (geração F1)", protocolada sob o CEUA nº 5294210322 (ID 011614), sob a responsabilidade de **Samara Urban de Oliva e equipe; Marina Nunes dos Santos; Profa. Dra. Sandra Maria Miraglia Valdeolivas; Renato Borges Tesser; Gabriela Nascimento; Samara Urban de Oliva; Catarina Conrado de Britto; Amanda Seraphim Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 12/05/2022.

We certify that the proposal "Carbamazepine effects on epididymal sperm and reproductive capacity of adult rats and possible impacts on neurobehavioral and reproductive development of offspring (F1 generation)", utilizing 40 Heterogenics rats (10 males and 30 females), protocol number CEUA 5294210322 (ID 011614), under the responsibility of **Samara Urban de Oliva and team; Marina Nunes dos Santos; Profa. Dra. Sandra Maria Miraglia Valdeolivas; Renato Borges Tesser; Gabriela Nascimento; Samara Urban de Oliva; Catarina Conrado de Britto; Amanda Seraphim Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/12/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)



Comissão de Ética no Uso de Animais

Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 85 a 95 dias N: 10
Linhagem:	Wistar		Peso: 300 a 350 g
Origem:	CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Fêmeas	idade: 80 a 90 dias N: 30
Linhagem:	Wistar		Peso: 200 a 300 g
Origem:	Biotério de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento (UNIFESP - São Paulo)		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 93 a 93 dias N: 0
Linhagem:	Wistar		Peso: 300 a 350 g
Origem:	Biotério de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento (UNIFESP - São Paulo)		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 90 a 90 dias N: 0
Linhagem:	Wistar		Peso: 300 a 350 g
Origem:	Biotério de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento (UNIFESP - São Paulo)		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 45 a 45 dias N: 0
Linhagem:	Wistar		Peso: 100 a 120 g
Origem:	Biotério das Disciplinas de Biologia Celular e Parasitologia (UNIFESP - São Paulo)		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Fêmeas	idade: 90 a 90 dias N: 0
Linhagem:	Wistar		Peso: 200 a 300 g
Origem:	Biotério de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento (UNIFESP - São Paulo)		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Fêmeas	idade: 45 a 45 dias N: 0
Linhagem:	Wistar		Peso: 90 a 120 g

Vigência da Proposta: de 06/2022 a 02/2027 Área: Biologia do Desenvolvimento/morfologia

Local do experimento: Laboratório de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento -
Disciplina de Biologia do Desenvolvimento -

Rua Botucatu, 740 - 2º andar - Vila Clementino - CEP 04023-061 - São Paulo/SP - tel: +55 (11) 5576-4848
Horário de atendimento: 2ª a 6ª, das 8h às 12h e das 14h às 17h : e-mail: ceuasecretaria@gmail.com
CEUA N 5294210322

Departamento de Morfologia e Genética - UNIFESP/EPM



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 17 de agosto de 2022

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

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