

Efeitos da carbamazepina sobre o epidídimo e possíveis impactos sobre a maturação espermática**Epididymal effects of carbamazepine and potential impacts on sperm maturation**

DOI:10.34119/bjhrv3n3-017

Recebimento dos originais:01/04/2020

Aceitação para publicação: 06/05/2020

Marina Nunes

Mestre em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/ EPM

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino, São Paulo, SP

E-mail: marinunes.biomed@gmail.com

Leonardo Wensing Fischer

Especialista em Reprodução Humana Assistida pelo Instituto Sapientiae

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino, São Paulo, SP

E-mail: leof2192@gmail.com

Rafaela Doretto do Valle Freitas

Discente do curso de Biomedicina – Centro Universitário São Camilo

Aluna de Iniciação Científica – UNIFESP/ EPM

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino, São Paulo, SP

E-mail: rafaela.doretto@hotmail.com

Sandra Maria Miraglia

Doutora em Ciências pela Escola Paulista de Medicina (EPM) e Livre-docente em Embriologia pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino, São Paulo, SP

E-mail: miraglia.sm@gmail.com

Samara Urban de Oliva

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do
Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino,
São Paulo, SP

E-mail: samaraurban@gmail.com; oliva.samara@unifesp.br

RESUMO

A carbamazepina (CBZ) é um fármaco amplamente utilizado no controle de convulsões, no tratamento da neuralgia do trigêmeo e em distúrbios afetivos. Alterações das características seminais, dos níveis de hormônios sexuais, da espermatogênese e da fertilidade masculina têm sido referidas durante e após terapia prolongada com CBZ. Embora não existam estudos evidenciando a ação deste medicamento sobre o epidídimo e o processo de maturação espermática, possíveis efeitos diretos da CBZ sobre os espermatozoides epididimários devem ser considerados, pois este fármaco é altamente lipossolúvel. O objetivo deste trabalho foi investigar uma possível ação direta da CBZ sobre parâmetros qualitativos do espermatozoide epididimário, utilizando o rato como modelo experimental, na fase adulta jovem. Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, distribuídos em 2 grupos: tratado com CBZ (200mg/kg, via gavagem), por quatro dias consecutivos, a partir dos 91 dias, e controle (n=5) - os animais receberam o veículo (azeite de oliva), seguindo o mesmo protocolo experimental utilizado no grupo tratado. Os testículos e epidídimos esquerdos e a próstata ventral foram removidos e pesados. Espermatozoides foram coletados da porção proximal da cauda epididimária direita e avaliados quanto a motilidade, a vitalidade e a morfologia. O tratamento com CBZ causou redução significativa na proporção de espermatozoides com motilidade progressiva associada ao aumento de espermatozoides apresentando motilidade não progressiva. Além disso, houve aumento significativo na porcentagem de espermatozoides mortos e de espermatozoides com alterações morfológicas. Os resultados sugerem que a CBZ pode atuar diretamente sobre o espermatozoide epididimário de ratos adultos jovens, reduzindo a fertilidade masculina.

Palavras-chave: Epidídimo; Carbamazepina; Espermatozoides

ABSTRACT

Carbamazepine (CBZ) is a drug widely used in the control of seizures, in the treatment of trigeminal neuralgia and in affective disorders. Changes in seminal characteristics, levels of sex hormones, spermatogenesis and male fertility have been reported during and after prolonged therapy with CBZ. Although there are no studies showing the action of this medication on the epididymis and the sperm maturation process, possible direct effects of CBZ on epididymal sperm should be considered, as this drug is highly fat-soluble. The objective of this work was to investigate a possible direct action of CBZ on qualitative parameters of the epididymal sperm, using the rat as an experimental model, in the young adult phase. Male Wistar rats were used, distributed in 2 groups: treated with CBZ (200mg / kg, via gavage), for four consecutive days, starting at 91 days, and control (n = 5) - the animals received the vehicle (olive oil), following the same experimental protocol used in the treated group. The left testicles and epididymides and the ventral prostate were removed and weighed. Spermatozoa were collected from the proximal portion of the right epididymal tail and evaluated for motility, vitality and morphology. Treatment with CBZ caused a

significant reduction in the proportion of sperm with progressive motility associated with an increase in sperm showing non-progressive motility. In addition, there was a significant increase in the percentage of dead sperm and sperm with morphological changes. The results suggest that CBZ can act directly on the epididymal sperm of young adult rats, reducing male fertility.

Keywords: Epididymis; Carbamazepine; Sperm

1 INTRODUÇÃO

A carbamazepina (CBZ) é um fármaco amplamente utilizado no controle de convulsões, no tratamento da neuralgia do trigêmeo e em desordens afetivas (Söderpalm, 2002; Bialer et al., 2012; Ullah et al., 2018). Alterações das características seminais, dos níveis de hormônios sexuais, da espermatogênese e da fertilidade masculina têm sido referidas durante e após terapia prolongada com CBZ. Embora não existam estudos evidenciando a ação deste medicamento sobre o epidídimo e o processo de maturação espermática, possíveis efeitos diretos da CBZ sobre os espermatozóides epididimários devem ser considerados, pois este fármaco é altamente lipossolúvel (Chen et al., 1992; Røste et al., 2003; Isojärvi et al., 2004).

Em trabalho realizado por nosso grupo, foi demonstrado que o tratamento crônico com CBZ, desde o desmame por até 70 dias, causa redução na concentração de espermatozóides 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 espermatozóides e do tempo de trânsito espermático através do epidídimo. Estes dados sugerem um possível efeito direto da CBZ, tanto sobre o epidídimo, como sobre o espermatozóide epididimário (Oliva & Miraglia, 2009).

A CBZ induz o estresse oxidativo resultante da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e/ou remoção insuficiente destes compostos pelo sistema de defesa antioxidante, podendo acarretar possível espermatoxicidade. Ainda, a CBZ pode causar danos mitocondriais, alterações na condutância de íons sódio e estabilização de membranas (Gierbolini et al., 2016; Aitken, 2017; Finsterer, 2017; Arhan et al., 2019).

Portanto, o conhecimento dos efeitos potencialmente tóxicos da CBZ sobre o epidídimo é um tema de extrema relevância para a compreensão dos danos observados em espermatozóides de pacientes que fazem uso desta droga, bem como do impacto destas alterações na fertilidade masculina. Desta forma, considerando que agentes tóxicos

epididimários podem afetar diretamente a maturação e sobrevivência espermática ou alterar a função epididimária, o objetivo geral deste trabalho foi investigar uma possível ação direta da CBZ sobre parâmetros qualitativos do espermatozóide epididimário, utilizando o rato como modelo experimental, na fase adulta jovem (95 dias de idade).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), e 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 tiveram livre acesso à água filtrada e à ração comercial balanceada para ratos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFESP – Protocolo no. 2660050619.

Os animais foram distribuídos em 2 grupos: 1) tratado com CBZ (n=5) - os animais receberam CBZ diluída em azeite de oliva, na dose de 200mg/kg, via gavagem, durante quatro dias consecutivos, a partir dos 91 dias; 2) controle (n=5) - os animais receberam o veículo (azeite de oliva), seguindo o mesmo protocolo experimental utilizado no grupo tratado.

Ao final do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem de Tiopental (150mg/Kg, via intraperitoneal) (Brasil, 2019). Os testículos e epidídimos esquerdos e a próstata ventral foram removidos e pesados. Espermatozóides foram coletados a partir da porção proximal da cauda epididimária direita para avaliação dos parâmetros espermáticos qualitativos. Para a avaliação da motilidade espermática, 1µL da amostra de espermatozóides foi diluída em 40µL de PBS+BSA 1%. A análise foi realizada em câmara de Neubauer e consistiu na determinação da porcentagem de espermatozóides móveis progressivos, móveis não progressivos e imóveis; foram analisados 200 espermatozóides/animal, em microscópio de luz com auxílio de objetiva de 40x (Gray et al., 1988).

Para a análise da vitalidade espermática, 1 µL da amostra espermática foi diluída em 20µl do corante eosina (Eosina Y 5%, diluída em solução fisiológica 0,9%) e foram realizados esfregaços em lâminas histológicas. Em seguida, foram analisados 200

espermatozoides por animal, em microscópio de luz, classificando-os como corados (mortos) e não corados (vivos) (Kermani-Alghoraishi et al., 2010). A partir da amostra espermática (1 μ L de amostra diluída em 40 μ L de PBS), também foram realizados esfregaços em lâminas histológicas, os quais foram corados pelo método Schorr (Shorr, 1941), utilizado na avaliação da morfologia espermática conforme descrito por Filler (1993) e Miranda-Spooner et al. (2016).

Para a comparação dos resultados entre os animais controles e tratados foi utilizado o teste t (de Student). As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

No presente estudo, o peso corporal final, bem como os pesos absolutos e relativos dos testículos e epidídimos não mostraram diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais. No entanto, ratos tratados com CBZ mostraram uma diminuição estatisticamente significativa dos pesos absoluto e relativo da próstata ventral em comparação aos do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corpóreo e pesos absolutos e relativos dos testículos epidídimos e da próstata ventral dos animais dos grupos controle (C95) e tratado com CBZ (CBZ95).

Parâmetros	Grupos	
	C95	CBZ95
Peso corporal inicial (g) – aos 91 dias	365,00 \pm 18,00	380,00 \pm 9,0
Peso corporal final (g) – aos 95 dias	367,20 \pm 23,30	379,0 \pm 23,90
Peso absoluto do testículo direito (mg)	1712 \pm 152,55	1833,33 \pm 99,73
Peso relativo do testículo direito (mg/100g)	455,10 \pm 50,10	482,10 \pm 44,61
Peso absoluto do epidídimo esquerdo (mg)	618,00 \pm 86,14	656,67 \pm 88,02
Peso relativo do epidídimo esquerdo (mg/100g)	163,04 \pm 8,67	171,64 \pm 15,27
Peso absoluto da próstata ventral (g)	460,00 \pm 88,32	328,00 \pm 50,20*
Peso relativo da próstata ventral (mg/100g)	112,00 \pm 20,49	86,00 \pm 11,40*

Valores expressos como média \pm DP; * $p \leq 0,05$. Teste T-Student; n=5.

Animais do grupo CBZ também apresentaram redução significativa na proporção de espermatozoides com motilidade progressiva (Figura 1), associada ao aumento significativo da porcentagem de espermatozoides com anormalidades morfológicas (Tabela 2). As anormalidades morfológicas dos espermatozoides observadas incluíram principalmente

cabeça isolada, cabeça sem curvatura característica, cauda dobrada e cauda enrolada (Tabela 2 e Figura 2).

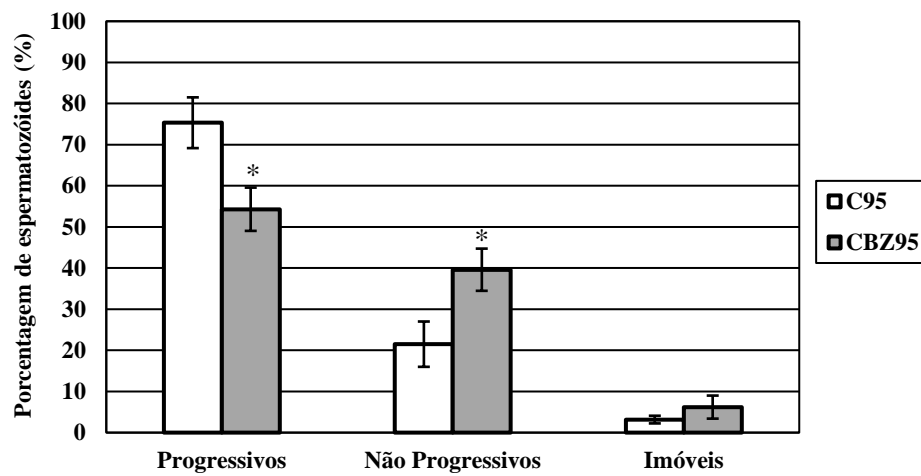


Figura 1. Motilidade espermática de animais pertencentes aos grupos controle (C95) e tratado com CBZ (CBZ95). Média \pm EPM * $p \leq 0,05$. Teste T-Student; $n=5$.

Tabela 2. Porcentagem de espermatozoides normais e anormais e tipos de anormalidades morfológicas observadas em espermatozoides dos animais controles (C95) e tratados com CBZ (CBZ95).

		Grupos	
		C95	CBZ95
Espermatozoides normais (%)		76,88	44,75*
Espermatozoides anormais (%)		23,92	55,25*
Tipos de anormalidades dos espermatozoides			
Anormalidades de cabeça	Cabeça isolada (%)	1,4 \pm 0,82	7,3 \pm 3,6*
	Cabeça sem curvatura característica (%)	1,0 \pm 0,5	7,0 \pm 2,62*
Implantação angular da peça intermediária (%)		1,2 \pm 0,8	1,75 \pm 1,5
Anormalidades de cauda	Cauda enrolada (%)	3,8 \pm 2,95	11,0 \pm 1,9*
	Cauda quebrada (%)	1,12 \pm 0,47	0,87 \pm 0,75
	Cauda dobrada (%)	14 \pm 1,0	26,33 \pm 4,53*
	Cauda isolada (%)	1,40 \pm 0,82	1,0 \pm 1,3

Valores expressos como média \pm DP; * $p \leq 0,05$. Teste T-Student; $n=5$.

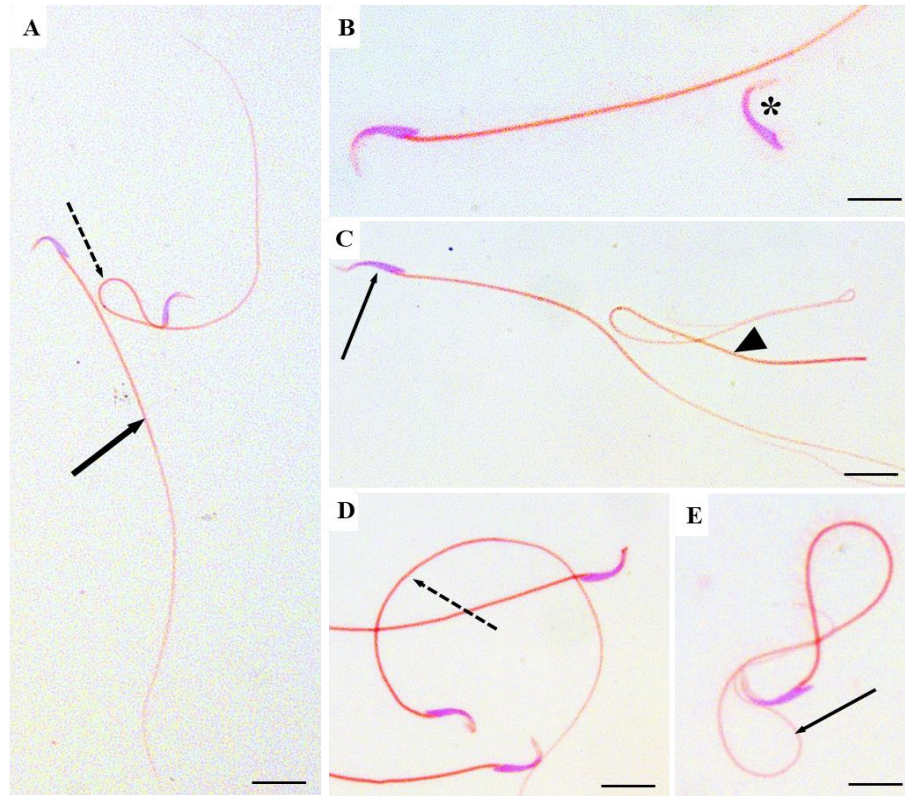


Figura 2. Fotomicrografias de espermatozoides coletados da cauda epididimária, pertencentes aos animais do grupo CBZ95. A. Observar a presença de espermatozoides com morfologia normal (seta grossa) e espermatozoides com cauda dobrada (seta tracejada). Barra: 20 μ m; B e C. Observar a presença de cabeça isolada (asterisco), espermatozoides com alteração na curvatura da cabeça (seta fina) e cauda isolada (cabeça de seta). Barras: 10 μ m. D e E. Notar espermatozoides com anormalidades de cauda, incluindo cauda dobrada (seta tracejada) e cauda enrolada (seta). Barras: 10 μ m. Coloração de Schorr.

Além disso, houve redução na proporção de espermatozoides vivos (não corados) (Figura 3).

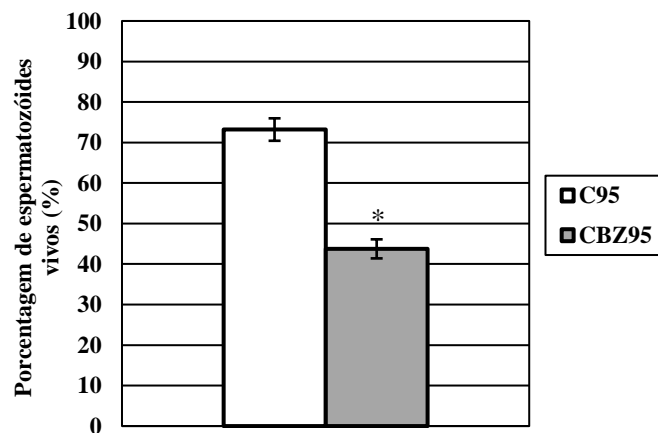


Figura 3. Porcentagem de espermatozoides vivos nos animais pertencentes aos grupos controle (C95) e tratado com CBZ (CBZ95). Média \pm EPM. * $p \leq 0,05$. Teste T-Student; $n=5$.

4 DISCUSSÃO

Alterações das características seminais e dos níveis de hormônios sexuais, da espermatogênese e da fertilidade de ratos têm sido observadas durante o tratamento com drogas anticonvulsivantes, entre elas a carbamazepina, em doses, períodos de tratamento e idades variáveis (Cohn et al., 1982; Soliman & Abla Abd, 1999; Oliva & Miraglia, 2009; Andretta et al., 2014).

Algumas drogas anticonvulsivantes, como a fenitoína, a carbamazepina e o fenobarbital, são indutoras enzimáticas, sendo capazes de reduzir os níveis de hormônios esteróides sexuais biologicamente ativos (Dana-Haeri et al., 1982; Isojärvi et al., 1990; Murialdo et al., 1994; Duncan et al., 1999; Rättya et al., 2001; Bauer, 2004; Herzog et al., 2004). Ainda, o crescimento e a atividade funcional das glândulas sexuais acessórias estão relacionados aos níveis plasmáticos de andrógenos (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Desta forma, redução nos pesos absolutos e relativos da próstata ventral após a exposição de CBZ pode ter ocorrido devido a um prejuízo na secreção e no armazenamento dos fluidos na glândula, em parte, acarretado pelas alterações nos níveis hormonais ou na resposta da próstata à estimulação androgênica, em face de um acúmulo órgão-específico desta droga.

A CBZ pode afetar a concentração, a morfologia e a motilidade espermática (Chen et al., 1992; Soliman & Abla-Abd, 1999; Røste et al., 2003; Isojärvi et al., 2004; Brezina et al., 2012). Embora alterações dos níveis de hormônios sexuais possam ter contribuído, em parte, para a ocorrência de alterações na qualidade espermática, os possíveis efeitos diretos dos medicamentos anticonvulsivantes sobre os espermatozóides devem ser considerados, pois estes fármacos são altamente lipossolúveis e, presumivelmente, atravessam a barreira hematoepididimária, atingindo as vias seminais, por um mecanismo semelhante ao transporte através da barreira hematoencefálica (Okumura et al., 1985; Chen et al., 1992; Semet et al., 2017).

A avaliação da morfologia espermática tem sido utilizada para a determinação de efeitos espermatoxícos, sendo um dos parâmetros seminais para a avaliação da fertilidade masculina. Especificamente, a frequência de anormalidades na cabeça dos espermatozóides está associada à alterações acrossômicas e da cromatina do núcleo espermático (Chemes & Rawe, 2003), enquanto que a presença de caudas enroladas ou quebradas pode prejudicar a motilidade espermática, também afetando a fertilidade masculina (Bostofte et al., 1990; Donnely et al., 1998; Lim et al., 1998).

Além disso, drogas como a CBZ, que são bloqueadoras de canais de Na⁺ voltagem-dependentes e que afetam a condutância do íon Na⁺, podem inibir parcial ou totalmente a propagação do potencial de ação, o que leva à estabilização da membrana, inibindo potencialmente a motilidade e a vitalidade espermática (White 1999; Clare et al., 2000; Hayashi et al., 2005; Gakhar et al., 2018).

A viabilidade espermática também está correlacionada com a fertilidade masculina, sendo indicadora da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides (Garner et al., 1986; Chemes & Rawe, 2003).

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a CBZ pode atuar diretamente sobre o espermatozoide epididimário de ratos adultos jovens, causando alterações espermáticas qualitativas importantes para a fertilidade masculina.

REFERÊNCIAS

- Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev.* 2017;84(10):1039-1052.
- Andretta RR, Okada FK, Paccola CC, Stumpp T, de Oliva SU, Miraglia SM. Carbamazepine-exposure during gestation and lactation affects pubertal onset and spermatoc parameters in male pubertal offspring. *Reprod Toxicol.* 2014;44:52-62.
- Arhan E, Kurt ANC, Neselioglu S, Yarel O, Uçar HK, Aydin K, Serdaroglu A. Effects of antiepileptic drugs on dynamic thiol/disulphide homeostasis in children with idiopathic epilepsy. *Seizure.* 2019;65:89-93. doi: 10.1016/j.seizure.2018.12.019.
- Bauer J, Blumenthal S, Reuber M, Stoffel-Wagner B. Epilepsy syndrome, focus location, and treatment choice affect testicular function in men with epilepsy. *Neurology* 2004;62(2):243-246.
- Bialer M. Why are antiepileptic drugs used for nonepileptic conditions? *Epilepsia.* 2012; 53(Suppl 7):26-33.
- Bostofte E, Bagger P, Michael A, Stakemann G. Fertility prognosis for infertile men: results of follow-up study of semen analysis in infertile men from two different populations evaluated by the Cox regression model. *Fertil Steril.* 1990;54(6):1100-1106.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019.

Brezina PR, Yunus FN, Zhao Y. Effects of pharmaceutical medications on male fertility. *J Reprod Infertil.* 2012;13(1):3-11.

Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: A step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update.* 2003;9:405-428.

Chen SS, Shen MR, Chen TJ, Lai SL. Effects of antiepileptic drugs on sperm motility of normal controls and epileptic patients with long-term therapy. *Epilepsia.* 1992;33(1):149-153.

Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discov Today.* 2000;5:506-520.

Cohn DF, Homonnai ZT, Paz GF. The effect of anticonvulsant drugs on the development of male rats and their fertility. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1982;45(9):844-846.

Dana-Haeri J, Oxley J, Richens A. Reduction of free testosterone by antiepileptic drugs. *Br Med J* 1982;284(6309):85-86.

Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril.* 1998 Aug;70(2):305-314.

Duncan S, Blacklaw J, Beastall GH, Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy and sexual function in men with epilepsy. *Epilepsia* 1999;40(2):197-204.

Filler R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: Chapin RE, Heindel JJ (eds). *Methods in Toxicology – Part A: Male Reproductive Toxicology.* San Diego: Academic Press. 1993. Pp. 334-343.

Finsterer J. Toxicity of Antiepileptic Drugs to Mitochondria. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;240:473-488. doi: 10.1007/164_2016_2.

Gakhar HA, Waheed I, Ahmad T, Naeem-ur-rahman. Effect of voltage-gated sodium channels blockers on motility and viability of human sperm in vitro. *Asian Pac J Reprod.* 2018; 7(2): 62-71.

- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod.* 1986;34(1):127-138.
- Gierbolini J, Giarratano M, Benbadis SR. Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy - a comparative review. *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17(7):885-888.
- Gray LE Jr, Ostby J, Sigmon R, Ferrell J, Rehnberg G, Linder R, Cooper R, Goldman J, Laskey J. The development of a protocol to assess reproductive effects of toxicants in the rat. *Reprod Toxicol.* 1988;2(3-4):281-287.
- Hayashi T, Yoshinaga A, Ohno R, Ishii N, Kamata S, Watanabe T, Yamada T. Asthenozoospermia: possible association with long-term exposure to an anti-epileptic drug of carbamazepine. *Int J Urol.* 2005 Jan;12(1):113-114.
- Herzog A.G., Drislane F.W., Schomer D.L., Pennell P.B., Bromfield E.B., Kelly K.M., Farina E.L. and Frye, C.A. Differential effects of antiepileptic drugs on sexual function and reproductive hormones in men with epilepsy: interim analysis of a comparison between lamotrigine and enzyme-inducing antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 2004;45:764-768.
- Isojärvi JI, Pakarinen AJ, Ylipalosaari PJ, Myllylä VV. Serum hormones in male epileptic patients receiving anticonvulsant medication. *Arch Neurol.* 1990;47(6):670-676.
- Isojärvi JI, Löfgren E, Juntunen KS, Pakarinen AJ, Päivänsalo M, Rautakorpi I, Tuomivaara L. Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health. *Neurology.* 2004;62(2):247-253.
- Kermani-Alghoraishi M, Mortaza Anvari M, Talebi AR, Amini-Rad O, Ghahramani R, Miresmaili SM. The effects of acrylamide on sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice. *Eur. J. Obstet. Gynecol.* 2010; 153:52-55.
- Lim CC, Lewis SE, Kennedy M, Donnelly ET, Thompson W. Human sperm morphology and in vitro fertilization: sperm tail defects are prognostic for fertilization failure. *Andrologia.* 1998;30(1):43-47.
- Mann T & Lutwak-Mann C (1981). Secretory function of the prostate, seminal vesicle, Cowper's gland and other accessory organs of reproduction. In: Mann T & Lutwak-Mann C (Editors), *Male Reproductive Function and Semen.* Springer-Verlag, New York, 171-193.
- Miranda-Spooner M, Paccola CC, Neves FM, de Oliva SU, Miraglia SM. Late reproductive analysis in rat male offspring exposed to nicotine during pregnancy and lactation. *Andrology.* 2016;4(2):218-231. doi: 10.1111/andr.12100.

Murialdo G, Galimberti CA, Fonzi S, Manni R, Costelli P, Parodi C, Torre F, Solinas GP, Polleri A, Tartara A. Sex hormones, gonadotropins and prolactin in male epileptic subjects in remission: role of the epileptic syndrome and of antiepileptic drugs. *Neuropsychobiology*. 1994;30(1):29-36.

Oliva SU, Miraglia SM. Carbamazepine damage to rat spermatogenesis in different sexual developmental phases. *Int J Androl*. 2009;32(5):563-574.

Okumura K, Lee IP, Dixon RL. Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1975;194(1):89-95.

Rättyä J, Turkka J, Pakarinen AJ, Knip M, Kotila MA, Lukkarinen O, Myllylä VV, Isojärvi JI. Reproductive effects of valproate, carbamazepine, and oxcarbazepine in men with epilepsy. *Neurology*. 2001;56(1):31-36.

Røste LS, Taubøll E, Haugen TB, Bjørnenak T, Saetre ER, Gjerstad L. Alterations in semen parameters in men with epilepsy treated with valproate or carbamazepine monotherapy. *Eur J Neurol*. 2003;10(5):501-506.

Semet M, Paci M, Saias-Magnan J, Metzler-Guillemain C, Boissier R, Lejeune H, Perrin J. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*. 2017;5(4):640-663. doi: 10.1111/andr.12366.

Shorr E. A new technic for staining vaginal smears: iii, a single differential stain. *Science*. 1941;94(2449):545-546.

Söderpalm B. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. *Eur J Pain*. 2002;6 Suppl A:3-9.

Soliman GA, Abla Abd, el-Meguid. Effects of antiepileptic drugs carbamazepine and sodium valproate on fertility of male rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1999 Mar;106(3):110-113.

Ullah S, Ali N, Khan A, Ali S, Nazish HR, Uddin Z. Epilepsy control with carbamazepine monotherapy from a genetic perspective. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2018;19(1):73.

White HS. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 1999;40 Suppl 5:S2-10.