



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

JESSICA SANTANA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E OXIDATIVA DO TESTÍCULO
DE RATOS PROVENIENTES DE FÊMEAS INDUZIDAS AO DIABETES
DO TIPO 2 E SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM METFORMINA
E PENTOXIFILINA**

Recife, 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

JESSICA SANTANA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E OXIDATIVA DO TESTÍCULO
DE RATOS PROVENIENTES DE FÊMEAS INDUZIDAS AO DIABETES
DO TIPO 2 E SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM METFORMINA
E PENTOXIFILINA**

Tese apresentada ao Programa de Ciência Animal Tropical, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Recife, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

- O48a Oliveira, Jessica Santana de.
Análise histomorfométrica e oxidativa do testículo de ratos provenientes de fêmeas induzidas ao diabetes do tipo 2 e submetidas ao tratamento com metformina e pentoxifilina / Jessica Santana de Oliveira. – Recife, 2018.
169 f.: il.
- Orientador(a): Valdemiro Amaro da Silva Junior.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências e apêndices.
1. Dieta hiperlipídica 2. Peroxidação lipídica 3. Espermatogênese
4. Células de Sertoli 5. Células de Leydig I.Silva Júnior, Valdemiro Amaro da,
Coorient. II. Título

CDD 636.089

JESSICA SANTANA DE OLIVEIRA

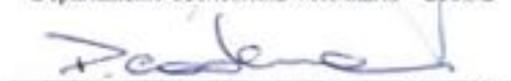
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E OXIDATIVA DO TESTÍCULO DE
RATOS PROVENIENTES DE FÊMEAS INDUZIDAS AO DIABETES DO
TIPO 2 E SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM METFORMINA E
PENTOXIFILINA

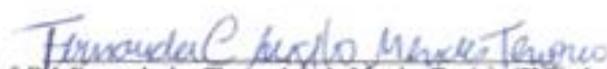
Tese apresentada ao Programa de Ciência Animal Tropical, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Aprovada em 1 / 1 /

Banca examinadora:


Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Orientador)
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

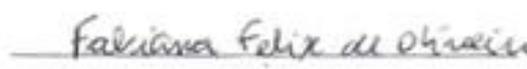

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (1º Titular)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE


Prof. Dr. Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório (2º Titular)
Centro de Ciências Biológicas - UFPE


Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório (3º Titular)
Centro de Ciências da Saúde - UFPB


Prof. Dr. Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira (4º Titular)
CAV-UFPE/UNINASSAU

Prof. Dr. Marleyne Jose Afonso Accioly Lins Amorim (Suplente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE


Prof. Dr. Fabiana Felix de Oliveira (Suplente)
IBGM

“A mind needs books as a sword needs a whetstone, if it is to keep its edge”

George R.R. Martin

Agradecimentos

Meus pais, por me educarem e estimularem a estudar sempre, me fornecendo as condições necessárias para a minha dedicação. E ao meu pai também por me acompanhar aos finais de semana à universidade para os procedimentos de gavagem.

Meu orientador, Professor Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior, pela preocupação, confiança, disponibilidade, apoio e por todo o ensinamento.

CNPq e Capes, pelo apoio financeiro, tanto com relação à execução do projeto quanto à bolsa de doutorado.

Simone e Alluanan, por compartilharem (e sofrerem) todos os momentos experimentais do diabetes e gavagem.

Aos demais amigos e companheiros de laboratório, Fabiana, Ana Katharyne, Anna Kelly e Giselle, pelo auxílio nos dias de eutanásia e processamento, além da descontração pra deixar o trabalho mais leve.

Vinícius Souza, meu namorado, por estar sempre ao meu lado me apoiando, me dando força e acreditando em mim.

Farmácia Roval, pela ajuda com as drogas utilizadas.

Renata Carneiro e Marcos André do biotério, pela ajuda com os animais e pela descontração durante o período experimental.

Fernanda Dias e Elizabeth Oliveira, pelo auxílio com as dosagens do estresse oxidativo.

Professores Ana Porto, Márcia Pereira e Rinaldo Mota, pelo auxílio com os equipamentos dos seus laboratórios.

Aos demais amigos, da universidade, do laboratório e da vida, pelo apoio e pela força de sempre.

Resumo

A associação entre gravidez e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) resulta em elevados níveis de espécies reativas de oxigênio e de fatores pró-inflamatórios na região da placenta. Tal ambiente se estende ao feto, adaptando a sua fisiologia para a sobrevivência imediata, mas programando prejuízos para a fase adulta. O sistema reprodutor masculino é altamente suscetível à programação fetal devido à importância dos períodos iniciais no desenvolvimento e maturação das células somáticas testiculares. Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar o testículo da prole de fêmeas com DM2 e avaliar os efeitos dos tratamentos com metformina e pentoxifilina na prevenção dos danos testiculares. Ratas Wistar foram induzidas ao DM2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, divididas em cinco grupos experimentais e tratadas diariamente: Grupo Controle, não induzidas ao diabetes; Grupo Hiperlipídico-Diabético, induzidas ao DM2 e sem tratamento; Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, induzidas ao DM2 e tratadas com a metformina; Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, induzidas ao DM2 e tratadas com a pentoxifilina, Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina, induzidas ao DM2 e tratadas com ambas as drogas. As fêmeas foram acasaladas e os machos das proles experimentais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia em dois períodos: fase pré-púbere e fase adulta. Os animais pré-púberes do grupo sem tratamento apresentaram um testículo com reduções no peso, no diâmetro e volume tubulares, além do aumento da densidade volumétrica da túnica basal. Nesta fase, o tratamento com a metformina não resultou em melhoras ao testículo, as quais foram melhor alcançadas através da ação pentoxifilina. No adulto, foram observadas reduções no comprimento tubular, nas células de Leydig, nas células de Sertoli e na produção espermática para os animais do GHD. Em tal idade, a metformina atuou de maneira a proteger o compartimento tubular das alterações, enquanto que a pentoxifilina apresentou melhores resultados na proteção da volumetria e da população das células intersticiais de Leydig. Dessa forma, conclui-se que a exposição ao DM2, durante as etapas iniciais de desenvolvimento testicular, resulta em danos à gônada que culminam na alteração da sua função no adulto e o tratamento combinado da metformina e pentoxifilina é de grande importância na prevenção dos danos a ambos os compartimentos testiculares e na garantia da produção espermática.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica, peroxidação lipídica, espermatogênese, células de Sertoli, células de Leydig

Abstract

The association between pregnancy and type 2 diabetes mellitus (T2D) results in high levels of reactive oxygen species and proinflammatory factors in the placenta. This environment extends to the fetus, adapting its physiology for immediate survival, but programming it to disturbances during adulthood. The male reproductive system is highly susceptible to fetal programming due to the importance of early periods in the development and maturation of testicular somatic cells. Thus, the aim of this study is to characterize the offspring's testicle from DM2 females and to evaluate the effects of metformin and pentoxifylline treatments in the prevention of testicular damage. Female Wistar rats were induced to T2D, using the hyperlipid diet-streptozotocin model, divided into five groups and treated daily: Control Group (CG), non-diabetic rats; Hyperlipid-Diabetic Group (HDG), rats induced to T2D and untreated; Hyperlipid-Diabetic-Metformin Group (HDMG), rats fed the hyperlipidic diet, induced to T2D and treated with metformin; Hyperlipidemic-Diabetic-Pentoxifylline Group (HDPG), rats fed the hyperlipidic diet, induced to T2D and treated with pentoxifylline, Hyperlipidemic-Diabetic-Metformin-Pentoxifylline Group (HDMPG), rats fed the hyperlipidic diet, induced to T2D and treated with both drugs. The females were mated and the males from the experimental offspring were submitted to euthanasia procedures in two different phases: prepuberty and adulthood. The prepubertal animals from the untreated group had reduced testicular weight, tubular diameter and volume, and increased volumetric density of the basal lamina. At this phase, metformin treatment did not improve these testicular parameters, but the treatment using pentoxifylline achieved better results. In the adult animals, tubular length, Leydig cells, Sertoli cells and sperm production reduced in HDG. At such age, metformin acted to protect the tubular compartment from the diabetes alterations, whereas pentoxifylline showed better results in protecting the volume and population of Leydig interstitial cells. Thus, it was concluded that exposure to T2D, during early stages of testicular development, results in gonadal damage that culminates in functional impairment during adulthood, and the combined treatment of metformin and pentoxifylline is of great importance in the prevention of damage to both testicular compartments and the maintenance of sperm production.

Keywords: hyperlipidic diet, lipid peroxidation, spermatogenesis, Sertoli cells, Leydig cells

Lista de figuras

- Figura 1. Estrutura molecular da insulina, mostrando as duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por duas pontes dissulfeto (A7-B7, A20-B19). A cadeia A apresenta também uma ponte dissulfeto intramolecular ligando os resíduos de aminoácidos 6 e 11. Fonte: <http://keywordsuggest.org/gallery/157047.html>.....24
- Figura 2. Estrutura secundária da insulina, mostrando a cadeia A (roxo) e a cadeia B (vermelho). Notar as duas α -hélices formadas na cadeia A e a aproximação de suas extremidades. Na cadeia B, observa-se a α -hélice central seguida de uma volta- β que causa uma dobradura em forma de “V”. Fonte: Elsayed et al. (2012).....25
- Figura 3. A- Representação do alinhamento das duas moléculas de insulina na formação do dímero. B- Interações entre as cadeias B na formação da folha- β entre os monômeros de insulina. Fonte: Weiss et al., 2014.....26
- Figura 4. Estrutura do hexâmero de insulina: os números indicam as unidades diméricas; as cadeias A e B estão em cores diferentes e identificadas na figura; no centro, observa-se um dos íons de Zn^{2+} , o outro se localizando no plano abaixo dele. Fonte: Bhatnagar et al. (2006).....26
- Figura 5. Representação das estruturas da pré-pró-insulina, da pró-insulina e da insulina, evidenciando o peptídeo sinalizador (sequência sinalizadora), localizado na extremidade N-terminal da pré-pró-insulina, o peptídeo C e as cadeias A e B. Fonte: Champe et al., 2009.....27
- Figura 6. Via de sinalização da insulina, através de sua ligação às subunidades α do receptor, levando à autofosforilação das subunidades β . Isso permite a fosforilação dos substratos sinalizadores intracelulares que contribuem para a inserção do transportador de glicose na membrana celular, via ativação de enzimas específicas. IRS-1: Substrato 1 do receptor de insulina; IRS-2: Substrato 2 do receptor de insulina; PI(3)K: Fosfatidilinositol-3-quinase; AKT: Proteína quinase B; Fonte: Fraga et al. (2012).....32
- Figura 7. Representação das moléculas da guanidina, da biguanida (formada a partir de duas moléculas de guanidina juntas, com eliminação de uma molécula de amônia) e da metformina, a dimetilbiguanida. Fonte: DeRuiter, 2003.....38
- Figura 8. Representação testicular mostrando o seu revestimento pela túnica albugínea, a sua divisão interna em lóbulos e a sua constituição de túbulos seminíferos enovelados. Observa-se também a saída das extremidades dos túbulos seminíferos, os túbulos retos, na rede testicular,

a formação dos túbulos eferentes, do epidídimo e do ducto deferente, além do suprimento vascular do testículo. Fonte: <https://web.duke.edu/anatomy/lab07/lab7.html>.....47

Figura 9. A – Representação da secção transversal testicular, mostrando a organização do parênquima, com os túbulos seminíferos e os constituintes do interstício. Fonte: Cooke, 2002. B – Fotomicrografia da secção transversal de testículo de rato, evidenciando a divisão dos compartimentos testiculares. Seta preta – núcleo da célula de Sertoli; ES – epitélio seminífero; seta branca – célula de Leydig (notar citoplasma cheio de grânulos de secreção); cabeça de seta – célula peritubular mióide; arterisco – vaso sanguíneo. Foto mostra um aumento total de 1000x. Fonte: Arquivo pessoal.....48

Figura 10. A – Arquitetura da célula de Sertoli. Notar os processos e criptas citoplasmáticas que se estendem entre as células germinativas. Fonte: França; Chiarini-Garcia (2005) B – Representação de um corte transversal de um túbulo seminífero, mostrando a distribuição de células germinativas ao longo do epitélio e a presença das junções de oclusão entre as células de Sertoli, formando a barreira hemato-testicular. Fonte: <https://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Reproductive.html>.....50

Figura 11. Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos Wistar representando os oito estágios do ciclo do epitélio seminífero seguindo o método da morfologia tubular, a qual leva em consideração o formato do núcleo das células espermatogênicas, a ocorrência de divisões meióticas e o arranjo das espermátides no epitélio germinativo. Os números nas fotos indicam os respectivos estágios. Fonte: Arquivo pessoal.....54

Figura 12. Estádios do ciclo do epitélio seminífero baseado no método do sistema acrossômico, indicados por números romanos. Uma região do túbulo que está ocupada por células formando o estágio I irá progredir para se tornar estágio II, estágio III e, assim, sucessivamente até o ciclo se repetir. As fotomicrografias mostram o ciclo do epitélio seminífero em humanos, apresentando seis estádios. A duração do ciclo no homem é de 16 dias, e a progressão de espermatogônias até espermatozoide leva 4,5 ciclos do epitélio seminífero. Fonte: Silber (1991) e Hess (1998).....55

Figura 13. Estádios do ciclo do epitélio seminífero baseado no método do sistema acrossômico, indicados por números romanos. As fotomicrografias mostram o ciclo do epitélio seminífero em ratos, apresentando 14 estádios. Uma espermatogônia A em qualquer área do epitélio seminífero progride através da meiose e da espermiogênese para se tornar um espermatozoide, e a área específica do túbulo passa por 14 estádios 4 vezes. Em cada progressão, a progênie da

espermatogônias se move progressivamente em direção ao lúmen do túbulo. Fonte: Hess (1998).....56

Figura 14. A - Representação dos túbulos seminíferos, mostrando a distribuição dos estádios ao longo do seu comprimento. A.1 – Túbulo seminífero de rato, mostrando distribuição segmentada dos estádios, com apenas um estágio por secção transversal. A.2 – Túbulo seminífero de humano, mostrando a distribuição em espiral, com mais de um estágio por secção transversal de túbulo seminífero. Fonte: Silber, 2010. B – Fotomicrografia da secção transversal do túbulo seminífero de rato, mostrando um túbulo no estágio XI, baseado no método do sistema Fonte:
acrossômico. https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/male_reproductive/testis/setubreten/index.htm. C -
Fotomicrografias da secção transversal dos túbulos seminíferos de humano, mostrando a presença de diferentes estádios. C.1 – Túbulo com estádios IV, V e VI, baseado no método do sistema acrossômico. C.2 – Túbulo com estádios I, II e III, baseado no método do sistema acrossômico. Fonte: Zhang et al., 2004.....57

Figura 15. Passos do processo de peroxidação lipídica. Fonte: Mimica-Dukić et al. (2012) modificado.....71

Figura 16. Representação da molécula de pentoxifilina. Fonte: <https://pharmaffiliates.com/pentoxifylline/3138/pentoxifylline-api-impurity>.....75

Figura 17. Representação do design experimental aplicado aos cinco grupos de fêmeas de ratos Wistar. As fêmeas iniciaram a ingestão das dietas aos 30 dias de vida, a qual continuou durante todo o período experimental de tais animais. Aos 60 dias, os grupos receberam uma injeção intraperitoneal contendo tampão citrato (0,1 M; pH 4,5) (Grupo Controle) ou 35 mg/kg de estreptozotocina em tampão citrato (demais grupos experimentais, como parte da indução do diabetes mellitus do tipo 2). 15 dias após tal aplicação, ocorreu a confirmação do diabetes e o início do tratamento com as respectivas drogas (metformina – 500 mg/kg; pentoxifilina – 100 mg/kg). Aos 90 dias de idades, as fêmeas foram acasaladas, e o fornecimento das dietas e o tratamento com as drogas continuaram durante prenhez e lactação, até o desmame, 21 dias após o nascimento das proles experimentais.....78

Figura 18. Concentração de glicose sanguínea de jejum (mg/dl) de fêmeas induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, medidas imediatamente antes e 2 h depois da aplicação do tratamento específico de cada grupo. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina,

GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Asteriscos indicam diferença estatística dentro de um mesmo grupo (antes e 2 h depois), letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos, ambos para $p < 0,005$85

Figura 19. Valores de peso corporal no dia do nascimento de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....86

Figura 20. Valores de peso corporal (A), peso testicular (B), índice gonadossomático (IGS) (C) e glicemia de jejum (D) aos 21 dias de idade de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....87

Figura 21. Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos aos 21 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. A e B – Grupo Controle, C e D – Grupo Hiperlipídico-Diabético, E e F – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina; G e H – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, I e J – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Observa-se uma maior quantidade de alterações histopatológicas nos grupos provenientes de fêmeas diabéticas, principalmente para os animais sem tratamentos. As alterações são indicadas por: cabeças de setas brancas – degeneração celular; cabeças de setas pretas – vacuolização do citoplasma das células de Sertoli; seta branca – espessamento da túnica própria. Na foto B, a letra T indica o compartimento tubular e o I aponta o compartimento intertubular.....88

Figura 22. Proporção (%) das regiões de túbulo (A), túnica própria (B) e intertúbulo (C) no parênquima testicular de ratos aos 21 dias de idade induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético,

GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....90

Figura 23. Valores morfométricos dos compartimentos tubular e intertubular (A-D) e população de células de Sertoli (E) por testículo de ratos aos 21 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....91

Figura 24. Valores glicemia de jejum ao longo do experimento (de 30 a 90 dias de vida) de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....93

Figura 25. Valores de peso testicular (A) e índice gonadossomático (IGS) (B) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....93

Figura 26. Valores morfométricos dos túbulos seminíferos (diâmetro tubular - A, altura do epitélio seminífero - B, diâmetro do lúmen -C, volume tubular - D e comprimento total dos túbulos seminíferos- E) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....95

Figura 27. Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. A e B – Grupo Controle, C e D – Grupo Hiperlipídico-Diabético, E e F – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina; G e H – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, I e J – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Na foto A, as letras I e EG indicam intertúbulo e epitélio germinativo, respectivamente. Nas fotos B e D, as letras representam as células formadoras do epitélio germinativo: Epg – espermatogônias; CS – célula de Sertoli; Pré-Lep – espermatócito I em pré-leptóteno/leptóteno; Paq – espermatócito I em paquíteno; Ar – espermátide arredondada; Al – espermátide alongada. Podem ser observadas alterações ao parênquima testicular, como descamações no epitélio germinativo (setas pretas), vacúolos nas células de Sertoli (cabeças de setas brancas) e degenerações de células germinativas (setas brancas).....98

Figura 28. Valores de volumetria das células de Leydig (nuclear - A, citoplasmática - B e celular - C) e do número de células de Leydig por grama de testículo (D) e por testículo (E) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....100

Figura 29. Concentração de malondialdeído (MDA) (A) e atividade das enzimas anti-oxidantes superóxido dismutase (SOD) (B), glutationa-S-transferase (GST) (C) e catalase (CAT) (D) no testículo de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras ausentes representam ausência de diferença estatística ($p > 0,005$).....101

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição das dietas utilizadas durante o período experimental (FRANCO et al., 2009).....	77
Tabela 2. Valores de peso corporal (g) dos 30 dias até os 90 dias de idade de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação.....	92
Tabela 3. Densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular (%) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação.....	96
Tabela 4. População de células de Sertoli por testículo, número de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero, produção espermática diária (PED) por testículo e produção espermática diária por grama (g) de testículo de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação.....	97

Lista de abreviações

5 α -DHT - 5 α -dihidrotestosterona

ABP - Proteína ligadora de andrógeno

ADA – Associação Americana de Diabetes

AGE - Produtos finais de glicosilação avançada

ALX – Aloxana

AMPc - Adenosina monofosfato cíclica

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

CaMKK β - Proteína quinase dependente *de* Ca(+2)-calmodulina

CAT - Catalase

DM – Diabetes mellitus

DM1 – Diabetes mellitus do tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus do tipo 2

dpc - Dias pós-concepção

EASD - Associação Europeia para Estudo do Diabetes

GHS – Glutathiona reduzida

GLUT – Transportador de Glicose

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

GPx - Glutathiona peroxidase

GSSG - Glutathiona dissulfeto

GST - Glutathiona S-transferase

IMC - Índice de massa corporal

IMC – Índice de massa corporal

iNOS - Óxido nítrico sintetase induzida

IRS - Proteínas substratos do receptor de insulina

LKB1- Quinase do fígado B1

MDA – Malondialdeído

NA – Nicotinamida

OCT1 - Transportador de cátion orgânico 1

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGC1- α - Coativador α do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOCS - Sinalizador do supressor de citocina

SOD - Superóxido dismutase

STK11 - Serina/treonina quinase 11

STZ – Estreptozotocina

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

UCP2 - Proteína desacopladora 2

UKPDS - Estudo Prospectivo de Diabetes do Reino Unido

Sumário

1. Introdução.....	20
2. Objetivos.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específico.....	22
3. Fundamentação Teórica.....	23
3.1. Diabetes mellitus.....	23
3.1.1. Insulina.....	24
3.1.1.1. Estrutura da insulina.....	24
3.1.1.2. Biossíntese de insulina.....	27
3.1.1.3. Regulação da secreção de insulina.....	28
3.1.1.4. Mecanismo de ação da insulina.....	31
3.1.2. Diabetes do tipo 2.....	32
3.1.2.1. Resistência à insulina.....	33
3.1.2.2. Causas da resistência à insulina na obesidade e no diabetes.....	35
3.1.2.3. Prevenção e tratamento.....	36
3.1.3. Metformina.....	38
3.1.3.1. Mecanismo de ação.....	38
3.1.3.2. Outras atuações.....	40
3.1.4. Métodos de indução do diabetes.....	40
3.1.4.1. Método cirúrgico.....	41
3.1.4.2. Modelos genéticos.....	41
3.1.4.3. Métodos químicos.....	41
3.1.4.3.1. Estreptozotocina (STZ) e mecanismo de ação.....	42
3.1.4.3.2. Aloxana e mecanismo de ação.....	43
3.1.4.4. Indução do diabetes mellitus do tipo 2.....	44
3.1.4.4.1. Modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina.....	44
3.1.4.4.2. Modelo de nicotinamida-estreptozotocina.....	45
3.1.4.4.3. Modelo de frutose-estreptozotocina.....	45
3.2. Espermatogênese.....	46
3.2.1. Testículo e organização testicular.....	46
3.2.1.1. Epitélio seminífero.....	49
3.2.1.1.1. Células de Sertoli.....	49

3.2.1.1.2. Células germinativas e espermatogênese.....	51
3.2.1.2. Ciclo do epitélio seminífero.....	53
3.2.1.3. Células de Leydig.....	58
3.2.2. Regulação hormonal da espermatogênese.....	59
3.2.3. Desenvolvimento testicular.....	60
3.2.3.1. Origem e diferenciação das células de Sertoli.....	61
3.2.3.2. Origem e desenvolvimento das células de Leydig.....	62
3.2.3.3. Células de Leydig adultas.....	64
3.3. Estresse oxidativo.....	66
3.3.1. Espécies reativas de oxigênio.....	67
3.3.2. Defesas antioxidantes.....	68
3.3.3. Efeitos do estresse oxidativo.....	69
3.3.3.1. No DNA.....	69
3.3.3.2. Nas proteínas.....	69
3.3.3.3. Na transdução de sinais.....	70
3.3.3.4. Nos lipídios da membrana.....	70
3.3.4. Estresse oxidativo no testículo.....	72
3.3.5. Estresse oxidativo e diabetes.....	73
3.4. Pentoxifilina.....	75
3.4.1. Atuação na reprodução.....	76
4. Material e métodos.....	77
4.1. Grupos experimentais.....	77
4.2. Procedimentos de eutanásia e coleta de órgãos.....	79
4.3. Mensuração da glicemia de jejum.....	80
4.4. Cálculo do índice gonadossomático (IGS)	80
4.5. Processamento histológico do testículo.....	80
4.6. Morfometria testicular aos 21 dias.....	81
4.7. Morfometria testicular aos 90 dias.....	82
4.8. Análises histopatológicas.....	83
4.9. Análises de estresse oxidativo.....	83
4.10. Análise estatística.....	84
5. Resultados.....	85
5.1. Glicemias de jejum das fêmeas.....	85
5.2. Animais pré-púberes.....	86

5.2.1. Pesos e glicemia.....	86
5.2.2. Histomorfometria testicular.....	87
5.3. Animais adultos.....	92
5.3.1. Pesos e glicemia.....	92
5.3.2. Histomorfometria testicular.....	94
5.3.3. Homeostase redox testicular.....	101
6. Discussão.....	102
6.1. Glicemias materna e da prole e peso de nascimento.....	102
6.2. Pesos corporais ao longo do experimento.....	103
6.3. Testículos pré-púberes.....	104
6.4. Testículos adultos.....	106
7. Conclusão.....	111
8. Referências.....	112
9. Apêndices.....	129
9.1. Autorização do Comitê de Ética do Uso de Animais de Experimentação (CEUA-UFRPE).....	129
9.2. Artigo científico em análise para publicação no Indian Journal of Experimental Biology.....	130
9.3. Artigo científico publicado em periódico.....	158

1. Introdução

O diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), conhecido como o tipo não insulino dependente, é a forma mais comum do diabetes, acometendo cerca de 90-95% dos pacientes (CHAMPE et al., 2009; ADA, 2016a). Seu desenvolvimento está diretamente relacionado ao estilo de vida moderno, onde há a abundante disponibilidade de nutrientes e reduzidas atividades físicas, o que contribui para o armazenamento do excesso de energia em forma de gordura e para o surgimento do sobrepeso e da obesidade (OMS, 2016; PRENTKI; NOLAN, 2006).

Devido à crescente epidemia mundial de obesidade, a idade para o surgimento do DM2 diminuiu, atingindo, então, mulheres em idade fértil. Em várias partes do mundo, a frequência de grávidas com diabetes do tipo 2 é maior do que com o tipo 1, além de estudos indicarem que os resultados da gravidez com DM2 podem ser tão prejudiciais quanto ou mais prejudiciais do que o DM1 (CHAUDRY et al., 2007; CUNDY et al., 2007).

A gravidez é caracterizada por grandes demandas energética e de oxigênio. A placenta é rica em mitocôndrias e altamente vascularizada, apresentando altas taxas metabólicas, o que resulta em uma elevada produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHEN; SCHOLL, 2005). Em condições fisiológicas normais, a atuação eficiente dos antioxidantes mantém as ROS em níveis apropriados. Contudo, quando a gravidez está associada ao diabetes, no qual a alta produção das ROS é a principal causa das complicações, o desequilíbrio oxidante/antioxidante leva ao estresse oxidativo (WU et al., 2016). Este se estende à placenta e, juntamente com a alta produção das ROS, ocorre a migração de células inflamatórias, como monócitos e macrófagos, e a produção de fatores pró-inflamatórios (WU et al., 2016). Além disso, a presença da obesidade, que é uma doença de inflamação crônica de baixo grau, contribui para exacerbar ainda mais esse quadro (CHALLIER et al., 2008; WU et al., 2016). Esta alta concentração de oxidantes e pró-inflamatórios na região da placenta implica na conjunta exposição deste ambiente ao feto, o qual irá se desenvolver sob tais circunstâncias (THOMPSON; AL-HASAN, 2012).

Durante a vida embrionária e fetal, a exposição a distúrbios alimentares, contaminantes ambientais, alterações endócrinas e estresse pode adaptar o desenvolvimento fisiológico de maneira a maximizar as suas chances imediatas de sobrevivência (GODFREY e BARKER, 2001; ROSEBOOM et al., 2001; VICKERS et al., 2007). Contudo, essa situação pode criar uma espécie de “programação fetal” ou “memória metabólica”, de maneira que as alterações

resultem em prejuízos morfológicos e funcionais expressos durante a fase adulta (YESSOUFOU; MOUTAIROU, 2011).

O sistema reprodutor do macho é altamente suscetível a uma programação devido à importância dos períodos fetal e neonatal para o desenvolvimento e maturação da gônada e, conseqüentemente, o estabelecimento da produção espermática do adulto (ORTH, 1993; SILVA JUNIOR et al., 2006; RODRÍGUEZ-GONZÁLES et al., 2012). Em ratos, o desenvolvimento testicular se inicia entre os dias 13,5 e 14,5 pós-concepção, as células de Sertoli proliferam durante os períodos fetal e neonatal, até aproximadamente o 21º dia de idade e as células de Leydig adultas se diferenciam durante a segunda semana de vida (ORTH, 1982; ARIYARATNE et al., 2000; NEF e PARADA, 2000; SHARPE et al., 2003; DELBÈS et al., 2007; CHEN et al., 2009). Assim, é necessária uma intervenção terapêutica de maneira a controlar os níveis oxidativos e inflamatórios dos tecidos testiculares durante os períodos críticos, evitando a alteração do desenvolvimento e o risco à atividade reprodutora durante a fase adulta.

A metformina é um hipoglicemiante utilizado clinicamente há mais de 50 anos no tratamento do DM2 (ALVES et al., 2014; FANTUS, 2015). Estudos mostram que a metformina é capaz de melhorar a atividade reprodutora masculina de pacientes com obesidade e resistência à insulina, através do aumento dos níveis de testosterona, da inibição da apoptose de células germinativas, da estimulação da atividade antioxidante testicular e da melhora da qualidade do esperma (ALVES et al., 2014; YAN et al., 2015).

Por outro lado, alguns fármacos são conhecidos pela sua atuação sobre o sistema imune, inibindo vários mecanismos inflamatórios, e pelo seu papel antioxidante, como é o caso da pentoxifilina. No sistema reprodutor do macho, ela pode ser empregada para proteger o parênquima testicular de agressões provenientes de distúrbios vasculares, inflamatórios, térmicos e inespecíficos (RAMANI et al., 1994; SAMLASKA e WINFIELD, 1994; RADFAR et al., 2005; QUEIROZ et al., 2013). Dessa forma, a atuação combinada de tais fármacos poderia ser capaz de atenuar os efeitos patológicos do DM2 durante o desenvolvimento testicular e, assim, garantir uma melhor atividade reprodutora no adulto.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar histomorfometricamente e oxidativamente o testículo de ratos Wistar pré-púberes e adultos, cujas mães foram pré-induzidas ao diabetes do tipo 2, e avaliar os efeitos dos tratamentos com a metformina e a pentoxifilina, nas concentrações de 500 mg/kg e 100 mg/kg respectivamente, na prevenção dos danos na reprodução do macho.

2.2. Objetivos específicos

- Acompanhar o desenvolvimento ponderal e as concentrações de glicose sanguínea dos animais ao longo do experimento.
- Avaliar a eficiência dos tratamentos com a metformina e pentoxifilina através da análise histopatológica dos testículos em duas fases da vida: fase pré-púbere e fase adulta.
- Realizar a análise morfométrica dos parâmetros tubulares, das células germinativas e das células somáticas testiculares em ambas as idades.
- Analisar a atividade testicular do adulto através da determinação da produção espermática.
- Avaliar a homeostase redox através dos níveis de peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes.

3. Fundamentação Teórica

3.1. Diabetes mellitus

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na utilização da insulina pelos tecidos ou de ambos. A persistência dos altos níveis de glicose sanguínea compromete a homeostase corporal e provoca danos a longo-prazo, afetando principalmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2014; VAN BELLE et al., 2011). Esse conjunto de enfermidades representa um considerável encargo econômico para o indivíduo e para a sociedade, especialmente quando mal controlada, sendo a maior parte dos custos diretos de seu tratamento relacionada às suas complicações, que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos (MCLELLAN et al., 2007).

De acordo com a OMS (2017), no mundo todo, estima-se que 422 milhões de adultos possuíam diabetes em 2014, comparado a 108 milhões em 1980. A prevalência global quase dobrou desde 1980, aumentando de 4,7% para 8,5% na população de adultos, o que reflete um aumento nos fatores de risco associados. Além disso, o diabetes causou 1,6 milhões de mortes em 2015, enquanto que níveis de glicose sanguíneas acima do normal acarretaram na morte de mais 2,2 milhões de pessoas, quase metade antes dos 70 anos, devido ao aumento dos riscos para doenças cardiovasculares e de outros tipos. A entidade prevê que até 2030, o diabetes será a sétima maior causa de morte em todo o mundo.

A Associação Americana de Diabetes (ADA) classifica o Diabetes Mellitus em quatro tipos: tipo 1, ou insulino dependente; tipo 2, ou não insulino dependente; gestacional; e secundário a outras patologias (FRAGA et al., 2012; ADA 2016). No DM1, geralmente mediada por processos autoimunes, a destruição das células β pancreáticas leva à deficiência absoluta de insulina. O DM2 está associado à resistência à insulina e à progressiva diminuição de sua secreção, estando frequentemente relacionado a outros problemas da chamada síndrome metabólica. O diabetes gestacional está relacionado a problemas de tolerância à glicose que surgem ou são primeiramente detectados durante a gravidez. Os casos específicos de diabetes devido a outras causas podem surgir, por exemplo, a partir de doenças do pâncreas exócrino (pancreatite, fibrose cística), de formas monogênicas do diabetes (MODY), de endocrinopatias (síndrome de Cushing, acromegalia) ou induzido por drogas (glicocorticoides, neurolépticos, pentamidina) (KERNER e BRÜCKEL, 2014; ADA, 2016a).

3.1.1. Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas (ilhotas de Langerhans), que compreendem aglomerados de células dispersas no tecido acinar. No pâncreas adulto normal, as ilhotas constituem somente 1 a 2% da massa pancreática, com cerca de 1 milhão de ilhotas distribuídas irregularmente pelo parênquima exócrino, mais densamente na região da cauda (CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A insulina desempenha um papel central na regulação do metabolismo humano, sendo de extrema importância na coordenação da utilização de combustíveis pelos tecidos (CHAMPE et al., 2009; WEISS et al., 2014). Seus efeitos metabólicos são anabólicos, favorecendo, por exemplo, a síntese do glicogênio, dos triacilgliceróis e das proteínas (CHAMPE et al., 2009).

3.1.1.1. Estrutura da insulina

A insulina é formada por 51 aminoácidos arranjados em duas cadeias de polipeptídeos, denominadas A (com 21 resíduos de aminoácidos) e B (com 30 resíduos de aminoácidos), que estão conectadas por duas pontes dissulfeto (A7-B7, A20-B19) (JOSHI et al., 2007; CHAMPE et al., 2009; FU et al., 2013; MONTENEGRO JR et al., 2016) (Figura 1). Além dessas, uma ligação dissulfeto intramolecular está presente entre os resíduos de aminoácidos 6 e 11 da cadeia A (JOSHI et al., 2007; CHAMPE et al., 2009). A insulina apresenta peso molecular de aproximadamente 5800 daltons (MONTENEGRO JR et al., 2016).

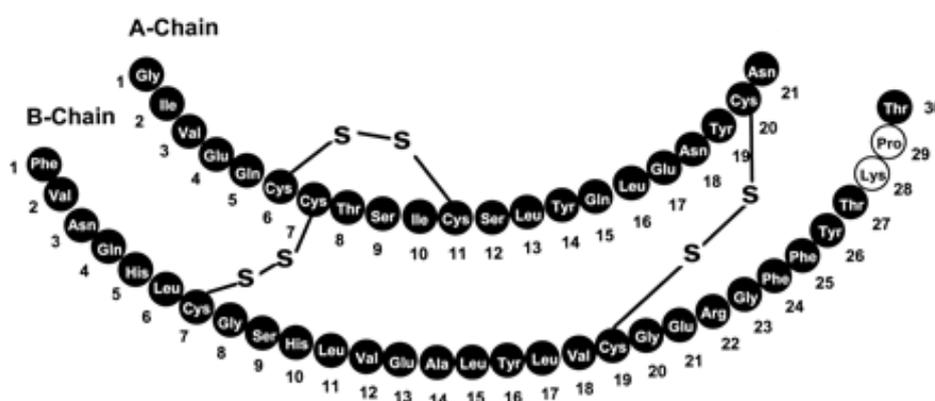


Figura 1. Estrutura molecular da insulina, mostrando as duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por duas pontes dissulfeto (A7-B7, A20-B19). A cadeia A apresenta também uma ponte dissulfeto intramolecular ligando os resíduos de aminoácidos 6 e 11. Fonte: <http://keywordsuggest.org/gallery/157047.html>.

A estrutura secundária da cadeia A é constituída por duas α -hélices antiparalelas, formadas entre os resíduos A2-A8 e A13-A19, que são conectadas pelos resíduos de

aminoácidos A9 ao A12. Essa conformação faz com que as duas extremidades da cadeia (N-terminal e C-terminal) se aproximem (Figura 2) (FU et al., 2013; WEISS et al., 2014). Na cadeia B, o segmento N-terminal (resíduos B1-B6) é seguido por uma volta- β (B7-B10), uma α -hélice central (B9-B19), uma volta- β (B20-B23), a qual faz com que a cadeia se dobre em forma de “V”, e uma cadeia β C-terminal estendida (B24-B30) (WEISS, 2009; FU et al., 2013) (Figura 2). A estrutura secundária das cadeias A e B é surpreendentemente complexa para peptídeos tão pequenos, e suas intrincadas interações laterais determinam a afinidade do receptor de insulina (FU et al., 2013).

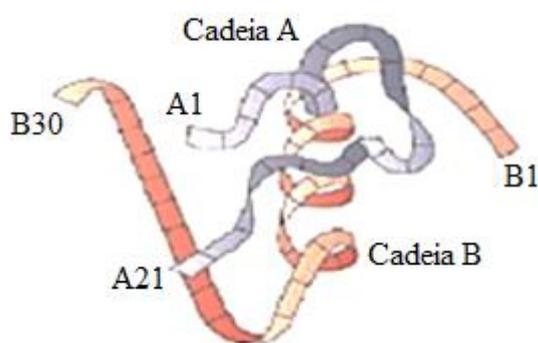


Figura 2. Estrutura secundária da insulina, mostrando a cadeia A (roxo) e a cadeia B (vermelho). Notar as duas α -hélices formadas na cadeia A e a aproximação de suas extremidades. Na cadeia B, observa-se a α -hélice central seguida de uma volta- β que causa uma dobradura em forma de “V”. Fonte: Elsayed et al. (2012).

A estrutura terciária do monômero de insulina é altamente organizada e estabilizada por interações entre as cadeias laterais de aminoácidos específicos (FU et al., 2013). Tais interações formam um centro hidrofóbico na estrutura monomérica da proteína. Além disso, elas ajudam a compor a superfície da molécula, a qual está parcialmente exposta ao solvente e está envolvida na estabilização do dímero e hexâmetro (WEISS et al., 2014). Os aminoácidos PheB24, ValB12, e LeuB15 interagem para estabilizar a volta- β na cadeia B (B20-B23), permitindo que os resíduos de B23-B30 se dobrem sobre a hélice central e o núcleo hidrofóbico (FU et al., 2013; WEISS et al., 2014).

Em concentrações micromolares, os monômeros de insulina formam dímeros (FU et al., 2013). As duas moléculas de insulina interagem de maneira que as regiões COOH-terminal de cada cadeia B se aproximam para formar uma folha- β antiparalela, que é mantida por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (WEISS et al., 2014) (Figura 3). Tais folhas- β ficam expostas na superfície da estrutura dimérica, enquanto que o interior é formado pelos resíduos apolares do núcleo hidrofóbico.

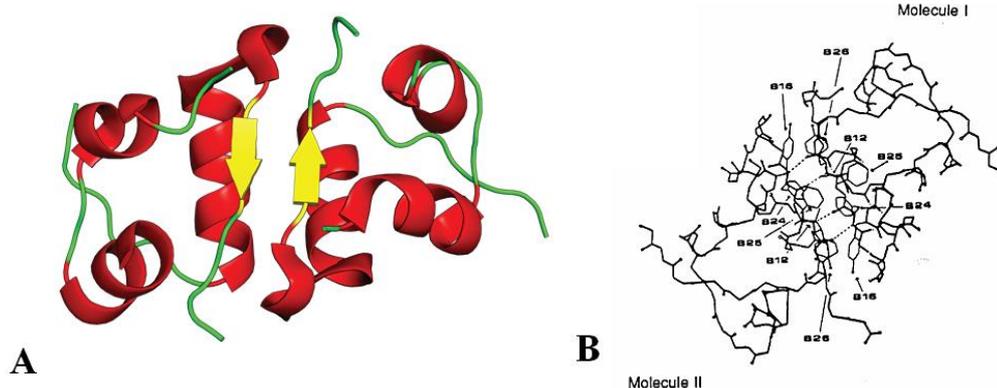


Figura 3. A- Representação do alinhamento das duas moléculas de insulina na formação do dímero. B- Interações entre as cadeias B na formação da folha- β entre os monômeros de insulina. Fonte: Weiss et al., 2014.

A insulina armazenada nas células β é acondicionada em “grânulos” densamente agrupados que consistem em cristais insolúveis de insulina hexamérica, a qual é formada por 6 moléculas organizadas em 3 dímeros, juntamente com dois Zn^{2+} (Figura 4) (FU et al., 2013). Entretanto, as interações entre os dímeros do hexâmetro são mais fracas do que as interações entre os monômeros no dímero, sendo então, menos estável e mais suscetível à dissociação quando as concentrações de insulina flutuam (FU et al., 2013; WEISS et al., 2014).

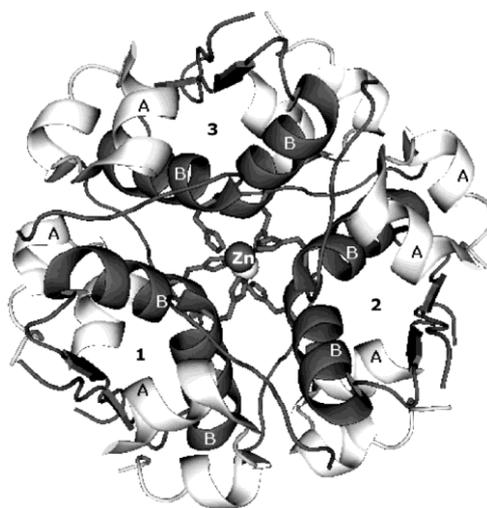


Figura 4. Estrutura do hexâmetro de insulina: os números indicam as unidades díméricas; as cadeias A e B estão em cores diferentes e identificadas na figura; no centro, observa-se um dos íons de Zn^{2+} , o outro se localizando no plano abaixo dele. Fonte: Bhatnagar et al. (2006).

3.1.1.2. Biossíntese de insulina

Apesar de a insulina secretada possuir 51 aminoácidos, o gene da insulina codifica um precursor de 110 aminoácidos, conhecido como pré-pró-insulina (FU et al., 2013). A pré-pró-insulina é uma molécula de alto peso molecular, aproximadamente 12 kda constituída por quatro domínios diferentes: peptídeo C, cadeias A e B (insulina) e um peptídeo sinalizador N-terminal (Figura 5) (FU et al., 2013; WEISS et al., 2014; MONTENEGRO JR et al., 2016). Este peptídeo sinalizador, formado por 24 aminoácidos, interage com ribonucleoproteínas citosólicas, as partículas de reconhecimento de sinal (SRP), que facilitam a passagem da pré-pró-insulina pela membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) em direção ao lúmen (FU et al., 2013; WEISS et al., 2014). No RER, a pré-pró-insulina sofre clivagem do seu peptídeo sinalizador, através de enzimas proteolíticas, e origina a pró-insulina (JOSHI et al., 2007; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A pró-insulina é formada por duas cadeias, A-carboxiterminal e B-aminoterminal, unidas pelo peptídeo C (Figura 5), cuja principal função é o alinhamento das pontes dissulfeto que ligam as duas cadeias, permitindo o dobramento adequado da molécula e, conseqüentemente, sua clivagem. (MONTENEGRO JR et al., 2016). Subseqüente à maturação da estrutura tridimensional, a pró-insulina é transportada por microvesículas até o complexo de Golgi (CG), num processo ATP-dependente (JOSHI et al., 2007; FU et al., 2013; MONTENEGRO JR et al., 2016). Durante o trajeto pelo CG até a formação dos grânulos de secreção, a pró-insulina é convertida em insulina através da clivagem do peptídeo C, através da ação de endopeptidases específicas (pró-convertases 2 e 3) e uma exopeptidase (carboxipeptidase H) (JOSHI et al., 2007; MONTENEGRO JR et al., 2016).

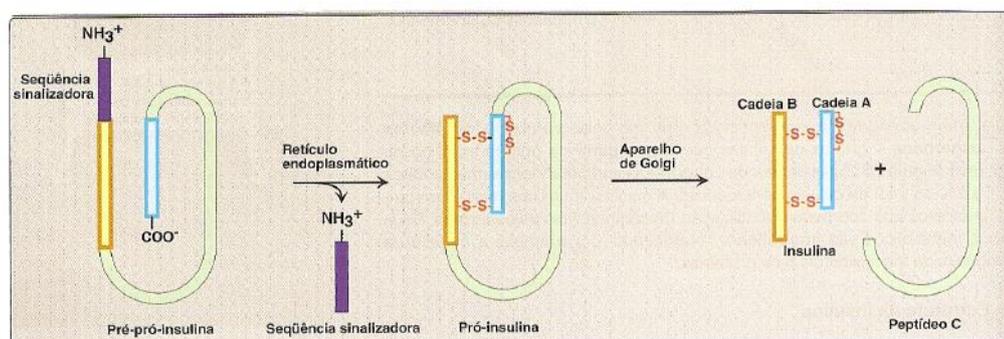


Figura 5. Representação das estruturas da pré-pró-insulina, da pró-insulina e da insulina, evidenciando o peptídeo sinalizador (sequência sinalizadora), localizado na extremidade N-terminal da pré-pró-insulina, o peptídeo C e as cadeias A e B. Fonte: Champe et al., 2009.

Uma vez separados, a insulina e o peptídeo C são acondicionados em grânulos secretores (MONTENEGRO JR et al., 2016). Os monômeros de insulina se agregam, na presença de Zn e pH ácido, para formar hexâmetros (JOSHI et al., 2007; MONTENEGRO JR et al., 2016). A insulina permanece estocada no citosol que, com o estímulo apropriado, é liberada por exocitose (CHAMPE et al., 2009).

3.1.1.3. Regulação da secreção de insulina

A principal função da célula β é produzir, estocar e secretar insulina. Sob condições normais, tais células estão em constante reposição do estoque, de modo que, em situações agudas, haja disponibilidade imediata do hormônio. Além disso, a célula β é capaz de modular a sua síntese e secreção de acordo com a demanda metabólica (MONTENEGRO JR et al., 2016). Em pacientes saudáveis, a secreção da insulina e glucagon é precisamente exata para atender tal demanda, de maneira que a velocidade de produção da glicose hepática é mantida igual à velocidade de utilização da glicose pelos tecidos periféricos (CHAMPE et al., 2009; FU et al., 2013).

Para ser sensível ao estado nutricional e exercer esse papel coordenador, as células β são agrupadas em ilhotas que se conectam estrategicamente à vasculatura. As ilhotas formam uma densa rede com pequenos vasos sanguíneos e recebem 10 vezes mais sangue do que as células exócrinas nas regiões circundantes. Os capilares que cercam as ilhotas mostram um número notável de pequenos poros, chamados fenestras, que permitem uma maior troca de nutrientes entre a circulação e os tecidos circundantes. Essa estrutura aumenta a permeabilidade, permitindo acesso amplo aos nutrientes para que as células β possam sentir o estado nutricional rapidamente. As fenestrações também permitem a rápida difusão de insulina no sangue (FU et al., 2013).

A célula β apresenta sensibilidade a uma variedade de estímulos, com a síntese e a secreção de insulina sendo aumentada principalmente por glicose, aminoácidos, ácidos graxos e hormônios gastrointestinais (CHAMPE et al., 2009; FU et al., 2013; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A glicose é o principal regulador da secreção da insulina e, em roedores e humanos, a amplitude dessa secreção é muito maior comparada ao estímulo por aminoácidos e ácidos graxos. Na célula β , a glicose atravessa a membrana plasmática por difusão facilitada através do transportador GLUT-2. Este transportador também é expresso nas células do fígado, e, em

menor extensão, nas células renais e intestinais absorptivas. Ao contrário do GLUT4, expresso no músculo e nas células adiposas, a mobilização do GLUT2 pela membrana plasmática é insulino-independente e apresenta baixa afinidade pelo substrato, garantindo um alto influxo de glicose (FU et al., 2013; MONTENEGRO JR et al., 2016).

Uma vez dentro da célula β , a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato através da ação da enzima glucoquinase (JOSHI et al., 2007; FU et al., 2013; MONTENEGRO JR et al., 2016). Essa enzima pertence à família das hexoquinases e é expressa em apenas quatro tipos de células nos mamíferos: células hepáticas, células β , enterócitos e neurônios sensíveis à glicose (FU et al., 2013; MONTENEGRO JR et al., 2016). Duas importantes propriedades possibilitam que a glucoquinase funcione como um sensor de glicose nas células β , distinguindo-a das demais hexoquinases. A primeira é a sua baixa afinidade por glicose, e a segunda é a ausência de inibição pelo seu produto, o que permite a sua atividade contínua, apesar de uma alta carga, e faz com sua ação seja um fator limitante no metabolismo da glicose na célula β (FU et al., 2013). Mutações no gene que codifica a glucoquinase resultam em isoformas hipoativas, levando a um tipo de diabetes monogênico conhecido como MODY-2 (maturity-onset diabetes of the young type 2) (MONTENEGRO JR et al., 2016).

Em um estado onde a concentração de glicose sanguínea não causa a estimulação das células β , a entrada de K^+ pelos canais K^+ ATP-dependentes abertos mantém a membrana da célula com um potencial negativo (em torno de -70 mV), que faz com que os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem permaneçam fechados (JOSHI et al., 2007). Quando os níveis de glicose aumentam, a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato nas células β leva à geração de acetil-coenzima A e ATP no ciclo de Krebs, o que causa o fechamento dos canais de K^+ ATP-dependentes e a redução do efluxo de K^+ (MONTENEGRO JR et al., 2016).

O acúmulo de cargas positivas dentro da célula (K^+ e Na^+) provoca a despolarização da membrana. Quando o potencial atinge em torno de -20 mV, ocorre a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, aumento do influxo e mobilização das reservas intracelulares deste cátion. A elevação na concentração intracelular de cálcio desencadeia a exocitose dos grânulos de insulina (JOSHI et al., 2007; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A ingestão de proteínas causa um aumento transitório nos níveis plasmáticos de aminoácidos, os quais induzem imediata secreção de insulina, independente dos níveis de glicose (CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016). Os principais aminoácidos que estimulam a secreção de insulina são arginina, lisina e leucina, contudo, certas combinações

de aminoácidos também são potentes secretagogos deste hormônio (FU et al., 2013; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A elevação aguda nos níveis séricos de ácidos graxos livres induz adequadamente uma resposta compensatória na secreção de insulina (MONTENEGRO JR et al., 2016). Além disso, eles também potencializam a secreção para compensar o aumento da necessidade desse hormônios na resistência à insulina do DM2. Recentemente, foi descoberto que as células β possuem um receptor para ácidos graxos livres, o FFAR-1 (free fatty acid receptor), através do qual estes podem influenciar na função da célula β (FU et al., 2013).

A secretina, o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), a colecistocinina, assim como outros hormônios gastrointestinais, estimulam a secreção de insulina (CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016). Esses hormônios são liberados após a ingestão de alimentos, causando um aumento antecipado nos níveis de insulina na veia porta, antes que ocorra um aumento real na glicemia (CHAMPE et al., 2009). Além disso, incretinas, como GIP (Gastric inhibitory polypeptide) e GLP-1 (glucagon-like peptide-1), são também secretadas após a ingestão alimentar e aumentam a secreção da insulina estimulada pela glicose (GSIS, glucose-stimulated insulin secretion) (FU et al., 2013).

As ilhotas pancreáticas são inervadas por fibras simpáticas e parassimpáticas do sistema nervoso autônomo. A secreção da insulina é estimulada pelas fibras vagais, enquanto que a inibição ocorre pelas fibras simpáticas. Em situações de jejum prolongado, hipoglicemia ou atividade física, ocorre a liberação de noradrenalina, a qual inibe a secreção de insulina e estimula a liberação de glucagon, causando uma estimulação rápida de combustíveis produtores de energia, incluindo a glicose hepática e os ácidos graxos do tecido adiposo. Estímulos sensoriais em situações pré-refeições, como aroma, visão ou expectativa de alimentação, desencadeiam um reflexo condicionado e estimulação vagal. A acetilcolina é liberada, sensibilizando a célula β , e estimulando a secreção de insulina de maneira a prevenir o aumento precoce dos níveis de glicose (CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A insulina é degradada pela enzima insulinase, presente no fígado e, em menor quantidade, nos rins. Possui meia-vida plasmática de aproximadamente 6 minutos, sendo possível, assim, a alteração rápida nos seus níveis circulantes (CHAMPE et al., 2009).

3.1.1.4. Mecanismo de ação da insulina

A insulina liga-se a receptores específicos de alta afinidade na membrana celular de diversos tecidos, incluindo hepático, adiposo e muscular, o que reflete sua variedade de funções. Além disso, muitas vezes, tal distribuição não está relacionada ao controle glicêmico e lipídico, como o que acontece nos ovários, onde está envolvido com a regulação do estrógeno e dos andrógenos (CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016).

O receptor de insulina é uma proteína heterotetramérica transmembrana, pertencente à família das tirosinas quinases, codificada por um único gene presente no cromossomo 19 (MAASSEN et al., 2003; MONTENEGRO JR et al., 2016). Tal proteína é sintetizada como um peptídeo único, que é glicosilado e clivado em duas subunidades α e duas subunidades β , as quais são reunidas em um tetrâmero através de ligações dissulfeto (CHAMPE et al., 2009). Em cada subunidade β , um domínio hidrofóbico atravessa a membrana plasmática e projeta-se no citoplasma da célula. As subunidades α , situadas inteiramente do lado externo da membrana celular, contêm o sítio de ligação da insulina. O domínio citosólico da subunidade β é uma tirosina-quinase, a qual é ativada pela insulina (CHAMPE et al., 2009).

A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidades β adquira atividade quinase, levando à alteração conformacional e promovendo uma rápida autofosforilação de um resíduo específico de tirosina (CARVALHEIRA et al., 2002; CHAMPE et al., 2009). Em sequência, é iniciada uma cascata de respostas de sinalização celular, com a fosforilação de vários substratos proteicos em tirosina. Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados, com quatro deles pertencendo a uma família de proteínas denominadas "proteínas substratos do receptor de insulina" (IRS) (CARVALHEIRA et al., 2002; CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A glicose precisa de transportadores específicos, uma vez que é uma molécula hidrofílica e não é capaz de atravessar a membrana. Seu transporte é realizado a favor de um gradiente de concentração, ou seja, não necessita de energia. Pelo menos seis transportadores de glicose (GLUTs) já foram identificados. O GLUT 1 está amplamente distribuídos nos tecidos, contudo, está mais relacionado ao transporte de glicose basal e não mediada pela insulina. O GLUT 2 permite o influxo de glicose na célula β , onde sua concentração intracelular aumenta proporcionalmente aos níveis extracelulares, o que, juntamente com a glucoquinase, funciona como um sensor de glicose. O GLUT 3 está presente no sistema nervoso central e, juntamente com o GLUT 1, permite o fluxo de glicose cerebral. O GLUT 4 é expresso em

tecidos sensíveis à insulina, principalmente no músculo esquelético e no tecido adiposo, sendo responsável pela captação periférica de glicose (MONTENEGRO JR et al., 2016).

Ao contrário dos outros, o GLUT 4 está localizado em vesículas intracelulares. A insulina promove um rápido deslocamento das vesículas intracelulares para a superfície celular, além de regular o acoplamento e a fusão das vesículas na membrana plasmática (MACHADO, 1998; CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016). Esse mecanismo, chamado de translocação, é responsável pelo aumento da captação da glicose, enquanto que à queda nos níveis insulinêmicos, segue-se a internalização do GLUT 4, reduzindo novamente o índice de transporte de glicose nesses tecidos (MACHADO, 1998) (Figura 6).

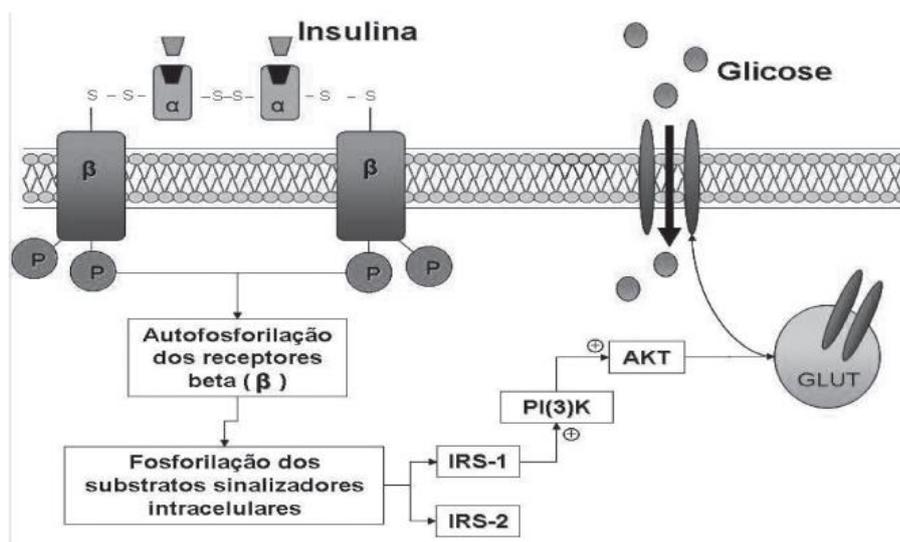


Figura 6. Via de sinalização da insulina, através de sua ligação às subunidades α do receptor, levando à autofosforilação das subunidades β . Isso permite a fosforilação dos substratos sinalizadores intracelulares que contribuem para a inserção do transportador de glicose na membrana celular, via ativação de enzimas específicas. IRS-1: Substrato 1 do receptor de insulina; IRS-2: Substrato 2 do receptor de insulina; PI(3)K: Fosfatidilinositol-3-quinase; AKT: Proteína quinase B; Fonte: Fraga et al. (2012).

3.1.2. Diabetes do tipo 2

O DM2 é a forma mais comum da doença, acometendo cerca de 90-95% dos pacientes com diabetes (CHAMPE et al., 2009; ADA, 2016a). Nas últimas três décadas, a prevalência do DM2 tem aumentado drasticamente em países de todos os níveis de desenvolvimento (OMS, 2016). Foi estimado que aproximadamente 150 milhões de pessoas no mundo inteiro tinham a doença no ano de 2000, com a previsão de que este número dobre para 300 milhões até 2025 (PRENTKI; NOLAN, 2006).

Apesar de o diabetes dos tipos 1 e 2 serem doenças heterogêneas, com apresentação clínica e progressão variando consideravelmente, alguns pacientes não conseguem ser claramente classificados como possuindo um tipo ou outro na época do diagnóstico. Isso se torna prejudicial na determinação da terapia adequada, visto que a classificação é de extrema importância para tal. Além, disso, o paradigma tradicional de que o DM2 ocorre apenas em adultos e que o DM1 ocorre apenas em crianças não é mais tão preciso, com ambas as doenças ocorrendo em ambos os grupos. Contudo, embora a dificuldade de distinção possa ocorrer em todas as idades no começo, o diagnóstico verdadeiro se torna mais óbvio com o passar do tempo (ADA, 2016a).

Como explicado anteriormente, o DM2 é referido como “não insulínica”, englobando indivíduos que apresentam resistência à insulina e disfunção das células β . Ao menos inicialmente, e geralmente ao longo da vida, tais pacientes não necessitam de tratamento com a insulina para sobreviver, embora esta possa ser requerida para controlar a hiperglicemia em alguns casos (CHAMPE et al., 2009; ADA, 2016a). Os sintomas podem ser similares aos do DM1, mas são, normalmente, menos acentuados ou ausentes. Como resultado, a doença pode continuar sem diagnóstico por vários anos, até que surjam complicações (OMS, 2016).

O risco para esta doença é determinado por uma interação de fatores genéticos e metabólicos. Etnia, histórico familiar de diabetes e diabetes gestacional combinados com idade avançada e o estilo de vida moderno, com abundante disponibilidade de nutrientes e atividades físicas reduzidas que resultam em excesso de peso e obesidade, aumentam tais riscos (OMS, 2016; PRENTKI; NOLAN, 2006). A maioria dos pacientes com esta forma de diabetes é obesa, e a obesidade por si só causa algum grau de resistência à insulina. Os pacientes que não são obesos pelos critérios tradicionais de peso apresentam um percentual aumentado de gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal (ADA, 2016a).

3.1.2.1. Resistência à insulina

A resistência à insulina é uma condição na qual as concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal nas células dos tecidos-alvo, como hepáticas, musculares e adiposas. Caracteristicamente, é observada uma produção descontrolada de glicose hepática e uma captação diminuída de glicose pelo músculo e tecido adiposo. Em consequência dessa resposta inadequada, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais (CHAMPE et al., 2009; MONTENEGRO JR et al., 2016).

Pode ser adquirida ou genética, ocorrendo em múltiplos níveis do ponto de vista molecular, desde o receptor até os componentes das vias de sinalização insulínica (MONTENEGRO JR et al., 2016). Cada vez mais prevalente, ela está presente em várias situações clínicas como DM2, obesidade, hipertensão arterial, síndrome do ovário policístico, processos infecciosos e situações como gravidez, estresse e puberdade (FRAGA et al., 2012; MONTENEGRO JR et al., 2016). Também pode ser secundária ao uso de diversas medicações, particularmente glicocorticoides, mas as formas mais comuns são devido a defeitos genéticos (MONTENEGRO JR et al., 2016).

Vários estudos mostram que a resistência à insulina precede o desenvolvimento da hiperglicemia em pacientes com DM2 (PRENTKI; NOLAN, 2006). A obesidade é um dos principais fatores patogênicos para o desenvolvimento da resistência à insulina, contudo, a resposta normal da célula β é a hipersecreção compensatória, a fim de manter a normoglicemia (PRENTKI; NOLAN, 2006; FU et al., 2013). Quanto maior o índice de massa corpórea, maior o estado hiperinsulinêmico, além de evidências sugerirem que ocorre uma hiperplasia anormal na massa das células β (MONTENEGRO JR et al., 2016).

Contudo, o aumento na concentração plasmática de insulina para prevenir a descompensação da tolerância diminuída à glicose, em um indivíduo insulino-resistente, não significa que essa resposta compensatória seja benigna. A resistência à captação de glicose estimulada pela insulina está associada a uma série de alterações que aumentam o risco para doenças cardiovasculares, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, redução do HDL-c, hipertensão arterial e obesidade abdominal (MCLELLAN et al., 2007).

Tem sido observado que o DM2 apenas se desenvolve diante da disfunção das células β , ou seja, quando essas são incapazes de secretar uma quantidade de insulina adequada para compensar a reduzida sensibilidade. Além disso, pacientes com esta doença sempre manifestam um aumento na apoptose das células β e uma consequente redução em sua massa, o que pode ser ocasionado pelos efeitos citotóxicos da hiperglicemia persistente ou pelo aumento dos ácidos graxos livres (PRENTKI; NOLAN, 2006; CHAMPE et al., 2009; FU et al., 2013). Dessa forma, em estágios mais tardios, começa a ser necessário o tratamento juntamente com a insulinoterapia (PRENTKI; NOLAN, 2006).

Os testes diagnósticos mais importantes são a glicemia de jejum e o teste oral de tolerância à glicose (OGTT), com este último informando tanto sobre a secreção de insulina quanto sobre sua ação periférica. Tais concentrações de glicose precisam apresentar valores

iguais ou maiores a 126 mg/dL e 200 mg/dL, respectivamente (MCLELLAN et al., 2007; CHAMPE et al., 2009).

3.1.2.2. Causas da resistência à insulina na obesidade e no diabetes

Como explicado anteriormente, a resistência à insulina aumenta com o ganho de peso e diminui com a perda de peso. Isso sugere que o acúmulo de lipídeos é importante no seu desenvolvimento (CHAMPE et al., 2009). A grande concentração de ácidos graxos livres inibe a captação muscular de glicose estimulada pela insulina na etapa do transportador de glicose e/ou fosforilação, a capacidade da insulina de suprimir a secreção hepática de glicose e a secreção insulínica pelas células β pancreáticas. Os adipócitos da gordura abdominal apresentam maior sensibilidade lipolítica e são mais resistentes ao efeito antilipolítico da insulina, aumentando ainda mais a oferta de ácidos graxos ao fígado, induzindo o acúmulo de triglicérides e contribuindo para aumentar a resistência insulínica hepática e periférica (MCLELLAN et al., 2007; MONTENEGRO JR et al., 2016).

A obesidade é caracterizada pelo desenvolvimento de um estado inflamatório crônico de baixo grau do tecido adiposo, o qual é considerado um componente chave na promoção da resistência à insulina associada à obesidade (BOUCHER et al., 2014; MONTENEGRO JR et al., 2016). A expansão do tecido adiposo ocorre em resposta à sobrecarga calórica, e é associada ao aumento da infiltração de células imunes e uma subsequente resposta pró-inflamatória (BOUCHER et al., 2014). Dois tipos celulares são especialmente importantes nesse cenário, os adipócitos e os macrófagos, ambos capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias e de induzir a resistência à insulina (BOUCHER et al., 2014).

O aumento da secreção de citocinas, como TNF- α , IL-1b e IL-6, tanto pelos macrófagos quanto pelos adipócitos, induz a resistência à insulina através de vários mecanismos, incluindo a ativação da serina/treonina quinase, redução da expressão de IRS-1, GLUT4 e PPAR γ ou a ativação do SOCS3 nos adipócitos. Outro fator importante no processo inflamatório associado à obesidade é a ativação dos TLRs (Toll-like receptors), os quais pertencem ao sistema imune inato e, geralmente, são ativados por padrões moleculares associados aos patógenos, como lipopolissacarídeos (LPS), e induzem inflamação por meio da ativação da via NF- κ B. Especialmente, há a ativação dos TLR-2 e TLR-4, sendo este último presente de maneira elevada durante a obesidade no músculo esquelético e no tecido adiposo (BOUCHER et al., 2014).

Tanto o TNF- α quanto os ácidos graxos livres podem ativar cascatas de sinalização em tecidos sensíveis à insulina, as quais resultam na ativação de serina quinases, especialmente a JNK e a IKK β , e da PCK (proteína kinase C) (BOUCHER et al., 2014; MONTENEGRO JR et al., 2016). As serina quinases fosforilam as proteínas IRSs em serina, provocando um feedback negativo na sinalização da insulina por atenuar a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após o estímulo (MONTENEGRO JR et al., 2016).

Estudos mostram que a JNK é um mediador chave da obesidade e da resistência insulínica, e um possível alvo para agentes terapêuticos. A IKK β também participa da via de transmissão do sinal do TNF- α e IL-1, importantes no desenvolvimento do processo inflamatório, o que culmina na regulação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, que está envolvido na expressão de uma variedade de genes que regulam a resposta inflamatória (MONTENEGRO JR et al., 2016).

Outras moléculas implicadas na resistência insulínica promovida pelo TNF- α são as iNOS e SOCS, cujos genes são alvos das vias da JNK e IKK β e apresentam expressão aumentada na obesidade. Além disso, o estresse do retículo endoplasmático, ou seja, uma sobrecarga na sua capacidade funcional, e o aumento no metabolismo da glicose, que gera um aumento na produção de ROS, também estão implicados na ativação das vias inflamatórias da resistência (MONTENEGRO JR et al., 2016). O estresse oxidativo causado pelas altas concentrações de ROS também age diretamente de maneira a ativar as quinases de estresse que induzem a resistência à insulina pela fosforilação da serina das proteínas IRS (BOUCHER et al., 2014).

3.1.2.3. Prevenção e tratamento

O objetivo primário da terapia do diabetes é manter as concentrações sanguíneas de glicose o mais próximo possível do normal, sem causar hipoglicemia. O bom controle da glicose plasmática ajuda a proteger contra o desenvolvimento de complicações a longo prazo (CHAMPE et al., 2009; WADA, 2015).

O estilo de vida está diretamente relacionado com a incidência do DM2 e da síndrome metabólica (MCLELLAN et al., 2007). Várias práticas alimentares, como a alta ingestão de ácidos graxos saturados, de bebidas com alto teor de açúcar e o consumo inadequado de fibras aumentam a probabilidade de sobrepeso ou obesidade, o que, aliado ao sedentarismo, são os maiores fatores de risco para o surgimento do DM2 (MCLELLAN et al., 2007; OMS, 2016). Por outro lado, dietas ricas em cereais integrais e ácidos graxo poli-insaturados, associadas ao

consumo reduzido de ácidos graxos trans e de alimentos com elevado índice glicêmico, ajudam a diminuir tais riscos (MCLELLAN et al., 2007).

Dessa forma, a redução no peso, a atividade física frequente, a modificação na dieta e a abstinência do tabagismo geralmente corrigem a hiperglicemia do DM2. Contudo, em alguns casos, agentes hipoglicemiantes ou a terapia com insulina podem ser necessários para atingir níveis satisfatórios de glicose sanguínea (MCLELLAN et al., 2007; CHAMPE et al., 2009).

Existe uma ampla gama de agentes farmacológicos disponíveis no tratamento da hiperglicemia, sendo a metformina, geralmente, a primeira escolha dentre os medicamentos orais (IDF, 2012). Essa recomendação é baseada nos efeitos da metformina na melhora da sensibilidade à insulina, na redução da glicemia, na inibição da gliconeogênese no fígado, na receptação periférica da glicose, na redução no peso e no seu baixo custo (BARALDI et al., 2012; IDF, 2012; VIOLLET et al., 2012; ALVES et al., 2014; YAN et al., 2015).

Alternativas à primeira linha de tratamento com a metformina incluem as sulfoniluréias e os inibidores de α -glicosidase (IDF, 2012). As sulfoniluréias induzem a liberação de insulina nas células β através da inibição do canal de potássio ATP-sensível, pela sua ligação em um sítio da subunidade SUR1, aumentando a secreção de insulina basal e da insulina liberada pelo estímulo oral da glicose (KALRA; GUPTA, 2015; MONTENEGRO JR et al., 2016). Contudo, as sulfoniluréias apresentam um mecanismo de ação glicose-independente, o que causa um grande risco de hipoglicemia, além de serem associadas ao ganho de peso (IDF, 2012; KALRA; GUPTA, 2015). Os inibidores de α -glicosidase, através da inibição competitiva e reversível das enzimas α -glicosidase intestinais, como a maltase, atrasam a digestão dos carboidratos, prolongando o seu tempo de digestão, e reduzem, assim, a taxa de absorção de glicose (BISCHOFF, 1995; VAN DE LAAR, 2008). Dessa forma, há o controle da glicemia pós-prandial, ajudando no tratamento do DM e também na redução do peso corporal (KALRA; GUPTA, 2015).

Quando a monoterapia falha em atingir os níveis de glicemia adequados, a adição de um segundo agente se torna necessária. É recomendada a adição de sulfoniluréias como abordagem usual para os pacientes tratados com a metformina, contudo, outras opções alternativas incluem os inibidores de α -glicosidase, inibidores de DPP-4 ou tiazolidinedionas. Tais opções são utilizadas em situações em que o uso da metformina e das sulfoniluréias é contraindicado ou devido aos efeitos colaterais. Se ainda assim, o controle do DM permanece insatisfatório, um terceiro agente é necessário. As abordagens comuns incluem um terceiro agente oral ou o início do tratamento com a insulina (IDF, 2012).

3.1.3. Metformina

A metformina (dimetilbiguanida) (Figura 7) é uma biguanida derivada da guanidina, proveniente da espécie vegetal *Galega officinalis* (arruda-caprária ou galega), pertencente a uma classe de hipoglicemiantes orais que tem sido utilizada clinicamente pelos últimos 50 anos no tratamento da resistência à insulina e do DM2 (BARALDI et al., 2012; FANTUS, 2015).

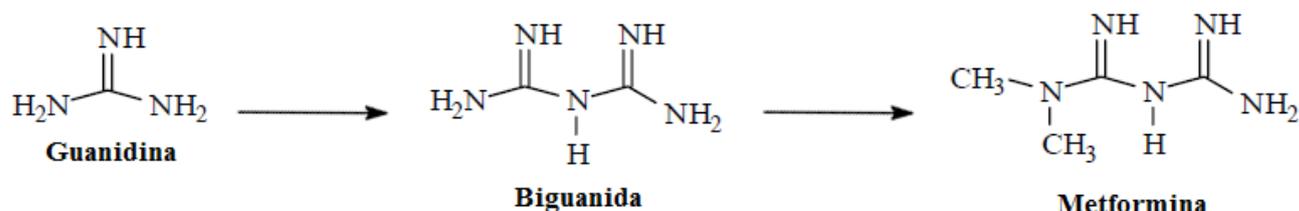


Figura 7. Representação das moléculas da guanidina, da biguanida (formada a partir de duas moléculas de guanidina juntas, com eliminação de uma molécula de amônia) e da metformina, a dimetilbiguanida. Fonte: DeRuiter, 2003.

Juntamente com a modificação do estilo de vida (como dieta, controle de peso e atividade física), é a principal terapia oral recomendada pela ADA e pela EASD para pacientes com DM2. Tal recomendação é baseada em estudos clínicos realizados pela UKPDS, que observaram que o controle intensivo da glicemia pela metformina é capaz de reduzir os riscos do surgimento das doenças associadas e de morte em pacientes diabéticos com sobrepeso, além de reduzir o ganho de peso, de ser responsável por reduzidas situações de hipoglicemia, quando comparada com a insulina e as sulfoniluréias, da sua capacidade de ser associada a outros agentes antidiabéticos e do seu baixo custo (VIOLLET et al., 2012; ROJAS; GOMES, 2013).

A metformina é frequentemente descrita como um sensibilizador de insulina por reduzir seus níveis plasmáticos e os sintomas da resistência, o que pode ser atribuído aos seus efeitos positivos na expressão do receptor e na atividade tirosina quinase (VIOLLET et al., 2012). Além disso, seu principal efeito é inibir gliconeogênese no fígado, atuando também de maneira a reduzir a absorção de glicose pela mucosa intestinal e a aumentar a captação periférica da glicose pelo tecido muscular esquelético (ALVES et al., 2014; ZHUO et al., 2014).

3.1.3.1. Mecanismo de ação

A ação preferencial da metformina nos hepatócitos é devido à predominante expressão do OCT1, que facilita a entrada no interior da célula, visto que a sua natureza hidrofílica impede o cruzamento através da membrana plasmática (GRAHAM et al., 2011; VIOLLET et al., 2012).

Consistente com isso, o acúmulo de metformina no fígado é maior do que nos outros tecidos, atingindo altas concentrações micromolares na região periportal (VIOLLET et al., 2012).

Uma vez no interior da célula, a metformina atua de maneira a ativar a AMPK, uma quinase de serina/treonina que compõe uma via de sinalização sensível à energia celular, desempenhando um papel crucial na proteção de funções celulares sob condições de reduzido aporte energético (FANTUS, 2015; VIOLLET et al., 2012). Sua ativação ocorre diante do aumento intracelular da razão AMP/ATP, resultado de um desequilíbrio entre a produção e o consumo de ATP, e necessita de uma fosforilação por quinases conhecidas como supressoras de tumor, como a STK11/LKB1 e CaMKK β , as quais são estimuladas pelo AMP (VIOLLET et al., 2012).

A ativação do AMPK muda o estado da célula de anabólico para catabólico, inibindo as vias de consumo de ATP e restaurando o balanço energético. Como resultado, os eventos de síntese de glicose, lipídios e proteínas, assim como o crescimento celular, são inibidos enquanto a oxidação dos ácidos graxos e a captura da glicose são estimuladas (VIOLLET et al., 2012). No metabolismo dos lipídios, a ativação da AMPK pela metformina induz a fosforilação e a inativação da acetil-CoA carboxilase, uma importante enzima na síntese no malonil-CoA, o qual é um precursor crítico para a biossíntese dos ácidos graxos e um potente inibidor da oxidação dos mesmos pelas mitocôndrias (VIOLLET et al., 2012; FANTUS, 2015).

No fígado, a gliconeogênese é suprimida pela fosforilação e inibição do PGC1- α e pela supressão da expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Essas ações representam uma tentativa de restaurar as concentrações de ATP e o balanço energético neste órgão (FANTUS, 2015).

A ativação de ambas as LKB1 e AMPK pela metformina parece ser secundária aos seus efeitos na mitocôndria, o alvo principal da droga (VIOLLET et al., 2012). Nesta organela, ela atua inibindo o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, o que causa a redução nos níveis de ATP (ROJAS; GOMES, 2013; FANTUS, 2015). Contudo, alguns estudos descrevem quem o efeito hipoglicemiante da metformina pode não recrutar o AMPK em todos os casos, o que indica alvos adicionais de ação da droga e demonstra que o conhecimento sobre seus mecanismos de ação celulares e moleculares ainda é incompleto (SALOMAKI et al., 2014; FANTUS, 2015).

3.1.3.2. Outras atuações

Além do seu potencial hipoglicemiante, a metformina também apresenta propriedades anti-inflamatórias, o que contribui na prevenção de complicações micro e macrovasculares. Ela atua inibindo a resposta pró-inflamatória através da inibição direta do NF- κ B, pelo do bloqueio da via PI3K/AKT (ROJAS; GOMES, 2013).

Um papel antioxidante também foi atribuído à metformina devido à sua contribuição redução nas ROS, através da inibição da respiração mitocondrial, e pela diminuição dos AGEs, o que pode ser indiretamente pela redução da hiperglicemia ou diretamente através de mecanismo insulino-dependentes. Além disso, algumas evidências suportam o efeito benéfico da metformina em alguns componentes do sistema de defesa antioxidante, como no estímulo à expressão da UCP2 no tecido adiposo e no aumento das concentrações da glutathiona reduzida (ROJAS; GOMES, 2013).

3.1.4. Métodos de indução do diabetes

Embora ainda existam debates sobre a utilização de modelos animais no estudo do diabetes, assim como a capacidade de extrapolação de tais resultados para a prática clínica, deve-se admitir que tais modelos experimentais são ferramentas essenciais para entender as bases moleculares, a patogênese das complicações e a eficácia de agentes terapêuticos e antidiabetogênicos (CHATZIGEORGIOU et al., 2009; ETUK, 2010).

A indução do DM experimental em animais de laboratório pode ser realizada utilizando-se procedimentos cirúrgicos (pancreatectomia), manipulações genéticas e agentes químicos (ETUK, 2010; RADENKOVIC et al., 2016). Tais metodologias podem atingir o mesmo resultado, eliminando a habilidade do animal de produzir insulina ou aumentando a resistência à insulina produzida, mas os procedimentos são bastante diferentes (MARTINS, 2010).

No início dos estudos experimentais com o DM, modelos de cachorros pancreatectomizados foram utilizados para confirmar o papel central do pâncreas na homeostase da glicose, assim como para descobrir e purificar a insulina (LENZEN; PANTEN, 1988; CHATZIGEORGIOU et al., 2009). Contudo, nos dias atuais, a grande maioria dos estudos utiliza roedores, como ratos e camundongos, como animais experimentais (RADENKOVIC et al., 2016).

3.1.4.1. Método cirúrgico

A remoção cirúrgica do pâncreas (pancreatomia) pode ser utilizada como um meio de indução do DM quando a indução química não é adequada, devido aos possíveis efeitos adversos ao órgão ou estrutura a ser analisada, ou quando são necessários modelos animais maiores do que roedores, como em analogias mais próximas dos humanos (MARTINS, 2010).

Contudo, esta técnica é pouco utilizada diante das suas limitações, que incluem: alto nível de experiência técnica e sala cirúrgica adequada, alto risco de infecção, administração pós-operatória adequada de analgésicos e antibióticos, suplementação com enzimas pancreáticas para prevenir a má absorção, perda da resposta regulatória pancreática contra a hipoglicemia, além de altos riscos de morte dos animais (ETUK, 2010; SHARMA et al., 2013).

3.1.4.2. Modelos genéticos

Os modelos espontâneos de desenvolvimento do DM permitem uma avaliação do organismo sem a interferência dos efeitos colaterais induzidos pelo método químico (ETUK, 2010; SHARMA et al., 2013). Um exemplo é o rato Goto-Kakizaki, que é um modelo animal não-obeso de DM2, originado a partir de reprodução seletiva de várias gerações de ratos Wistar com intolerância à glicose (CHEN; WANG, 2005; SHARMA et al., 2013).

No caso dos modelos geneticamente modificados, os animais são produzidos para super-expressar ou inibir a expressão de proteínas que desempenham papéis importantes no metabolismo da glicose. Contudo, os altos custos de tais modelos animais são um empecilho para a sua ampla utilização nos estudos experimentais (ETUK, 2010; SHARMA et al., 2013).

Além disso, alguns modelos de DM dependente de insulina podem ser desenvolvidos com a utilização de vírus ou proteínas virais, os quais provocam uma resposta auto-imune nas células β pancreáticas, levando à destruição das mesmas. Em tais casos, a utilização é baixa devido às técnicas e equipamentos sofisticados necessários para a sua execução (ETUK, 2010; SHARMA et al., 2013).

3.1.4.3. Métodos químicos

A maioria dos estudos recentes publicados no campo da etnofarmacologia utilizam o modelo químico de indução do DM (ETUK, 2010). Neste método, utilizam-se drogas que foram desenvolvidas para apresentar atividade tóxica às células β pancreáticas, destruindo-as e, assim, induzindo um estado de hiperglicemia (MARTINS, 2010).

As drogas mais importantes e mais frequentemente utilizadas para este fim são a estreptozotocina (STZ) e a aloxana (ALX), embora a STZ seja a mais largamente empregada (ARAUJO, 2010; ETUK, 2010; MARTINS, 2010; RADENKOVIC et al., 2016). Ambas podem ser administradas por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea, oferecendo uma maneira fácil e econômica de induzir a hiperglicemia diabética (ETUK, 2010; MARTINS, 2010).

A utilização dessas substâncias permite a realização de estudos detalhados de eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos durante e após a indução do diabetes, além de permitir o teste de eventuais fatores de proteção contra a lesão da célula β e, com isso, a possibilidade de descoberta de novas terapias (ARAUJO, 2010).

3.1.4.3.1. Estreptozotocina e mecanismo de ação

A STZ é um análogo de nitrosuréia isolada a partir da fermentação do fungo *Streptomyces acromagenes* que apresenta, classicamente, atividade antitumoral e antibiótica (LENZEN, 2008; ARAUJO, 2010; ETUK, 2010). Ela previne a síntese de DNA nas células dos mamíferos e das bactérias. Nestas últimas, a STZ produz reações especiais com grupos de citocinas, resultando em degeneração e destruição do DNA (ETUK, 2010; SHARMA et al., 2013; TRIPATHI; VERMA, 2014).

As nitrosuréias são, geralmente, lipofílicas e penetram na célula através da bicamada lipídica da membrana plasmática celular. Contudo, como resultado de uma substituição de hexose, a STZ é hidrofílica, sendo introduzida na célula β pancreática através do transporte de baixa afinidade pelos transportadores de glicose GLUT2 (LENZEN, 2008; RADENKOVIC et al., 2016). Uma vez no interior da célula, a STZ causa, principalmente, a aquilação do DNA, através da transferência de um grupo metil para tal molécula, levando a uma cadeia de eventos que culminam na fragmentação do material genético. Além disso, a STZ induz a ativação de difosfato de adenosina (ADP)-ribosilação, a liberação de óxido nítrico, a partir do seu grupo nitroso, e a geração de ROS, resultando na destruição da célula β por necrose (LENZEN, 2008; MARTINS, 2010; SHARMA et al., 2013; TRIPATHI; VERMA, 2014; RADENKOVIC et al., 2016).

A aplicação de STZ realizada em meio ácido, geralmente diluída em tampão citrato (pH 4,5 - 0,1 M), e em baixas temperaturas é mais eficaz devido a sua instabilidade em temperaturas ambientais e pH neutro (ARAUJO, 2010; ETUK, 2010). As doses diabetogênicas variam entre as espécies. Uma mesma dose pode ser tóxica e causar um índice alto de mortalidade em uma

espécie e ser pouco diabetogênica em outra (ARAUJO, 2010). Em ratos adultos, a dose de 65 mg/kg é a mais comum para induzir o DM dependente de insulina (SHARMA et al., 2013).

Sua administração produz flutuações trifásicas do nível de glicose sanguínea, a qual atinge o máximo cerca de duas horas após a aplicação, é seguida de hipoglicemia acentuada, com níveis glicêmicos mínimos após 10 horas e grandes riscos de convulsões morte para o animal e, finalmente, a hiperglicemia permanente (LENZEN, 2008; ARAUJO, 2010; RADENKOVIC et al., 2016). Dessa forma, é indicado que, em ratos, a confirmação do DM seja realizada após cerca de sete dias da indução (ETUK, 2010).

3.1.4.3.2. Aloxana e mecanismo de ação

A ALX é um derivado de pirimidina, sintetizada pela oxidação do ácido úrico pelo ácido nítrico (MARTINS, 2010; RADENKOVIC et al., 2016). Por ser hidrofílica e por apresentar estrutura similar à glicose, a ALX é transportada para o interior da célula β de maneira semelhante à STZ, através do GLUT 2. Contudo, a afinidade deste transportador pela ALX é muito maior (RADENKOVIC et al., 2016; LENZEN, 2008).

Apresenta efeito necrótico seletivo nas células β das ilhotas pancreáticas (ARAUJO, 2010; ETUK, 2010; TRIPATHI; VERMA, 2014). Contudo, é possível a produção de diferentes graus de severidade do diabetes através da variação da dose de ALX utilizada (ETUK, 2010; SHARMA et al., 2013; TRIPATHI; VERMA, 2014). Os níveis severos produzidos por esta droga resultam em valores glicêmicos equivalentes a uma total pancreatectomia (ETUK, 2010).

Possui meia-vida de curta duração, sendo mais estável em pH ácido e baixas temperaturas (RADENKOVIC et al., 2016). Em solução aquosa, é espontaneamente decomposta em ácido aloxânico não diabetogênico dentro de poucos minutos. Dessa forma, deve ser absorvido e acumulado rapidamente na célula β e, portanto, é ineficaz quando o fluxo sanguíneo para o pâncreas é interrompido durante os primeiros minutos após a sua injeção (LENZEN, 2008).

Após entrar na célula β , a ALX produz seus efeitos patológicos através de dois mecanismos independentes: a inibição da glucoquinase e a geração das ROS. A inibição da glucoquinase ocorre através da reação do grupo 5-carbonila central presente na molécula da ALX, o qual reage com o grupo tiol da enzima. Isto acarreta na redução da oxidação da glicose e da geração de ATP, suprimindo, então, o sinal de ATP que desencadeia a secreção de insulina.

O estímulo à formação das ROS resulta na necrose seletiva das células β , criando um estado de diabetes dependente de insulina (LENZEN, 2008; RADENKOVIC et al., 2016).

Contudo, dois minutos após a aplicação da ALX, ocorre uma elevação nos níveis de insulina, seguida de uma consequente redução da glicose plasmática, levando à hipoglicemia. Passada essa fase inicial, os níveis glicêmicos dos animais induzidos pela ALX seguem o mesmo padrão da indução pela STZ, com aumento dos níveis de glicose, o qual é seguido de uma queda brusca na glicemia e, novamente, de um aumento, que cresce de maneira constante até 48h, quando o estado de hiperglicemia persistente se desenvolve (LENZEN, 2008; TRIPATHI; VERMA, 2014; RADENKOVIC et al., 2016).

3.1.4.4. Indução do diabetes mellitus do tipo 2

A STZ pode ser usada para induzir os tipos 1 e 2 de diabetes (RADENKOVIC et al., 2016). Por outro lado, a ALX é menos utilizada para o desenvolvimento do modelo experimental de DM2 porque a sua administração produz graves danos às células β pancreáticas, induzindo um estado de hiperglicemia que é mais condizente com o DM1 (ETUK, 2010; RADENKOVIC et al., 2016).

A aplicação isolada da STZ, contudo, não produz o efeito esperado para o DM2, visto que ela é incapaz de induzir um estado de resistência à insulina (RADENKOVIC et al., 2016). Dessa forma, outros modelos foram desenvolvidos visando atingir esse objetivo, como o modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina (REED et al., 2000; SRINIVASAN et al., 2005), nicotinamida-estreptozotocina (MASIELLO et al., 1998) e ingestão de frutose-estreptozotocina (WILSON; ISLAM, 2012).

3.1.4.4.1. Modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina

O modelo da dieta hiperlipídica-estreptozotocina é o mais reconhecido e o mais amplamente utilizado modelo de STZ para o DM2. Ele foi desenvolvido com a ideia de simular a progressão e as alterações naturais que ocorrem no metabolismo humano com a doença (RADENKOVIC et al., 2016). Além disso, o regime dietético empregado exemplifica a situação nutricional vivenciada pela população mundial, diante da abundante oferta de alimentos hiperlipídicos (CORREIA-SANTOS et al., 2012).

A ideia para esse modelo surgiu a partir da análise de estudos que demonstravam uma importante influência das dietas enriquecidas com gorduras sobre o desenvolvimento da resistência à insulina, seguida por um estado de hiperinsulinemia. Contudo, devido à

hiperinsulinemia, o percentual de animais hiperglicêmicos era insatisfatório (RADENKOVIC et al., 2016).

A partir disso, Reed et al. (2000) administraram STZ aos modelos animais previamente alimentados com uma dieta rica em gorduras, de maneira a driblar os problemas anteriores. A aplicação da droga, e a contínua alimentação com a alimentação hiperlipídica, resultou em níveis elevados de glicose, de insulina, de ácidos graxos e triglicerídeos em comparação a animais controles (alimentação padrão e aplicação da mesma dose de STZ). Além disso, o tratamento com a metformina, que é a droga mais utilizada para o DM2, levou à redução dos níveis glicêmicos. Dessa forma, os resultados encontrados foram suficientes para estabelecer adequadamente o modelo de DM2 à base de dieta hiperlipídica-STZ (RADENKOVIC et al., 2016).

Após a introdução desse modelo, várias modificações foram realizadas, principalmente visando reduzir a dose de STZ fornecida (RADENKOVIC et al., 2016). Isto se baseou no fato de que doses altas de STZ prejudicam gravemente a secreção de insulina, simulando o DM1, enquanto que baixas doses de STZ induzem um distúrbio de secreção mediano, o qual é similar às características dos estágios mais avançados do DM2, quando ocorre a disfunção parcial das células β (SUBRAMANIAN; PRASATH, 2014).

3.1.4.4.2. Modelo de nicotinamida-estreptozotocina

A nicotinamida (NA) é conhecida como uma droga que altera os efeitos tóxicos da STZ, além de ser capaz de prevenir e reverter o desenvolvimento do diabetes. Recentemente, a combinação de tais drogas foi introduzida como um modelo viável de DM2. A explicação para este modelo, introduzido por Masiello et al. (1998) está na proteção às células β realizada pela NA, o que resulta em uma menor perda da massa dessas células e o desenvolvimento do DM2, ao mesmo tempo que a capacidade de produzir insulina é mantida (CHATZIGEORGIU et al., 2009; RADENKOVIC et al., 2016).

Este modelo é caracterizado por hiperglicemia moderada, que não precisa de insulina exógena, redução de cerca de 40% das células β e de 60% da produção de insulina, intolerância à glicose e responsividade a sulfoniluréias (GHASEMI et al., 2014).

3.1.4.4.3. Modelo de frutose-estreptozotocina

Este modelo foi desenvolvido por Wilson e Islam (2012) com o objetivo de ser uma alternativa não-genética para o desenvolvimento do DM2, simular da melhor maneira a

patogênese da doença em si e, ao mesmo tempo, torná-lo executável e sem muitos custos adicionais. A principal ideia para o uso da frutose veio da sua anterior utilização em alguns modelos de indução do DM1 (RADENKOVIC et al., 2016).

3.2. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo temporal pelo qual as células germinativas precursoras, as chamadas espermatogônias, passam por uma complexa série de divisões para originar espermatozoides funcionais. Este processo ocorre no epitélio dos túbulos seminíferos testiculares, uma estrutura composta pelas células germinativas e células somáticas de suporte radialmente orientadas, as células de Sertoli (O'DONNELL et al., 2017).

3.2.1. Testículo e organização testicular

Os testículos são órgãos pares, de formato elipsoide, envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso (túnica albugínea) e localizados no escroto, fora da cavidade abdominal (KIERSZENBAUM, 2004; SHARMA, 2013). Essa localização permite a manutenção da temperatura testicular em cerca de 34°C a 35°C, o que é 2°C a 3°C abaixo da temperatura corporal e essencial para o processo espermatogênico normal (KIERSZENBAUM, 2004; SHARMA; AGARWAL, 2011).

As superfícies testiculares, exceto pela borda posterior, são cobertas por uma membrana serosa, chamada de túnica vaginal. Esta túnica consiste em uma camada parietal exterior, aderida ao escroto, e uma camada visceral interna, que recobre a túnica albugínea nas porções laterais e anterior do testículo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). No espaço entre os folhetos, há fluido secretado pelas células mesoteliais, que permite o movimento sem atrito dos testículos no saco escrotal (Figura 8) (MONTANARI, 2016).

Na borda posterior, o testículo está ligado ao epidídimo que, no seu polo inferior, dá origem ao ducto deferente (SHARMA, 2013). Tanto os testículos quanto o epidídimo estão suspensos no escroto pelo cordão espermático, contendo o ducto deferente, a artéria espermática, o plexo venoso e o plexo linfático (Figura 8) (KIERSZENBAUM, 2004).

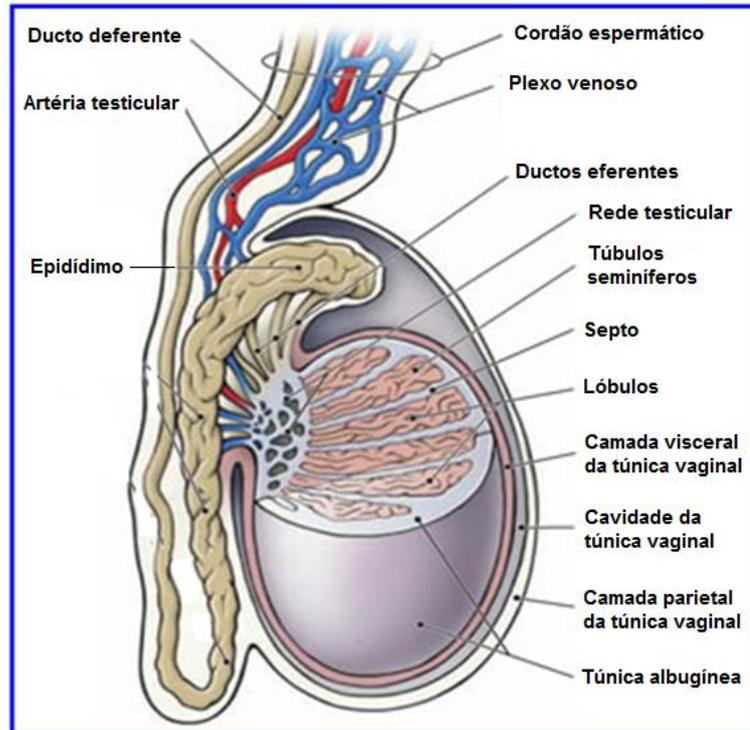


Figura 8. Representação testicular mostrando o seu revestimento pela túnica albugínea, a sua divisão interna em lóbulos e a sua constituição de túbulos seminíferos enovelados. Observa-se também a saída das extremidades dos túbulos seminíferos, os túbulos retos, na rede testicular, a formação dos túbulos eferentes, do epidídimo e do ducto deferente, além do suprimento vascular do testículo. Fonte: <https://web.duke.edu/anatomy/lab07/lab7.html>

A túnica albugínea se espessa na borda posterior dos testículos, formando o mediastino testicular, de onde partem septos fibrosos para o interior do órgão, levando vasos e nervos e dividindo-o incompletamente em cerca de 250-300 lóbulos cônicos, onde são alojados os túbulos seminíferos (SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; MONTANARI, 2016). Por lóbulo, são encontrados de um a quatro túbulos seminíferos em forma de U, contorcendo-se repetidamente até às extremidades, as quais formam extensões tubulares retas (túbulos retos) que passam para o mediastino do testículo e juntam-se na rede testicular (Figura 9-A) (KIERSZENBAUM, 2004; MONTANARI, 2016; O'DONNELL et al., 2017). Esta é formada por canais que coletam os produtos do epitélio seminífero, como espermatozoides, proteínas secretadas e íons (KIERSZENBAUM, 2004). A partir da rede testicular, no ser humano, uma série de seis a doze ductos eferentes finos se juntam para formar o ducto do epidídimo (O'DONNELL et al., 2017).

Os túbulos seminíferos se alojam dentro de um tecido conjuntivo frouxo, o que resulta na divisão do parênquima testicular em dois compartimentos principais: o compartimento

tubular e o compartimento intertubular ou intersticial (RUSSELL et al., 1990; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O compartimento tubular corresponde à maior parte (90%) do volume do testículo, sendo formado pelos túbulos seminíferos, os quais apresentam um lúmen central revestido pelo epitélio seminífero especializado, envolvidos por uma túnica própria (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015). A túnica própria dos túbulos seminíferos é constituída de uma membrana basal e uma parede formada por fibras colágenas, fibroblastos e células mióides contráteis. As células mióides são responsáveis pela atividade contrátil rítmica que impulsiona os espermatozoides imóveis para a rede testicular. O epitélio seminífero contém duas populações celulares distintas: as células de Sertoli somáticas e as células espermatogênicas (Figura 9) (KIERSZENBAUM, 2004).

O compartimento intertubular é formado por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células de Leydig, outros tipos celulares, como células do tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e fibras do tecido conjuntivo (NEVES, 2001; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015). Apesar de existir variação na proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes desse compartimento entre as espécies de mamíferos (FAWCETT et al., 1973; FRANÇA; RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999), de maneira geral, a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante (Figura 9) (HOOKER, 1970).

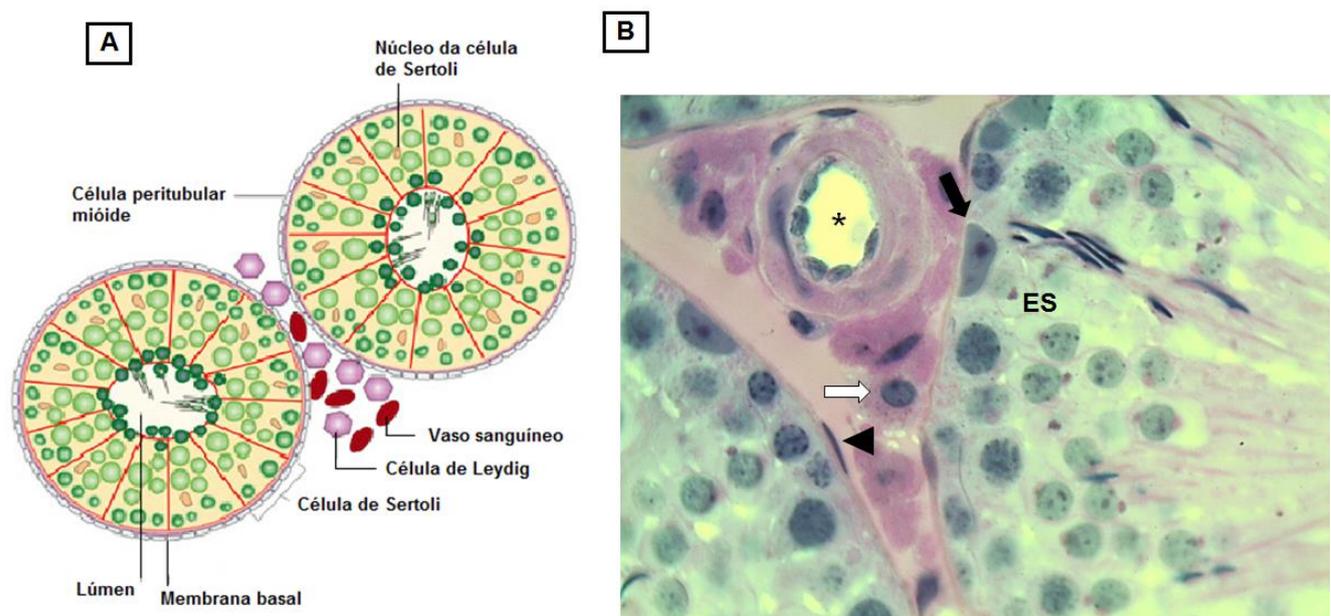


Figura 9. **A** – Representação da secção transversal testicular, mostrando a organização do parênquima, com os túbulos seminíferos e os constituintes do interstício. Fonte: Cooke e Saunders (2002). **B** – Fotomicrografia da

secção transversal de testículo de rato, evidenciando a divisão dos compartimentos testiculares. Seta preta – núcleo da célula de Sertoli; ES – epitélio seminífero; seta branca – célula de Leydig (notar citoplasma cheio de grânulos de secreção); cabeça de seta – célula peritubular mióide; arterisco – vaso sanguíneo. Foto mostra um aumento total de 1000x. Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.1.1. Epitélio seminífero

O epitélio seminífero consiste de células germinativas em diferentes estágios do desenvolvimento, que são as espermatogônias, os espermátócitos primários e secundários e as espermatídes, localizadas dentro das invaginações das células de Sertoli (KIERSZENBAUM, 2004).

3.2.1.1.1. Células de Sertoli

As células de Sertoli são células cilíndricas altamente especializadas, que se estendem da membrana basal até o lúmen dos túbulos seminíferos (KIERSZENBAUM, 2004; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; O'DONNELL et al., 2017). Seu perfil citoplasmático é extremamente complexo, com as membranas apical e lateral apresentando perfis irregulares que formam criptas para alojar e circundar as células germinativas, em um padrão arbóreo (KIERSZENBAUM, 2004; O'DONNELL et al., 2017). Apresentam um núcleo maior do que a maioria das células, o qual possui endentações e um grande nucléolo associado com as massas de heterocromatina (KIERSZENBAUM, 2004; SHARMA; AGARWAL, 2011) (Figura 10-A).

Cada célula de Sertoli faz contato com cinco outras células de Sertoli e, aproximadamente, 40-50 células germinativas em vários estágios de desenvolvimento e diferenciação (SHARMA; AGARWAL, 2011). No seu domínio basolateral, as células de Sertoli formam junções de oclusão entre si, originando a barreira hemato-testicular, a qual divide o epitélio seminífero em uma compartimento basal e uma compartimento adluminal (KIERSZENBAUM, 2004) (Figura 10-B).

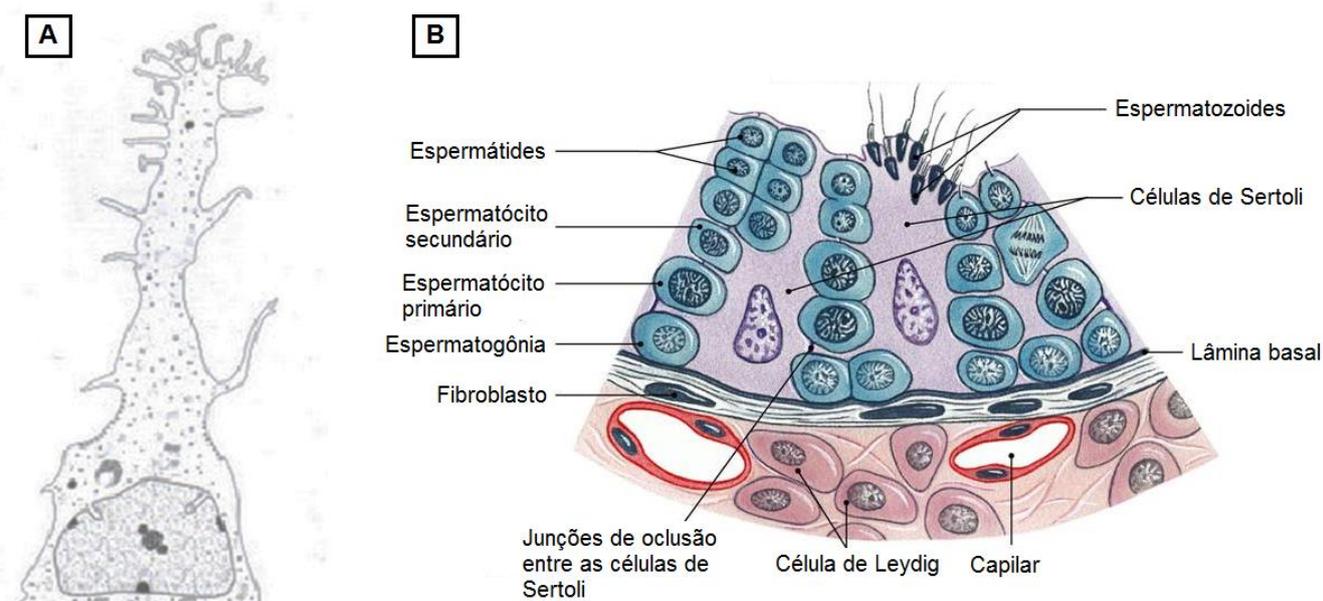


Figura 10. **A** – Arquitetura da célula se Sertoli. Notar os processos e criptas citoplasmáticas que se estendem entre as células germinativas. Fonte: França; Chiarini-Garcia (2005). **B** – Representação de um corte transversal de um túbulo seminífero, mostrando a distribuição de células germinativas ao longo do epitélio e a presença das junções de oclusão entre as células de Sertoli, formando a barreira hemato-testicular. Fonte: <https://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Reproductive.html>

A barreira hemato-testicular impede a difusão de moléculas provenientes do sangue em direção ao interior dos túbulos seminíferos (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; O'DONNELL et al., 2017). Isso assegura que as células germinativas em estágios de desenvolvimento mais avançado consigam se desenvolver em um microambiente imunologicamente privilegiado, além de garantir à célula de Sertoli o controle total e preciso das substâncias que entram no compartimento adluminal (SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; O'DONNELL et al., 2017).

Apresentam inúmeras funções, como o suporte, proteção e a nutrição das células germinativas; a compartimentalização do epitélio seminífero, promovendo um meio ambiente especializado para o desenvolvimento celular; a liberação das espermátides alongadas em fase final de desenvolvimento no lúmen tubular; a secreção de fluídos e de proteínas; a fagocitose das células germinativas degeneradas e do excesso de citoplasma remanescente dos espermatozoides liberados; a mediação da ações da testosterona, através da produção da ABP, e do FSH (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994).

3.2.1.1.2. Células germinativas e espermatogênese

Dentro dos túbulos seminíferos, as células germinativas estão dispostas em uma sequência altamente ordenada da membrana basal ao lúmen (SHARMA, 2013). As espermatogônias repousam diretamente na membrana basal, seguidas dos espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides (Figura 10-B), de maneira que a célula germinativa mais desenvolvida se mova em direção ao lúmen para sair do epitélio seminífero (SHARMA; AGARWAL, 2011; SHARMA, 2013).

As junções oclusivas separam as espermatogônias e os espermatócitos iniciais (pré-leptóteno) dentro do compartimento basal, com acesso livre às substâncias provenientes do interstício e vasos sanguíneos, enquanto que todas as células meióticas e pós-meióticas subsequentes se localizam no compartimento adluminal (SHARMA, 2013; O'DONNELL et al., 2017). Como os espermatócitos em pré-leptóteno precisam migrar do compartimento basal do túbulo para o compartimento adluminal, essas junções oclusivas abrem para que essa migração celular ocorra e, logo em seguida, se refazem abaixo dos recém-formados espermatócitos em leptóteno (O'DONNELL et al., 2017).

O processo espermatogênico envolve divisões mitóticas e meióticas, além de uma grande remodelação celular. Dessa forma, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) proliferação e diferenciação das espermatogônias, (2) meiose, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado e (3) espermiogênese, um processo complexo que transforma espermátides arredondadas pós-meióticas em espermatozoides (RUSSEL et al., 1990; SHARMA; AGARWAL, 2011; SHARMA, 2013).

Em humanos, a espermatogênese demora cerca de 64 dias no testículo (de espermatogônias para espermatozoide), com um adicional de 10-14 dias no processo de maturação epididimal do espermatozoide. Assim, todo o processo leva cerca de 74 dias para ser completado (CLERMONT, 1972). Em ratos, esse processo necessita de 48 a 52 dias (SUCKOW et al., 2006).

As espermatogônias são células espermatogênicas diploides, que se dividem por mitose para renovar a sua população, de maneira a restaurar o seu número e permitir a continuação indefinida da espermatogênese, e para formar espermatogônias comprometidas a entrar no processo de meiose (KIERSZENBAUM, 2004; SHARMA, 2013).

Em geral, dois tipos principais de espermatogônias, conhecidas como Tipo A e B, podem ser identificadas nos testículos dos mamíferos com base na sua morfologia nuclear (O'DONNELL et al., 2017). Em humanos, as espermatogônias do tipo A se dividem em tipo A escuras e tipo A pálidas, além das espermatogônias do tipo B (HELLER; CLERMONT, 1964; KRETZER et al., 1998; KIERSZENBAUM, 2004). Em roedores, são encontrados vários tipos de espermatogônias A, espermatogônias intermediárias e espermatogônias do tipo B (KRETZER et al., 1998). Este último tipo representa as espermatogônias mais diferenciadas comprometidas com a entrada na meiose, as quais perdem o contato com a membrana e dão origem aos espermátócitos primários em pré-leptóteno (KRETZER et al., 1998; SHARMA, 2013; O'DONNELL et al., 2017).

As espermatogônias não se separam completamente após a meiose, mas permanecem ligadas por pontes intercelulares, as quais persistem durante todos os estágios da espermatogênese e facilitam as interações bioquímicas que permitem o sincronismo da maturação das células germinativas (SHARMA; AGARWAL, 2011; SHARMA, 2013).

Os espermátócitos primários, as maiores células do epitélio seminífero, sofrem a meiose I (divisão reducional) para formar os espermátócitos secundários. A prófase desta primeira divisão meiótica é muito longa e, assim, o espermátócito primário tem o maior período de vida. Os espermátócitos secundários, então, rapidamente entram para a meiose II (divisão equacional), produzindo as espermátides haplóides. Os espermátócitos secundários apresentam um período de vida bem menor, de cerca de 1,1 a 1,7 dias (SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

Durante a fase meiótica, ocorre o pareamento dos cromossomos, o crossing-over e a troca genética para a determinação de um novo genoma (SHARMA, 2013). Na teoria, cada espermátócito primário produz quatro espermátides, contudo a produção real é menor porque a complexidade do processo meiótico é associada à perda de algumas células germinativas (SHARMA; AGARWAL, 2011; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

Na fase da espermiogênese, que é considerada um dos acontecimentos de diferenciação mais elaborados entre as células dos mamíferos, as espermátides arredondadas haploides passam por uma sequência de eventos citológicos complexos que as transformam em espermatozoides altamente especializados (KRETZER et al., 1998; SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015). Nesses eventos, ocorre a condensação progressiva da cromatina nuclear, para cerca de 1/10 do volume da espermátide imatura, e sua movimentação

para a periferia da célula, a inativação do genoma, a formação do acrossoma a partir do aparelho de Golgi e o desenvolvimento do flagelo (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; O'DONNELL et al., 2017).

Ao final, as espermátides fecham as suas pontes citoplasmáticas, desconectam-se do epitélio germinativo, liberam uma grande parte do seu citoplasma sob a forma de corpo residual, o qual é fagocitado pelas células de Sertoli, e entram no lúmen do túbulo como espermatozoides (KRETSEK et al., 1998; SHARMA; AGARWAL, 2011; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015). Estes espermatozoides recém-liberados são imaturos e incapazes de se mover por conta própria. Dessa forma, eles são empurrados pelo do lúmen através da secreção de fluidos pelas células de Sertoli e pela atividade contrátil rítmica das células mióides, chegando ao epidídimo, onde passam pelo estágio de maturação (KIERSZENBAUM, 2004; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

3.2.1.2. Ciclo do epitélio seminífero

No interior dos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, o arranjo das células germinativas durante a espermatogênese não ocorre de maneira aleatória, mas de modo altamente organizado para formar uma série de associações celulares ou estádios (SHARMA, 2013; O'DONNELL et al., 2017). Um estádio é um conjunto definido de gerações de células germinativas encontrado, em determinado momento, num túbulo seminífero seccionado transversalmente (CASTRO et al., 1997).

Os estádios se seguem ao longo do túbulo, e a finalização de uma série de estágios é chamada de “ciclo” (O'DONNELL et al., 2017). De acordo com LeBlond e Clermont (1952), o ciclo do epitélio seminífero é uma série de alterações em uma determinada área do túbulo seminífero que ocorrem entre dois aparecimentos sucessivos do mesmo estádio.

Existem duas metodologias principais para o estudo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero dos mamíferos: a primeira é denominada métodos da morfologia tubular e se baseia nas alterações da forma do núcleo das células espermatogênicas, na ocorrência de divisões meióticas e no arranjo das espermátides no epitélio seminífero. Este método resulta na obtenção de oito estágios do ciclo para todas as espécies, representados por números arábicos (BERNDTSON, 1977; COUROT et al., 1970; COSTA; PAULA, 2003) (Figura 11).

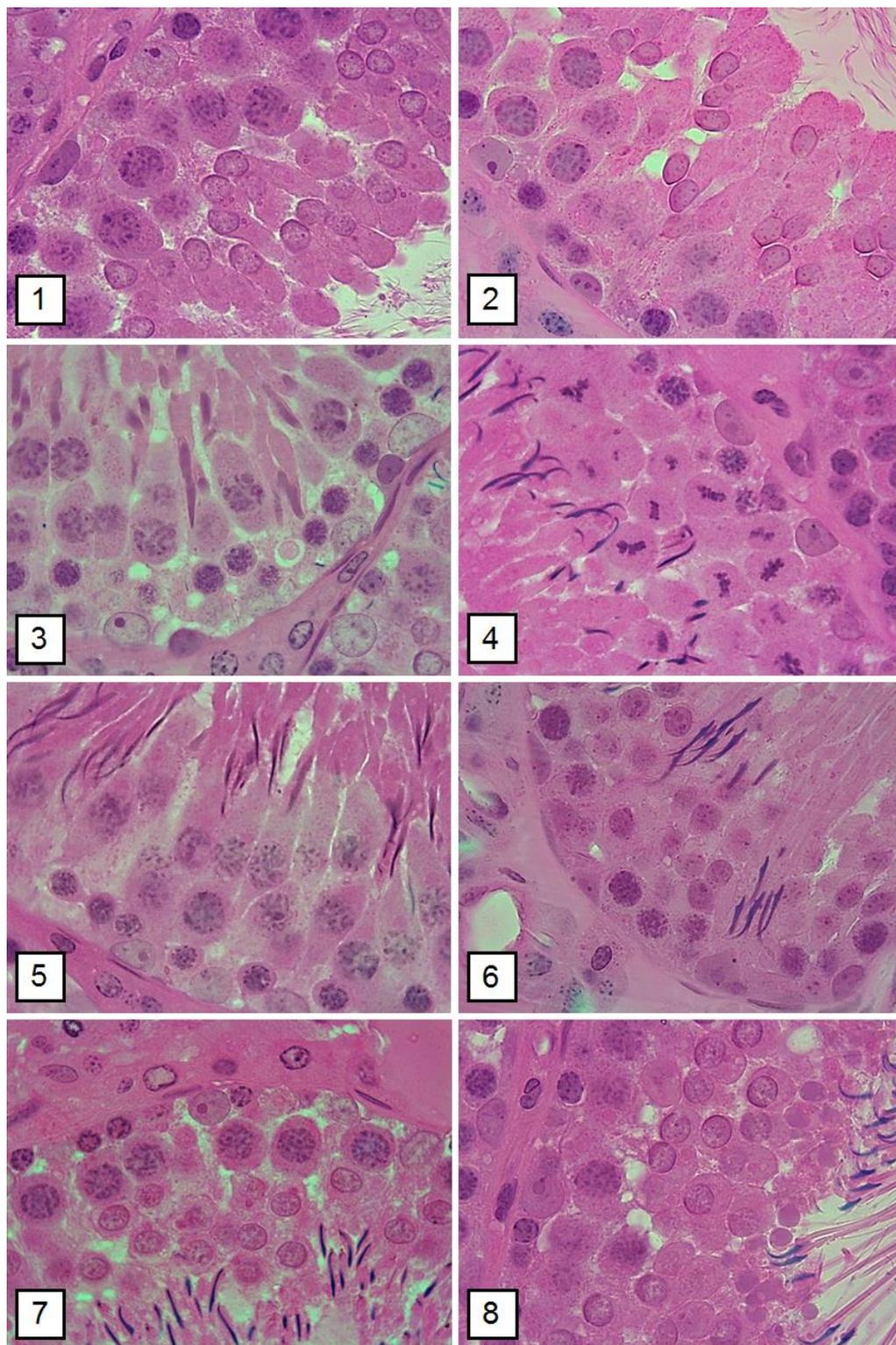


Figura 11. Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos Wistar representando os oito estágios do ciclo do epitélio seminífero seguindo o método da morfologia tubular, a qual leva em consideração o formato do núcleo das células espermatogênicas, a ocorrência de divisões meióticas e o arranjo das espermátides no epitélio germinativo. Os números nas fotos indicam os respectivos estágios. Fonte: Arquivo pessoal.

A segunda, conhecida como método do sistema acrossômico, baseia-se nas alterações acrossomais e na morfologia das espermatídes em desenvolvimento, sendo designada por números romanos. Com esse método, o número de estádios varia entre as espécies, girando em torno de 10 a 16 na maioria dos animais (RUSSELL et al., 1990; FRANÇA; RUSSELL, 1998; COSTA; PAULA, 2003) (Figuras 12 e 13). Esta classificação se baseia no fato de que apesar das características gerais da espermiogênese serem semelhantes entre as espécies, vão existir diferenças nos detalhes do desenvolvimento do acrossoma entre elas (COSTA; PAULA, 2003).

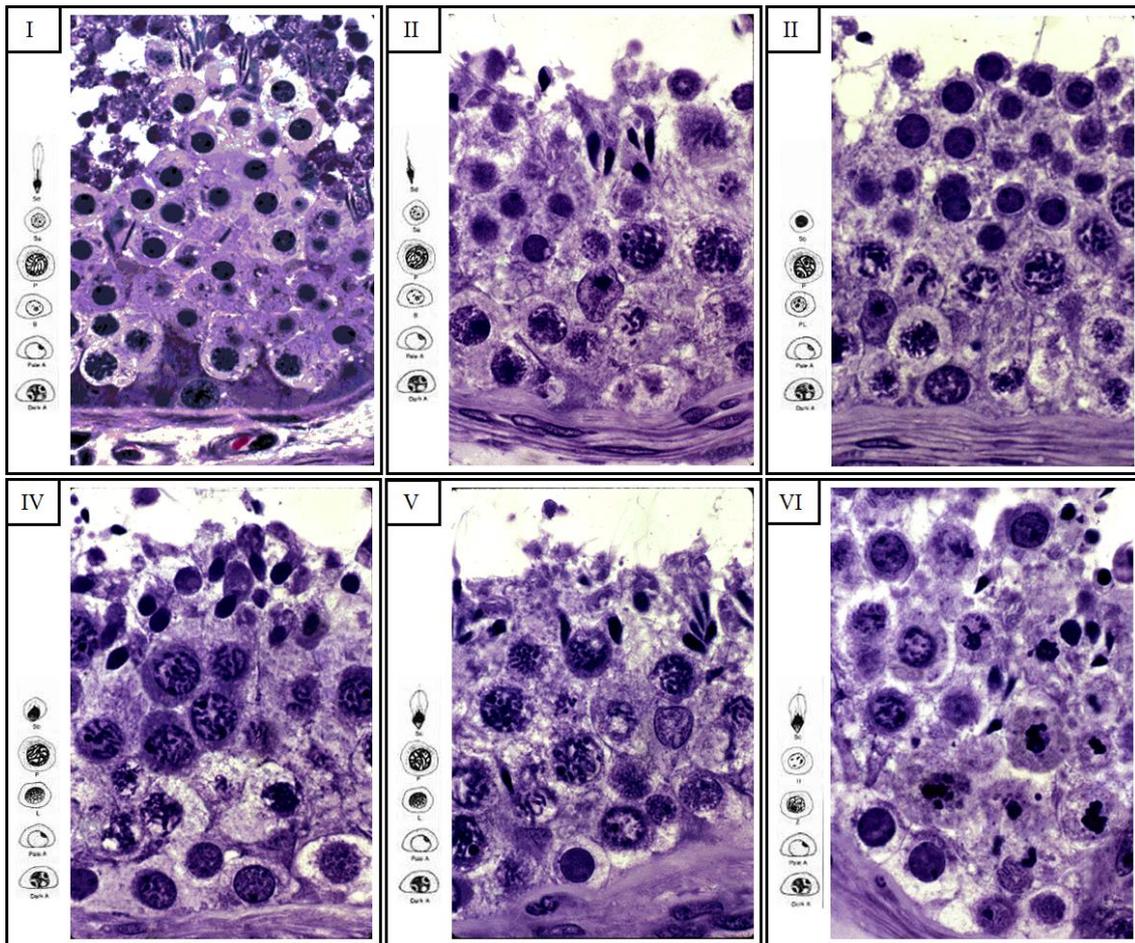


Figura 12. Estádios do ciclo do epitélio seminífero baseado no método do sistema acrossômico, indicados por números romanos. Uma região do túbulo que está ocupada por células formando o estágio I irá progredir para se tornar estágio II, estágio III e, assim, sucessivamente até o ciclo se repetir. As fotomicrografias mostram o ciclo do epitélio seminífero em humanos, apresentando seis estádios. A duração do ciclo no homem é de 16 dias, e a progressão de espermatogônias até espermatozoide leva 4,5 ciclos do epitélio seminífero. Fonte: Silber (1991) e Hess (1998).

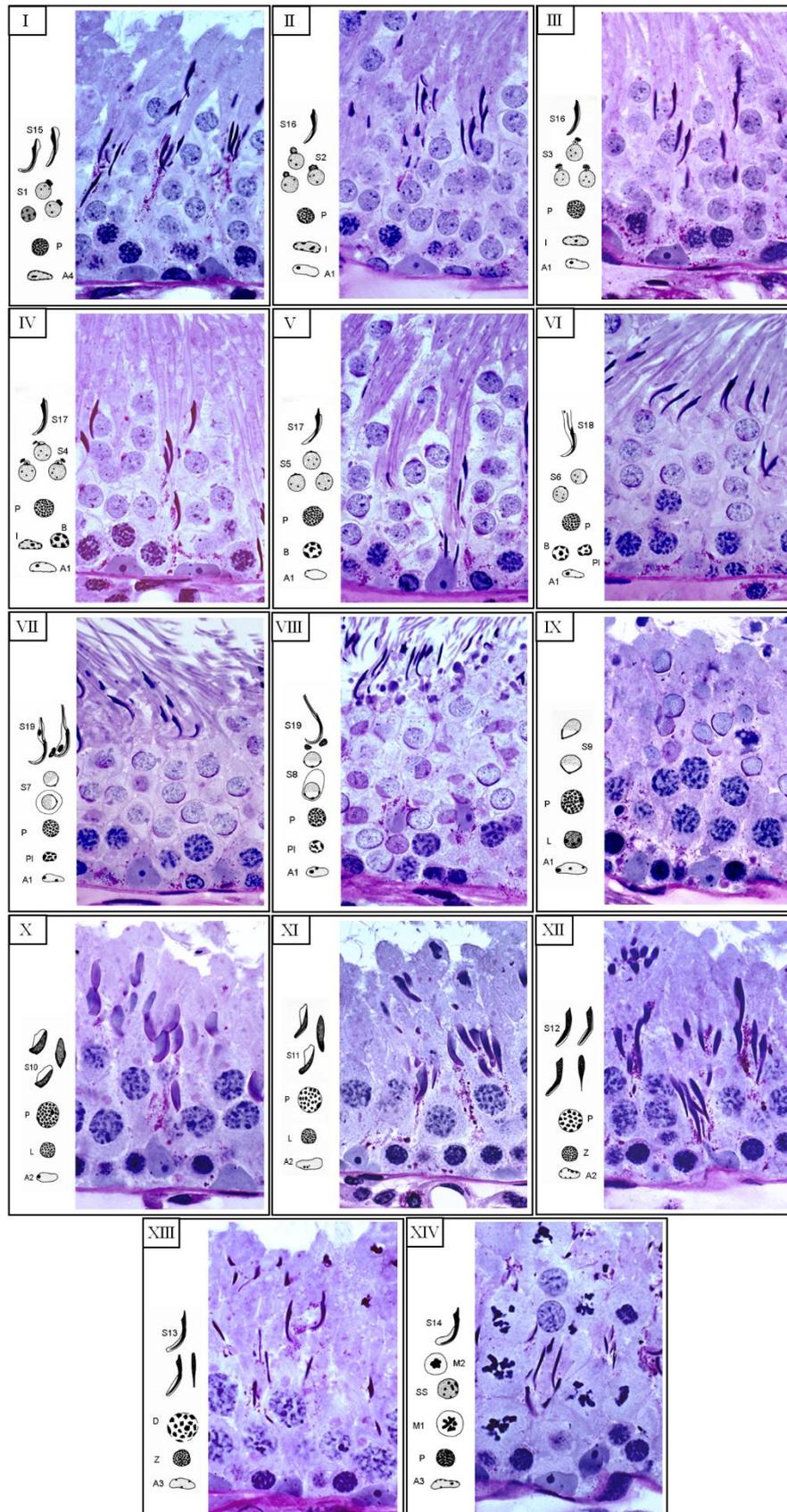


Figura 13. Estádios do ciclo do epitélio seminífero baseado no método do sistema acrossômico, indicados por números romanos. As fotomicrografias mostram o ciclo do epitélio seminífero em ratos, apresentando 14 estádios.

Uma espermatogônia A em qualquer área do epitélio seminífero progride através da meiose e da espermiogênese para se tornar um espermatozoide, e a área específica do túbulo passa por 14 estádios 4 vezes. Em cada progressão, a progênie da espermatogônias se move progressivamente em direção ao lúmen do túbulo. Fonte: Hess (1998).

Nos mamíferos domésticos, como o rato, o arranjo dos estádios é segmentado e, usualmente, ocorre somente um estágio por secção transversal de túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990). Já nos testículos humanos, as gerações de células espermatogênicas estão organizadas em um padrão espiral. Desse modo, uma secção transversal irá apresentar três ou quatro associações celulares ao invés de apenas uma única associação (KIERSZENBAUM, 2004) (Figura 14).

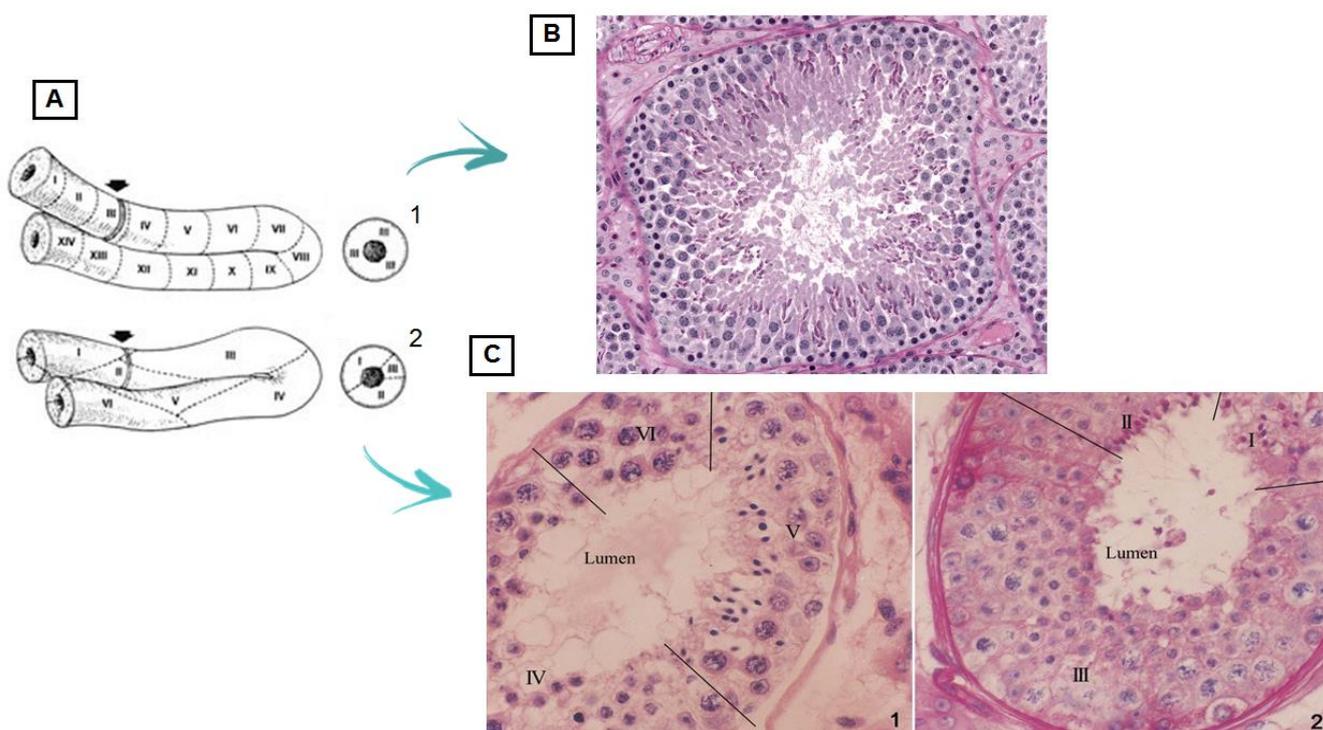


Figura 14. A - Representação dos túbulos seminíferos, mostrando a distribuição dos estádios ao longo do seu comprimento. **A.1** – Túbulo seminífero de rato, mostrando distribuição segmentada dos estádios, com apenas um estágio por secção transversal de túbulo seminífero. **A.2** – Túbulo seminífero de humano, mostrando a distribuição em espiral, com mais de um estágio por secção transversal de túbulo seminífero. Fonte: Silber, 2010. **B** – Fotomicrografia da secção transversal do túbulo seminífero de rato, mostrando um túbulo no estágio XI, baseado no método do sistema acrossômico. Fonte: https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/male_reproductive/testis/setubreten/index.htm. **C** - Fotomicrografias da secção transversal dos túbulos seminíferos de humano, mostrando a presença de diferentes estádios. **C.1** – Túbulo com estádios IV, V e VI, baseado no método do sistema acrossômico. **C.2** – Túbulo com estádios I, II e III, baseado no método do sistema acrossômico. Fonte: Zhang et al., 2004.

A duração do ciclo do epitélio seminífero é geralmente constante para uma determinada espécie, variando, no entanto, de uma espécie para a outra (AMANN, 1970; RUSSELL et al.,

1990; COSTA; PAULA, 2003). Este intervalo de tempo dura 8,9 dias no camundongo (OAKBERG, 1956); 12,9 dias no rato (CLERMONT et al., 1959; COSTA; PAULA, 2003) e 16 dias no homem (HELLER; CLERMONT, 1964; KIERSZENBAUM, 2004).

Os estádios estão sequencialmente arranjados ao longo da extensão do túbulo seminífero, ou seja, usualmente um determinado estádio está em posição adjacente a um segmento em estádio subsequente, resultando na chamada onda do epitélio seminífero (CURTIS, 1918; PEREY et al., 1961; SHARMA; AGARWAL, 2011). De acordo com Johnson (1991), as funções dessa onda são: garantir uma liberação contínua de espermatozoides; reduzir a competição por hormônios utilizados em um dado estádio; evitar a congestão ao longo do túbulo que ocorreria se a espermiogênese ocorresse de modo simultâneo; assegurar o fluxo constante de fluido do túbulo seminífero, mantendo o veículo para o transporte de espermatozoides e hormônios utilizados pelo epitélio do epidídimo; e facilitar a maturação dos espermatozoides no epidídimo por um fluxo constante dos mesmos e de fluidos vindos do testículo.

3.2.1.3. Células de Leydig

As células de Leydig são células de formato irregular e de citoplasma granular, sendo encontradas individualmente ou, mais frequentemente, em grupos no interior do tecido conjuntivo, entre os túbulos seminíferos e próximas aos vasos sanguíneos (SHARMA; AGARWAL, 2011; SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; O'DONNELL et al., 2017). Representam cerca de 5-12% do volume testicular, mas sua população varia de acordo com a espécie e a idade do indivíduo (DELLMANN e WROBEL, 1982; SHARMA; AGARWAL, 2011).

Tais células são caracterizadas morfológicamente pela grande quantidade de retículo endoplasmático liso e mitocôndria, sendo a principal fonte de testosterona, sintetizada a partir do colesterol (SETCHELL, 1991; SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015). Tal produção ocorre sob o estímulo do LH e de maneira a atuar como um feedback negativo na pituitária (SHARMA; AGARWAL, 2011). Comparado aos níveis de testosterona no sangue, a concentração intratesticular é muitas vezes maior, especialmente perto da membrana basal dos túbulos seminíferos (SHARMA, 2013).

As funções da testosterona incluem a diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa, a masculinização do cérebro e do comportamento sexual, a aquisição dos

caracteres secundários, o início e a manutenção da espermatogênese e a manutenção do comportamento sexual normal (libido) e da atividade das glândulas acessórias (SHARMA; AGARWAL, 2011; SHARPE, 1994; PELLINIEMI et.al., 1996).

Além da testosterona, as células de Leydig secretam substâncias neuroendócrinas, que servem como neurotransmissores, e fatores de crescimento para as células de Leydig vizinhas, vasos sanguíneos, lâmina própria e células de Sertoli. Além disso, as células de Leydig contribuem para a nutrição das células de Sertoli, ajudam a regular o fluxo sanguíneo na microvasculatura intertubular e, aquelas localizadas na região peritubular, influenciam na contratilidade dos miofibroblastos, regulando os movimentos peristálticos dos túbulos seminíferos e o transporte de espermatozoides (SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

3.2.2. Regulação hormonal da espermatogênese

A regulação hormonal da espermatogênese está sob o controle do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. Esse eixo começa com a liberação do GnRH pelo hipotálamo, o qual age na porção anterior da hipófise e estimula a produção de LH e FSH. O LH atua na célula de Leydig, estimulando a produção de testosterona através da conversão do colesterol. Por outro lado, o FSH age na célula de Sertoli para estimular a secreção de inibina e da ABP, além de garantir o início da espermatogênese e a maturação das células germinativas (SHARMA, 2013; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

As ações da testosterona e do FSH na espermatogênese são mediadas pelas células de Sertoli, devido à ausência de tais receptores nas células germinativas (KRETZER et al., 1998; O'DONNELL et al., 2017). Ambos os hormônios apresentam efeitos independentes nas células de Sertoli, mas também agem cooperativamente e sinergicamente para iniciar e manter a espermatogênese normal e, conjuntamente, uma boa funcionalidade da célula de Sertoli (O'DONNELL et al., 2017).

A ligação do FSH ao seu receptor na célula de Sertoli também estimula a secreção da ABP no lúmen dos túbulos seminíferos. Além disso, o FSH induz a conversão da testosterona em 5α -DHT e 17β -estradiol. A 5α -DHT é mais ativa do que a testosterona e, juntamente com o 17β -estradiol, está envolvida no desenvolvimento e nas funções do pênis, escroto, glândulas sexuais acessórias, caracteres sexuais secundários, libido e potência (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

A ABP apresenta alta afinidade por andrógenos, se ligando à 5 α -DHT e à testosterona (em menor proporção). Uma vez ligada, a ABP se move do testículo ao epidídimo, onde sua capacidade de ligação é total ou parcialmente destruída (COUROT, 1980). Através dessa ligação, a ABP permite o aumento das concentrações de 5 α -DHT e testosterona ao redor das células germinativas e dos espermatozoides, essencial para o início e a continuação do processo espermatogênico e a maturação espermática no epidídimo (COUROT, 1980; SHARMA; AGARWAL, 2011).

3.2.3. Desenvolvimento testicular

O desenvolvimento gonadal começa durante a quinta semana de gestação, em humanos, quando dois espessamentos longitudinais (as cristas gonadais) surgem de cada lado da linha média, entre o mesonefro e o mesentério dorsal. A proliferação epitelial emite os cordões sexuais primários, que logo penetram o mesênquima subjacente e que servirão de sustentáculo para as células que invadirão a gônada primitiva (MOORE e PERSAUD, 2004). Forma-se uma zona cortical e uma medular (GARCIA; GARCIA FERNANDEZ, 2003).

As células germinativas primordiais são derivadas do epiblasto e são visíveis como células grandes e esféricas no início da quarta semana entre as células endodérmicas do saco vitelino. Durante o fechamento do corpo do embrião e consequente incorporação da parte dorsal do saco vitelino, tais células migram ao longo do mesentério dorsal do intestino posterior para as cristas gonadais (MOORE e PERSAUD, 2004).

Durante a sexta semana em humanos e 13,5 dpc em ratos (ORTH, 1993), as células germinativas primordiais penetram o mesênquima subjacente e, nas cristas gonadais dos machos, são envolvidas por células somáticas de suporte (células de Sertoli), resultando na formação dos cordões seminíferos. Nestes, as células germinativas primordiais sofrem mudanças morfológicas e passam a ser denominadas “gonócitos”, os quais proliferam durante alguns dias e então atingem a fase G0/G1 do ciclo celular (MOORE e PERSAUD, 2004), permanecendo quiescentes por períodos que variam entre as espécies. Essa quiescência deve-se, provavelmente, à produção de inibidores pelas células de Sertoli (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

O aparecimento dos cordões seminíferos é o primeiro evento reconhecido em uma gônada destinada a se tornar um testículo (DESJARDINS; EWING; 1993). Esses cordões

permanecerão maciços até a puberdade, onde a luz começará a se desenvolver e resultará na diferenciação em túbulos seminíferos (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

3.2.3.1. Origem e diferenciação das células de Sertoli

A célula de Sertoli se origina a partir do epitélio celomático e é o primeiro tipo celular a se diferenciar na gônada primitiva, o que ocorre em torno de 11,5 dpc em camundongos, aos 13,5 dpc ratos e ao final da sexta semana de gestação no homem (MAGRE; JOST, 1991; FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005). Já durante este período, as interações ao nível morfológico e funcional entre as células de Sertoli e as células germinativas, entre as células de Sertoli e a membrana basal e as células de Sertoli entre si são cruciais para a formação dos cordões seminíferos e para os eventos iniciais que propiciarão o desenvolvimento da espermatogênese (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

O desenvolvimento das células de Sertoli apresenta duas fases funcionais bastantes distintas, uma de proliferação e outra de maturação. A fase de proliferação é provavelmente controlada por vários fatores, incluindo-se os hormônios hipofisários e fatores intratesticulares. Contudo, o FSH é considerado o principal fator mitogênico para estas células. Já a inibição da divisão mitótica e a promoção da maturação são estimuladas pelo T3 (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

A proliferação das células de Sertoli ocorre durante dois períodos: na vida fetal ou neonatal e no período pré-púbere. Embora na maioria das espécies a proliferação das células de Sertoli ocorra em ambos os períodos, em algumas, um pode ser mais importante do que outro. Em outras espécies, como os ratos, o período neonatal se sobrepõe ao pré-púbere, dificultando a diferenciação dessas duas fases de proliferação, que se estendem até 2 a 3 semanas após o nascimento. Por outro lado, em humanos esses períodos são separados por uma década ou mais (SHARPE et al., 2003; FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

A partir da puberdade as células de Sertoli tornam-se maduras e não se dividem mais, constituindo, assim, uma população estável dentro do túbulo seminífero (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005). Tais células apresentam capacidade de suporte de células germinativas fixa para cada espécie e, dessa forma, o número de células de Sertoli presente na maturação determina o potencial espermatogênico do testículo (HESS; FRANÇA, 2008; O'DONNELL et al., 2017).

Paralelos à maturação das células de Sertoli, também ocorrem a proliferação dos espermatócitos primários, o aparecimento das junções de oclusão, responsáveis pela formação da barreira hematotesticular, e a formação do lúmen testicular, proveniente da secreção de fluidos pelas células de Sertoli em direção ao centro dos cordões seminíferos (SHARPE et al., 2003; FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

A secreção de fluidos para formar o lúmen testicular é dependente do gradiente osmótico, ocasionando o fluxo de líquido do compartimento basal para o adluminal, o que resulta na formação de vacúolos no citoplasma das células de Sertoli que posteriormente se juntam para formar estruturas maiores, de forma semelhante a lacunas. Tal processo ocorre de maneira assíncrona no parênquima testicular, sendo possível a observação de túbulos totalmente luminados ao lado de cordões testiculares em diferentes estágios de vacuolização (MURTA et al., 2008).

3.2.3.2. Origem e desenvolvimento das células de Leydig

Nos testículos dos mamíferos, a ontogênese das células de Leydig envolve duas gerações de células morfologicamente e funcionalmente distintas (LEJEUNE et al., 1998; SIRIL-ARIYARATNE et al., 2000). A primeira geração desenvolve-se durante a vida fetal, sendo chamada de células de Leydig fetais, e é responsável pela produção da testosterona necessária para a masculinização do sistema urogenital (LEJEUNE et al., 1998). A segunda geração surge durante a puberdade, sendo predominante no testículo adulto, e seus membros são chamados de células de Leydig adultas. Tais células produzem a testosterona necessária para a o início da espermatogênese e a manutenção das funções reprodutivas do macho (BENTON et al., 1995; LEJEUNE et al., 1998; CHEN et al., 2009).

As células de Leydig fetais se diferenciam relativamente tarde durante a formação testicular, logo após a diferenciação básica dos testículos em seus componentes principais (cordão testicular e interstício). Assim, não desempenham nenhum papel na diferenciação primária da gônada (LEJEUNE et al., 1998; COLLETA e CARVALHO, 2005).

A origem das células de Leydig ainda não é clara, mas algumas delas têm sido sugeridas, como o epitélio celomático, o mesênquima do mesonefro e as células da crista neural (BENTON et al., 1995; BRENNAN et al., 2003; BARSOUM e YAO, 2010). Tais origens são questionadas devido ao papel dessas células na formação das gônadas, com o epitélio celomático sendo responsável pela formação da maior parte da crista gonadal e pelo

fornecimento de vários tipos celulares somáticos para o desenvolvimento das gônadas antes da diferenciação sexual (MERCHANT-LARIOS et al., 1993).

As células mesenquimais do mesonefro migram para a gônada durante a embriogênese e contribuem para a formação de vários tipos celulares somáticos (RODEMÉR-LENZ, 1989; BENTON et al., 1995). Contudo, a expressão de várias proteínas específicas de células neurais, como a molécula de adesão de célula neuronal (NCAM), em células de Leydig sugerem a descendência de tais células do neuroectoderma, mais especificamente na crista neural, que migram para o interior da crista gonadal (MAYERHOFER et al., 1992; MIDDENDORFF et al. 1993; MAYERHOFER et al. 1996; LEJEUNE et al., 1998; BRENNAN et al., 2003). Além disso, alguns estudos ainda sugerem um precursor comum para as células esteroideogênicas da adrenal e as células de Leydig (HATANO et al. 1996; BRENNAN et al., 2003).

As células de Leydig fetais aparecem no testículo do rato entre 14 e 14,5 dpc, estando presentes no nascimento, até a maturidade sexual (SIRIL-ARIYARATNE et al., 2000; MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001). A diferenciação morfológica e funcional (a capacidade de produzir testosterona) é atingida em 15,5 dpc (LEJEUNE et al., 1998; COLLETA e CARVALHO, 2005; CHEN et al., 2009). O processo de diferenciação e o início da produção de testosterona são independentes de gonadotrofinas, uma vez que o RNAm para o hormônio luteinizante é detectado apenas 16,5 dpc, enquanto a proteína LH é detectada aos 17 dpc. No plasma, o LH começa a ser detectado em 17,5 dpc e altos níveis plasmáticos são percebidos somente a partir de 20,5 dpc (COLLETA e CARVALHO, 2005).

Após a diferenciação inicial, em um curto espaço de tempo, a esteroideogênese testicular apresenta um aumento brusco, ao mesmo tempo em que o número de células de Leydig praticamente dobra (LEJEUNE et al., 1998; COLLETA e CARVALHO, 2005). A elevação do número dessas células se deve, quase que exclusivamente, à diferenciação das células preexistentes, uma vez que as células de Leydig fetais não apresentam atividade mitótica (LEJEUNE et al., 1998; COLLETA e CARVALHO, 2005; BARSOUM e YAO, 2010).

A presença de células de Leydig fetais no nascimento e nos períodos neonatais iniciais é necessária para o desenvolvimento adequado da função reprodutiva masculina, através da ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-testicular, essencial para a completa deiscência testicular, e a masculinização do cérebro para comportamento sexual e o padrão masculino de secreção de gonadotrofinas (SIRIL-ARIYARATNE, 2000; MENDIS-HANDAGAMA et al., 1998). Durante a terceira semana de vida pós-natal, quando a população de células de Leydig

adultas possui um número significante, as células de Leydig fetais apresentam atrofia celular (MENDIS-HANDAGAMA et al., 1998).

3.2.3.3. Células de Leydig adultas

No rato, a diferenciação das células de Leydig adultas acontece em torno da segunda semana de vida pós-natal (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001). O processo de desenvolvimento das células de Leydig adultas envolve quatro diferentes tipos celulares: as células de Leydig tronco, as células de Leydig progenitoras, as células de Leydis imaturas e as células de Leydig adultas (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001; CHEN et al., 2009).

O interstício testicular de ratos no início da vida pós-natal, aproximadamente aos sete dias, apresenta uma população de células fusiformes, as quais são células indiferenciadas semelhantes às células mesenquimais (BENTON et al., 1995; CHEN et al., 2009). Na segunda semana de vida pós-natal, um grupo de células tronco semelhante a células mesenquimais torna-se comprometido com a linhagem de células de Leydig. Os primeiros sinais de comprometimento são evidentes próximo ao 14^a dia, quando se inicia a expressão de marcadores de células de Leydig, como a atividade da 3 β -HSD e os receptores de LH (BENTON et al., 1995). Estas células positivamente marcadas são as células de Leydig progenitoras, as quais aumentam em número entre o 14^o e o 28^o dia, devido à proliferação das células semelhantes a mesenquimais (CHEN et al., 2009).

As células de Leydig progenitoras são pequenas e fusiformes, com um retículo endoplasmático liso não muito desenvolvido, localizadas na região peritubular e morfológicamente indistinguíveis das células de Leydig tronco (MENDIS-HANDAGAMA et al., 2001; CHEN et al., 2009). Contudo, são reconhecidas como membros da linhagem de células de Leydig devido à expressão de marcadores, como a enzima de clivagem de cadeia lateral P450, a 3 β -HSD, a 17 α -hidroxilase e os receptores de LH, e pela sua produção de andrógenos (BENTON et al., 1995; SIRIL-ARIYARATNE et al., 2000; (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001; CHEN et al., 2009). Tais células aumentam de tamanho gradualmente, adquirindo uma forma arredondada, perdem a sua capacidade de proliferação e movem-se para uma posição central no interstício (BENTON et al., 1995; MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001).

Ao 28º dia, as células de Leydig progenitoras além de terem sofrido as modificações descritas acima, adquirem numerosas inclusões lipídicas em seu citoplasma, originando, assim, as células de Leydig imaturas (BENTON et al., 1995; CHEN et al., 2009). Durante essa diferenciação, o retículo endoplasmático liso aumenta bastante em tamanho, apresentando uma ultra-estrutura similar àquele das células de Leydig adultas (BENTON et al., 1995; CHEN et al., 2009). À medida que o retículo se expande, a capacidade esteroidogênica é desenvolvida, com o aumento dos níveis de 3β -HSD, P450_{scc} e P450_{c17} (BENTON et al., 1995; CHEN et al., 2009). A população de células de Leydig imaturas sofre uma única divisão celular do 28º ao 56º dia, resultando em um total de aproximadamente 25 milhões de células de Leydig por testículo (BENTON et al., 1995; CHEN et al., 2009).

O passo final no desenvolvimento das células de Leydig, que ocorre aproximadamente no 56º dia, é a transformação das células imaturas em células de Leydig adultas e maduras (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001; CHEN et al., 2009). Tal transição envolve um aumento significativo no tamanho celular, um desenvolvimento no retículo endoplasmático liso, o desaparecimento das gotas lipídicas no citoplasma e uma maior acentuação nuclear (BENTON et al., 1995; MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2001; CHEN et al., 2009).

As células de Leydig adultas não apresentam capacidade proliferativa, mas são capazes de se regenerar se destruídas. Contudo, tal regeneração provavelmente é originária das células de Leydig tronco, que permanecem no testículo durante a vida adulta, desenvolvendo a mesma progressão que ocorre durante o desenvolvimento normal da população de células de Leydig adultas (BENTON et al., 1995).

Em um mamífero macho adulto, os andrógenos são necessários para a espermatogênese, a manutenção do funcionamento das glândulas sexuais acessórias, o comportamento sexual e um desempenho reprodutor bem sucedido (SIRIL-ARIYARATNE et al., 2000). Com o avançar da idade, a concentração da testosterona sérica e testicular cai progressivamente devido à redução da atividade esteroidogênica das células de Leydig (MATSUMOTO, 2002; NEVES et al., 2017). Em tais células, observam-se reduções no volume nuclear e citoplasmático, as quais podem estar relacionadas a remodelamentos da cromatina e encurtamentos dos telômeros e à hipotrofia do retículo endoplasmático liso (NEVES et al., 2017). Além disso, o declínio na concentração de testosterona está associado a alterações na composição corporal, diminuição

de energia, da força muscular e da função física, redução na função sexual e diminuição da função cognitiva (MATSUMOTO, 2002).

3.3. Estresse oxidativo

A vida aeróbica utiliza oxigênio (O_2) para oxidar os substratos alimentares (ricos em carbono e hidrogênio) com o objetivo de adquirir as energias térmica e química essenciais à vida. Quando as moléculas são oxidadas com o O_2 , este reduz-se, originando os metabólitos reativos de oxigênio (YOSHIKAWA; NAITO, 2002; TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Os metabólitos reativos de oxigênio são mais reativos que a molécula original de O_2 por apresentarem elétrons desemparelhados e pela alta tendência destes de formarem pares com outros elétrons (YOSHIKAWA; NAITO, 2002). Assim, tais moléculas são englobadas no grupo das ROS, as quais são capazes de receber ou doar elétrons para a ampla gama de moléculas biológicas (YOSHIKAWA; NAITO, 2002; TANGVARASITTICHAJ, 2015). O radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\bullet) fazem parte deste grupo e são as três ROS de maior importância fisiológica (TURNER; LYSIAK, 2008; BIRBEN et al., 2002; TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Em concentrações baixas e moderadas, as ROS desempenham importantes funções nos processos celulares fisiológicos, como um componente da resposta das células imunes à invasão microbiana e como um mensageiro intra e intercelular de sinais que incluem apoptose, expressão gênica e ativação de cascatas de sinalização celular (BIRBEN et al., 2002; HELD, 2010). Contudo, em altas concentrações, elas produzem modificações adversas aos componentes celulares, como lipídeos, proteínas e DNA (BIRBEN et al., 2002; TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Em condições fisiológicas normais, a produção das ROS no organismo é contrabalanceada pelo mecanismo de defesa celular antioxidante, que atua neutralizando a ação das mesmas (TANGVARASITTICHAJ, 2015). Além disso, as células conseguem tolerar níveis oxidativos moderados através do aumento da expressão gênica dos sistemas de defesa redutores, garantindo o equilíbrio oxidante/antioxidante (WHILLIER, 2011). Contudo, quando este aumento não pode ser atingido devido a danos às enzimas, limitação de substratos ou se a geração das ROS ocorre de maneira excessiva ou em locais anormais, o balanço entre a formação e a remoção é perdido, resultando em uma situação chamada de estresse oxidativo (BIRBEN et al., 2002; YOSHIKAWA; NAITO, 2002; WHILLIER, 2011). Esta situação pode

variar de acordo com a intensidade, as diferentes localizações celulares e ainda pode ocorrer de modo agudo ou crônico (TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Em situações de estresse oxidativo, as ROS levam à morte celular por peroxidação lipídica, oxidação dos carboidratos, das proteínas e dos ácidos nucleicos (TURNER; LYSIAK, 2008; NOORI, 2012). Dessa forma, ele contribui para o desenvolvimento dos danos patológicos associados a uma gama de doenças, incluindo câncer, desordens neurológicas, aterosclerose, hipertensão, isquemia/reperfusão, síndrome de dificuldade respiratória aguda, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e diabetes (BIRBEN et al., 2002; WHILLIER, 2011).

3.3.1. Espécies reativas de oxigênio

A maioria das ROS são produzidas como subprodutos da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, dos peroxissomos e do sistema do citocromo P450 (HELD, 2010; TANGVARASITTICHAJ, 2015). O átomo de oxigênio possui dois elétrons desemparelhados na sua camada eletrônica externa, o que o torna suscetível para a formação de radicais (HELD, 2010). A redução sequencial do oxigênio pela adição de elétrons leva à formação de um número de ROS, incluindo radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), e não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HClO), o ácido hipobromoso (HBrO) e o óxido nítrico (NO) (HELD, 2010; TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Várias enzimas podem acelerar a produção das ROS, como as ciclooxigenases (COX), xantina oxidase, sintetase de óxido nítrico (NOS), lipoxigenases e NADPH oxidases. Além disso, existem fontes externas de ROS, que incluem a utilização de algumas drogas (doxorubicina, cisplatina, acetaminofeno e nimesulida), a hiperóxia, a exposição a metais pesados (Fe, Cd, Hg, Pb, Cu, As), ao ozônio, a poluentes ambientais (óxidos de nitrogênio, SO_2 , CO_2), à radiação ionizante e à fumaça de cigarro, e infecções virais e bacterianas (BIRBEN et al., 2002; NOORI, 2012; TANGVARASITTICHAJ, 2015). Contudo, uma das principais fontes exógenas de ROS é a dieta, especialmente as gorduras animais que são ricas fontes de peróxidos lipídicos (TANGVARASITTICHAJ, 2015).

3.3.2. Defesas antioxidantes

O corpo possui diferentes mecanismos de defesa antioxidante, de origem endógena ou exógena, enzimáticos ou não, que previnem os efeitos deletérios da oxidação das ROS, o que é primordial para a garantia da vida aeróbica (HELD, 2010; WHILLIER, 2011; ULLAH et al., 2016). Um antioxidante é qualquer substância que atrasa ou previne significativamente a oxidação de um substrato através da sua ação como agente redutor. Os antioxidantes mais importantes encontrados na célula são a SOD, a catalase, a tioredoxina redutase, a vitamina C, a vitamina E, a GHS, a GST e a GPx (WHILLIER, 2011; TANGVARASITTICHAJ, 2015; ULLAH et al., 2016).

A SOD catalisa a conversão de dois ânions superóxidos em uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma de oxigênio: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (HELD, 2010). Como o ânion superóxido é uma ROS primária, produzido a partir de uma variedade de fontes, sua dismutação pela superóxido dismutase é de extrema importância para a vida celular (BIRBEN et al., 2002).

Nos peroxissomos das células eucarióticas, a catalase converte o H_2O_2 em água e oxigênio, completando, assim, a desintoxicação iniciada pela SOD: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. A glutatona peroxidase é um grupo de enzimas contendo selênio, que também catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, assim como peróxidos orgânicos em álcool (HELD, 2010).

A glutatona é o mais importantes defensor intracelular contra os efeitos deletérios das ROS (BIRBEN et al., 2002; HELD, 2010). O seu tripeptídeo linear (ácido glutâmico, cisteína e glicina) expõe um grupo sulfidril na porção da cisteína, que é o local ativo responsável pelas suas propriedades redutoras (HELD, 2010; WHILLIER, 2011).

Pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), contudo, cerca de 98% do total de glutatona nas células de humanos saudáveis existe sob a forma reduzida (GSH) (WHILLIER, 2011). Ela atua reduzindo o peróxido de hidrogênio e os peróxidos lipídicos através da ação das glutatonas peroxidases (GSH-Pxs). Estas são uma família de enzimas tetraméricas que possuem em comum um átomo de selênio na forma de selenocisteína em seu sítio ativo e usam tióis de baixo peso molecular, como a GSH, para reduzir o H_2O_2 e os peróxidos lipídicos, além de doar prótons para a membrana lipídica e protege-la dos ataques oxidantes (BIRBEN et al., 2002).

A GSH doa seu elétron para o H_2O_2 de maneira a reduzi-lo em H_2O e O_2 , o que resulta na formação da GSSG, a forma oxidada (BIRBEN et al., 2002). A enzima glutathiona redutase rapidamente a reduz de volta a GSH usando o NADPH como doador de elétrons, garantindo, assim, que as ROS não alterem a razão da concentração de GSH/GSSG (BIRBEN et al., 2002; HELD, 2010; WHILLIER, 2011). Contudo, quando a carga oxidativa na célula atinge níveis elevados, pode ocorrer uma mudança no controle da homeostase redox, resultando em danos oxidativos à célula (WHILLIER, 2011). Dessa forma, a razão GSH para GSSG é um bom indicador do estresse oxidativo celular (BIRBEN et al., 2002; HELD, 2010).

As glutathiona S-transferases (GST) são enzimas que conjugam a GSH com uma variedade de compostos eletrofílicos, como as ROS, reduzindo a sua toxicidade, além de torná-los mais hidrofílicos e facilitar a sua excreção (TREVISAN, 2008; GLESSE, 2011).

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma molécula hidrossolúvel capaz de remover as ROS no meio intracelular ou extracelular, enquanto que a vitamina E (α -tocoferol) é uma molécula lipossolúvel que apresenta papel semelhante nas membranas, sendo o principal protetor contra a peroxidação lipídica (BIRBEN et al., 2002; HELD, 2010; NOORI, 2012). Ela impede a propagação da cadeia da peroxidação através da doação de um átomo de hidrogênio do seu grupo fenil para o radical peroxila, estabilizando-o. Por sua vez, a vitamina E é convertida em um radical estável e menos reativo, improvável de atacar a membrana lipídica e perpetuar a reação em cadeia (YOSHIKAWA; NAITO, 2002).

3.3.3. Efeitos do estresse oxidativo

3.3.3.1. No DNA

As ROS podem levar a modificações no DNA de várias maneiras, envolvendo a degradação de bases, a quebra de fitas simples e duplas de DNA, mudanças na ligações das purinas, das pirimidinas e dos açúcares, mutações, deleções ou translocações e ligações cruzadas com proteínas. A maioria dessas modificações do DNA são altamente relevantes para a carcinogênese, o envelhecimento e doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e autoimunes (BIRBEN et al., 2002).

3.3.3.2. Nas proteínas

As ROS causam a fragmentação da cadeia peptídica, alteração das cargas elétricas e ligações cruzadas entre as proteínas, oxidação de aminoácidos específicos e, portanto, levam a

uma maior suscetibilidade à proteólise por degradação por proteases específicas. Os resíduos de cisteína e metionina são os mais suscetíveis à oxidação (BIRBEN et al., 2002).

3.3.3.3. Na transdução de sinais

As ROS podem induzir a expressão de vários genes envolvidos na transdução de sinais. Alterações na razão GSH/GSSG causa a ativação de fatores de transcrição sensíveis ao balanço redox, como o NF- κ B, AP-1, o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1), que são envolvidos na resposta inflamatória (BIRBEN et al., 2002; YOSHIKAWA; NAITO, 2002).

3.3.3.4. Nos lipídios da membrana

Entre os danos patológicos às macromoléculas celulares causados pelas ROS, a peroxidação lipídica é o mais prejudicial (NOORI, 2012). Isso se dá porque os produtos formados durante este processo conduzem a uma reação em cadeia de auto-propagação, e, assim, uma oxidação inicial de apenas algumas moléculas pode resultar em dano tecidual significativo (MYLONAS; KOURETAS, 1999; NOORI, 2012).

A peroxidação lipídica se inicia diante da grande suscetibilidade dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da membrana lipídica de serem atacados pelas ROS (MYLONAS; KOURETAS, 1999; HELD, 2010). Tal ataque resulta na abstração de um átomo de hidrogênio de um carbono insaturado, formando água e um radical lipídico (HELD, 2010; MARTINS, 2010; NOORI, 2012) (Figura 15). As espécies reativas que podem estar envolvidas nessa extração do hidrogênio incluem o radical hidroxila (OH), o radical hidroperoxila (HOO), o radical peroxila (LOO) e o radical alcoxila (LO) (YOSHIKAWA; NAITO, 2002).

O radical lipídico formado passa por um rearranjo molecular e origina um dieno conjugado (duas duplas ligações intercaladas com uma ligação simples). O dieno, que é um radical aquila, reage com o oxigênio molecular formando o LOO. Este, por sua vez, também é uma espécie instável que reage com outro ácido graxo livre, retirando o seu hidrogênio e gerando outro radical lipídico e um peróxido lipídico (LOOH), resultando na propagação em cadeia do processo (Figura 15). Além disso, se a peroxila reagir com uma dupla ligação da sua própria cadeia de ácido graxo, forma-se um peróxido cíclico (YOSHIKAWA; NAITO, 2002; MARTINS, 2010).

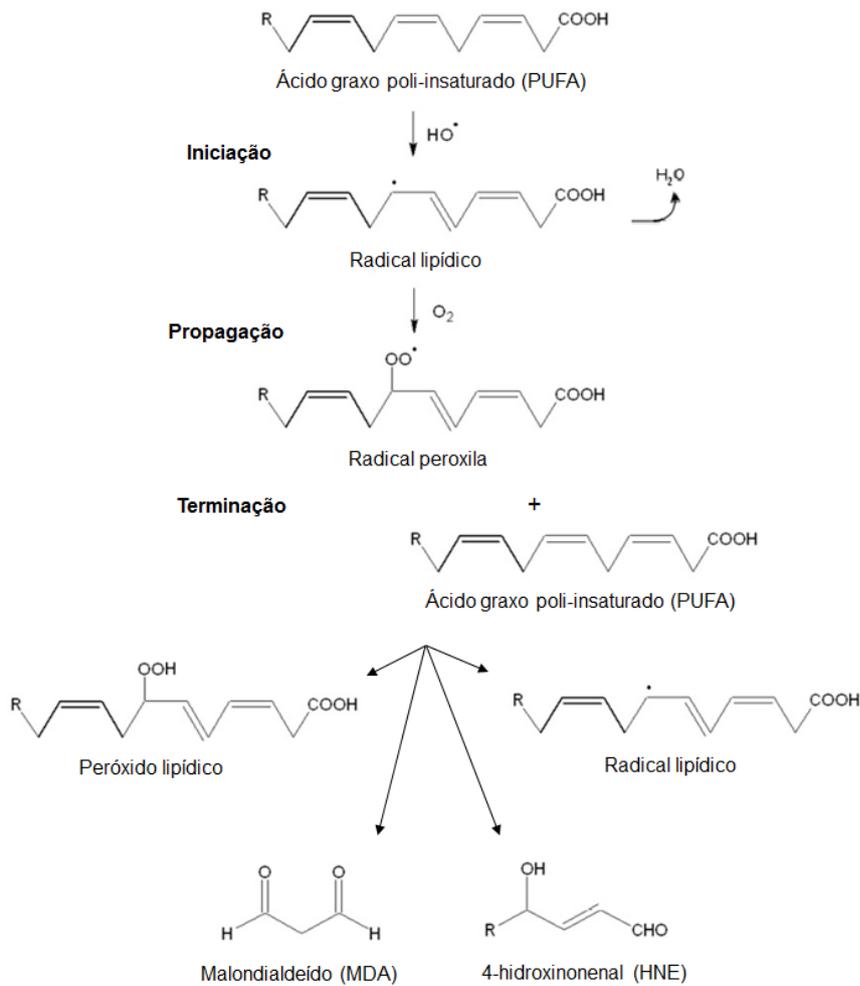


Figura 15. Passos do processo de peroxidação lipídica. Fonte: Mimica-Dukić et al. (2012) modificado.

A peroxidação lipídica altera o arranjo da bicamada lipídica da membrana, danificando e inativando os receptores, as proteínas e as enzimas associadas, além de aumentar a permeabilidade celular e, conseqüentemente, dos tecidos (BIRBEN et al., 2002, TANGVARASITTICHAI, 2015). Seus produtos finais são aldeídos insaturados reativos, como o MDA e o 4-hidroxinonenal (HNE) (Figura 15), capazes de inativar várias proteínas celulares através da formação de ligações cruzadas, além do HNE causar a redução da GSH intracelular e induzir a produção de peróxidos (BIRBEN et al., 2002). Nos últimos anos, tornou-se evidente que a peroxidação lipídica é um passo crucial na patogênese de vários estados patológicos em adultos e crianças (MYLONAS; KOURETAS, 1999).

3.3.4. Estresse oxidativo no testículo

Os altos índices de divisões celulares inerentes à espermatogênese implicam em altos níveis de consumo de oxigênio mitocondrial pelo epitélio seminífero. Como a mitocôndria é a principal fonte de ROS celular, este nível elevado de atividade implica em uma alta produção desses antioxidantes em condições fisiológicas normais (AITKEN; ROMAN, 2008). Além disso, a esteroidogênese também é responsável por grande produção de ROS, principalmente através da respiração mitocondrial e das reações catalíticas das enzimas do citocromo P450 (TURNER; LYSIAK, 2008).

Diante do grande potencial oxidativo das ROS e da ampla variedade de moléculas por elas danificadas, o estresse oxidativo no interior do testículo pode ser especialmente prejudicial, sendo considerado uma das principais causas da infertilidade masculina (AITKEN; ROMAN, 2008; TURNER; LYSIAK, 2008).

Geralmente, o efeito primário do estresse oxidativo ocorre na membrana mitocondrial, onde a associação entre fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos dos membros da família Bcl-2 é alterada, permitindo a liberação do citocromo c e a eventual ativação da cascata de caspase, o que, ultimamente, resulta na fragmentação do DNA celular. Este processo leva ao prejuízo da diferenciação das células germinativas em espermatozoides e da esteroidogênese nas células de Leydig (AITKEN; ROMAN, 2008). Além disso, ao nível do espermatozoide, o ataque das ROS pode induzir a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA, causando danos tanto à motilidade quanto à habilidade de suportar o desenvolvimento embrionário normal (AITKEN; ROMAN, 2008).

Dessa forma, a capacidade antioxidante testicular é de extrema importância, sendo necessária a presença de uma elaborada variedade de sistemas de defesa antioxidante, formados por constituintes enzimáticos e não-enzimáticos, para garantir que as funções de espermatogênese e esteroidogênese não sejam impactadas pelo estresse oxidativo (AITKEN; ROMAN, 2008; TURNER; LYSIAK, 2008).

A superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, principais enzimas antioxidantes nos mamíferos, são expressas nos testículos (TURNER; LYSIAK, 2008). No caso da SOD, o testículo apresenta, além das formas convencionais citosólicas e mitocondriais, o tipo extracelular (SOD-Ex), que é produzida, principalmente, pelas células de Sertoli e também pelas células germinativas (AITKEN; ROMAN, 2008).

Além das enzimas, os testículos dependem da ação de antioxidantes de baixo peso molecular para a sua completa proteção contra os danos oxidativos (AITKEN; ROMAN, 2008). A vitamina E é de importância vital para a manutenção do processo espermato gênico em mamíferos, estando presente em grandes concentrações nas células de Sertoli e nos espermatócitos em paquíteno, e em menor quantidade na espermatídes arredondadas. A vitamina C também contribui para suportar a espermatogênese, além de ser capaz de reduzir o α -tocoferol e manter a seu estado antioxidante ativo. O hormônio pineal melatonina também protege o testículo do estresse oxidativo, sendo capaz de atravessar a barreira hemato-testicular para proteger o epitélio germinativo (AITKEN; ROMAN, 2008).

3.3.5. Estresse oxidativo e diabetes

O estresse oxidativo é considerado um dos maiores fatores de risco para a patogênese e a progressão do diabetes (RAINS; JAIN, 2011; LAZO-DE-LA-VEJA-MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013). Vários fatores de risco comuns, como obesidade, idade avançada e hábitos alimentares não saudáveis, como a alta ingestão de ácidos graxos, contribuem para um ambiente oxidante que pode alterar a sensibilidade à insulina por aumentar a resistência ou por prejudicar a tolerância à glicose (RAINS; JAIN, 2011; LAZO-DE-LA-VEJA-MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013).

A resistência à insulina pelas ROS é ocasionada pela alteração da sua cascata de sinalização, através da indução da fosforilação da serina/treonina, de alterações na redistribuição celular de componentes da sinalização da insulina, da redução da transcrição do gene do GLUT4 ou da alteração da atividade mitocondrial (RAINS; JAIN, 2011; LAZO-DE-LA-VEJA-MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013).

Na literatura atual, existem vários estudos que indicam que pacientes diabéticos apresentam níveis mais elevados de estresse oxidativo do que pacientes saudáveis (RAINS; JAIN, 2011; LAZO-DE-LA-VEJA-MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013). A hiperglicemia, o fator comum presente no diabetes do tipo 1 e do tipo 2, é o maior contribuinte para esse aumento dos níveis de estresse oxidativo. Isso ocorre através de vários mecanismos, incluindo o aumento do fluxo da via do poliol, a auto-oxidação da glicose, o aumento da formação intracelular de produtos finais de glicação avançada, ativação da proteína quinase C ou superprodução de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (RAINS; JAIN, 2011; TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Entre estes mecanismos, a formação de substâncias derivadas do açúcar, as AGES, é de extrema importância para o desenvolvimento das complicações do diabetes. Estas são produzidas em um nível constante e baixo no organismo saudável, mas esse ritmo se torna acelerado no diabetes devido ao aumento da disponibilidade da glicose (PEPPA et al., 2003).

A glicação ocorre a partir de uma reação não enzimática em que um açúcar redutor, como a glicose, forma uma dupla ligação, através do seu grupo funcional aldeído, com os grupos amino livres das proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (PEPPA et al., 2003; WHILLIER, 2011). Seus efeitos patológicos estão relacionados à sua capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas (BARBOSA et al., 2008). Através do aumento da produção de radicais livres, da formação de ligações cruzadas entre proteínas ou de interações com receptores celulares, as AGES promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais, como na matriz celular, membrana basal e nos componentes das paredes dos vasos, e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (PEPPA et al., 2003; JAKUS; RIETBROCK, 2004; AHMED, 2005).

Além disso, a hiperglicemia característica do diabetes causa o aumento do metabolismo da glicose, resultando na superprodução de NADH e FADH₂, os quais são utilizados pela cadeia transportadora de elétrons para gerar ATP. Esta superprodução dos doadores de elétrons resulta em uma produção aumentada do radical superóxido (TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Juntamente à hiperglicemia, o excesso de lipídios na alimentação, que também está relacionado ao diabetes do tipo 2, leva ao aumento da oxidação dos ácidos graxos livres, assim como da oxidação da acetil CoA no ciclo do ácido cítrico. Isto resulta em um maior nível dos doadores de elétrons NADH e FADH₂ e, como na oxidação da glicose, na superprodução de ROS mitocondriais (TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Além do desenvolvimento do estresse oxidativo, o diabetes é associado a níveis reduzidos de antioxidantes, como a SOD, a GSH, a vitamina C e a vitamina E (RAINS; JAIN, 2011; LAZO-DE-LA-VEJA-MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013). A glicação das enzimas antioxidantes durante a hiperglicemia, como a superóxido dismutase, pode resultar na inibição da sua atividade, levando a distúrbios nos mecanismos de defesa celular, ao desenvolvimento do estresse oxidativo, à suscetibilidade dos tecidos e à progressão do diabetes (RAINS; JAIN, 2011; ULLAH et al., 2016).

3.4. Pentoxifilina

A pentoxifilina, ou 1-(5-oxohexil)-3, 7-dimetilxantina (Figura 16), é uma metilxantina derivada da teobromina, similar à cafeína e à teofilina. Ela pertence a um grupo de drogas vasoativas, as quais melhoram o fluxo sanguíneo periférico e aumentam a oxigenação periférica dos tecidos, e tem sido desenvolvida desde 1972 para o tratamento de desordens vasculares caracterizadas pela deficiência na microcirculação regional (MORAES et al., 2009; SANOFI CANADA, 2011; FEYLI et al., 2017).

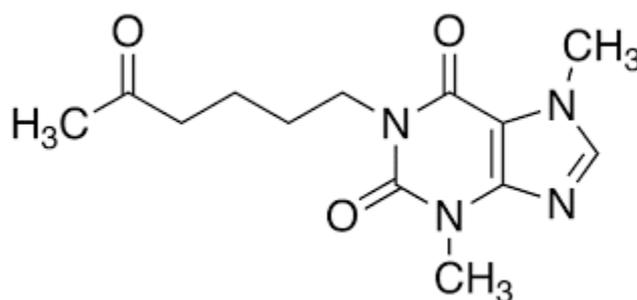


Figura 16. Representação da molécula de pentoxifilina. Fonte: <https://pharmaffiliates.com/pentoxifylline/3138/pentoxifylline-api-impurity>.

Logo no início dos estudos sobre a sua atuação, realizados no final dos anos 70, foi revelado que ela exercia efeitos terapêuticos em estruturas não-vasculares, especificamente os eritrócitos (AVIADO; PORTER, 1984). Nesta células, a pentoxifilina age de maneira a aumentar a flexibilidade celular, contribuindo para a melhora da habilidade do sangue em circular pelos vasos periféricos (AVIADO; PORTER, 1984; SANOFI CANADA, 2011).

Além disso, a pentoxifilina reduz a concentração de fibrinogênio no plasma, diminuindo a viscosidade do sangue, reduz a agregação das plaquetas e a formação de trombos e melhora a oxigenação em tecidos isquêmicos, através do aumento do ATP no interior dos glóbulos vermelhos (WARD; CLISSOLD, 1987; TAKHTFOOLADI et al., 2015).

Além de ser conhecida por suas propriedades hemorreológicas pelas ações acima citadas, a pentoxifilina é um conhecido inibidor inespecífico de fosfodiesterases (MORAES et al., 2009). As fosfodiesterases são enzimas que catalisam a hidrólise do AMPc em adenosina monofosfato (5' AMP), funcionando como moduladores da resposta celular a hormônios através do controle da concentração intracelular desse segundo mensageiro, e a sua inibição leva ao aumento nos níveis do AMPc (MAGNUSSON, 2009; MORAES et al., 2009).

O efeito do aumento dos níveis de AMP_c varia de acordo com o tipo celular. Nos leucócitos e macrófagos, ocorre a supressão da expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-12) e do TNF- α , o qual é responsável pela fragmentação do DNA e apoptose, além do estímulo à produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (MOUSTAFA; FELDMAN, 2014).

Além disso, a pentoxifilina exerce a sua atividade anti-inflamatória de maneira a inibir a cascata do complemento e reduzir a ativação celular, a fagocitose e a adesão endotelial (DÁVILA-ESQUEDA; MARTÍNEZ-MORALES, 2004; TAKHTFOOLADI et al., 2015; NOURI et al., 2016). Outra função está presente através do seu papel antioxidante, onde ela atua reduzindo a produção de superóxidos, combatendo as ROS e reduzindo a peroxidação lipídica, a qual está associada a lesões nas membranas e à apoptose (MAXWELL et al., 2002; QUEIROZ et al., 2013).

3.4.1. Atuação na reprodução

Na área da reprodução, a pentoxifilina é utilizada para o tratamento de infertilidade masculina através da reprodução humana assistida (MATSON et al., 1995; TOURNAYE et al., 1995; GUASTI et al., 2013). Graças a sua ação inibidora de fosfodiesterase, há uma elevação nos níveis intracelulares de AMP_c, o que resulta no aumento da fosforilação da tirosina na cauda do espermatozoide, melhorando a sua motilidade, e no estímulo à capacidade de fertilização do espermatozoide, visto que o sistema de segundo mensageiro do AMP_c atua na reação acrossômica (DE JONGE et al., 1991; YOVICH et al., 1993; CALOGERO et al., 1998; YUNES et al., 2005; ESTEVES et al., 2007).

Além disso, a pentoxifilina auxilia na preservação da integridade da membrana plasmática e do DNA do espermatozoide, através da redução da peroxidação lipídica e das ROS (PONCE et al., 1999; GUASTI et al., 2013; NOURI et al., 2016).

4. Material e métodos

4.1. Grupos experimentais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (n = 25) aos 30 dias de idade, inicialmente divididas em dois grupos experimentais: Grupo Hiperlipídico (n = 20, alimentados com a dieta hiperlipídica) e Grupo Controle (n = 5, alimentadas com a dieta controle). Ambas as dietas foram preparadas de acordo com as recomendações da American Institute of Nutrition (AIN) e fornecidas *ad libitum* às fêmeas durante todo o período experimental. Os ingredientes e a composição de cada uma estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas utilizadas durante o período experimental (FRANCO et al., 2009).

Constituintes	Dieta Hiperlipídica (g/kg)	Dieta Controle (g/kg)
Amido	509,48	579,48
Caseína	200	200
Sacarose	100	100
Mix mineral	35	35
Mix vitamínico	10	10
L-Cistina	3	3
Colina	2,5	2,5
Butil-hidroxi-tolueno	0,014	0,014
Óleo de soja	140	70

Aos 60 dias de idade, o grupo hiperlipídico recebeu uma injeção intraperitoneal de 35 mg/kg de estreptozotocina dissolvida em 0,1 M de tampão citrato, pH 4,5. Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento, mas apenas o tampão citrato foi injetado. Aos 7 e 15 dias após a aplicação da estreptozotocina, a glicemia foi mensurada e, apenas os animais com valores acima de 126 mg/dl (MADHU et al., 2014) foram selecionados para o estudo. A partir de então, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais e foram iniciados os tratamentos com a metformina (500 mg/kg em água destilada) (LEMOS et al., 2014) e a pentoxifilina (100 mg/kg em água destilada) (ZAKARIA; AL-BUSADAH, 2015) uma vez ao dia via gavagem, de acordo com a seguinte divisão:

- **Grupo Controle (GC)** (n = 5), fêmeas alimentadas com a dieta controle.
- **Grupo Hiperlipídico-Diabético (GHD)** (n = 5), fêmeas alimentadas com a dieta hiperlipídica e induzidas ao diabetes do tipo 2.
- **Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina (GHDM)** (n = 5), fêmeas alimentadas com a dieta hiperlipídica, induzidas ao diabetes do tipo 2 e tratadas com a metformina.

- **Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina (GHDP)** (n = 5), fêmeas alimentadas com a dieta hiperlipídica, induzidas ao diabetes do tipo 2 e tratadas com a pentoxifilina.
- **Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina (GHDMP)** (n = 5), fêmeas alimentadas com a dieta hiperlipídica, induzidas ao diabetes do tipo 2 e tratadas com a metformina e a pentoxifilina.

Os animais dos GC e GHD receberam doses diárias de 1 ml de água destilada via gavagem, de maneira a repetir o estresse das aplicações das drogas. Os grupos tratados foram pesados semanalmente para acompanhamento e cálculo das doses da metformina e pentoxifilina. Aos 90 dias de idade, as fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para cada três fêmeas. A prenhez foi confirmada pela detecção do espermatozoide no esfregaço vaginal e esse dia foi considerado como o dia 0 da gestação.

Um dia após o nascimento, as proles experimentais foram ajustadas para o número de 6 filhotes por fêmeas (incluindo machos e fêmeas), por esse número oferecer o maior potencial lactogênico às progenitoras (FISHBECK; RASMUSSEN, 1987; TEIXEIRA et al., 2007). Os neonatos foram deixados com a mãe até os 21 dias de idade, quando ocorreu o desmame. A Figura 17 mostra uma representação do fornecimento de dietas e aplicação das drogas às fêmeas ao longo do experimento.

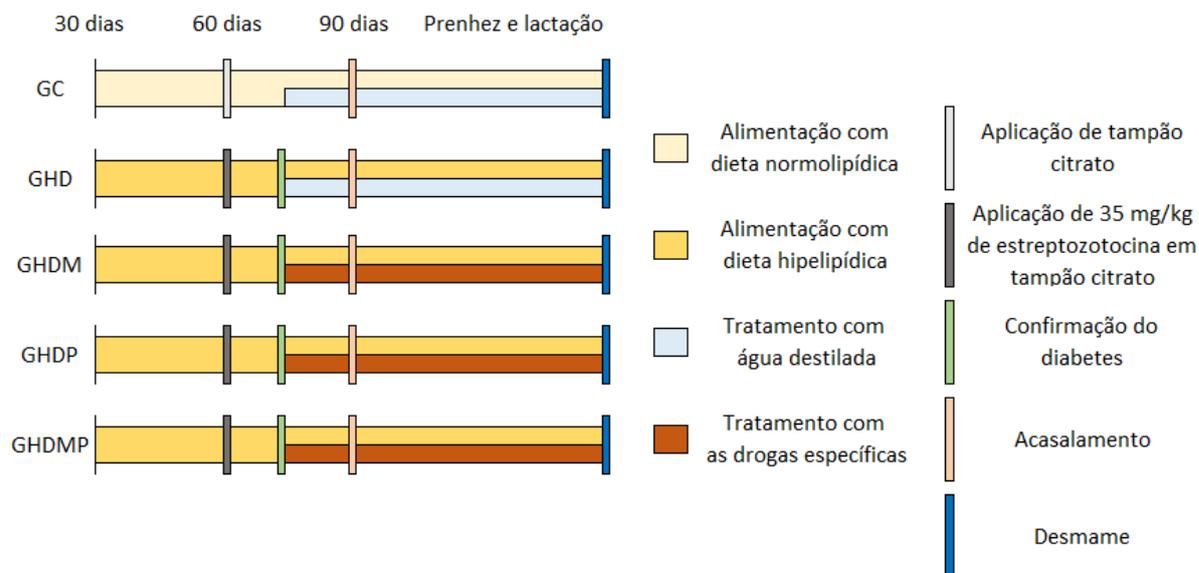


Figura 17. Representação do design experimental aplicado aos cinco grupos de fêmeas de ratos Wistar. As fêmeas iniciaram a ingestão das dietas aos 30 dias de vida, a qual continuou durante todo o período experimental de tais animais. Aos 60 dias, os grupos receberam uma injeção intraperitoneal contendo tampão citrato (0,1 M; pH 4,5) (Grupo Controle) ou 35 mg/kg de estreptozotocina em tampão citrato (demais grupos experimentais, como parte

da indução do diabetes mellitus do tipo 2). 15 dias após tal aplicação, ocorreu a confirmação do diabetes e o início do tratamento com as respectivas drogas (metformina – 500 mg/kg; pentoxifilina – 100 mg/kg). Aos 90 dias de idades, as fêmeas foram acasaladas, e o fornecimento das dietas e o tratamento com as drogas continuaram durante prenhez e lactação, até o desmame, 21 dias após o nascimento das proles experimentais.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha e limpas diariamente, com acesso *ad libitum* à água, no interior do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. Neste, atuou um ciclo de luz de 12h/12h (luz das 6:00 às 18:00) e a temperatura era controlada na faixa de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Dentro das gaiolas, os animais foram distribuídos com número máximo de três, com exceção das fêmeas prenhes e lactantes, as quais foram deixadas sozinhas com sua prole. Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA – UFRPE; Processo: 23082.015702/2016-04; Licença: 106/2016) (Apêndice 9.1).

4.2. Procedimentos de eutanásia e coleta de órgãos

Ao total, foram utilizados 16 machos, provenientes das proles experimentais, para cada grupo. No dia do desmame, após jejum de 12 h, oito machos de cada grupo foram submetidos aos procedimentos de eutanásia. Para tal, os animais foram pesados e anestesiadas de modo intraperitoneal com quetamina (80 mg/kg) associada à xilazina (15 mg/kg) na mesma seringa (FANTONI e CORTOPASSI, 1994), seguida de aprofundamento anestésico com tiopental (100 mg/kg). A seguir, diante da falta de resposta à dor e ao reflexo corneano, os animais foram afixados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica. Os testículos foram retirados, pesados e fixados por imersão em glutaraldeído 4% (em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2) e direcionados para processamento histológico.

Os animais machos restantes (8 animais por grupo) deram continuidade ao experimento, sendo alimentados com a dieta normolipídica padrão do biotério (*Labina*[®], *Purina*) até os 90 dias de vida. Os pesos corporais e glicemias de jejum foram mensuradas a cada 10 dias até a eutanásia dos animais.

Aos 90 dias de idade, também após jejum de 12 h, as proles experimentais foram pesadas e anestesiadas da mesma maneira explicada acima. A seguir, os animais foram afixados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica, foi feita uma incisão ventral para expor a cavidade torácica

e, conseqüentemente, o coração. Fragmentos teciduais de testículo foram coletados, pesados e armazenados em tubos Falcon contendo tampão Tris-HCl (pH 7,4) à -20°C.

A seguir, um gelco foi inserido no ventrículo esquerdo e o átrio direito foi seccionado a fim de manter um fluxo contínuo de perfusão. O processo iniciou-se com a lavagem do leito vascular com solução salina 0,9% por 90 segundos, sendo, após este período, substituída pelo fixador (glutaraldeído 4%, pH 7,2), que permaneceu até ser observado o enrijecimento dos testículos, indicando macroscopicamente a fixação. Uma vez fixado, os testículos foram coletados, pesados, pós-fixados por imersão em solução de glutaraldeído 4% (em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2), e direcionados para processamento histológico em resina.

4.3. Mensuração da glicemia de jejum

Ao longo de todo o experimento, os animais, incluindo mães e proles, tiveram as suas glicemias de jejum mensuradas uma vez por semana através da utilização de tiras reativas analisadas em glicosímetros (Accu Check Active - Roche) com limites de detecção de 10-600mg/dL. Para as mães, eram realizadas duas dosagens em tempos distintos, uma imediatamente antes da aplicação da droga e outra 2 h depois da aplicação, afim de observar a ação do medicamento na concentração de glicose sanguínea.

4.4. Cálculo do índice gonadossomático (IGS)

O índice gonadossomático ($IGS = [\text{peso líquido testicular} / \text{peso corporal}] \times 100$) foi calculado a partir dos pesos obtidos no dia da eutanásia (OLIVEIRA et al., 2015). O peso testicular líquido para os animais aos 21 dias foi obtido subtraindo 9,2 % do peso testicular bruto, correspondente à albugínea, enquanto que para os adultos, foi subtraído um valor de 6,5 % (RUSSELL; FRANÇA, 1995).

4.5. Processamento histológico do testículo

Os testículos fixados foram fragmentados, desidratados em série crescentes de álcool etílico e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato, segundo técnica rotineira. Posteriormente, foram seccionados em micrótomo de maneira semi-seriada para obtenção de cortes histológicos com 4 µm de espessura, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina-

floxina. Após coloração, os cortes foram montados e analisados em microscópio de campo claro, com aumentos totais de 100x a 1000x.

4.6. Morfometria testicular aos 21 dias

O diâmetro dos túbulos em formação foi calculado através da medição do perfil transversal de 15 túbulos diferentes, escolhidos aleatoriamente, sendo completamente circulares ou os mais circulares possíveis. As 15 secções foram obtidas utilizando-se um sistema de captura de imagem acoplado a um microscópio óptico Olympus BX-51 (Tóquio, Japão). Cada valor encontrado foi o resultado da média de duas medidas diametralmente opostas utilizando-se o programa Image J para Windows (OLIVEIRA et al., 2017).

As proporções volumétricas entre os diferentes componentes do parênquima testicular foram estimadas utilizando-se 15 fotos de campos escolhidos aleatoriamente, em aumento total de 400x, que foram obtidas utilizando-se o mesmo sistema de captura citado acima. Em cada foto, foram sobrepostos 432 pontos (24 linhas e 18 colunas), utilizando o mesmo programa citado acima, perfazendo um total de 6480 pontos por animal (TENORIO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTS) por testículo, expresso em metros, foi obtido a partir do volume ocupado pelos túbulos seminíferos (VTS) no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI, 1974): $CTS = VTS / \pi R^2$, onde πR^2 é a área da secção transversal de túbulo seminífero e $R = \text{diâmetro tubular} / 2$. O VTS (mL) foi estimado a partir do conhecimento do volume líquido do testículo. Como a densidade do testículo é igual a 1,04 g/mL (densidade = massa/volume) (FRANÇA, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. O comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo corresponde à razão entre o comprimento tubular total e o peso líquido do testículo.

O número de células de Sertoli por secção transversal foi obtido através da análise de 10 túbulos por animal. Tal resultado foi corrigido para o diâmetro nuclear e a espessura do corte histológico. Esta correção foi realizada utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962), conforme segue:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{\text{DM}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{DM}}{4}\right)^2}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média dos diâmetros de 10 núcleos de células de Sertoli para cada animal dos grupos experimentais. Imagens dos 10 núcleos foram captadas e cada medida constou da média de duas medições diametralmente opostas. A população foi o resultado da multiplicação do número corrigido pelo comprimento total dos túbulos seminíferos (μm) e dividido pela espessura do corte.

4.7. Morfometria testicular aos 90 dias

O diâmetro dos túbulos seminíferos foi calculado da mesma forma que foi descrita para os animais aos 21 dias. A altura do epitélio seminífero e o diâmetro do lúmen foram medidos através do perfil transversal dos mesmo 15 túbulos utilizados para o diâmetro. Cada medida foi resultante da média obtida de duas medidas diametralmente opostas (OLIVEIRA et al., 2017)

As proporções volumétricas dos compartimentos testiculares e o comprimento total dos túbulos seminíferos foram calculados da mesma maneira explicada para os animais de 21 dias de idade.

A partir de 10 tubúlos redondos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, foram contados o número de espermatogônias, nucléolos de células de Sertoli, espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, espermatócitos primários em paquíteno e espermatídes arredondadas. A contagem obtida para cada tipo de célula germinativa foi corrigida para o diâmetro nuclear médio e a espessura do corte, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962). Pelo fato de as células de Sertoli maduras apresentarem núcleo irregular, a correção do número das mesmas foi feita a partir do diâmetro nucleolar médio. Neste caso, comente núcleos com nucléolos evidentes contados (RODRIGUES, 2010). A seguinte fórmula foi utilizada para a obtenção do número corrigido:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{\text{DM}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{DM}}{4}\right)^2}}$$

A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Oliveira et al. (2017): $PEd = N^{\circ}$ Total de células de Sertoli por testículo x a proporção de espermátides redondas no estágio VII x estágio VII com frequência relativa / duração do estágio (dias).

O volume nuclear das células de Leydig foi obtido através da medição do diâmetro nuclear de 50 células por animal e da utilização da fórmula do volume da esfera, $4/3\pi R^3$. A proporção volumétrica núcleo/citoplasma de tais células foi obtida através da contagem de 1000 pontos sobre o citoplasma e núcleo, utilizando-se um retículo com 441 intersecções sob o aumento de 1000x (SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). A partir dessa proporção foi calculado o volume citoplasmático e o volume celular:

Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig por testículo, foi obtido o número total destas células por testículo. A divisão desse valor pelo peso líquido do testículo forneceu o número de células de Leydig por grama de testículo.

4.8. Análises histopatológicas

As análises histopatológicas para ambas as idades foram realizadas através de observações de cortes histológicos, utilizando microscópio óptico Olympus BX-51 (Tóquio, Japão), seguindo a metodologia de Silva Junior et al. (2006) e Tenorio et al. (2011).

4.9. Análises de estresse oxidativo

As amostras testiculares congeladas foram homogeneizadas em tampão de fosfato de potássio (pH 7,4; 0,2M), contendo EDTA 1M, utilizando um homogeneizador (OMNI) e centrifugadas (13.800 g a 4 °C durante 10 min). O sobrenadante foi utilizado para dosagens das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), o marcador de estresse oxidativo malondialdeído (MDA) e níveis de proteína total. Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas por duplicado usando um

espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A atividade da SOD foi mensurada através do protocolo de Siddiqui et al. (2005). A atividade da CAT foi determinada pela taxa de queda da absorbância, em 60 segundos, do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a atividade da GST foi mensurada através da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (AEBI, 1984). Os níveis de malondialdeído (MDA) foram determinados utilizando-se solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO) (WALLIN et al., 1993). A concentração de proteína total das amostras foi mensurada utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão (LOWRY et al., 1951).

4.10. Análise estatística

Todos os dados tiveram a sua normalidade testada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Aqueles que passaram no teste foram analisados pela ANOVA, seguida do pós-hoc de Tukey. Os dados que falharam no teste de normalidade, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunn. As análises foram feitas utilizando o programa Sigmastat para Windows (Versão 3.10). Eles foram representados por média e desvio padrão, sendo $p < 0.05$ considerado significativo.

5. Resultados

5.1. Glicemias de jejum das fêmeas

As concentrações da glicose de jejum das fêmeas ao longo do experimento indicaram que, antes da aplicação das drogas, todos os grupos induzidos ao diabetes do tipo 2 apresentavam valores significativamente maiores do que o grupo Controle ($p = 0,004$). Duas horas após a aplicação das drogas, os animais dos GHDM e GHDMP, os quais receberam tratamentos com a metformina, obtiveram redução estatística com relação aos valores anteriores ($p = 0,022$ e $p = 0,025$, respectivamente), e não mais diferiram das concentrações encontradas para os animais controles (Figura 18).

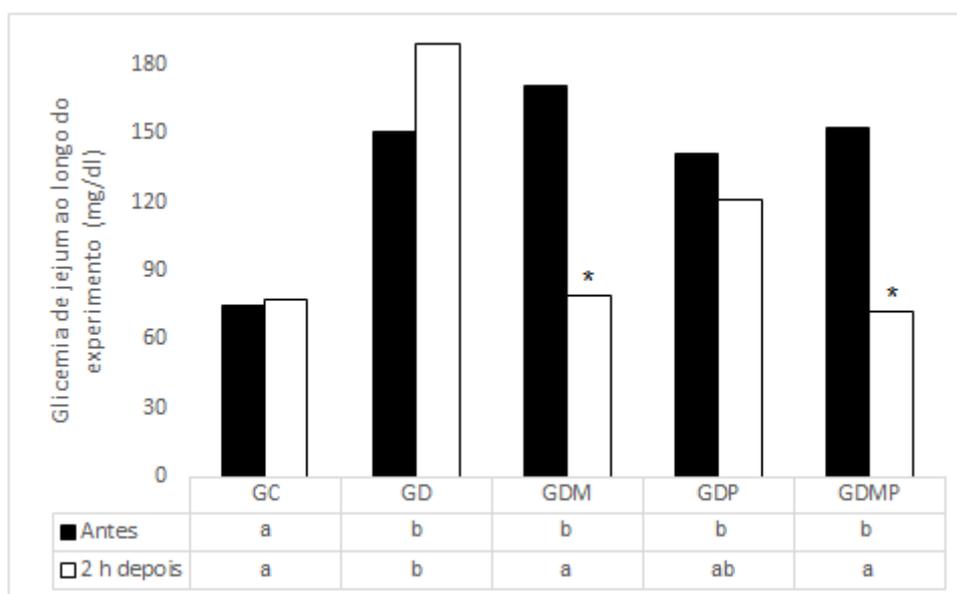


Figura 18. Concentração de glicose sanguínea de jejum (mg/dl) de fêmeas induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, medidas imediatamente antes e 2 h depois da aplicação do tratamento específico de cada grupo. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Asteriscos indicam diferença estatística dentro de um mesmo grupo (antes e 2 h depois), letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos, ambos para $p < 0,005$.

5.2. Animais pré-púberes

5.2.1. Pesos e glicemia

Para o peso corporal de nascimento da prole, pode-se observar na Figura 19 que não houve diferença estatísticas dos grupos em relação ao GC.

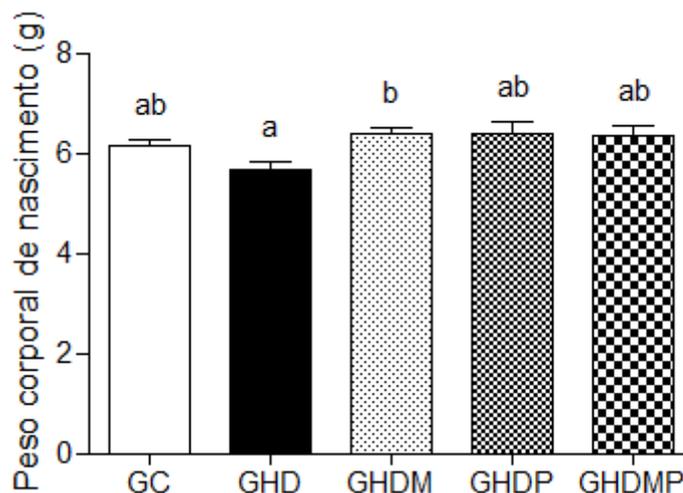


Figura 19. Valores de peso corporal no dia do nascimento de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepzotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Aos 21 dias, todas as proles experimentais provenientes de fêmeas induzidas ao diabetes do tipo 2 apresentaram valores reduzidos de peso corporal, diferindo estatisticamente quando comparados ao GC (Figura 20-A). Para o peso testicular, houve redução significativa para os GHD e GHDM em relação ao grupo controle. Os grupos tratados com a pentoxifilina apresentaram valores intermediários, mas não diferiram do GC (Figura 20-B). Por outro lado, o IGS não diferiu entre nenhum dos grupos (Figura 20-C).

Os valores de glicemia aos 21 dias mensurados para o GHD foram elevados, estatisticamente maiores do que os demais grupos (Figura 20-D).

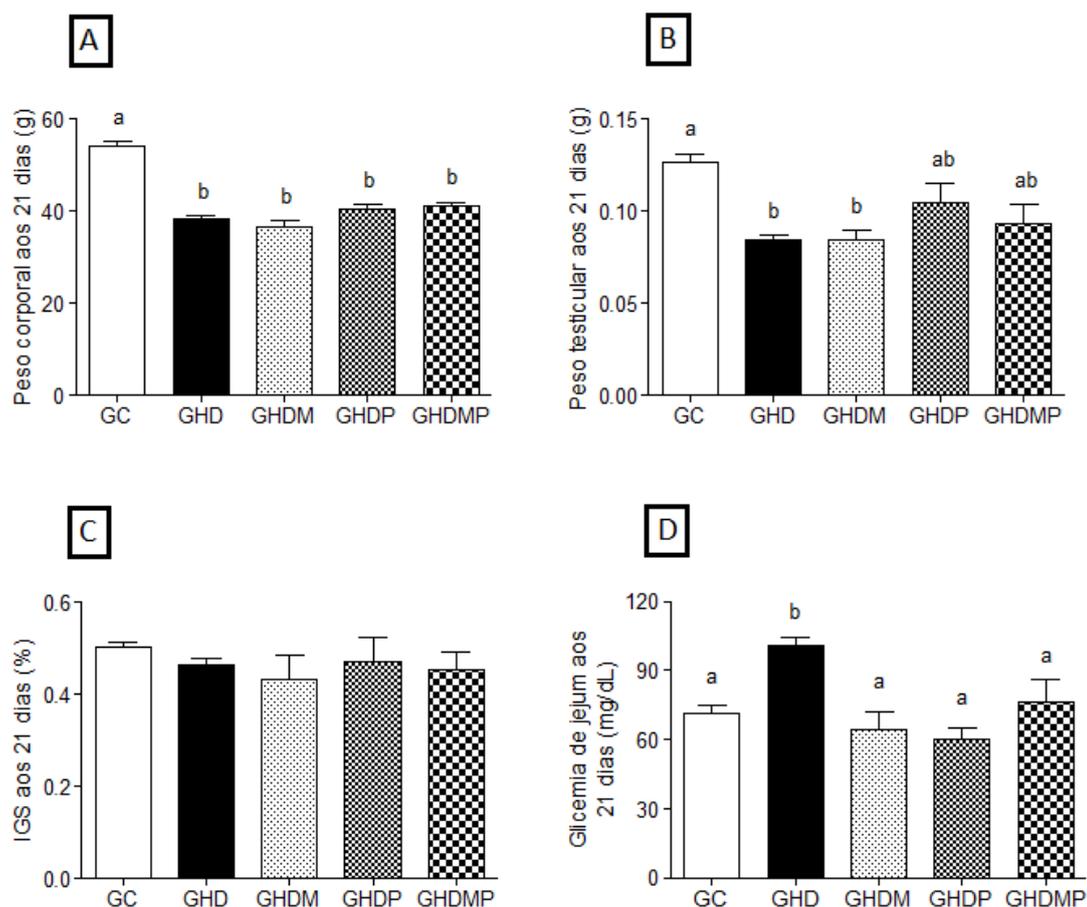


Figura 20. Valores de peso corporal (A), peso testicular (B), índice gonadosomático (IGS) (C) e glicemia de jejum (D) aos 21 dias de idade de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.2.2. Histomorfometria testicular

Na Figura 21 está representado o parênquima testicular de todos os grupos experimentais. De maneira geral, constataram-se alterações histopatológicas no epitélio seminífero, como vacuolização do citoplasma das células de Sertoli e degeneração das células germinativas. Contudo, no grupo controle, tais alterações foram observadas em uma intensidade bastante menor, como mostrado nas Figura 21-A e B. Para os demais grupos, principalmente para o grupo proveniente de fêmeas diabéticas sem tratamento, estas eram frequentemente encontradas, e em maior intensidade dentro de um mesmo túbulo seminífero. Além disso, no grupo GHD, pôde-se observar uma expressão clássica do diabetes no parênquima testicular, o espessamento da túnica própria (Figura 21-C).

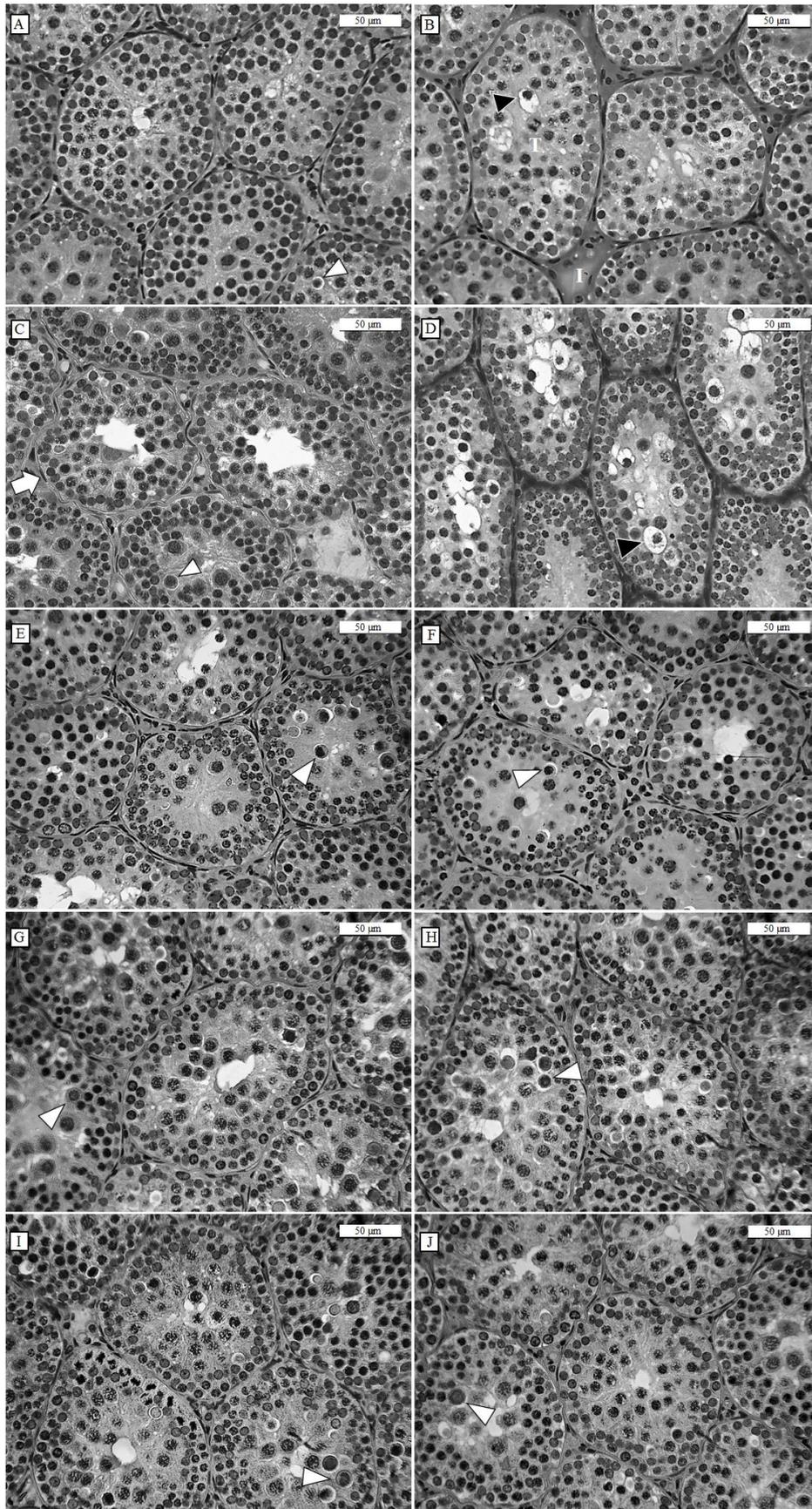


Figura 21. Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos aos 21 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a

metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. A e B – Grupo Controle, C e D – Grupo Hiperlipídico-Diabético, E e F – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina; G e H – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, I e J – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Observa-se uma maior quantidade de alterações histopatológicas nos grupos provenientes de fêmeas diabéticas, principalmente para os animais sem tratamentos. As alterações são indicadas por: cabeças de setas brancas – degeneração celular; cabeças de setas pretas – vacuolização do citoplasma das células de Sertoli; seta branca – espessamento da túnica própria. Na foto B, a letra T indica o compartimento tubular e o I aponta o compartimento intertubular.

Através do gráfico da Figura 22-B é possível constatar que a proporção (%) de túnica própria no parênquima testicular dos animais do GHD e do GHDM foi estatisticamente maior do que a do GC. Contudo, os grupos que receberam a pentoxifilina tiveram reduções significativas em relação ao GHD ($p = 0,011$) e seus valores foram estatisticamente semelhantes ao GC.

Para túbulo e intertúbulo (Figuras 22-A e C), os GC, GHDP e o GHDMP diferiram estatisticamente do GHD ($p < 0,001$). No espaço tubular, a pentoxifilina atuou de maneira a aumentar a sua proporção, enquanto que o compartimento intertubular apresentou resultado contrário.

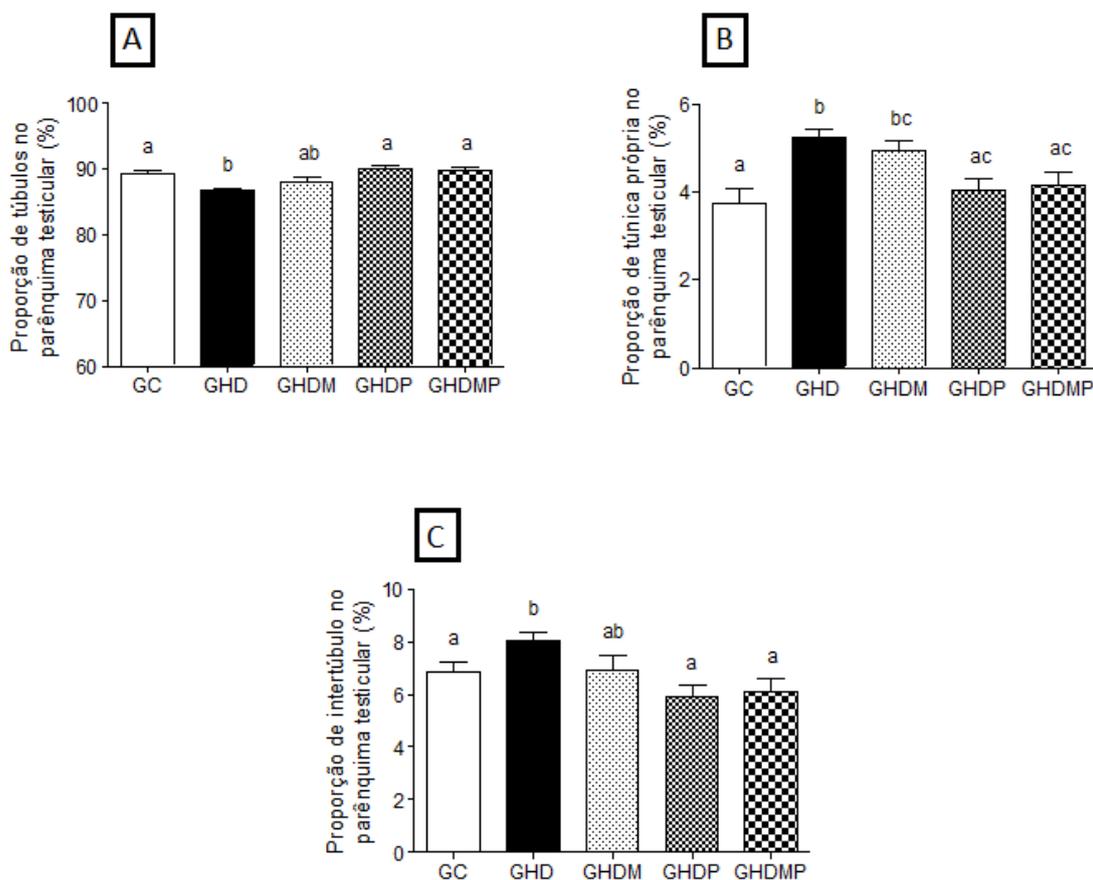


Figura 22. Proporção (%) das regiões de túbulo (A), túnica própria (B) e intertúbulo (C) no parênquima testicular de ratos aos 21 dias de idade induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Para as medidas de diâmetro tubular aos 21 dias (Figura 23-A), observou-se redução significativa ($p < 0,001$) nos valores encontrados para o GHD, GHDM e GHDMP quando comparados ao GC. No volume tubular (Figura 23-B), os GHD e GHDM apresentaram valores estatisticamente menores em relação aos animais controle. Já para o volume do espaço intertubular (Figura 23-C), foi observada redução significativa ($p < 0,001$) em todos os grupos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2 quando comparados ao GC. Para o comprimento total dos túbulos seminíferos (Figura 23-D), não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais ($p = 0,480$).

O gráfico da Figura 23-E mostra a população de células de Sertoli por testículo aos 21 dias de idade. Pode-se observar a ausência de diferença estatística ($p = 0,603$) entre os grupos experimentais.

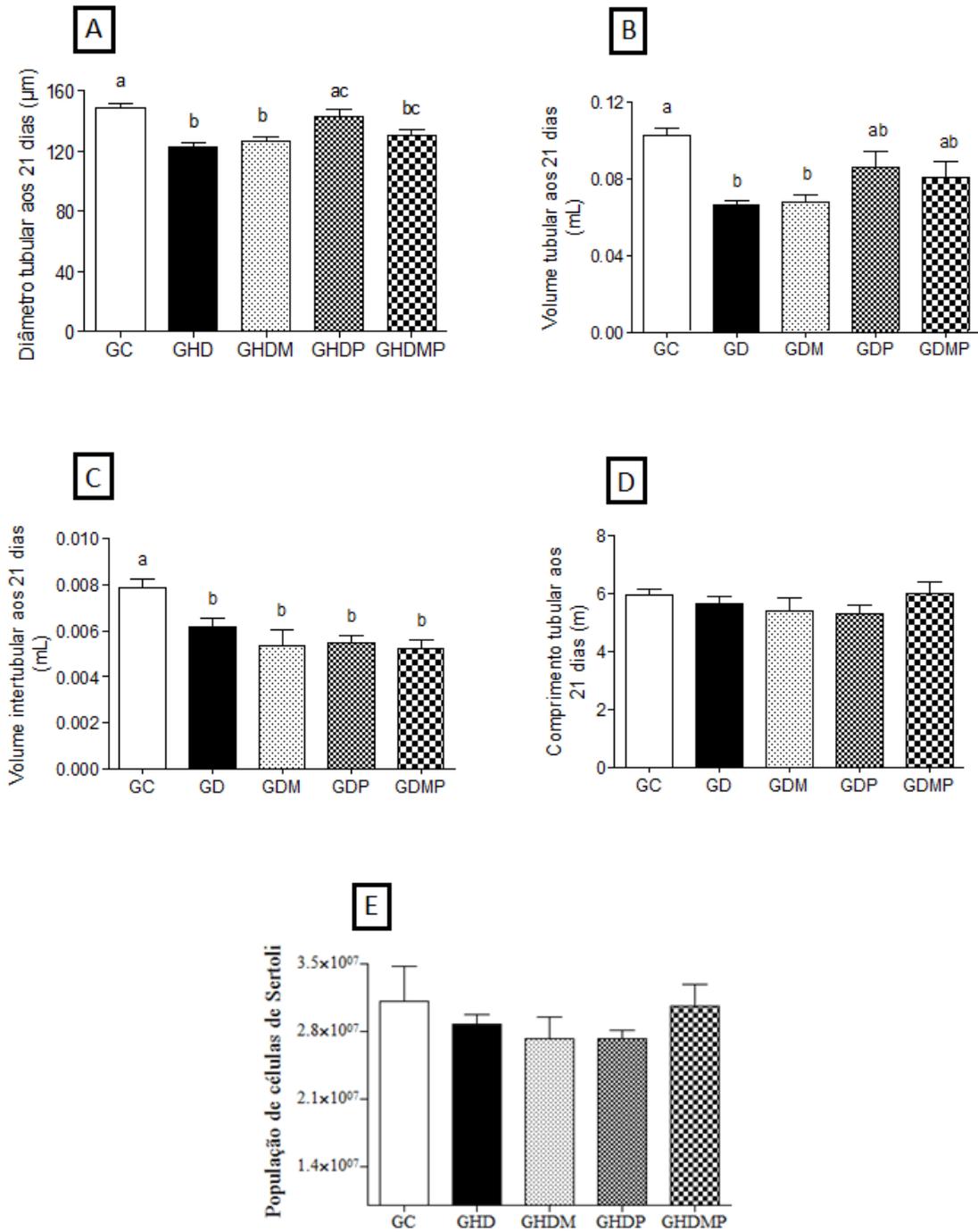


Figura 23. Valores morfométricos dos compartimentos tubular e intertubular (A-D) e população de células de Sertoli (E) por testículo de ratos aos 21 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-

Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.3. Animais adultos

5.3.1. Pesos e glicemia

Na Tabela 2, pode-se observar o peso corporal dos animais dos 30 aos 90 dias de vida. Aos 30 dias, o GC possuía valores de peso significativamente maiores do que os demais grupos, enquanto esses não diferiram entre si. No 40º dia, o GHDMP mostrou uma recuperação em tal parâmetro, não mais diferindo dos valores apresentados para o GC. Aos 50 dias, o GHDM foi o único grupo com médias significativamente menores do que o GC, contudo os GHD, GHDM e GHDP continuaram a apresentar médias menores do que o grupo Controle. A partir do 60º dia até a eutanásia, não houve mais diferença estatística entre os pesos corporais dos grupos experimentais. Contudo, dos 70 dias em diante, o GC não mais apresentava as maiores médias, sendo progressivamente ultrapassado por todos os demais grupos.

Tabela 2. Valores de peso corporal (g) dos 30 dias até os 90 dias de idade de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação.

Idade	Grupos experimentais					p
	GC	GHD	GHDM	GHDP	GHDMP	
30 dias	105,6 ± 11,9 a	83,5 ± 7,9 b	76,6 ± 13,5 b	82,9 ± 6,6 b	85,2 ± 5,3 b	< 0,001
40 dias	162,7 ± 16,9 a	132,3 ± 13,6 b	128,8 ± 15,1 b	136,3 ± 9,5 b	145,5 ± 11,7 ab	< 0,001
50 dias	219,9 ± 22,0 a	193,1 ± 24,2 ab	181,8 ± 22,4 b	196,9 ± 11,6 ab	203,4 ± 13,3 ab	0,006
60 dias	258,1 ± 22,2	244,6 ± 26,4	233,6 ± 18,6	243,2 ± 14,3	251,8 ± 12,3	0,169
70 dias	280,7 ± 23,7	278,6 ± 25,8	267,6 ± 25,3	278,6 ± 19,2	284,1 ± 12,9	0,633
80 dias	312,4 ± 24,1	311,5 ± 24,7	292,1 ± 33,8	304,7 ± 20,7	318,3 ± 16,8	0,351
90 dias	308,9 ± 17,2	339,3 ± 30,5	316 ± 33,5	327,0 ± 22,5	336,7 ± 14,9	0,09

GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Ao longo do período de estudo, os animais pertencentes ao GHD apresentaram os maiores valores de glicemia de jejum entre os grupos, diferindo estatisticamente dos GC, GHDM e GHDP. Contudo, o GHDMP apresentou médias intermediárias, não exibindo diferença com relação a nenhum dos grupos experimentais (Figura 25).

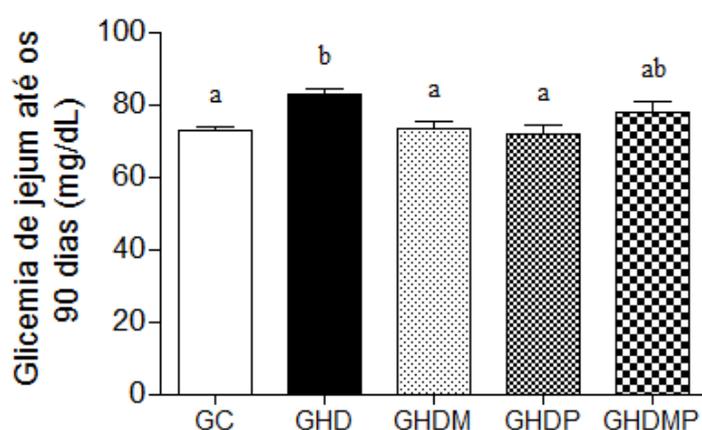


Figura 24. Valores glicemia de jejum ao longo do experimento (de 30 a 90 dias de vida) de ratos cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Através do gráfico da Figura 26-A, observa-se que, para o peso testicular, nenhum grupo diferiu dos valores do GC. Apenas foi constatada diferença estatística comparando-se o GHDMP aos GHDM e GHDP. Já para o índice gonadossomático (IGS), os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,080$) (Figura 26-B).

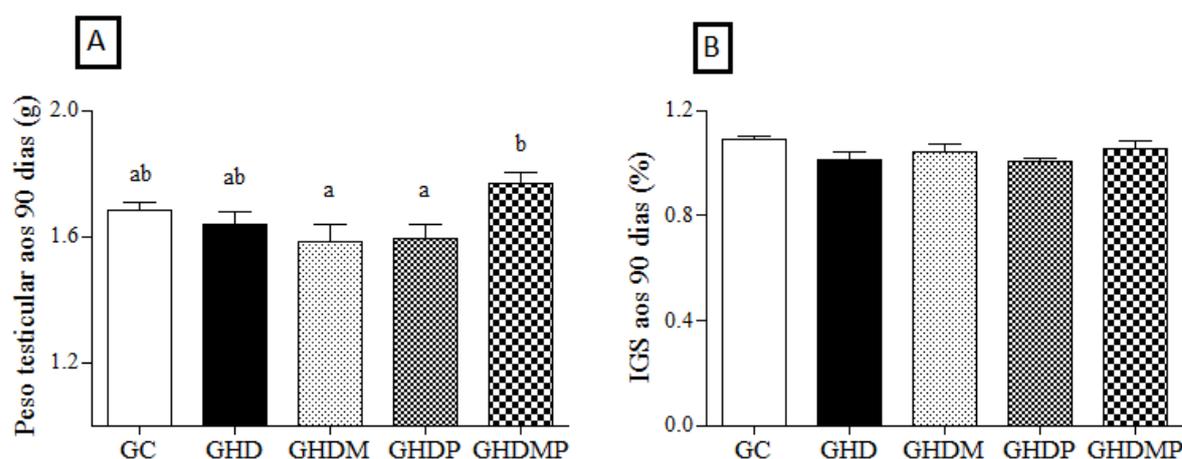


Figura 25. Valores de peso testicular (A) e índice gonadossomático (IGS) (B) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.3.2. Histomorfometria testicular

Os valores obtidos para o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero (Figuras 27-A e B) foram estatisticamente maiores para o GHDP e o GHDMP quando comparados aos animais controles. Para o diâmetro do lúmen do túbulo seminífero, só houve diferença estatística comparando-se o GHD ao GC (Figura 27-C).

Para o volume tubular, não foi constatada diferença significativa ($p = 0,124$), apesar do GC e GHDMP apresentarem os maiores valores entre os grupos (Figura 27-D). Já para o comprimento total dos túbulos seminíferos, o GC apresentou as maiores médias, diferindo estatisticamente do GHD, GHDP e GHDMP, mas não mostrando diferença quando comparado ao GHDM (Figura 27-E).

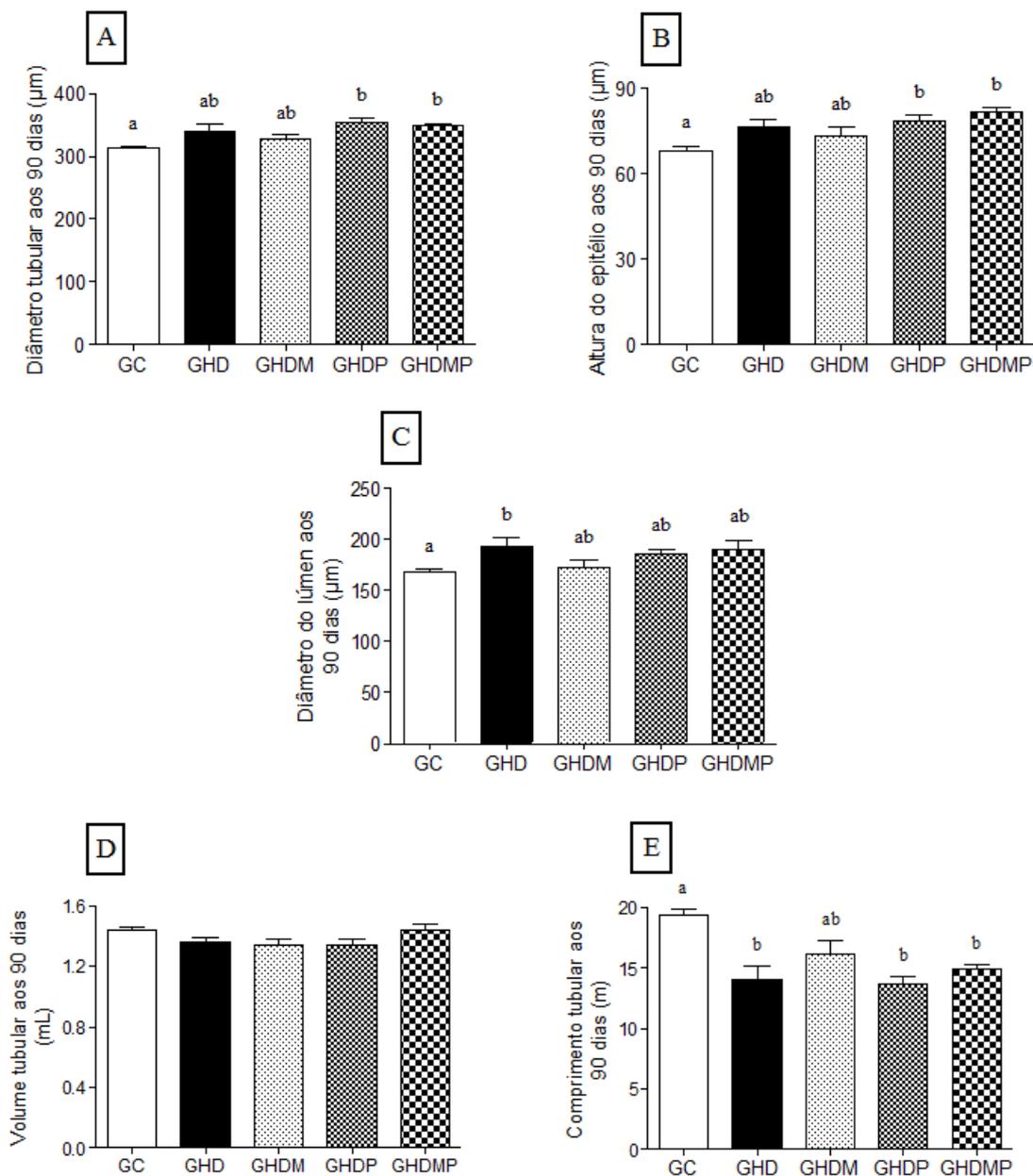


Figura 26. Valores morfométricos dos túbulos seminíferos (diâmetro tubular - A, altura do epitélio seminífero - B, diâmetro do lúmen - C, volume tubular - D e comprimento total dos túbulos seminíferos - E) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

A densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular (Tabela 3) não diferiu entre os grupos experimentais, exceto pelas células de Leydig. As células de Leydig reduziram para os animais do GHD em relação ao Grupo Controle, enquanto os demais apresentaram valores intermediários, com o GHDMP possuindo médias mais próximas ao GC.

Tabela 3. Densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular (%) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação.

Componentes	Grupos experimentais					p
	GC	GD	GDM	GDP	GDMP	
Túnica própria	2,0 ± 0,6	2,1 ± 0,4	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,6	0,362
Epitélio seminífero	73,0 ± 3,4	71,8 ± 2,4	73,6 ± 2,8	72,1 ± 1,8	70,6 ± 3,2	0,249
Lúmen tubular	14,5 ± 2,8	16,1 ± 3,7	15,2 ± 2,7	15,9 ± 2,2	16,4 ± 3,1	0,651
Células de Leydig	2,6 ± 0,4 a	1,9 ± 0,4 b	2,0 ± 0,3 ab	2,3 ± 0,5 ab	2,5 ± 0,6 ab	0,014
Células do conjuntivo	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,5	1,9 ± 0,4	0,251
Fibras do conjuntivo	3,8 ± 1,0	3,9 ± 0,7	3,9 ± 1,07	4,0 ± 0,5	3,6 ± 1,3	0,933
Lúmen do v. sanguíneo	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,241
Parede do v. sanguíneo	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,4	0,142
Espaço linfático	1,7 ± 0,8	1,6 ± 0,9	1,6 ± 1,0	1,5 ± 0,8	1,9 ± 1,2	0,886

GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Dentro do epitélio seminífero dos animais aos 90 dias de idade, a população de células de Sertoli reduziu estatisticamente em todos os grupos provenientes de fêmeas com DM2 em comparação ao grupo Controle, exceto pelo tratado apenas com a metformina (Tabela 4). Após o GHDM, os maiores valores foram obtidos pelo grupo tratado com ambas as drogas.

Para as células germinativas por secção transversal, não foi observada diferença estatística. Contudo, as produções espermáticas diárias (PED) por testículo e por g de testículo foram estatisticamente maiores para o GC em comparação aos GHD e GHDP. Os grupos tratados com a metformina apresentaram melhores resultados para tais parâmetros, não diferindo do encontrado para o GC (Tabela 4).

Tabela 4. População de células de Sertoli por testículo, número de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero, produção espermática diária (PED) por testículo e produção espermática diária por grama (g) de testículo de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação.

Parâmetros	Grupos experimentais					p
	GC	GHD	GHDM	GHDP	GHDMP	
População Sertoli ($\times 10^7$)	4,2 \pm 0,6 a	3,0 \pm 0,6 b	3,5 \pm 0,7 ab	2,9 \pm 0,4 b	3,3 \pm 0,4 b	< 0,001
Espermatogônia	1,2 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3	1,3 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4	1,3 \pm 0,5	0,358
Cito I Pré-Leptóteno	24,1 \pm 2,5	25,3 \pm 4,7	24,0 \pm 2,4	24,5 \pm 2,4	24,3 \pm 3,8	0,921
Cito I Paquíteno	21,4 \pm 1,8	22,3 \pm 3,3	19,0 \pm 1,3	20,7 \pm 3,5	20,7 \pm 5,1	0,466
Espermatíde Arredondada	81,7 \pm 5,0	78,6 \pm 5,4	75,2 \pm 5,9	78,4 \pm 8,9	83,8 \pm 10,6	0,338
PED/testículo ($\times 10^7$)	2,8 \pm 0,4 a	2,1 \pm 0,5 b	2,3 \pm 0,4 ab	2,0 \pm 0,3 b	2,3 \pm 0,3 ab	0,002
PED/g testículo ($\times 10^7$)	1,8 \pm 0,2 a	1,4 \pm 0,3 b	1,5 \pm 0,1 ab	1,3 \pm 0,2 b	1,4 \pm 0,2 b	0,002

GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Através de visualizações das secções transversais dos testículos dos grupos experimentais na Figura 28, nota-se que, para o grupo controle, o parênquima testicular e o epitélio germinativo não apresentaram degenerações (Figura 28-A e 28-B), e este último exibiu uma grande quantidade de células germinativas em toda a altura epitelial (Figura 28-B). Para os GHD (Figuras 28-C), GHDM (Figura 28-E), e GHDP (Figura 28-G), observa-se uma maior intensidade de alterações, como descamações do epitélio seminífero, vacúolos nas células de Sertoli e degeneração de células germinativas. No grupo tratado com ambas as drogas (Figura 28-I) é observada uma menor intensidade de tais alterações. No interior dos túbulos seminíferos, observa-se que no grupo sem tratamento (Figura 28-D) e no tratado apenas com a pentoxifilina (Figura 28-H), as células germinativas não se distribuía de forma abundante ao longo da altura do epitélio seminífero, como observado para o GC. Com o tratamento isolado (Figura 28-F) e conjunto (Figura 28-J) da metformina, observa-se um padrão mais semelhante ao encontrado para o GC.

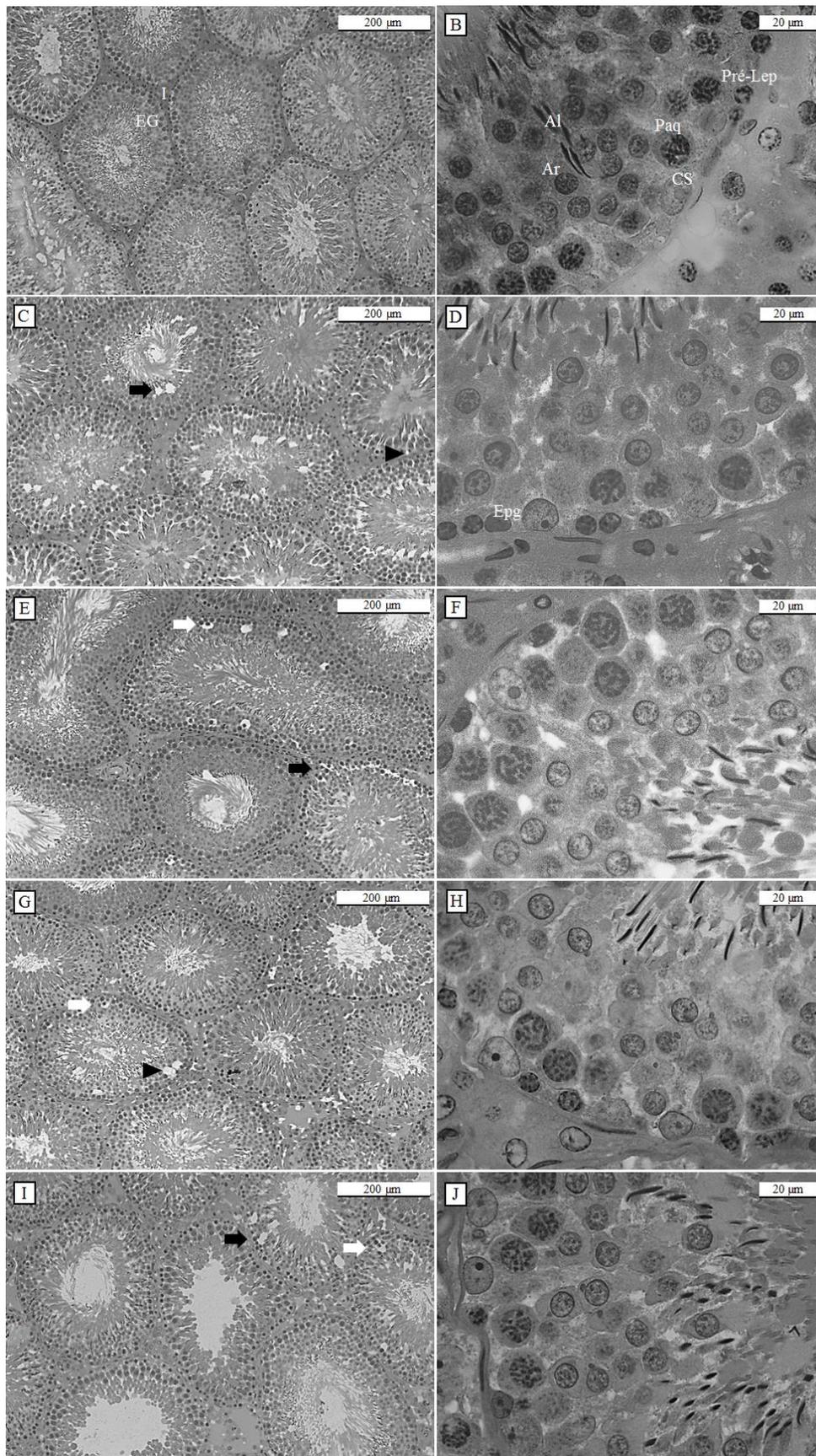


Figura 27. Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a

metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. A e B – Grupo Controle, C e D – Grupo Hiperlipídico-Diabético, E e F – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina; G e H – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, I e J – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Na foto A, as letras I e EG indicam intertúbulo e epitélio germinativo, respectivamente. Nas fotos B e D, as letras representam as células formadoras do epitélio germinativo: Epg – espermatogônias; CS – célula de Sertoli; Pré-Lep – espermátocito I em pré-leptóteno/leptóteno; Paq – espermátocito I em paquíteno; Ar – espermátide arredondada; Al – espermátide alongada. Podem ser observadas alterações ao parênquima testicular, como descamações no epitélio germinativo (setas pretas), vacúolos nas células de Sertoli (cabecas de setas brancas) e degenerações de células germinativas (setas brancas).

Nas células de Leydig, os valores para o volume nuclear e o número de células por testículo não apresentaram diferença entre os grupos experimentais ($p = 0,859$ e $p = 0,298$, respectivamente) (Figura 29-A e 29-D). Para o volume citoplasmático e a população de células por testículo, os GHD e GHDM reduziram estatisticamente em comparação ao grupo Controle (Figura 29-E e 29-B). Já para o volume celular, apenas o GHD foi diferente em relação ao GC. O número de células de Leydig por g de testículo não diferiu, apesar do GC ter apresentado os maiores valores, seguido de perto pelo GHDM ($p = 0,298$).

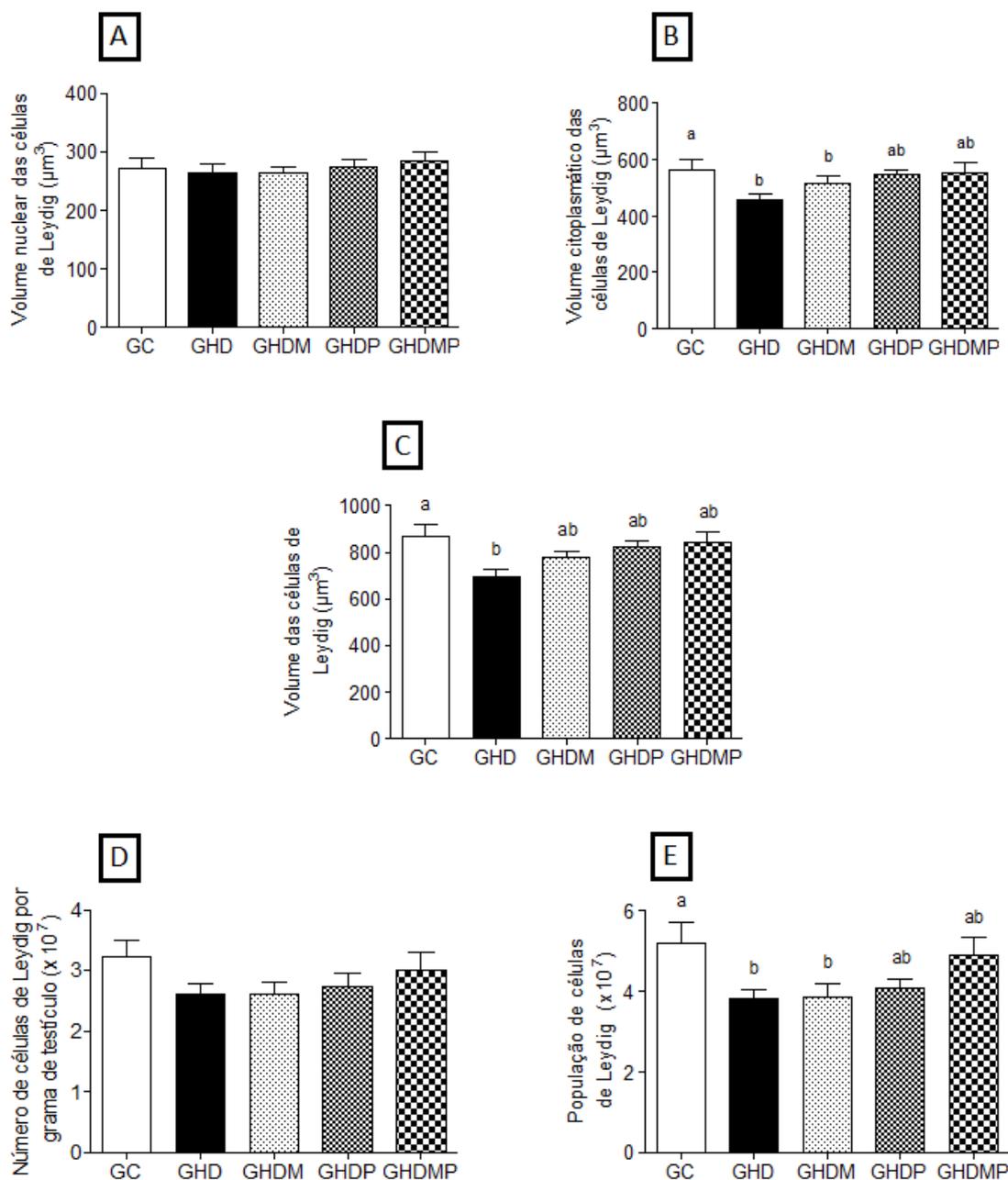


Figura 28. Valores de volumetria das células de Leydig (nuclear - A, citoplasmática - B e celular - C) e do número de células de Leydig por grama de testículo (D) e por testículo (E) de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estrepotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.3.3. Homeostase redox testicular

Para a homeostase redox testicular, não foram observadas diferenças significantes com relação à concentração malondialdeído (MDA) e à atividade das enzimas antioxidantes SOD, GSH-Pxs e CAT (Figura 30).

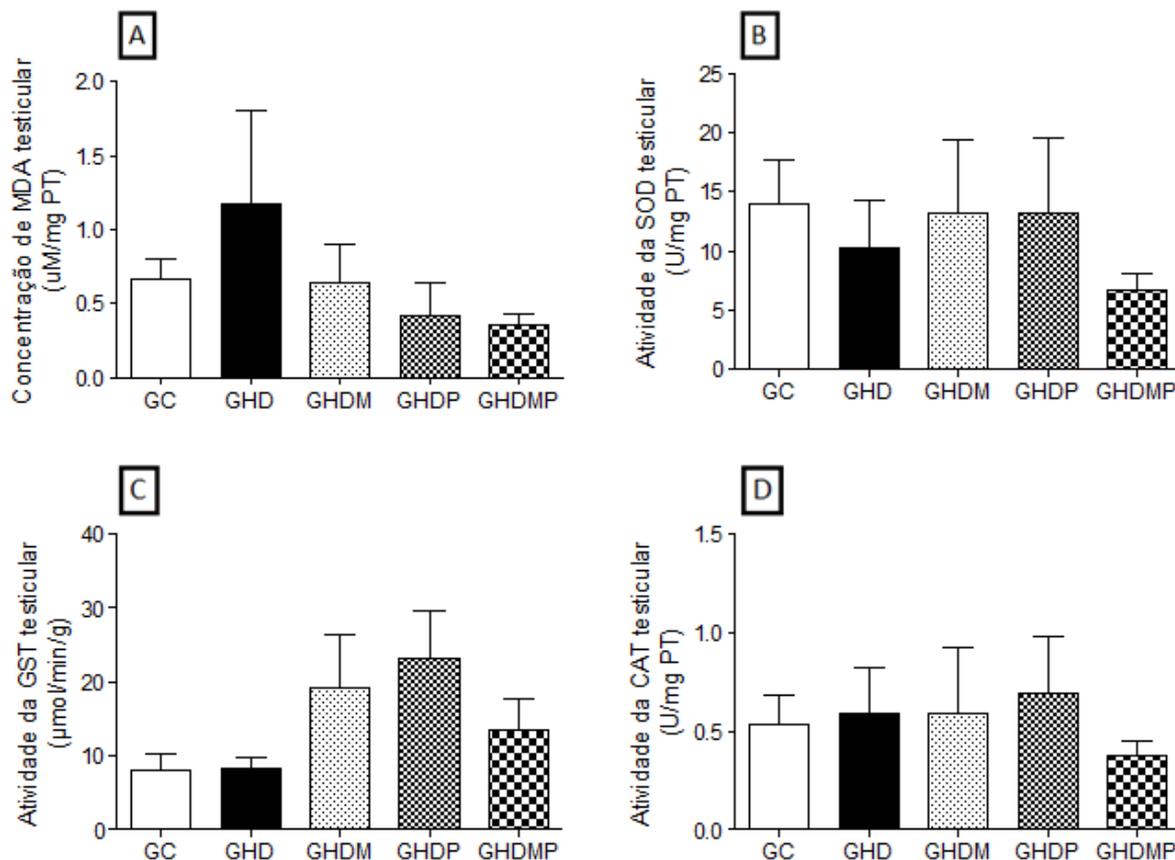


Figura 29. Concentração de malondialdeído (MDA) (A) e atividade das enzimas anti-oxidantes superóxido dismutase (SOD) (B), glutationa-S-transferase (GST) (C) e catalase (CAT) (D) no testículo de ratos aos 90 dias de idade cujas mães foram induzidas ao diabetes do tipo 2, através do modelo de dieta hiperlipídica-estreptozotocina, e tratadas com a metformina e a pentoxifilina durante a prenhez e a lactação. GC – Grupo Controle, GHD – Grupo Hiperlipídico-Diabético, GHDM – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina, GHDP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Pentoxifilina, GHDMP – Grupo Hiperlipídico-Diabético-Metformina-Pentoxifilina. Letras ausentes representam ausência de diferença estatística ($p > 0,005$).

6. Discussão

6.1. Glicemias materna e da prole e peso de nascimento

O acompanhamento da glicemia de jejum das fêmeas ao longo do período experimental deixa clara a eficiência da atividade da metformina, utilizada sozinha ou em associação, em reduzir as concentrações de glicose sanguínea. Tal atividade é explicada pelo seu papel em reduzir a absorção de glicose pela mucosa intestinal, aumentar a captação periférica da glicose pelo tecido muscular esquelético e reduzir a resistência à insulina (VIOLLET et al., 2012; ALVES et al., 2014; ZHUO et al., 2014).

Por outro lado, os níveis de glicose sanguínea das fêmeas tratadas apenas com a pentoxifilina não diferiram significativamente com a aplicação da droga. Resultados semelhantes com a pentoxifilina podem ser encontrados na literatura em trabalhos sobre diabetes utilizando ratos (MASSART et al., 2012; AN et al., 2015; SÖNMEZ et al., 2016) e humanos (HEIDRICH; SCHIROP, 1980).

Estudos presentes na literatura afirmam que níveis glicêmicos moderadamente elevados, característicos do diabetes do tipo 2, em fêmeas prenhes resultam em macrossomia da prole (SOULIMANE-MOKHTARI et al., 2005; VAMBERGUE; FAJARDY, 2011; YESSOUFOU; MOUTAIROU, 2011; WAHABI et al., 2012). Contudo, este fato não foi observado neste estudo. De acordo com Kervran et al. (1978) e Kiss et al. (2009), estudos com ratos apresentam controversas com respeito à macrossomia da prole de mulheres com níveis moderados de hiperglicemia. De acordo com esses autores, as diferenças observadas entre as espécies dizem respeito à curta duração da prenhez em ratos e do baixo desenvolvimento do tecido adiposo, o principal responsável pela macrossomia, em neonatos de ratos (cerca de 1% do peso corporal) e de humanos (cerca de 16%).

Durante a gravidez, os altos níveis de glicemia materna provocam uma resposta no feto não-diabético, de maneira que o pâncreas, diante do estímulo hiperglicêmico, comece a secretar grandes quantidades de insulina (JOVANOVIC, 2001). Isso acontece porque a insulina materna não cruza a placenta e, dessa forma, a atividade pancreática do filhote depende unicamente da concentração de glicose sanguínea da mãe (KELLY et al., 2005; VAN LIESHOUT e VORUGANTI, 2008). Ao longo do tempo, essa elevada atividade do pâncreas leva à redução da sua habilidade, resultando em hiperglicemia (JOVANOVIC, 2001; SONG et al., 2012). Níveis mais elevados de glicemia foram observados na prole experimental proveniente das fêmeas diabéticas não tratadas, visto que essas apresentavam elevadas concentrações de glicose

sanguínea. Nos grupos tratados com a metformina, a ação hipoglicemiante da droga no período intrauterino impediu a exposição do feto aos altos níveis glicêmicos, evitando, assim, o comprometimento do desenvolvimento pancreático.

A diminuição da atividade das células β pancreáticas leva a um estado de exaustão celular, causada pelo desequilíbrio entre a alta secreção de insulina, devido à hiperglicemia, e a reduzida produção da pró-insulina pelo retículo endoplasmático (PRENTKI; NOLAN, 2006). Essa baixa atividade do retículo é induzida pelo estresse oxidativo dos elevados níveis glicêmicos e pela lipotoxicidade dos ácidos graxos livres (BACK; KAUFMAN, 2012). Dessa forma, a ação antioxidante e anti-inflamatória da pentoxifilina, cruzando a placenta em direção ao feto (BAILEY, 2010), pode ter protegido o pâncreas em desenvolvimento, apesar dos altos níveis glicêmicos maternos, fazendo com que a prole não desenvolva problemas em controlar a sua glicose sanguínea.

Para os animais adultos, apesar da distribuição do gráfico da glicemia ter seguido o mesmo padrão observado para os animais pré-púberes, com as mesmas diferenças estatísticas entre os grupos, o GHD não mais mostrou valores elevados, como observado aos 21 dias. Isso pode ter ocorrido porque, após o desmame, a dieta fornecida aos animais foi alterada para uma ração normolipídica padrão para animais experimentais de biotério. De acordo com Song et al. (2012), quando a prole de fêmeas diabéticas é alimentada com dietas relativamente saudáveis, os animais podem voltar a manter os seus níveis normais de glicemia. Neste estudo, a glicemia ainda diferiu do encontrado para os animais controle e tratados, mas observa-se que a reeducação alimentar é de extrema importância como um dos primeiros passos para amenizar os efeitos adversos de uma exposição intrauterina ao diabetes do tipo 2.

6.2. Pesos corporais ao longo do experimento

Todas as proles experimentais provenientes das fêmeas induzidas ao diabetes do tipo 2 apresentaram reduzido desenvolvimento corporal aos 21 dias, o que foi observado pela redução do peso desses animais. Para os animais provenientes das fêmeas sem tratamento, este é um resultado diferente do que é geralmente encontrado na literatura, onde observa-se grande ganho de peso corporal e desenvolvimento de sobrepeso/obesidade na prole de fêmeas com DM2 (POLANCO PONCE et al., 2005; TZANETAKOU et al., 2011; KC et al., 2015).

Contudo, Yessoufou e Moutairou (2011) explicam que a reduzida atividade das células β da prole diante do contínuo estímulo hiperglicêmico através da mãe resulta em

hipoinsulinemia e na redução da captação de glicose, levando a um retardo no desenvolvimento corporal do animal. Dessa forma, os elevados níveis glicêmicos observados para os animais do GHD podem ser uma explicação para essa redução inicial de desenvolvimento.

Por outro lado, percebe-se que, ao longo do acompanhamento do peso corporal até a fase adulta, os valores obtidos pelo GC foram, lentamente, alcançados e ultrapassados pelos demais grupos. Entre estes, o GHD apresentou as maiores médias ao final do experimento. De acordo com Kubo et al. (2014), observaram que a associação entre a glicose materna e a adiposidade da prole não foi mediada pela alteração do peso do nascimento. Neste estudo, o aumento do peso dos animais foi observado ao longo da vida. Estes autores afirmam que a exposição aos altos níveis de glicose em útero pode predispor a prole a diferentes padrões metabólicos, alterando a regulação do balanço energético à longo prazo.

No presente estudo, supõe-se que, com o prolongamento do período experimental, os animais pertencentes ao GHD possam continuar a aumentar seus pesos corporais e atingir um estado de sobrepeso, o qual é característico da prole de fêmeas com o diabetes do tipo 2.

Contudo, apesar de a metformina ter conhecido papel na redução do ganho de peso corporal ligado ao DM2 (VIOLLET et al., 2012) e por reduzir o risco de obesidade após a exposição intrauterina (SALOMAKI et al., 2014), a associação entre as drogas não mostrou bons resultados para tal parâmetro no presente estudo, com o GHDMP exibindo médias próximas ao grupo sem tratamento. No estudo realizado por Massart et al. (2012), a pentoxifilina não alterou o ganho de peso corporal de camundongos obesos e diabéticos ob/ob. No protocolo experimental do presente estudo, pentoxifilina na concentração de 100 mg/kg pode ter interferido no efeito da metformina sobre tal parâmetro.

6.3. Testículos pré-púberes

Aos 21 dias, o peso testicular tendeu a seguir o mesmo padrão observado para o peso corporal. Porém, para os grupos tratados com a pentoxifilina, tal parâmetro não diferiu dos animais do grupo Controle, o que pode ser um sinal inicial de proteção do órgão por esta droga. Nos estudos realizados por Zakaria et al. (2015) e Sonmez et al. (2016), os autores viram que as reduções no peso testicular causadas pela exposição ao cádmio e ao diabetes, respectivamente, foram menos acentuadas com o tratamento com a pentoxifilina.

No interior dos testículos pertencentes ao GHD, foi constatada uma expressão clássica do diabetes no parênquima testicular, o espessamento da túnica própria dos túbulos seminíferos,

observada através do aumento da sua densidade volumétrica. Tal aumento de espessura no diabetes parece ser causado por uma maior deposição de fibras colágenas, moléculas de adesão e glicoproteínoglicanas, além de distúrbios na renovação das proteínas constituintes (AHMED et al., 2013).

De acordo com Ghanbari et al. (2016) e Pourmasumi et al. (2017), o espessamento da túnica própria dos túbulos seminíferos é acompanhado pela redução do diâmetro tubular, por distúrbios ao processo espermatogênico e pela diminuição da produção espermática e da fertilidade. Neste estudo, foi observado que o diâmetro dos túbulos seminíferos reduziu, acompanhando o espessamento da túnica própria, como afirmado pelos autores. Por outro lado, foi observado que a pentoxifilina atuou melhorando ambos os parâmetros, com os grupos tratados apresentando valores estatisticamente semelhantes aos encontrados para o Controle. Esta pode ser uma das formas que a pentoxifilina aja de maneira a melhorar o desempenho da produção espermática diretamente nos túbulos seminíferos.

Acompanhando a restauração do diâmetro tubular, os grupos tratados com a pentoxifilina também tiveram uma recuperação na proporção e no volume dos túbulos seminíferos, em comparação ao grupo diabético sem tratamento. Consequente a isso, houve a redução na proporção e no volume intertubular, assim como observado para o GC. De acordo com Sonmez et al. (2016) e Feyli et al. 2017, ratos adultos diabéticos tratados com a pentoxifilina conseguiram reverter os efeitos adversos no peso testicular e no diâmetro tubular causados pelo diabetes, o que foi um resultado do potencial anti-inflamatório e antioxidante da droga.

Por outro lado, os animais provenientes das fêmeas tratadas apenas com a metformina não conseguiram obter valores morfométricos diferentes dos encontrados para o grupo sem tratamento. Isso demonstra que, apesar de a literatura mostrar efeitos protetores da metformina sobre o testículo adulto (YAN et al., 2015; ASGHARI et al., 2016; KOROGLU et al., 2016), a sua exposição durante a fase intrauterina ainda tem resultados controversos, como no trabalho de Tartarin et al. (2012). Neste, os autores afirmam que a exposição fetal à metformina, através da barreira placentária (KOVO et al., 2008), resulta na diminuição do peso e volume testicular, além de reduzir o número de células de Sertoli. Além disso, eles explicam que tais alterações são causadas por reduções na população de células de Leydig e, conseqüentemente, na produção de testosterona durante as fases de formação e desenvolvimento testicular.

De acordo com as observações das fotomicrografias dos animais pré-púberes, foi possível constatar células germinativas com sinais de degeneração celular, mesmo nos animais provenientes do grupo Controle. Isso é explicado porque, da primeira até a sexta semana de vida pós-natal, ocorre a primeira onda espermatogênica em ratos. Esta é marcada por uma fase de apoptose, envolvendo espermatócitos e espermatogônias, que culmina na terceira semana de vida (JAHNUKAINÉ et al., 2004). Os processos apoptóticos que ocorrem durante esse período são de extrema importância para o desenvolvimento da maturidade sexual e a função testicular, visto que, dessa forma, ocorre o ajuste do número de células germinativas que podem ser adequadamente mantidas pelas células de Sertoli, cuja diferenciação e funcionamento normal dependem de uma rede elaborada de comunicações (MORENO et al., 2006; MORALES et al., 2007).

Dessa forma, problemas no desenvolvimento das células de Sertoli, tanto com relação a atrasos na maturação quanto com relação ao número, podem resultar na incapacidade de formar um meio ambiente especializado para o desenvolvimento do número correto de células germinativas para a espécie, resultando em um maior número de apoptose, como observado para os grupos sem tratamento e os grupos tratados apenas com uma das drogas.

A população de células de Sertoli não diferiu entre os grupos. Contudo, no período de eutanásia dos animais pré-púberes, as células de Sertoli ainda não finalizaram o seu período de proliferação. Dessa forma, a população nesta idade esclarece como as divisões mitóticas aconteceram até então, com relação a aumentos ou reduções, e podem ser um indicativo do que vai ser encontrado para os animais durante a fase adulta, na maturação testicular.

6.4. Testículos adultos

Na fase adulta, apesar de os pesos testiculares entre os grupos terem diferido, onde os tratados com apenas uma das drogas apresentaram valores reduzidos em comparação ao tratamento com ambas, o IGS, que representa uma relação percentual entre o peso testicular e o peso corporal (CALDEIRA et al., 2010), não diferiu. Isso mostra que não houve prejuízo preferencial às gônadas diante do crescimento corporal dos animais ao longo do tempo.

No parênquima testicular, a densidade volumétrica da túnica própria para o grupo sem tratamento não diferiu dos demais, o que foi contrário à observação para o mesmo grupo aos 21 dias. De acordo com Ahmed et al. (2013) e Khaneshi et al. (2013), os tratamentos com o suco de romã e gergelim, respectivamente, diminuíram a espessura da membrana basal dos

túbulos seminíferos de ratos diabéticos, o que foi relacionado à redução da glicemia e à melhora dos parâmetros morfométricos tubulares. Neste estudo, a glicemia dos animais adultos também foi menor com relação ao encontrado para os animais pré-púberes, o que pode ter contribuído para a redução da espessura. Além disso, como nos estudos de Ahmed et al. (2013) e Khaneshi et al. (2013), a diminuição da densidade volumétrica da túnica própria no presente trabalho também foi transparecida em melhorias na morfometria testicular, com a recuperação do diâmetro e volume tubulares.

Em estudos com ratos diabéticos, Zhai et al. (2015), Li et al. (2016) e Zhai et al. (2017) obtiveram bons resultados utilizando a metformina na redução da espessura na lâmina basal glomerular, cujo espessamento é também uma característica importante do diabetes. Da mesma forma, Dávila-Esqueda et al. (2005) obtiveram bons resultados com a ação anti-inflamatória da pentoxifilina e da vitamina E em reduzir o espessamento da membrana glomerular.

De acordo com França e Chiarini-Garcia (2005), a altura do epitélio seminífero é um importante parâmetro na determinação da produção espermática diária, visto que este é formado pela associação entre células de Sertoli e células germinativas. No presente estudo, o grupo controle apresentou menores médias para a altura do epitélio quando comparado aos grupos tratados com a pentoxifilina. Contudo, através das visualizações das fotomicrografias, observa-se que todos os grupos provenientes de fêmeas com DM2 apresentavam alterações epiteliais, como degenerações de células germinativas, vacuolizações das células de Sertoli e uma distribuição mais espaçada das células no epitélio germinativo. Por outro lado, o grupo controle exibiu um número bastante reduzido de alterações no parênquima testicular e grande frequência de células espermatógenicas em toda a extensão do epitélio.

Dessa forma, e devido ao aumento do comprimento tubular, os animais controles mostraram as maiores produções espermáticas diárias e por grama de testículo. Os demais grupos apresentaram médias menores, com reduções significantes para o grupo sem tratamento e aquele tratado utilizando apenas a pentoxifilina. Sönmez et al. (2016) e Feyli et al. (2016) observaram, em ratos diabéticos, danos ao epitélio germinativo caracterizados pela redução do Johnsen's score, aumento no número de apoptoses e diminuição no número de espermatozoides. Em ambos os estudos, foram realizados tratamentos com a pentoxifilina, mas Sönmez et al. (2016) não obtiveram resultados positivos com relação a essa análise, assim como no presente estudo.

Por outro lado, a utilização da metformina resultou em melhorias para a produção espermática diária, tanto em sua utilização individual quanto na utilização conjunta. Tais resultados diferem do que foi encontrado para os animais pré-púberes, onde a metformina não apresentou efeitos benéficos ao testículo. Contudo, observa-se que após um longo período da exposição ao fármaco, os túbulos seminíferos ainda em maturação conseguiram recuperar a diminuição da produção espermática provocada pela exposição intrauterina e pós-natal ao diabetes do tipo 2. Como observa-se na literatura, o principal problema da utilização da metformina na gestação é o acompanhamento da prole para a análise dos efeitos ao longo da vida (SALOMAKI et al., 2014).

Além disso, a metformina, por inibir a cadeia respiratória mitocondrial e reduzir a respiração celular, estimula a produção de lactato pelas células de Sertoli. O lactato é o substrato energético primário para as células germinativas masculinas e o seu suprimento pode regular a sobrevivência e a atividade metabólica dos espermátócitos (TARTARIN et al., 2012; ALVES et al., 2014; BERTOLDO et al., 2014). De acordo com Alves et al. (2012), a insulina desempenha importante papel na regulação do metabolismo da célula de Sertoli e a sua desregulação inibe a produção de lactato. Assim, os tratamentos com a metformina podem ter ajudado na recuperação das células germinativas e da produção espermática dos animais pela ação do lactato na sustentação celular e na inibição das perdas por apoptose.

A redução das produções espermáticas observadas para o GHD e o GHDP refletem a diminuição na população de células de Sertoli, visto que elas apresentam capacidade de suporte para as células germinativas relativamente fixa por espécie (HESS; FRANÇA, 2008).

As células de Sertoli apresentam um período proliferativo que começa durante a vida fetal e se estende até a fase pré-púbere, cerca de 3 semanas de vida pós-natal nos ratos (SHARPE et al., 2003; FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005). Durante esses períodos, o FSH é o principal estimulador das mitoses, enquanto o T3 inibe tais divisões e promove a maturação celular. Dessa forma, variações nas concentrações destes hormônios durante as fases proliferativas determinam o número final das células de Sertoli e, conseqüentemente, o tamanho e a produção espermática testicular (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005). Contudo, de acordo com PITETTI et al. (2013), o FHS necessita de uma cascata de sinalização insulina/IGF adequada para mediar os seus efeitos proliferativos nas células de Sertoli imaturas. Os autores constataram que o bom funcionamento do receptor de insulina é indispensável para evitar reduções na população de células de Sertoli.

No presente trabalho, o único grupo que não apresentou diminuição no número de células de Sertoli, em comparação ao grupo controle, foi o grupo cujas progenitoras foram tratadas com a metformina. Por esta droga ser amplamente conhecida por melhorar a sensibilidade à insulina (VIOLLET et al., 2012), o tratamento com ela pode ter influenciado positivamente a atuação do FSH e a performance mitótica das células de Sertoli, impedindo a redução diante do DM2. Isso fica mais claro observando-se o menor desempenho da pentoxifilina neste parâmetro, mesmo diante de baixos níveis glicêmicos dos animais aos 21 dias de idade. Por outro lado, a associação entre as drogas não apresentou resultados tão positivos quanto a utilização isolada da metformina.

Na análise da densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular, observou-se uma redução para as células de Leydig no GHD. Analisando-se a volumetria de tal célula, observa-se que, para tal grupo, o volume citoplasmático, o volume celular e a população de células mostraram-se reduzidos.

Vários estudos na literatura mostram alterações no número (BALLESTER et al., 2004; BALLESTER et al., 2005), no volume (KANESHI et al., 2013; SILVA et al., 2014) e na ultraestrutura (KIANIFARD et al., 2012) das células de Leydig de animais diabéticos. De acordo com Kianifard et al (2012), reduções no volume citoplasmático e total da célula de Leydig podem indicar uma involução do retículo endoplasmático liso (REL), o qual é a organela mais abundante no citoplasma desta célula. Dessa forma, pode-se estimar um distúrbio na função celular, uma vez que o REL é diretamente relacionado à produção de andrógenos (HASSEN et al., 2007).

A diferenciação das células de Leydig adultas no rato acontece por volta da segunda semana de vida pós-natal (MENDIS-HANDAGAMA et al., 2001), sendo assim, o período neonatal é de extrema importância para o estabelecimento da população final no indivíduo adulto. Na fase pré-púbere, os níveis glicêmicos dos animais proveniente das fêmeas GHD eram mais elevados (cerca de 100 mg/dL), o que pode ter atrapalhado o desenvolvimento celular e ter causado uma programação para o tamanho desta população.

Contrariando o que foi encontrado para os túbulos seminíferos, as melhoras observadas nas células de Leydig foram relacionadas ao tratamento com a pentoxifilina, a qual recuperou os valores reduzidos do diabetes do tipo 2 para médias próximas ao encontrado no GC, principalmente quando utilizada em combinação. Alguns trabalhos mostram um papel protetor da pentoxifilina na célula de Leydig, diante de distúrbios variados, de maneira a melhorar a

atividade esteroidogênica de tais células, como Queiroz et al. (2013), Moradi et al. (2015), Zakaria e Al-Busadah (2015) e Feyli et al. (2017). Já no estudo de Yao et al. (2016), a administração de pentoxifilina foi eficiente em inibir a redução nos níveis das 3β -HSD e StAR, que participam do processo de síntese da testosterona, causada pela exposição à hipóxia hipobárica intermitente.

De acordo com a literatura, o diabetes é caracterizado por altos níveis de peroxidação lipídica em ratos (KINALSKI et al., 1999; ABOONABI et al., 2014; GWARZO et al., 2014; ALUWONG et al., 2016) e humanos (NOBERASCO et al., 1991; DRIES et al., 2011; KAEFER et al., 2012), sendo a hiperglicemia o maior contribuinte para tal estado (TANGVARASITTICHAJ, 2015). Além disso, o diabetes é relacionado a reduzidos níveis de antioxidantes, além da inibição da atividade enzimática através da glicação das enzimas durante a hiperglicemia (RAINS; JAIN, 2011; LAZO-DE-LA-VEJA-MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013; ULLAH et al., 2016). Contudo, no presente estudo, tanto os níveis de peroxidação lipídica quanto a atividade das enzimas antioxidantes não mostraram diferença significativa entre os grupos experimentais.

As diferenças observadas entre os achados da literatura para o diabetes e o presente protocolo experimental podem ter sido causadas diante do longo período desde a exposição aos sintomas da doença (vida intrauterina) e o dia da coleta dos animais na fase adulta (90 dias). Além disso, após o desmame, os machos foram alimentados com a dieta padrão, o que resultou na diminuição da glicemia e pode ter sido um dos motivos para ausência de diferença na homeostase redox testicular.

7. Conclusão

De acordo com resultados obtidos com este protocolo experimental, pode-se concluir que a exposição intrauterina e neonatal ao diabetes mellitus do tipo 2, através da mãe, provocou alterações testiculares importantes, como reduções nas populações de células de Sertoli e de Leydig e na produção espermática, comprometendo a atividade gonadal. Apesar de, na fase pré-púbere, apenas a pentoxifilina ter protegido os parâmetros testiculares da prole, durante a fase adulta, ambas as drogas proporcionaram melhoras ao parênquima da gônada. A metformina protegeu integridade da região tubular e das células germinativas, o que foi traduzido na manutenção da população das células de Sertoli e da produção espermática diária. A pentoxifilina, por sua vez, amenizou os efeitos do diabetes sobre os parâmetros morfométricos das células intersticiais de Leydig. Dessa forma, o tratamento conjunto das drogas, durante as etapas iniciais de desenvolvimento testicular, foi importante ao combinar as influências positivas em ambos os compartimentos do parênquima do órgão, resultando em um melhor desempenho reprodutor para a gônada masculina.

8. Referências

- ABERCROMBIE, M. (1946) Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec*, 94:239-247.
- ABOONABI, A.; RAHMAT, A.; OTHMAN F. (2014) Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. *Toxicol Rep*, 1:915-922.
- ADA - American Diabetes Association (2016a) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 39(1):S13–S22.
- ADA - American Diabetes Association (2016b) Diagnosing diabetes and learning about prediabetes. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/?referrer=https://www.google.com.br/>> Acesso em: 21/08/17.
- AEBI, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105:121-126.
- AHMED, M. A. A. S.; EL-HAKEM, A. H. A.; EWIS, S. H. A.; EID, R. A. (2013) Effect of *Punica granatum* (pomegranate) juice on the ultrastructure of the testes in the streptozotocin induced diabetes in adult albino rat. *Int J Adv Res*, 1(9):831-851.
- AHMED, N. (2005) Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 67(1):3-21.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev*, 1(1):15-24.
- ALUWONG, T.; AYO, J. O.; KPUKPLE, A.; OLADIPO, O. O. (2016) Amelioration of hyperglycaemia, oxidative stress and dyslipidaemia in alloxan-induced diabetic wistar rats treated with probiotic and vitamin C. *Nutrients*, 8(5):151.
- ALVES, M. G.; MARTINS, A. D.; VAZ, C. V.; CORREIA, S.; MOREIRA, P. I.; OLIVEIRA, P. F.; SOCORRO S. (2014) Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism. *Br J Pharmacol*, 171(4):1033-1042.
- AMANN, R. P. (1970) Sperm production rates. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). *The testis*. New York: Academic Press.
- AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. (1962) Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J Dairy Sci*, 45(6):774-781.
- AN, Z. M.; DONG, X. G.; GUO, Y.; ZHOU, J. L.; QIN, T. Effects and clinical significance of pentoxifylline on the oxidative stress of rats with diabetic nephropathy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 35(3):356-361.
- ANURAG, P.; ANURADHA, C. V. (2002) Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes Obes Metab*, 4(1):36-42.
- ARAÚJO, T. M. V. (2010) Descrição do método de indução de diabetes mellitus para testes de novas drogas e procedimentos específicos. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba.
- ASGHARI, A.; AKBARI, G.; MEGHDADI, A.; MORTAZAVI, P. (2016) Protective effect of metformin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras*, 31(6).

- ATTAL, J.; COUROT, M. (1963) Développement testicular ET établissement de la spermatofénèse chez le taureau. *Ann Biol Animal Biochem Bioph*, 8(3):219-241.
- AVIADO, D. M.; PORTER, J.M. (1984) Pentoxifylline: a new drug for the treatment of intermittent claudication. Mechanism of action, pharmacokinetics, clinical efficacy and adverse effects. *Pharmacotherapy*, 4(6):297-307.
- BACK, S. H.; KAUFMAN, R. J. (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*, 81:767-93.
- BAILEY, C. S.; MACPHERSON, M. L.; POZOR, M. A.; TROEDSSON, M. H.; BENSON, S.; GIGUERE, S.; SANCHEZ, L. C.; LEBLANC, M. M.; VICKROY, T. W. (2010) Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. *Theriogenology*, 74(3):402-412.
- BALLESTER, J.; DOMINGUEZ, J.; MUNOZ, M. C.; SENSAT, M.; RIGAU, T.; GUINOVART, J. J.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. (2005) Tungstate treatment improves leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. *J Androl*, 26(6):706-715.
- BALLESTER, J.; MUNOZ, M. C.; DOMÍNGUEZ, J.; RIGAU, T.; GUINOVART, J. J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2004) Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH and LH-linked mechanisms. *J Androl*, 25(5):706-719.
- BARALDI, C. O.; MOISÉS, E. C.; DE JESUS PONTE CARVALHO, T. M.; DE JESUS ANTUNES, N.; LANCHOTE, V. L.; DUARTE, G.; CAVALLI, R. C. (2012) Effect of type 2 diabetes mellitus on the pharmacokinetics of metformin in obese pregnant women. *Clin Pharmacokinet*, 51(11):743-749.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. (2008) The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 52(6):940-950.
- BARSOU, I. B.; YAO, H. H. (2010) Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl*, 31(1):11-15.
- BEATRICE, A. M.; DUTTA, D.; KUMAR, M.; SIDDEGOWDA, S. K.; SINHA, A.; RAY, S.; CHOWDHURY, S. (2014) Testosterone levels and type 2 diabetes in men: current knowledge and clinical implications. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7:481-486.
- BENTON, L.; SHAN, L. X.; HARDY, M. P. (1995) Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53(1-6):61-68.
- BERNDTSON, W. E. (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.*, 44(5):818-83.
- BERTOLDO, M. J.; FAURE, M.; DUPONT, J.; FROMENT, P. (2014) Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation. *Ann Transl Med*, 2(6): 55.
- BHATNAGAR, S.; SRIVASTAVA, D.; JAYADEV, M. S.; DUBEY, A. K. (2006) Molecular variants and derivatives of insulin for improved glycemic control in diabetes. *Prog Biophys Mol Biol*, 91(3):199-228.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5(1):9-19.

- BISCHOFF, H. (1995) The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin Invest Med*, 18(4):303-311.
- BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. (2014) Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(1).
- BRENNAN, J.; TILMANN, C.; CAPEL, B. (2003) Pdgfr-a mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev*, 17(6):800-810.
- CALDEIRA, B. C.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; BALARINI, M. K.; CAMPOS, P. K. A. (2010) Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyonthus, Linnaeus, 1766*). *Revista Ceres*, 57(5):569-575.
- CALOGERO, A. E.; FISHEL, S.; HALL, J.; FERRARA, E.; VICARI, E.; GREEN, S.; HUNTER, A.; BURRELLO, N.; THORNTON, S.; D'AGATA, R. (1998) Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Hum Reprod*, 13(4):911-915.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. (2002) Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras de Endocrinol Metab*, 46(4).
- CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. (1997) Cinética e quantificação da espermatogênese: Bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, 21(25-34).
- CHALLIER, J. C.; BASU, S.; BINTEIN, T.; MINIMUM, J.; HOTMIRE, K.; CATALANO, P. M.; HAUGUEL-DE MOUZON, S. (2008) Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*, 29(3):274-281.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. (2009) *Bioquímica ilustrada*. 4ª. ed. Porto Alegre: Artmed.
- CHARLES, B.; NORRIS, R.; XIAO, X.; HAGUE, W. (2006) Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy. *Ther Drug Monit*, 28:67-72.
- CHATZIGEORGIOU, A.; HALAPAS, A.; KALAFATAKIS, K.; KAMPER, E. (2009) The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, 23(2):245-58.
- CHAUDRY, R.; GILBY, P.; CARROLL, P. V. (2007) Pre-existing (type 1 and type 2) diabetes in pregnancy. *Obstetrics Gynaecology Reprod Med*, 17(12):339-344.
- CHEN, D.; WANG, M. W. (2005). Development and application of rodent models for type-1 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 7(4):307-317.
- CHEN, H.; GE, R. S.; ZIRKIN, B. R. (2009) Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol*, 306(1-2):9-16.
- CHEN, X.; SCHOLL, T. O. (2005) Oxidative stress: Changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*, 5(4):282-288.
- CHEUNG, K. K. T.; LUK, A. O. Y.; SO, W. Y.; MA, R. C. W.; KONG, A. P. S.; CHOW, F. C. C.; CHAN, J. C. N. (2015) Testosterone level in men with type 2 diabetes mellitus and related metabolic effects: A review of current evidence. *J Diabetes Investig*, 6(2):112-123.

- CHISWICK, C.; REYNOLDS, R. M.; DENISON, F.; DRAKE, A. J.; FORBES, S.; NEWBY, D. E.; WALKER, B. R.; QUENBY, S.; WRAY, S.; WEEKS, A.; LASHEN, H.; RODRIGUEZ, A.; MURRAY, G.; WHYTE, S.; NORMAN, J. E. (2015) Effect of metformin on maternal and fetal outcomes in obese pregnant women (EMPOWaR): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(10):778-786.
- CLERMONT, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52(1):198-236.
- CLERMONT, Y.; LEBLOND, C. P.; MESSIER, B. (1959) Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*, 48:37-56.
- COLLETA, H. H. M. D.; CARVALHO, H. F. (2005) Células de Leydig. In: CARVALHO, H. F.; OLLARES-BUZATO, C. B. (Ed.). *Células: uma abordagem multidisciplinar*. 1ª ed. Barueri: Manole.
- COOKE, H. J.; SAUNDERS, P.T. K. (2002) Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet*, 3(10):790-801.
- CORREIA-SANTOS, A. M.; SUZUKI, A.; ANJOS, J. S.; RÊGO, T. S.; ALMEIDA, K. C. L.; BOAVENTURA, G. T. (2012) Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas Wistar. *Medicina*, 45(4): 436-444.
- COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. (2003) Espermatogênese em mamíferos. *Scientia Vila Velha*, 4(1/2):53-72.
- COUROT, M. (1980) ABP: the testicular protein that binds androgens. *Reprod Nutr Dev*, 20(2):587-591.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. (1970) Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). *The testis*. New York: Academic Press, v. 1, 339-432 p.
- CUNDY, T.; GAMBLE, G.; NEALE, L.; ELDER, R.; MCPHERSON, P.; HENLEY, P.; ROWAN, J. (2007) Differing causes of pregnancy loss in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30:2603-2607.
- CURTIS, G. M. (1918) The morphology of the mammalian seminiferous tubule. *Am J Anat*, 24:339-394.
- DÁVILA-ESQUEDA, M. E.; MARTÍNEZ-MORALES, F. (2004) Pentoxifylline diminishes the oxidative damage to renal tissue induced by streptozotocin in the rat. *Exp Diabetes Res*, 5(4):245-251.
- DÁVILA-ESQUEDA, M. E.; VERTIZ-HERNÁNDEZ, A. A.; MARTÍNEZ-MORALES, F. (2005) Comparative analysis of the renoprotective effects of pentoxifylline and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Ren Fail*, 27(1):115-122.
- DAY, C.; BAILEY, C. J. (2011) Obesity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Life Health Sci*, 11(2).
- DE JONGE, C. J.; HAN, H. L.; LAWRIE, H.; MACK, S. R.; ZANEVELD, L. J. (1991) Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool*, 258(1):113-125.
- DELLMANN, H. D.; WROBEL, K. H. (1982) Sistema Reprodutor Masculino. IN DELMANN, H. D.; BROWN, E. M. (Ed.). *Histologia Veterinária*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.

- DeRUITER, J. (2003) Overview of the antidiabetic agents. Endocrine Pharmacotherapy Module, Spring.
- DESJARDINS, C.; EWING, L.L. (1993) Cell and molecular biology of the testis. New York: Oxford University Press.
- DORST, V.J.; SAJONSKI, H. (1974) Morphometrische Untersuchungen am Tubulussystem des Schweinehodens während der postnatale Entwicklung. *Monatsh Veterinärmed*, 29:650-652.
- DRIES, S. S.; SOARES, B. S.; ANDRADE, F. M.; PERASSOLO, M. S. (2011) Estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em tratamento com metformina. XII Salão de Iniciação Científica – PUCRS.
- DRIES, S. S.; SOARES, B. S.; VERZA, S. G.; ZIULKOSKI, A. L.; LINDEN, R.; ANDRADE, F. M.; PERASSOLO, M. S. (2017) Oxidative stress in patients with type 2 diabetes *mellitus* treated with metformin. *Sci Med*, 27(2).
- DURAIRAJANAYAGAM D.; RENGAN, A.; SHARMA, R.; AGARWAL, A. (2015) Sperm biology from production to ejaculation. In: SCHATTMAN, G.; ESTEVES, S.; AGARWAL, A. (Ed.). *Unexplained Infertility*. New York: Springer.
- ELSAYED, A. M. (2012) Oral Delivery of Insulin: Novel Approaches. InTech.
- ESTEVES, S. C.; SPAINE, D. M.; CEDENHO, A. P. (2007) Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Braz J Med Biol Res*, 40(7):985-992.
- ETUK, E. U. (2010) Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am*, 1(2):130-134.
- FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. (1994) Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: LUCA, R. R. (Ed.). *Manual para técnicos de biotério*. São Paulo: Cobeia.
- FANTUS, G. (2015) Is metformin ready for prime time in pregnancy? Probably not yet. *Diabetes Metab Res Rev*, 35:36-38.
- FAWCET, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. (1973) Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*, 9(5):500-532.
- FEYLI, S. A.; GHANBARI, A.; KESHTMAND, Z. (2017) Therapeutic effect of pentoxifylline on reproductive parameters in diabetic male mice. *Andrologia*, 49(1).
- FISHBECK, K. L.; RASMUSSEN, K. M. (1987) Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr*, 117(11):1967-1975.
- FRAGA, P. L.; MARTINI-SANTOS, B. J.; SEVERINO, B. N. S.; OLIVEIRA, M. R. S.; FRANÇA, G. R. (2012) A interface entre o Diabetes Mellitus tipo II e a hipertensão arterial sistêmica: Aspectos bioquímicos. *Cadernos UniFOA*, 7(20).
- FRANÇA, L. R.; CHIARINI-GARCIA, H. (2005) Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H. F.; OLLARES-BUZATO, C. B. (Ed.). *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole.
- FRANÇA, L.R. (1991) Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- FRANCO, L. D. P. (2007) Dieta hiperlipídica e exercício físico: Consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - Estudo Em Modelo Animal. Dissertação de Mestrado – Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 1;9(1):25-53.
- GARCIA, S. M. L.; GARCIA FERNANDEZ, C. (2003) Embriologia. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed.
- GHANBARI, E.; NEJATI, V.; KHAZAEI, M. (2016) Antioxidant and protective effects of Royal jelly on histopathological changes in testis of diabetic rats. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 14(8):519–526.
- GHASEMI, A.; KHALIFI3, S.; JEDI, S. (2014) Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (Review). *Acta Physiol Hung*,101(4):408-420.
- GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. P. (2001) Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*, 4(2B):611-24.
- GODINHO, C.L. (1999) Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Dissertação de Mestrado – Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GRAHAM, G. G.; PUNT, J.; ARORA, M.; DAY, R. O.; DOOGUE, M. P.; DUONG, J. K.; FURLONG, T. J.; GREENFIELD, J. R.; GREENUP, L. C.; KIRKPATRICK, C. M.; RAY, J. E.; TIMMINS, P.; WILLIAMS, K. M. (2011) Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet*, 50(2):81-98.
- GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; MAZIERO, R. R.; MARTIN, I.; AVANZI, B. R.; DELLAQUA JR, J. A.; PAPA, F. O. (2013) Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. *J Equine Vet Sci*, 33(12):1153-1156.
- GWARZO, M. Y.; AHMADU, J. H.; AHMAD, M. B.; DIKKO, A. U. A. (2014) Serum glucose and malondialdehyde levels in alloxan induced diabetic rats supplemented with methanolic extract of *Tacazzea apiculata*. *Int J Biomed Sci*, 10(4):236-242.
- HASSEN, N. S.; EL ROUBI, N. M.; OMARA, E. A. (2007) Evaluation of the influence of each of melatonin and chromium against diabetes-induced alteration in the testis of albino rats using light and electron microscopies. *Egypt J Hosp Med*, 27:143-162.
- HATANO, O.; TAKAKUSU, A.; NOMURA, M.; MOROHASHI, K. (1996) Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF1. *Genes Cells*, 1(7):663-671.
- HEIDRICH, H.; SCHIROP, T. (1980) Blood glucose and serum insulin levels following acute and chronic pentoxifylline administration. *Acta Diabetol Lat*, 17(1):15-21.
- HELD, P. (2010) An Introduction to reactive oxygen species - Measurement of ROS in cells. BioTek Instruments, Inc.
- HELLER, C. H.; CLERMONT, Y. (1964) Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res*, 20:545-75.
- HESS, R. A. (1998) Stages: Interactive Software on Spermatogenesis. 2.2 ed. Champaign: Vanguard Productions and Cache River Press. 1 CD.

- HESS, R. A.; FRANCA L. R. (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. (Ed.). *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Austin: Landes Bioscience/Springer Science, 1-15 p.
- HOCHEREAU-DE-RIVIERS, M. T.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. (1987) Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil Suppl*, 34:101-14.
- HOOKER, C.W. (1970) The intertubular tissue of the testis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDERMARK, N. L. (Ed.). *The Testis*. New York: Academic Press.
- HUSSAIN, A.; HYDRIE, M. Z. I.; CLAUSSEN, B.; ASGHAR, S. (2010) Type 2 diabetes and obesity: A review. *J Diabetol*, 2(1).
- IDF - International Diabetes Federation (2012). *Clinical Guidelines Task Force. Global Guideline for Type 2 Diabetes*. Disponível em: <<https://www.idf.org/>> Acesso em: 04/07/2017.
- JAHNUKAINEN, K.; CHRYSIS, D.; HOU, M.; PARVINEN, M.; EKSBORG, S.; SÖDER, O. (2004) Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod*, 70(2):290-296.
- JAKUS, V.; RIETBROCK, N. (2004) Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*, 53(2):131-142.
- JOHNSON, L. (1986) Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl*, 7(6):331-354.
- JOHNSON, L. (1991) Spermatogenesis. In: CUPPS, P. T. (Ed.). *Reproduction in domestic animal*. 4ª ed. San Diego: Academic Press.
- JOSHI, S. R.; PARIKH, R. M.; DAS, A. K. (2007) Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc Physicians India*, 55:19-25.
- JOVANOVIC, L. (2001) Diabetes and pregnancy: glucose-mediated macrosomia and the fetus. Disponível em: <<http://www.medscape.org/viewarticle/418574>> Acesso em: 23/08/2017.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. (2013) *Histologia Básica*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 538 p.
- KAEFER, M.; DE CARVALHO, J. A.; PIVA, S. J.; DA SILVA, D. B.; BECKER, A. M.; SANGOI, M. B.; ALMEIDA, T. C.; HERMES, C. L.; COELHO, A. C.; TONELLO, R.; MOREIRA, A. P.; GARCIA, S. C.; MORETTO, M. B.; MORESCO, R. N. (2012) Plasma malondialdehyde levels and risk factors for the development of chronic complications in type 2 diabetic patients on insulin therapy. *Clin Lab*, 58(9-10):973-978.
- KALRA, S.; GUPTA, Y. (2015) Sulfonylureas. *J Pak Med Assoc*, 65(1):101-4.
- KC, K.; SHAKYA, S.; ZHANG, H. (2015) Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Ann Nutr Metab*, 66(2):14-20.
- KELLY, L.; EVANS, L.; MESSENGER, D. (2005) Controversies around gestational diabetes. *Can Fam Physician*, 51(5):688-695..
- KERVAN, A.; GUILLAUME, M.; JOST, A. (1978) The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia*, 15:387-393.

KHANESHI, F.; NASROLAHI, O.; AZIZI, S.; NEJATI, V. (2013) Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Avicenna J Phytomed*, 3(4):347-355.

KIERSZENBAUM, A.L. (2004) *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução a Patologia*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

KINALSKI, M.; ŚLEDZIEWSKI, A.; TELEJKO, B.; ZARZYCKI, W.; KINALSKA, I. (1999) Antioxidant therapy and streptozotocin-induced diabetes in pregnant rats. *Acta Diabetol*, 36(3):113-117.

KISS, A. C.; LIMA, P. H.; SINZATO, Y. K.; TAKAKU, M.; TAKENO, M. A.; RUDGE, M. V.; DAMASCENO, D. C. (2009) Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr*, 1(1):21.

KOROGLU, P.; BULAN, O. K.; TURKYILMAZ, I. B.; BUGAN, I.; ALTUN, S.; YANARDAG, R. (2016) Metformin ameliorates testicular damage in diabetes and prostate cancer model. *European Microscopy Congress 2016: Proceedings*.

KOVO, M.; HAROUTIUNIAN, S.; FELDMAN, N.; HOFFMAN, A.; GLEZERMAN, M. (2008) Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 136(1):29-33.

KRETSER, D. M.; LOVELAND, K. L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N. (1998) Spermatogenesis. *Hum Reprod*, 13(1):1-8.

KUBO, A.; FERRARA, A.; WINDHAM, G. C.; GREENSPAN, L. C.; DEARDORFF, J.; HIATT, R. A.; QUESENBERRY JR, C. P.; LAURENT, C.; MIRABEDI, A. S.; KUSHI, L. H. (2014) Maternal hyperglycemia during pregnancy predicts adiposity of the offspring. *Diabetes Care*, 37:2996–3002.

KUMAWAT, M.; SHARMA, T. K.; SINGH, I.; SINGH, N.; GHALAUT, V. S.; VARDEY, S. K.; SHANKAR, V. (2013). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus patients with and without nephropathy. *N Am J Med Sci*, 5(3):213-9.

LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY, M. L.; FERNÁNDEZ-MEJÍA, C. (2013) Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. (Ed.). *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/oxidative-stress-in-diabetes-mellitus-and-the-role-of-vitamins-with-antioxidant-actions>> Acesso em: 20/11/2017.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT; Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, 55(4):548-573.

LEJEUNE, H.; HABERT, R.; SAEZ, J. M. (1998) Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *J Mol Endocrinol*, 20(1):1-25.

LEMOS, A. J.; PEIXOTO, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; LUNA, R. L.; ROCHA, S. W.; SANTOS, H, M.; SILVA, A. K. NUNES, A. K.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. (2014) Effect of the combination of metformin hydrochloride and melatonin on oxidative stress before and during pregnancy, and biochemical and histopathological analysis of the livers of rats after treatment for polycystic ovary syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol*, 280(1):159-168.

- LENZEN, S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2):216-226.
- LENZEN, S.; PANTEN, U. (1988). Alloxan: History and mechanism of action. *Diabetologia*, 31(6):337-342.
- LI, Y. Q.; YE, S. D.; ZHAI, L. M.; HU, W. (2016) Effects of metformin on expression of renal tissue AGEs in type 2 diabetic rats. *Chin Pharmacol Bulletin*, 32(5):703-707.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265-275.
- MAASSEN, J. A.; TOBIAS, E. S.; KAYSERILLI, H.; TUKEL, T.; YUKSEL-APAK, M.; D'HAENS, E.; KLEIJER, W. J.; FÉRY, F.; VAN DER ZON, G. C. (2003) Identification and functional assessment of novel and known insulin receptor mutations in five patients with syndromes of severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9):4251-4257.
- MACHADO, U. F. (1998) Transportadores de glicose. *Arq Bras End Met*, 42(6):413-421.
- MADHU, S. V.; ASLAM, M.; GALAV, V.; BHATTACHARYA, S. K.; JAFRI, A. A. (2014) Atorvastatin prevents type 2 diabetes mellitus-an experimental study. *Eur J Pharmacol*, 728:135-140.
- MAGNUSSON, M. V. (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pentoxifylline and metabolites. Lund University, Faculty of Medicine. Disponível em: <<https://lucris.lub.lu.se/ws/files/3817295/1365883.pdf>> Acesso em: 07/11/2017.
- MAGRE, S.; JOST, A. (1991) Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J Electron Microsc Tech*, 19(2):172-88.
- MARTINS, L. (2010) Disponível em: <<http://biobioradicaislivres.blogspot.com.br/2010/12/peroxidacao-lipidica.html>> Acesso em: 01/12/2017.
- MASIELLO, P.; BROCA, C.; GROSS, R.; ROYE, M.; MANTEGHETTI, M.; HILLAIRE-BUYS, D.; NOVELLI, M.; RIBES, G. (1998) Experimental NIDDM: Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47(2):224-229.
- MASSART, J.; ROBIN, M. A.; NOURY, F.; FAUTREL, A.; LETTÉRON, P.; BADO, A.; ELIAT, P. A.; FROMENTY, B. (2012) Pentoxifylline aggravates fatty liver in obese and diabetic ob/ob mice by increasing intestinal glucose absorption and activating hepatic lipogenesis. *Br J Pharmacol*, 165(5):1361-1374.
- MATSON, P. L.; YOVICH, J. M.; EDIRISINGHE, W. R.; JUNK, S. M.; YOVICH, J. L. (1995) An argument for the past and continued use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*, 10(1):67-71.
- MATSUMOTO, A. M. (2002) Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 57(2):76-99.
- MAXWELL, D. T.; JACOBSON, J. D.; KING, A.; CHAN, P. J. (2002) Effect of pentoxifylline on tumor suppressor and proto-oncogene apoptosis in sperm. *J Assist Reprod Genet*, 19(6):279-283.

- MAYERHOFER, A.; LAHR, G.; SEIDL, K.; EUSTERSCHULTE, B.; CHRISTOPH, A.; GRATZL, M. (1996) The neural cell adhesion molecule (NCAM) provides clues to the development of testicular Leydig cells. *J Androl*, 7(3):223-230.
- MAYERHOFER, A.; SEIDL, K.; LAHR, G.; BITTER-SUERMAN, D.; CHRISTOPH, A.; BARTHELS, D.; WILLE, W.; GRATZL, M. (1992) Leydig cells express neural cell adhesion molecules *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 47(4):656-654.
- MCLELLAN, K. C. P.; BARBALHO, S. M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A. C. (2007) Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. *Rev Nutr*, 20(5):515-524.
- MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C.; ARIYARATNE, H. B.; TEUNISSEN VAN MANEN, K. R.; HAUPT, R. L. (1998) Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod*, 59(2):351-357.
- MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; ARIYARATNE, H. B. (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod*, 65(3):660-671.
- MERCHANT-LARIOS, H.; MORENO-MENDOZA, N.; BUEHR, M. (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol*, 37(3):407-15.
- MIDDENDORFF, R.; DAVIDOFF, M.; HOOLSTEIN, A. F. (1993) Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells - Changes by disturbances of testicular function. *Andrologia*, 25(5):257-262.
- MIMICA-DUKIĆ, N.; SIMIN, N.; SVIRČEV, E.; ORČIĆ, D.; BEARA, I.; LESJAK, M.; BILJANA BOŽIN, B. (2012) The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. In: CATALA, A. (Ed.). *Lipid Peroxidation*. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/the-effect-of-plant-secondary-metabolites-on-lipid-peroxidation-and-eicosanoid-pathway>> Acesso: 08/12/2017.
- MONTANARI, T. (2016) Atlas digital de Biologia celular e tecidual. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/atlasbiocel>> Acesso em: 01/12/2017.
- MONTENEGRO JR, R.; CHAVES, M.; FERNANDES, V. (2016) Fisiologia pancreática: Pâncreas endócrino. In: ORIA, R. B.; BRITO, G. A. C. (Ed.). *Sistema digestório: Integração básico-clínica*. 1ª ed. São Paulo: Blucher, 523-574 p.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. (2004) *Embriologia Básica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- MORADI, M.; MAHMOODI, M.; RAOOFI, A.; GHANBARI, A. (2015) Chorionic morphine, naltrexone and pentoxifylline effect on hypophyso-gonadal hormones of male rats. *Bratisl Lek Listy*, 116(4):276-279.
- MORAES, T. A. P.; JASSET, P. F.; TORRES, S. M.; MORAES, A. V.; SILVA JÚNIOR, V. A.; GUERRA, M. M. P. (2009) Efeito do uso de pentoxifilina no período neonatal sobre a produção espermática em ratos Wistar adultos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61(1):80-87.
- MORALES, A.; MOHAMED, F.; CAVICCHIA, J. C. (2007) Apoptosis and blood-testis barrier during the first spermatogenic wave in the pubertal rat. *Anat Rec*, 290(2):206-214.
- MORENO, R. D.; LIZAMA, C.; URZÚA, N.; VERGARA, S. P.; REYES, J. G. (2006) Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res*, 325(3):533-540.

- MOUSTAFA, F.; FELDMAN, S. R. (2014) A review of phosphodiesterase-inhibition and the potential role for phosphodiesterase 4-inhibitors in clinical dermatology. *Dermatol Online J*, 20(5):22608.
- MURTA, D. V. F.; COSTA, D. S.; RODRIGUES, W. B. (2008) Evolução do processo de luminação do epitélio seminífero em javalis (*Sus scrofa scrofa*). Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0729-3.pdf> Acessado em: 27/02/2016.
- MYLONAS, C.; KOURETAS, D. (1999) Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13(3):295-309.
- NADINE, G. (2011) Estudo dos polimorfismos dos genes de enzimas de metabolização/detoxificação na susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- NEVES, B. V. D.; LORENZINI, F.; VERONEZ, D.; MIRANDA, E. P.; NEVES, G. D.; FRAGA, R. (2017) Numeric and volumetric changes in Leydig cells during aging of rats. *Acta Cir Bras*, 2(10):807-815.
- NEVES, E. S. (2001) Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*). Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- NOBERASCO, G.; ODETTI, P.; BOERI, D.; MAIELLO, M.; ADEZATI, L. (1991) Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed Pharmacother*, 45(4-5):193-196.
- NOORI, S. (2012) An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Sci Rep*, 1(8).
- NOURI, M.; MOVASSAGHI, S.; FOROUMADI, A.; SOLEIMANI, M.; SHARIFI, Z. N. (2016) Protective effect of pentoxifylline on male Wistar rat testicular germ cell apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Iran J Basic Med Sci* 19(6):646-652.
- OAKBERG, E. F. (1956) A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat*, 99:391-413.
- O'DONNELL, L.; STANTON, P.; KRETSEK, D. M. (2017) Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis. In: DE GROOT, L. J.; CHROUSOS, G.; DUNGAN, K.; FEINGOLD, K. R.; GROSSMAN, A.; HERSHMAN, J. M.; KOCH, C.; KORBONITS, M.; MCLACHLAN, R.; NEW, M.; PURNELL, J.; REBAR, R.; SINGER, F.; VINIK, A. (Ed.). *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com.
- OLIVEIRA, J. S.; SILVA, A. A. N.; MAGALHÃES, C. P.; SOUZA, S. L.; SILVA JUNIOR, V. A.; NEVES, E. M. (2015) Protein restriction during intrauterine and lactation periods: effects on testicular development in pre-puberty rats. *Acta Sci Biol Sci*, 37(1):107-112.
- OLIVEIRA, J. S.; SILVA, A. A. N.; SOUZA, S. L.; MORAIS, R. N.; NEVES, E. M.; MAIA, F. C. L.; SILVA JUNIOR, V. A. (2017) Histomorphometric evaluation of the testicular parenchyma of rats submitted to protein restriction during intrauterine and postnatal life. *Turk J Biol*, 41:428-438.
- OMS – Organização Mundial da Saúde (2017) Diabetes. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> Acesso em: 02/02/2018.

- ORTH, J. M. (1993) Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C., EWING, L. L. (Ed.). *Cell and Molecular Biology of the Testis*. 1^a ed. New York: Oxford University Press, 3-42 p.
- PELLINIEMI, L.J.; KUPIO, T.; FRODJAM, K. (1996) The cell biology and functional of fetal Leydig cell. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSEL, L.D. *The Leydig cell*. Viena: Cache river press, 143-157 p.
- PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. (2003) Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clin Diabetes*, 21(4):186-187.
- PEREY, B.; CLERMONT, Y.; LEBLOND, C. P. (1961) The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat*, 108:47-77.
- PITETTI, J. L.; CALVEL, P.; ZIMMERMANN, C.; CONNE, B.; PAPAIOANNOU, M. D.; AUBRY, F.; CEDERROTH, C. R.; URNER, F.; FUMEL, B.; CRAUSAZ, M.; DOCQUIER, M.; HERRERA, P. L.; PRALONG, F.; GERMOND, M.; GUILLOU, F.; JÉGOU, B.; NEF, S. (2013) An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol*, 27(5):814-827.
- POLANCO PONCE, A. C.; REVILLA MONSALVE, M. C.; PALOMINO GARIBAY, M. A.; ISLAS ANDRADE, S. (2005) Effect of maternal diabetes on human and rat fetal development. *Ginecol Obstet Mex*, 73(10):544-552.
- PONCE, A. A.; FIOL DE CUNEO, M.; RUIZ, R. D.; VINCENTI, L. M.; SANTILLÁ, M. E.; STUTZ, G.; LACUARA, J. L. (1999) Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. *Arch Androl*, 43(1):77-84.
- POURMASUMI, S.; Mohsen, M.; Mehrabani, M.; Anjomshoa, M. (2017) Anti-apoptotic effect of semelil on testicular germ cells in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Global J Reprod Med*, 2(2).
- PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. (2006) Islet β cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 16(7):1802-12.
- QUEIROZ, G. C. D.; OLIVEIRA, V. V. G.; GUEIROS, O. G.; TORRES, S. M.; MAIA, F. C. L.; TENORIO, B. M.; MORAIS, R. N.; SILVA JUNIOR, V. A. (2013) Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. *Anim Reprod* 10(1):45-54.
- RADFAR, M.; LARIJANI, B.; HADJIBABAIE, M.; RAJABIPOUR, B.; MOJTAHEDI, A.; ABDOLLAHI, M. (2005) Effects of pentoxifylline on oxidative stress and levels of EGF and NO in blood of diabetic type-2 patients; a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial. *Biomed Pharmacother*, 59(6):302-306.
- RAINS, J. L.; JAIN, S. K. (2011) Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 50(5): 567-575.
- RAMANI, M.; KHECHAI, F.; OLLIVIER, V.; TERNISIEN, C.; BRIDEY, F.; HAKIM, J.; DE PROST, D. (1994) Interleukin-10 and pentoxifylline inhibit C-reactive protein-induced tissue factor gene expression in peripheral human blood monocytes. *FEBS Lett*, 356(1):86-88, 1994.

- REED, M. J.; MESZAROS, K.; ENTES, L. J.; CLAYPOOL, M. D.; PINKETT, J. G.; GADBOIS, T. M.; REAVEN, G. M. (2000). A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*, 49(11):1390-1394.
- ROCHA, D. C. M.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L. R. (1999) Exposure to constant light during testis development increase daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue Cell*, 31(3):372-379.
- RODEMÉR-LENZ, E. (1989) On cell contribution to gonadal soma formation in quail-chick chimeras during the indifferent stage of gonadal development. *Anat Embryol (Berl)*, 179(3):237-242.
- RODRIGUES, M. H. (2010) Análise morfológica e funcional do desenvolvimento testicular de caprinos da raça alpina criados em condições semi-intensivas. Tese de Doutorado – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; VIGUERAS-VILLASEÑOR; R. M.; MILLÁN, S.; MORAN, N.; TREJO, R.; NATHANIELSZ, P. W.; LARREA, F.; ZAMBRANO, E. (2012) Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J Dev Orig Health Dis*, 3(5):321-326.
- ROJAS, L. B. A.; GOMES, M. B. (2013) Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*, 5(6).
- ROMERO, A.; VILLAMAYOR, F.; GRAU, M. T.; SACRISTÁN, A.; ORTIZ, J. A. (1992) Relationship between fetal weight and litter size in rats: Application to reproductive toxicology studies. *Reprod Toxicol*, 6(5):453-456.
- ROSEBOOM, T. J.; VAN DER MEULEN, J. H.; RAVELLI, A. C.; OSMOND, C.; BARKER, D. J.; BLEKER, O. P. (2001) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol*, 185(1-2):93-98.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis. 1ª ed. Clearwater, FL: Cache River Press, 286 p.
- RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. (1995) Building a testis. *Tissue Cell*, 27(2):129-147.
- SAAD, S. Y.; TAWFEEG AO NAJJAR, T. A. O.; ALASHARI, M. (2004) Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31(12):862-867.
- SALOMAKI, H.; HEINANIEMI, M.; VAHATALO, L. H.; AILANEN, L.; EEROLA, K.; RUOHONEN, S. T. PESONEN, U.; KOULU, M. (2014) Prenatal metformin exposure in a maternal high fat diet mouse model alters the transcriptome and modifies the metabolic responses of the offspring. *PLoS One*, 9(12).
- SAMLASKA, C. P.; WINFIELD, E. A. (1994) Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol*, 30(4):603-621.
- SAVAS, C.; DINDAR, H.; BILGEHAN, A.; ATAUGLU, O.; YUCESAN, S. (2002) Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. *Scand J Urol Nephrol*, 36(1):65-70.
- SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes (2003) Consenso Brasileiro sobre Diabetes. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. São Paulo.

- SETCHELL, B. P. (1991) Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.). *Reproduction in Domestic Animals*. 4^a ed. San Diego: Academic Press Inc.
- SHARMA, R. K. (2013) Physiology of male gametogenesis. In: FALCONE, T.; HURD, W. W. (Ed.). *Clinical Reproductive Medicine and Surgery - A Practical Guide*. 2^a ed. New York: Springer.
- SHARMA, R.; AGARWAL, A. (2011) Spermatogenesis: An Overview. In: Zini, A.; Agarwal, A. (Ed.). *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. New York: Springer.
- SHARMA, R.; DAVE, V.; SHARMA, S.; JAIN, P.; YADAV, S. (2013) Experimental models on diabetes: a comprehensive review. *Int J Adv Pharm Sci*, 4:1-8.
- SHARPE, R. M. (1994) Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NELLY, J. D. (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2^a ed. New York: Raven Press.
- SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S. (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125(6):769-784.
- SIDDIQUI, I. A.; RAISUDDIN, S.; SHUKLA, Y. (2005) Protective effects of black tea extract on testosterone induced oxidative damage in prostate. *Cancer Lett*, 227(2):125-132.
- SILBER, S. J. (1991) Effect of Age on Male Fertility. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 9(3).
- SILBER, S. J. (2010) Sperm retrieval for azoospermia and intracytoplasmic sperm injection success rates – A personal overview. Disponível em: <<http://www.infertile.com/sperm-retrieval-azoospermia-intracytoplasmic-sperm-injection-success-rates/>> Acesso em: 12/10/2017
- SILVA JUNIOR, V. A.; VIEIRA, A. C.; PINTO, C. F.; DE PAULA, T. A.; PALMA, M. B.; LINS AMORIM, M. J.; AMORIM JR, A. A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. (2006) Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod Nutr Dev*, 46(2):157-166.
- SILVA, A. A. N., OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, R. R.; MORAES, S. R. A.; SILVA JUNIOR, V. A.; NEVES, E. M. (2014) Evaluation of quantitative parameters of Leydig cell in diabetic adults rats. *Acta Sci Biol Sci*, 36(4):483-489.
- SILVA, A. A. S.; OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, R. R.; MORAES, S. R. A.; SILVA JUNIOR, V. A.; NEVES, E. M. (2014) Evaluation of quantitative parameters of Leydig cell in diabetic adults rats. *Acta Sci Biol Sci*, 36(4):483-489.
- SIRIL ARIYARATNE, H. B. S.; MENDIS-HANDAGAMA, S. C.; HALES, D. B.; MASON J. I. (2000) Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol of Reprod*, 63(1):165-171.
- SONG, Y.; LI, J.; ZHAO, Y.; QIJUAN ZHANG, Q.; LIU, Z.; LI, J.; CHEN, X.; YANG, Z.; YU, C.; XIAO, X. (2012) Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet. *Exp Diabetes Res*, 2012.

- SÖNMEZ, M. F.; KILIÇ, E.; KARABULUT, D.; ÇILENK, K.; DELİGÖNÜL, E.; DÜNDAR, M. (2016) Nitric oxide synthase in diabetic rat testicular tissue and the effects of pentoxifylline therapy. *Syst Biol Reprod Med*, 62(1):22-30.
- SOULIMANE-MOKHTARI, N. A.; GUERMOUCHE, B.; YESSOUFOU, A.; SAKER, M.; MOUTAIROU, K.; HICHAMI, A.; MERZOUK, H.; KHAN, N. A. (2005) Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin Sci (Lond)*, 109(3):287-295.
- SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*, 52(4):313-320.
- SUBRAMANIAN, S. P.; PRASATH, G. S. (2014) Antidiabetic and antidyslipidemic nature of trigonelline, a major alkaloid of fenugreek seeds studied in high-fat-fed and low-dose streptozotocin-induced experimental diabetic rats. *Biomed Prev Nutr*, 4 (4):475–480.
- SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. (2006) *The Laboratory Rat*. 2^a ed. Amsterdam; Boston: Elsevier.
- TAKHTFOOLADI, M. A.; MOAYER, F.; TAKHTFOOLADI, H. A. (2015) Beneficial effect of pentoxifylline into the testis of rats in an experimental model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *Int Braz J Urol*, 41(3):576-583.
- TANGVARASITTICHAI, S. (2015) Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 6(3): 456-480.
- TARTARIN P.; MOISON, D.; GUIBERT, E.; DUPONT, J.; HABERT, R.; ROUILLER-FABRE, V.; FRYDMAN, N.; POZZI, S.; FRYDMAN, R.; LECUREUIL, C.; FROMENT, P. (2012) Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum Reprod*, 27(11):3304-3314.
- TEIXEIRA, C. V.; SILANDRE, D.; SANTOS, A. M. S.; DELALANDE, C.; SAMPAIO, F. J. B.; CARREAU, S.; RAMOS, C. F. (2007) Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol*, 192(2):301-311.
- TENORIO, B. M.; JIMENEZ, G. C.; MORAIS, R. N.; TORRES, S. M.; NOGUEIRA, R. A.; SILVA JUNIOR, V. A. (2011) Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. *J Appl Toxicol*, 31:223-230.
- TESSIER, D.; MAHEUX, P.; KHALIL, A.; FULOP, T. (1999) Effects of gliclazide versus metformin on the clinical profile and lipid peroxidation markers in type 2 diabetes. *Metabolism*, 48(7):897-903.
- THOMPSON, L. P.; AL-HASAN, Y. (2012) Impact of oxidative stress in fetal programming. *J Pregnancy*, 2012.
- TOURNAYE, H.; DEVROEY, P.; CAMUS, M.; VAN DER LINDEN, M.; JANSSENS, R.; VAN STEIRTEGHEM, A. (1995) Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*, 10(1):71-79.
- TREVISAN, R. (2008) Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: Análise de dois ecossistemas catarinenses. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- TRIPATHI, R.; TYAGI, S.; GOEL, V. (2017) Metformin in gestational diabetes mellitus. *Indian J Med Res*, 145(5):588–591.
- TRIPATHI, V.; VERMA, J. (2014) Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(6):29-32.
- TZANETAKOU, I. P.; MIKHAILIDIS, D. P.; PERREA, D. N. (2011) Nutrition during pregnancy and the effect of carbohydrates on the offspring's metabolic profile: in search of the “perfect maternal diet”. *Open Cardiovasc Med J*, 5:103-109.
- ULLAH, A.; KHAN, A.; KHAN, I. (2016) Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharm J*, 24(5):547-553.
- VAMBERGUE, A.; FAJARDY, I. (2011) Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J Diabetes*, 2(11):96-203.
- VAN BELLE, T.; COPPIETERS, K.; VON HERRATH, M. (2011) Type1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological Reviews*, 91(1):79-118.
- VAN DE LAAR, F. A. (2008) Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*, 4(6):1189-1195.
- VAN LIESHOUT, R. J.; VORUGANTI, L. P. (2008) Diabetes mellitus during pregnancy and increased risk of schizophrenia in offspring: a review of the evidence and putative mechanisms. *J Psychiatry Neurosci*, 33(5):395-404.
- VANKY, E.; ZAHLSSEN, K.; SPIGSET, O.; CARLSEN, S. M. (2005) Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 83:1575-1578
- VICKERS, M. H.; CUPIDO, C. L.; GLUCKMAN, P. D. (2007) Developmental programming of obesity and type 2 diabetes. *Fetal Matern Med Rev*, 18(1):1-23.
- VIOLLET, B. GUIGAS B, SANZ GARCIA N, LECLERC J, FORETZ M, ANDREELLI F. (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, 122(6):253-270.
- WADA - World Anti-Doping Program (2015). Diabetes Mellitus. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada-tpg-diabetes_mellitus-3.0-en.pdf> Acesso em: 04/07/2017.
- WAHABI, H. A.; ESMAEIL, S. A.; FAYED, A.; AL-SHAIKH, G.; ALZEIDAN, R. A. (2012) Pre-existing diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes. *BMC Res Notes*, 5:496-500.
- WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H. G.; CAMEJO, G. (1993) Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*, 208(1):10-15.
- WARD, A.; CLISSOLD, S. P. (1987) Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*, 34:50-97.
- WEISS, M. A. (2009) The structure and function of insulin: decoding the TR transition. *Vitam Horm*, v 80:33-49.
- WEISS, M.; STEINER, D. F.; PHILIPSON, L. H. (2014) Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. In: DE GROOT, L. J.; CHROUSOS, G.; DUNGAN, K.; FEINGOLD, K. R.; GROSSMAN, A.; HERSHMAN, J. M.; KOCH, C.; KORBONITS, M.; MCLACHLAN,

R.; NEW, M.; PURNELL, J.; REBAR, R.; SINGER, F.; VINIK, A. (Ed.). Endotext [Internet]. South Dartmouth: MDText.com, Inc.

WHILLIER, S.; KUCHEL, P. W.; RAFTOS, J. E. (2011). Oxidative stress in type ii diabetes mellitus and the role of the endogenous antioxidant glutathione. In: Croniger, C. (Ed.). Role of the Adipocyte in Development of Type 2 Diabetes. InTech. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/role-of-the-adipocyte-in-development-of-type-2-diabetes/oxidative-stress-in-type-ii-diabetes-mellitus-and-the-role-of-the-endogenous-antioxidant-glutathione>> Acesso em: 18/11/2017.

WILSON, R. D.; ISLAM, M. S. (2012). Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep*, 64(1):129-39.

WU, F.; TIAN, F. J.; LIN, Y.; XU, W. M. (2016) Oxidative stress: placenta function and dysfunction. *Am J Reprod Immunol*, 76(4):258-271.

YAN, W.; MU, Y.; YU, N.; YI, T. L.; ZHANG, Y.; PANG, X. L.; CHENG, D.; YANG, J. (2015) Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist Reprod Genet*, 32(7):1097-1104.

YAO, C.; LI, G.; QIAN, Y.; CAI, M.; YIN, H.; XIAO, L.; TANG, W.; GUO, F.; SHI, B. (2016) Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. *Oxi Med Cell Longev*, 2016.

YESSOUFOU, A.; MOUTAIROU, K. (2011) Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of “Metabolic Memory”. *Exp Diabetes Res*, 2011.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. (2002) What Is Oxidative Stress? *JMAJ*, 45(7):271–276.

YOVICH, J. L. (1993) Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod*, 8(11):1786-1791.

YUNES, R.; FERNÁNDEZ, P.; DONCEL, G. F.; ACOSTA, A. A. (2005) Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition increases tyrosine phosphorylation and hyper motility in normal and pathological human spermatozoa. *Biocell*, 29(3):287-293.

ZAKARIA, A.; AL-BUSADAH, K. A. (2015) Pentoxifylline efficiency in protecting testes against cadmium toxicity. *J Anim Vet Adv*, 14(1):18-29.

ZHAI, L.; GU, J.; YANG, D.; HU, W.; WANG, W.; YE, S. (2017) Metformin ameliorates podocyte damage by restoring renal tissue nephrin expression in type 2 diabetic rats. *J Diabetes*, 9(5):510-517.

ZHAI, L.; YE, S.; GU, J.; YANG, D.; HU, W. (2015) Protective effects of metformin on glomerular podocytes of type 2 diabetes model rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 95(40):3313-3316.

ZHANG, Y. Q.; HE, X. Z.; ZHANG, J. S.; WANG, R. A.; ZHOU, J.; XU, R. J. (2004) Stage-specific localization of transforming growth factor 1 and 3 and their receptors during spermatogenesis in men. *Asian J Androl*, 6:105-109.

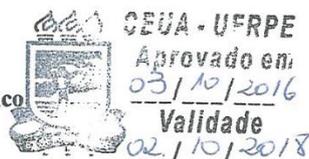
ZHUO, Z.; WANG, A.; YU, H. (2014) Effect of metformin intervention during pregnancy on the gestational diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Res*, 2014.

9. Apêndices

9.1. Autorização do Comitê de Ética do Uso de Animais de Experimentação (CEUA-UFRPE)



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	106/2016
Número do processo	23082.015702/2016-04
Data de emissão da licença	03 de Outubro de 2016
Título do Projeto	Análise Imunopatológica do Sistema reprodutor masculino de ratos provenientes de fêmeas obesas e diabéticas e submetidas ao tratamento com metformina e pentoxifilina
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Colaboradores	Jessica Santana de Oliveira; Simone Regina Barros de Macêdo; Alluanan Adelson do Nascimento Silva
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Ratos Heterogênico Wistar : 30 dias Fêmeas: 25 Prole oriunda acasalamento: 21 dias = 30 / 90 dias= 30 Total de animais : 85 ratos


Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof. Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

9.2. Artigo científico em análise para publicação no Indian Journal of Experimental Biology

AÇÃO PROTETORA DA PENTOXIFILINA SOBRE O TESTÍCULO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES DISTÚRBIOS: UMA REVISÃO

Oliveira, J. S.^a e Silva Junior, V. A.^b

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, 52171-900 - Recife, Pernambuco, Brasil. *e-mail: jessica_so@outlook.com

^bDepartamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, 52171-900 - Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A pentoxifilina, largamente utilizada no tratamento de distúrbios vasculares, é um inibidor inespecífico das fosfodiesterases, que possui propriedades hemorreológicas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Na reprodução humana assistida, ela é utilizada para tratar a infertilidade masculina, atuando no aumento da motilidade e na capacidade de fertilização do espermatozoide. Nos últimos anos, devido à sua diversidade funcional, começou-se a investir a sua atuação nas gônadas masculinas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão de literatura sobre os estudos experimentais que avaliam o efeito protetor da pentoxifilina sobre o testículo de ratos submetidos a diferentes distúrbios. Quatorze artigos foram selecionados, onde foram registrados onze distúrbios aos quais os animais experimentais foram submetidos. Os tratamentos com a pentoxifilina foram avaliados de acordo com o seu efeito na peroxidação lipídica, níveis e atividade das enzimas antioxidantes, níveis de oxidantes, análise histopatológica, número de células em apoptose e atividade da caspase-3, peso e morfometria testicular, avaliação espermática, níveis das testosterona sintases, concentrações séricas de testosterona, LH e FHS, concentrações testiculares de colesterol e testosterona, fluxo sanguíneo testicular, concentração testicular de platina, detecção, expressão gênica e protéica das óxido nítrico sintases e expressão da vimentina nas células de Sertoli. Depois de todas as análises, foi observado que pentoxifilina também pode atuar no organismo de maneira a proteger o parênquima e a função testicular dos danos causados por distúrbios variados, principalmente, através da sua capacidade de inibir a geração das espécies reativas de oxigênio e de estimular as enzimas antioxidantes.

Introdução

A pentoxifilina, ou 1-(5-oxohexil)-3,7-dimetilxantina, é uma metilxantina derivada da teobromina, semelhante à cafeína e à teofilina (OLIVEIRA et al., 2009). Vem sendo utilizada desde 1972 para o tratamento de distúrbios vasculares caracterizados por deficiência na microcirculação regional (MORAES et al., 2009; FEYLI et al., 2017).

Apresenta função de inibidor inespecífico das fosfodiesterases, enzimas que funcionam como moduladores da resposta celular a hormônios através do controle da concentração intracelular de AMP_c e GMP_c (MORAES et al., 2009). Também possui propriedades hemorreológicas, atuando de maneira a aumentar a flexibilidade dos eritrócitos e leucócitos, reduzindo a viscosidade do sangue através da diminuição da concentração de fibrinogênio no plasma, reduzindo a agregação das plaquetas e a formação de trombos e melhorando a oxigenação em tecidos isquêmicos, através do aumento do ATP no interior dos glóbulos vermelhos (WARD; CLISSOLD, 1987; TAKHTFOOLADI et al., 2015).

Além disso, a pentoxifilina também desempenha papel anti-inflamatório, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o qual é responsável pela fragmentação do DNA e apoptose, e limita a resposta inflamatória, com a inibição da cascata do complemento, redução da ativação celular, da fagocitose e da adesão endotelial (DÁVILA-ESQUEDA; MARTÍNEZ-MORALES, 2004; CARNEIRO et al., 2005; QUEIROZ et al., 2013; TAKHTFOOLADI et al., 2015; NOURI et al., 2016).

Diante de todas essas funções, e ainda aliado ao seu papel antioxidante, com redução na produção de superóxidos e combate às espécies reativas de oxigênio (ROS), e na redução da peroxidação lipídica, a qual está associada a lesões nas membranas e à apoptose, a pentoxifilina vêm sendo amplamente utilizada no tratamento de diversos distúrbios (MAXWELL et al., 2002; QUEIROZ et al., 2013).

Na área da reprodução, a pentoxifilina é utilizada para o tratamento de infertilidade masculina através da reprodução humana assistida (MATSON et al., 1995; TOURNAYE et al., 1995; GUAISTI et al., 2013). Graças a sua ação inibidora de fosfodiesterase, há uma elevação nos níveis intracelulares de AMP_c, o que resulta no aumento da fosforilação da tirosina na cauda do espermatozoide, melhorando a sua motilidade, e no estímulo à capacidade de fertilização do espermatozoide, visto que o sistema de segundo mensageiro do AMP_c atua na reação

acrossômica (DE JONGE et al., 1991; YOVICH et al., 1993; CALOGERO, 1998; YUNES et al., 2005; ESTEVES et al., 2007). Além disso, a pentoxifilina auxilia na preservação da integridade da membrana plasmática e do DNA do espermatozoide, através da redução da peroxidação lipídica e das ROS (PONCE et al., 1999; GUASTI et al., 2013; NOURI et al., 2016).

A partir das diversidades funcionais desempenhadas pela pentoxifilina, e pela sua já constante utilização na reprodução, nos últimos anos começou-se a se investigar a sua atuação nas gônadas masculinas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão de literatura sobre os estudos experimentais que avaliam o efeito protetor da pentoxifilina sobre o testículo de ratos submetidos a diferentes distúrbios.

Material e Métodos

Os artigos utilizados neste estudo foram encontrados através de uma pesquisa às bases de dados Scopus, PubMed e MedLine, realizada em Agosto de 2016. Não houve restrição com relação ao ano de publicação, contudo, apenas artigos completos publicados na língua Inglesa, utilizando experimentação *in vivo*, utilizando o rato como modelo experimental e analisando parâmetros testiculares da ação da pentoxifilina foram incorporados ao estudo.

Para a obtenção dos artigos, foi realizada uma estratégia de busca utilizando-se quatro combinações de palavras-chave: 1. *pentoxifylline AND testis*, 2. *pentoxifylline AND testicle*, 3. *pentoxifylline AND reproduction*, 4. *pentoxifylline AND spermatogenesis*.

Os estudos selecionados foram analisados e organizados de acordo com o ano de publicação, o distúrbio ao qual os animais experimentais foram submetidos, a dose da pentoxifilina, o tipo de tratamento proposto, os parâmetros testiculares analisados e a eficiência dos tratamentos.

Resultados e discussão

A pesquisa aos bancos de dados resultou em 503 artigos. Após a seleção de acordo com os objetivos da revisão e a remoção dos estudos duplicados, 14 artigos foram selecionados. A estratégia de busca e a seleção dos estudos estão resumidas na Figura 1.

A Tabela 1 mostra as características dos estudos selecionados. Estes foram organizados com base no ano da publicação e descritos com relação aos autores, o distúrbio utilizado para causar o dano testicular, a dose de pentoxifilina, a frequência e a via de aplicação da dose, a

metodologia de tratamento proposta e os parâmetros testiculares utilizados para avaliar a eficiência dos tratamentos.

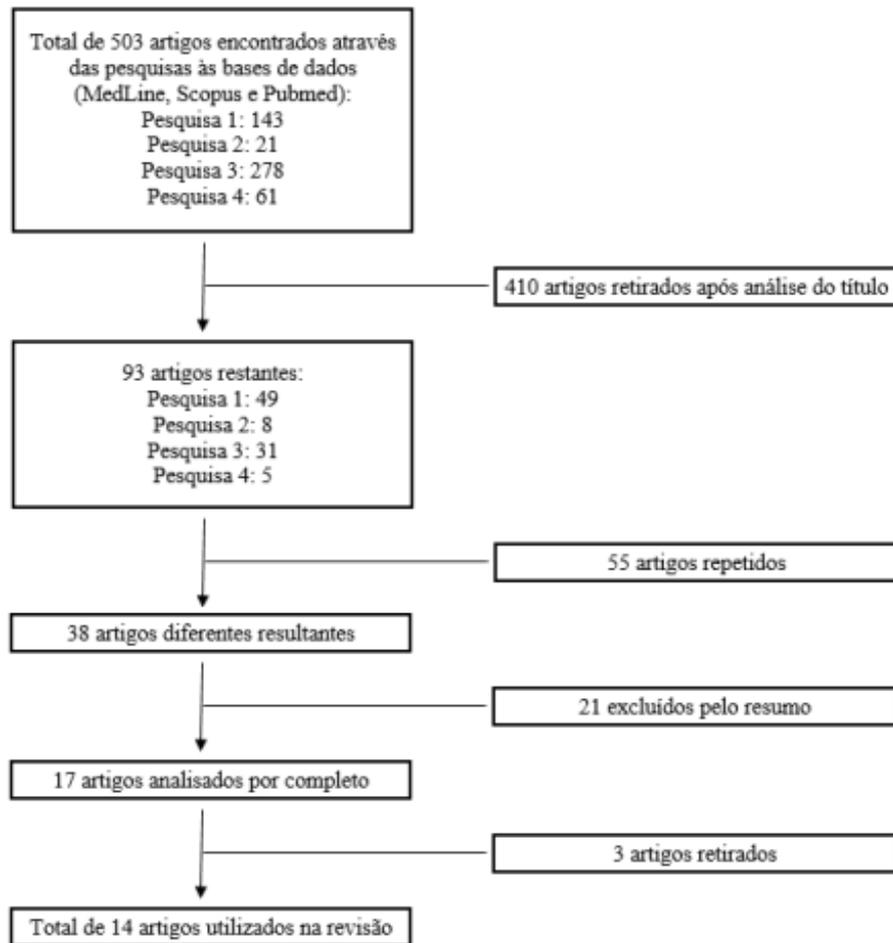


Figura 1. Estratégia de busca às bases de dados MedLine, Scopus e PubMed e seleção dos artigos sobre a ação protetora da pentoxifilina sobre o testículo de ratos submetidos a diferentes distúrbios

Tabela 1. Características metodológicas dos estudos selecionados sobre o efeito protetor da pentoxifilina no testículo de ratos submetidos a diferentes distúrbios

Autores	Ano	Distúrbio	Dose de pentoxifilina	Frequência de aplicação da dose	Via de administração	Tratamento	Parâmetros testiculares analisados
Özokutan, B.H., Küçükaydin, M., Muhtaroglu, S., Tekin, Y.	2001	Isquemia/reperfusão testicular unilateral	25 mg/kg	Aplicação única	Intraperitoneal	Um grupo experimental recebeu a pentoxifilina 5 minutos antes da distorção testicular	Peroxidação lipídica e análise histopatológica
Savas, C., Dindar, H., Bilgehan, A., Ataoglu, O., Yucesan, S.	2002	Isquemia/reperfusão testicular unilateral	50 mg/kg	Aplicação única	Intraperitoneal	Dois grupos experimentais receberam a pentoxifilina 15 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos: um grupo foi submetido à torção e distorção testicular unilateral e um grupo foi sham-operado	Peroxidação lipídica e análise histopatológica
Savas, C., Dindar, H., Aras, T., Yücesan, S.	2002	Isquemia/reperfusão testicular unilateral	50 mg/kg	Aplicação única	Intraperitoneal	Dois grupos experimentais receberam a pentoxifilina 15 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos: um grupo foi submetido à torção e distorção testicular unilateral e um grupo foi sham-operado	Fluxo sanguíneo testicular
Saad, S. Y., Najjar, T. A. O., Alashari, M.	2004	Exposição à cisplatina	50 mg/kg	Aplicação diária por 2 semanas	Intraperitoneal	Dois grupos experimentais receberam a pentoxifilina: um grupo exposto a cisplatina, uma semana após o início do tratamento com a pentoxifilina, e um grupo controle	Concentração de platina, níveis de nitrato/nitrito e glutatona, atividade da glutatona peroxidase, níveis de peroxidase, níveis de peroxidase lipídica, análise histopatológica

Yilmaz, O., Genc, A., Taneli, F., Demireli, P., Kocakoc, I. D., Sencan, A., Gunsar, C., Mir, E., Taneli, C.	2006	Ligadura da artéria espermática	50 mg/kg	Aplicação única	Intraperitoneal	Um grupo experimental recebeu a pentoxifilina 15 minutos antes da ligadura da artéria espermática	Níveis de Inibina B, tamanho testicular e análise histopatológica
Ozkan, L., Yardimoglu, M., Ozkurkugil, C., Costur, P., Yilmaz, H., Isken, T.	2013	Exposição à fumaça de cigarro	25 mg/kg	Aplicação diária por 8 semanas	Intraperitoneal	Um grupo experimental exposto à fumaça de cigarro recebeu a pentoxifilina	Número de células em apoptose e túbulos seminíferos em atrofia e análise histopatológica
Queiroz, G. C. D., Oliveira, V. V. G., Gueiros, O. G., Torres, S. M., Maia, F. C. L., Tenorio, B. M., Morais, R. N., Silva Junior, V. A.	2013	Choque térmico	50 mg/kg e 100 mg/kg	Aplicações diárias por 2, 6, 14, 29 e 59 dias	Intraperitoneal	Dois grupos experimentais submetidos ao choque de calor receberam a pentoxifilina um dia após o estímulo: um grupo foi tratado com 50 mg/kg por dia e um grupo foi tratado com 100 mg/kg	Peso testicular, diâmetro tubular, comprimento total dos túbulos seminíferos, volume dos compartimentos testiculares, número de células germinativas e de Sertoli, produção espermática diária, fragmentação nuclear das células germinativas, análise histopatológica e concentração de testosterona sérica
Moradi, M., Mahmoodi, M., Raoofi, A., Ghanbari, A.	2015	Dependência de morfina	12 mg/kg	Aplicações diárias por 50 dias	Intraperitoneal	Um grupo dependente de morfina recebeu a pentoxifilina	Níveis de LH, FSH e concentração de testosterona sérica

Takhtfooladi, M. A., Moayer, F., Takhtfooladi, H. A.	2015	Isquemia/reperfusão unilateral do membro posterior	40 mg/kg	Aplicação única	Intraperitoneal	Um grupo experimental submetido à isquemia unilateral do membro posterior recebeu a pentoxifilina imediatamente antes da reperfusão	Atividade da superóxido dismutase, da catalase e da mieloperoxidase, peroxidação lipídica, razão peso fresco/peso seco e análise histopatológica
Zakaria, A., Al-Busadah, K. A.	2015	Exposição ao cádmio	100 mg/kg	Aplicação diária por 30 dias	Oral	Três grupos experimentais receberam a pentoxifilina: um grupo recebeu durante a exposição ao cádmio e um grupo recebeu anteriormente à exposição ao cádmio e um grupo recebeu posteriormente à exposição ao cádmio	Peso do testículo, epidídimo, próstata e vesícula seminal, contagem espermática, percentual de espermatozoides vivos no epidídimo, motilidade e anormalidade espermática, concentração de testosterona sérica e testicular, níveis da glutatona, atividade da catalase e superóxido dismutase, peroxidação lipídica, concentração testicular de colesterol e análise histopatológica
Feyli, S. A., Ghanbari, A. e Keshtmand, Z.	2017	Diabetes	12 mg/kg	Aplicação diária por 14 dias	Intraperitoneal	Dois grupos experimentais receberam a pentoxifilina: um grupo diabético, uma semana após a indução, e um grupo saudável	Peso testicular, motilidade, morfologia e número de espermatozoides, diâmetro dos túbulos seminíferos, índice apoptótico de células germinativas e concentração de testosterona sérica

Sönmez, M. F., Kılıç, E., Karabulut, D., Çilenk, K., Deligönül, E., Dündar, M.	2016	Diabetes	50 mg/kg	Aplicação diária por 30 e 60 dias	Intraperitoneal	Três grupos experimentais receberam a pentoxifilina: um grupo foi tratado logo após a confirmação do diabetes, por dois meses, um grupo foi tratado um mês após a confirmação do diabetes, por 30 dias, e um grupo saudável foi tratado por dois meses	Peso testicular, diâmetro dos túbulos seminíferos, detecção, expressão gênica e protéica das óxido nítrico sintases (NOS) (NOS neuronal, NOS induzida e NOS endotelial), número de células em apoptose, análise histopatológica e concentração de testosterona sérica
Nouri, M., Movassaghi, S., Foroumadi, A., Soleimani, M., Sharifi, Z. N.	2016	Exposição a derivados de metanfetaminas	100 mg/kg	Aplicação única	Não informado	Dois grupos experimentais receberam a pentoxifilina: um grupo foi tratado juntamente com a última injeção de 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) e um grupo foi tratado uma semana antes das aplicações de MDMA	Número de células em apoptose, atividade da caspase-3 e análise histopatológica
Yao, C., Li, G., Qian, Y., Cai, M., Yin, H., Xiao, L., Tang, W., Guo, F., Shi, B.	2016	Hipóxia hipobárica intermitente	300 mg/kg	Aplicação diária por 32 dias	Oral	Um grupo experimental submetido à hipóxia hipobárica intermitente recebeu a pentoxifilina	Peroxidação lipídica, atividade antioxidante enzimática (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase), níveis das testosterona sintases 3 β -HSD e StAR, expressão da vimentina nas células de Sertoli, densidade e motilidade do esperma epididimal e análise histopatológica

Os artigos selecionados registraram 11 distúrbios aos quais os animais experimentais foram submetidos: alta temperatura, dependência de morfina, diabetes, exposição à cisplatina, exposição a derivados de metanfetaminas, exposição à fumaça de cigarro, exposição ao cádmio, hipóxia hipobárica intermitente, isquemia/reperfusão testicular unilateral, isquemia/reperfusão unilateral do membro posterior e ligadura da artéria espermática. Entre eles, os três primeiros trabalhos sobre a atividade protetora da pentoxifilina no testículo utilizaram o mesmo distúrbio, a isquemia/reperfusão testicular unilateral, fazendo com que este possua a maior frequência de investigação nesta revisão. Além do diabetes, que foi investigado em dois dos estudos (14.3 %), os demais distúrbios não se repetiram.

A torção testicular é um evento clínico frequente e uma das mais importantes emergências urológicas (OZOKUTAN et al., 2001; URT FILHO et al., 2012). O tratamento com a distorção resulta em danos ao tecido que vão além da isquemia, mas o reestabelecimento do fluxo sanguíneo cria o chamado fenômeno de isquemia/reperfusão (BLANK et al., 1993; OZOKUTAN et al., 2001; SILVA et al., 2005). Durante o período de isquemia, ocorre o aumento da produção de radicais livres, causando danos ao citoesqueleto e à membrana celular, com ativação das enzimas oxidantes e alterações mitocondriais que limitam ainda mais o fornecimento de ATP para as células (REILLY et al., 1991; URT FILHO et al., 2012). Além disso, o catabolismo do ATP resulta no acúmulo intracelular de hipoxantinas, e a xantina desidrogenase é convertida em xantina oxidase (AKGÜR et al., 1993; SILVA et al., 2005). Com a distorção testicular e a reperfusão, ocorre o retorno do aporte de oxigênio e a xantina oxidase converte a hipoxantina em ácido úrico, com subprodução de grandes quantidades de uratos, radicais superóxidos e, em última análise, radicais hidroxila (MCCORD, 1985; REILLY et al., 1991; OZOKUTAN et al., 2001; URT FILHO et al., 2012).

Os danos relacionados à isquemia/reperfusão também estão relacionados à ligadura da artéria espermática, onde os testículos não-descendentes e que apresentam vasos muito curtos para atingir o escroto, impossibilitando um procedimento em tempo único, são submetidos à orquidopexia Fowler-Stephens em dois tempos (TARAN; ELDER, 2006; BURGU et al., 2009). Em um primeiro momento ocorre a ligadura dos vasos espermáticos, seguida da mobilização testicular (orquidopexia) após 6 meses (RANSLEY et al., 1984; HAY, 2007). Após a ligadura, o principal suprimento sanguíneo deve vir da circulação colateral da artéria dos vasos deferentes e da artéria cremastérica (HAY, 2007; BURGU et al., 2009). Dessa forma, a ligadura dos vasos testiculares resulta em danos isquêmicos de baixo grau para os testículos, enquanto a

continuidade do fluxo colateral leva à reperfusão (FOWLER; STEPHENS, 1959; YILMAZ et al., 2006).

A isquemia/reperfusão do membro posterior pode acontecer após o desencarceramento de uma vítima de trauma, que foi comprimida com um grande peso por longo período de tempo (síndrome do esmagamento), ou após a retirada de torniquetes durante cirurgias ortopédicas (TAKHTFOOLADI et al., 2015). A isquemia/reperfusão do músculo esquelético inicia uma cascata inflamatória complexa que pode resultar em danos à estrutura e função do tecido sob isquemia e de órgãos remotos, como o fígado, pulmão, rins, miocárdio e testículo (GAINES et al., 1999; TAKHTFOOLADI et al., 2015). Após a reperfusão, os mediadores humorais e celulares produzidos localmente no membro são liberados para a corrente sanguínea que drena os tecidos revascularizados, o que acarreta na sua distribuição aos órgãos remotos (KALOGERIS et al., 2012; TAKHTFOOLADI et al., 2015).

No diabetes mellitus, a hiperglicemia é considerada a principal causa das complicações (PEPPA et al., 2003; SONMEZ et al., 2016). Seus efeitos deletérios são atribuídos, entre outras coisas, à formação de substâncias derivadas de açúcar, chamadas produtos finais da glicação avançada (AGES), produzidos em um ritmo constante e lento no organismo saudável, mas acelerado diante do aumento da disponibilidade da glicose no diabetes. A glicação ocorre a partir de uma reação não enzimática de um açúcar redutor com os grupos amino livres de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (PEPPA et al., 2003). Seus efeitos patológicos estão relacionados a sua capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas (BARBOSA et al., 2008). Através da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas entre proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGES promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais, como na matriz celular, membrana basal e nos componentes das paredes dos vasos, e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (PEPPA et al., 2003; JAKUS; RIETBROCK, 2004; AHMED, 2005).

A hipóxia hipobárica atinge pessoas que vivem e trabalham em altas altitudes, onde a reduzida pressão atmosférica diminui a pressão parcial e a disponibilidade do oxigênio, reduzindo a sua concentração no sangue (BRITO; HERRUZO, 2007; ZEPEDA et al., 2012; YAO et al, 2016). Diante da reduzida disponibilidade de oxigênio, que é o aceptor final de elétrons da cadeia transportadora, o acúmulo de elétrons resulta no ataque do estado fundamental do oxigênio disponível (O_2), formando o ânion superóxido (O_2^-), o qual origina

H₂O₂ e o radical hidroxila (OH[•]) (MAITI et al., 2006). Dessa forma, a exposição crônica à hipóxia hipobárica está associada ao aumento dos danos oxidativos e da peroxidação lipídica no testículo, além de reduzir a atividade da glutathiona redutase (FARIAS et al., 2005; FARIAS et al., 2010).

A cisplatina é uma droga antineoplásica amplamente utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente no trato geniturinário (VON HOFF; ROZENCWEIG, 1979; LIRDI et al., 2008; SHERIF et al., 2014). Apesar da sua efetiva atividade quimioterápica, o seu uso é limitado pela sua toxicidade (SHERIF et al., 2014). Estudos mostram que a toxicidade testicular se deve à alta atividade mitótica das células espermatogênicas, além da indução de danos testiculares pelo estresse oxidativo, da geração das ROS, do aumento da peroxidação lipídica e da redução nos níveis de antioxidantes (ATESSAHIN et al., 2006; TURK et al., 2008; ILBEY et al., 2009; CIFTCI et al., 2011).

A terapia farmacológica analgésica com opióides é baseada na habilidade desses agentes a se ligarem a receptores de opióide no sistema nervoso central e na periferia. O sulfato de morfina é conhecido por agir em várias regiões do corpo, do intestino ao cérebro, e por provocar uma drástica redução nos níveis de testosterona (BASBAUM; FIELDS, 1978; JANSON; STAIN, 2003; ALOISI et al., 2005, SMITH; ELLIOT, 2012). O mecanismo primário da deficiência de hormônio sexual induzida por opióides é a supressão do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (COLAMECO; COREN; 2009). A inibição da secreção de GnRH pelo hipotálamo resulta na redução da produção de gonadotrofinas e, conseqüentemente, na diminuição na produção dos hormônios gonadais (SMITH; ELLIOT, 2012).

De maneira semelhante, os derivados de metanfetamina, como o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) ou “ecstasy”, podem alterar o controle neuroendócrino das funções reprodutoras através de várias vias neurológicas, como as vias aferentes que regulam os neurônios secretores de GnRH, e, assim, afetar o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (GORE; TERASAWA, 2001; DICKERSON et al., 2008; NOURI et al., 2016). Além disso, alguns metabólitos do MDMA podem causar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (NOURI et al., 2016).

Na maioria dos mamíferos, a posição testicular fora da cavidade abdominal fornece uma temperatura entre 2 a 6 °C abaixo da temperatura corporal, o que é de fundamental importância para a espermatogênese (SETCHELL, 2006; QUEIROZ et al., 2013; KORNFANTY et al., 2014). Situações de aumento na temperatura testicular são responsáveis por degeneração

tecidual e alterações na produção e fertilidade dos espermatozoides (TURNER, 2007; QUEIROZ et al., 2013). A degeneração celular induzida por altas temperaturas é acompanhada por apoptose, ocasionada pela redução da síntese de DNA, RNA e proteínas, pela redução do fluxo de sangue pelos capilares que alimentam as células e pelos efeitos indiretos de proteínas sintetizadas pelas células de Sertoli e de Leydig (MIEUSSET; BUJAN, 1997; NAKAI et al., 2000).

O Cádmiio (Cd) é um metal pesado e um dos mais importantes agentes tóxicos ambientais, que corre naturalmente no meio-ambiente e como um poluente resultante da agricultura e da atividade industrial (SIU et al., 2009; JARUP; AKESSON, 2009; ZAKARIA; AL-BUSADAH, 2015). É altamente reativo, afetando adversamente vários órgãos, com o testículo apresentando grande sensibilidade à toxicidade e sendo um dos principais órgãos-alvo (STAJN et al., 1997; SIU et al., 2009; ZAKARIA; AL-BUSADAH, 2015). No interior do testículo, o cádmio atravessa a camada de células endoteliais da barreira hematotesticular e aumenta drasticamente a permeabilidade vascular. Isso acarreta no aumento da entrada de fluido, o qual supera a capacidade de drenagem do sistema linfático, resultando em hemorragia, isquemia, necrose e atrofia testicular (WONG et al., 2004; ZAKARIA; AL-BUSADAH, 2015).

Um cigarro aceso pode gerar, através de vários processos, cerca de 4000 compostos, como nicotina, monóxido de carbono e reconhecidos agentes cancerígenos e mutagênicos, como o polônio, cádmio, benzopireno, dimetilbenz(a)antraceno, dimetilnitrosamina, naftaleno e metilnaftaleno (ZAVOS; ZARMAKOUPIIS-ZAVOS, 1999; ARABI; MOSHTAGHI, 2005; MOSTAFA, 2010). No testículo, tais subprodutos são encontrados em altas concentrações e são capazes de se mover pela barreira hematotesticular (STEDMAN, 1968; ARABI; MOSHTAGHI, 2005). Fumantes apresentam níveis mais elevados de ROS e reduzidas concentrações de antioxidantes no interior do testículo (RAJPURKAR et al., 2000; SOARES, 2009). A peroxidação lipídica leva ao acúmulo de hidroperóxidos nas membranas celulares e das organelas, resultando em danos ao espermatozoide (ARABI; MOSHTAGHI, 2005). Além disso, os altos níveis de adutos causadores de danos oxidativos e quebras ao DNA do espermatozoide resultam em danos genéticos e na redução da qualidade espermática (SHEN et al., 1997; POTTS et al., 1999; ARABI; MOSHTAGHI, 2005).

Devido às diferentes naturezas dos distúrbios utilizados nos estudos e nos seus diversos modos de atuação sobre o testículo, a pentoxifilina teve a sua atividade protetora analisada diante de diferentes esquemas de tratamento e sob o ponto de vista de diferentes parâmetros.

A utilização da pentoxifilina foi explorada de diferentes maneiras nas metodologias dos estudos. Em 50%, os autores analisaram o papel protetor da pentoxifilina, ou seja, o tratamento foi realizado antes da indução do distúrbio. Por outro lado, 14,3% avaliou diferentes tempos de tratamento, variando entre aplicações anteriores, conjuntas e posteriores aos distúrbios. Apenas um estudo analisou diferentes doses da droga, visando obter uma concentração mais adequada ao tratamento dos animais.

42,8% dos trabalhos utilizaram apenas um grupo experimental para avaliar os efeitos da pentoxifilina. Já em 21,4%, a droga também foi fornecida a um grupo de animais saudáveis, visando a utilização de um grupo controle para os efeitos da mesma. Dos 5 estudos que utilizaram procedimento cirúrgico nos animais, apenas 2 (40%) utilizaram grupos sham-operados tratados com a pentoxifilina, o que é importante de maneira a remover dos resultados as possíveis alterações causadas pelos procedimentos cirúrgicos, e não pelo distúrbio em si.

43% dos estudos iniciaram a avaliação testicular levando em consideração parâmetros como o peso ou o tamanho. Dentre esses, resultados eficientes foram encontrados por Zakaria e Al-Busadah (2015), onde se conseguiu obter uma melhora dependendo do período escolhido para o tratamento, e Sonmez et al. (2016), que conseguiram atingir os valores encontrados para os animais controle. Em Takhtfooladi et al. (2015), foi calculada a razão peso fresco/peso seco, um índice de edema tecidual, para avaliar os níveis de injúria testicular. Os autores observaram uma redução em tal parâmetro após o tratamento, mostrando um papel da pentoxifilina em proteger o testículo.

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi mensurado em 21,4% dos estudos. Outros parâmetros morfológicos, como o comprimento total dos túbulos seminíferos, o volume dos compartimentos testiculares, o número de células germinativas e de Sertoli e a produção espermática diária foram estudadas apenas por Queiroz et al. (2013). Em ambos Sonmez et al. (2016) e Feyli et al. (2017), a pentoxifilina conseguiu recuperar a redução no diâmetro tubular, causada pelo diabetes, aos valores encontrados para o grupo controle. Isso demonstra a capacidade da droga em exercer seus efeitos terapêuticos na arquitetura dos túbulos seminíferos (FEYLI et al., 2017). Contudo, no estudo de Queiroz et al. (2013), não foi possível avaliar a ação da pentoxifilina em tais parâmetros devido à ausência de danos causados pela exposição à alta temperatura, mostrando, assim, uma inalteração da eficiência da espermatogênese diante do distúrbio.

A avaliação do estresse oxidativo no interior dos testículos foi realizada em 42,8% dos estudos. Tal avaliação se deu através na análise de parâmetros como a peroxidação lipídica (43% do total de trabalhos), os níveis das enzima antioxidantes (28,6%), como a superóxido dismutase (21,4%), a catalase (21,4%) e a glutationala peroxidase (14,3%), os níveis de glutationala (14,3%) e a capacidade antioxidante total (7,1%).

A peroxidação lipídica é conhecida por ser um fenômeno onde as ROS atacam os lipídios com duplas ligações carbono-carbono, especialmente os ácidos graxos poli-insaturados das membranas, levando à apoptose e necrose (YIN et al., 2011; AYALA et al., 2014). A membrana espermática é altamente suscetível a tais ataques, que podem alterar a sua permeabilidade, enquanto que o ataque à membrana mitocondrial leva à redução na produção do ATP, alterando a motilidade e a morfologia do espermatozoide (CHATTERJEE et al., 2013; TAKHTFOOLADI et al., 2015; YAO et al., 2016).

Em todos os estudos, a exposição aos distúrbios resultou no aumento dos níveis da peroxidação lipídica testicular. Em Savas et al. (2002a), Saad et al. (2004), Takhtfooladi et al. (2015), Zakaria e Al-Busadah (2015) e Yao et al. (2016), os tratamentos com a pentoxifilina conseguiram reduzir os níveis de tal parâmetro, embora os valores ainda tenham sido um pouco maiores do que o observado para os animais controle. Contudo, apenas no estudo de Ozokutan et al. (2001), o tratamento não foi eficiente em reduzir os níveis da peroxidação lipídica após a isquemia/reperfusão testicular unilateral. Tal diferença de resultado pode ser atribuída à diferença entre as metodologias utilizadas, com relação à concentração da droga e ao tempo entre e a aplicação e o início do procedimento cirúrgico. Porém, os resultados da maioria dos estudos demonstram um importante papel da pentoxifilina em proteger contra os efeitos do estresse oxidativo.

No testículo, a atividade da superóxido dismutase, catalase, glutationala peroxidase e glutationala redutase é essencial para proteger os tecidos e o fluido seminal contra os danos do estresse oxidativo (TAKHTFOOLADI et al., 2015; YAO et al., 2016). Em todos os estudos, os autores conseguiram reverter as reduções nos níveis das enzimas antioxidantes através dos tratamentos propostos. Isso demonstra o papel da pentoxifilina também em atenuar o metabolismo oxidativo e preservar as enzimas antioxidantes (WONG et al., 2002; ZAKARIA; AL-BUSADAH, 2015).

A concentração de glutationala reduzida, um antioxidante encontrado em grandes concentrações no testículo de ratos, foi analisada apenas por Saad et al. (2004) e Zakaria e Al-

Busadah (2015). No estudo de Saad et al. (2004), a exposição à cisplatina não resultou em alterações a esse parâmetro. Em Zakaria e Al-Busadah (2015), a exposição ao cádmio causou a diminuição da glutatona e os tratamentos com a pentoxifilina aumentaram os níveis desse antioxidante, sendo o tratamento iniciado após o distúrbio, o mais eficiente na recuperação dos valores.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa produzida pelas células endoteliais, sintetizado a partir da conversão da L-arginina pela ação da família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS), como a NOS neuronal (NOSn), NOS induzida (NOSi) e NOS endotelial (NOSe) (LUCILLA et al., 2003; SHIEKH et al., 2011; ADELA et al., 2015). Níveis baixos de NO são importantes para as funções fisiológicas e celulares, devido às variadas funções como imunomodulador, neurotransmissor e vasodilatador (JOSHI et al., 1999; ADELA et al., 2015). Contudo, níveis elevados podem aumentar a toxicidade das ROS, devido à sua reação com ânions superóxidos para a formação do radical peroxinitrito, um potente oxidante (JOSHI et al., 1999; ADELA et al., 2015; SONMEZ et al., 2016). Os níveis das NOS no tecido intersticial testicular foram medidos no estudo de Sonmez et al. (2016). A pentoxifilina conseguiu reduzir os níveis da expressão e da concentração de RNAm de cada uma das NOS, aumentados diante da ação do diabetes.

O equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose é um fator de extrema importância na regulação da população de células germinativas no epitélio dos túbulos seminíferos, refletindo diretamente na produção espermática (CLERMONT, 1972; RUSSELL et al., 1990; TAKASHIBA et al., 2011). Situações em que há o aumento na apoptose das células germinativas são as principais causas de infertilidade masculina (NOURI et al., 2016). 28,6% dos estudos avaliaram o número de células germinativas em apoptose através do teste de TUNEL. Queiroz et al. (2013) observaram a presença de fragmentação nuclear similar à apoptose nas células germinativas. Além disso, Nouri et al. (2016) também mensuraram a atividade da caspase-3, uma protease de morte frequentemente ativada, que catalisa a clivagem específica de muitas proteínas-chave da célula (PORTER; JANICKE 1999).

Ozkan et al. (2013), Queiroz et al. (2013) e Feyli et al. (2017) conseguiram obter resultados positivos com o tratamento em diminuir os altos níveis de morte das células germinativas observados diante das exposição aos distúrbios. Em Nouri et al. (2016), o número de células em apoptose e a atividade da caspase 3 reduziram apenas com o tratamento iniciado antes da exposição ao ecstasy. Contudo, Sonmez et al. (2016) não observaram diferença com a aplicação da droga.

Além das funções explicadas anteriormente, o NO também é um importante mediador de morte celular, através da apoptose ou da necrose, dependendo da intensidade e da duração do estímulo (OZKAN et al., 2013). Apesar das NOS regularem funções como motilidade espermática e maturação das células germinativas, a NOe e a NOi estão também relacionadas com a apoptose (YILMAZ et al., 2006; OZKAN et al., 2013). Como também observado por Sonmez et al. (2016), os inibidores de fosfodiesterases são conhecidos por inibir a produção do NO por algumas células, o que está associado com a elevação dos níveis celulares de AMPc e com a supressão da expressão da iNOS (BESHAY; PRUD'HOMME, 2001; OZKAN et al., 2013). Este pode ser um dos meios de atuação da pentoxifilina para reduzir os processos apoptóticos das células germinativas.

Além disso, a pentoxifilina é capaz de atenuar os efeitos do estresse oxidativo através do estímulo à atividade antioxidante, pela ação direta na redução das ROS e, conseqüentemente, na inibição da atividade da NK-kB e da AP-1, fatores de transcrição que participam da regulação das funções mitocondriais (RENKE et al., 2010; FEYLI et al., 2017). Todos esses fatores juntos contribuem para o efeito anti-apoptótico da pentoxifilina observados nos estudos analisados.

No estudo realizado por Moradi et al. (2015), devido à ação dos opióides no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, foi realizada a análise das concentrações séricas das gonadotrofinas (LH e FSH) e da testosterona. Para o FSH, a exposição aos opióides não alterou a concentração em relação ao grupo controle. Contudo, a utilização da pentoxifilina resultou em um grande aumento nos níveis de tal hormônio. Para o LH e a testosterona observou-se o mesmo padrão, onde a dependência de morfina reduziu as concentrações e a pentoxifilina foi capaz de aumentar tais níveis acima das medidas dos animais controle.

Incluindo o estudo de Moradi et al. (2015), apenas 35,7% dos trabalhos mediram a concentração de testosterona sérica. Em ambos os estudos de Sonmez et al. (2016) e Feyli et al. (2017), o diabetes reduziu os níveis de testosterona dos animais, mostrando a sua atuação também no controle endócrino da espermatogênese. Contudo, apenas Feyli et al. (2017) conseguiram reverter tais efeitos com o tratamento experimental.

Zakaria e Al-Busadah (2015) mensuraram, além dos níveis de testosterona sérica, os níveis de colesterol e testosterona testiculares. Para os três parâmetros, foi observada uma melhor recuperação com os tratamentos simultâneo ou após a exposição ao cádmio, com o tratamento anterior ao estímulo apresentando eficiência reduzida. Os autores sugerem uma

proteção da pentoxifilina aos danos às células do interstício, assim como foi observado na avaliação histopatológica. Já no estudo de Yao et al. (2016), a administração de pentoxifilina foi eficiente em inibir a redução nos níveis das 3β -HSD e StAR, que participam do processo de síntese da testosterona, causada pela exposição à hipóxia hipobárica intermitente.

A avaliação espermática, relacionada ao número, motilidade, anormalidades e percentual de espermatozoides vivos, foi realizada (dois parâmetros ou mais) em 21,4% dos trabalhos avaliados. Nos estudos de Yao et al. (2016) e Feyli et al. (2017), os tratamentos mostraram eficiência em reduzir os danos provocados pelos distúrbios. Em Zakaria e Al-Busadah (2015), as diferentes estratégias de aplicação da pentoxifilina apresentaram diferentes respostas, com o tratamento após a exposição ao distúrbio mostrando maior eficiência, seguido do tratamento simultâneo. Na motilidade do espermatozoide, a pentoxifilina é conhecida por seus efeitos, sendo amplamente utilizada *in vitro* e *in vivo*. Sua ação inibidora de fosfodiesterase aumenta os níveis intracelulares de AMPc, resultando no aumento da fosforilação da tirosina na cauda do espermatozoide (YUNES et al., 2005; ZAKARIA; AL-BUSADAH, 2015).

78,6% dos artigos realizaram a análise histopatológicas testicular. Apenas Saad et al. (2004) não observaram alterações significantes diante da exposição à cisplatina, o que, de acordo com os autores, pode ser atribuído ao curto tempo entre a exposição e a eutanásia dos animais. Os demais autores observaram variados danos histopatológicos, como espessamento da membrana basal, atrofia tubular, degeneração, descamação e atrofia do epitélio seminífero, vacuolização das células de Sertoli e núcleo picnóticos em células germinativas. Em alguns trabalhos, foram também observados túbulos formados apenas por espermatogônias e células de Sertoli no compartimento basal e necrose coagulativa. Além do compartimento tubular, o interstício também apresentou injúrias, como edema, hemorragia, necrose de células intersticiais e vacuolização citoplasmática das células de Leydig.

Savas et al. (2002a), Ozkan et al. (2013), Takhtfooladi et al. (2015), Zakaria e Al-Busadah (2015), Nouri et al. (2016) e Yao et al. (2016) observaram que a pentoxifilina conseguiu diminuir a frequência das lesões histopatológicas testiculares. Takhtfooladi et al. (2015) constataram que o tratamento reestabeleceu, essencialmente, o padrão normal de morfologia dos túbulos seminíferos. Em Queiroz et al. (2013), a maior dose da droga e o período de tratamento mais longo apresentaram os melhores resultados de regeneração testicular. Já em Zakaria e Al-Busadah (2015), foi observada maior eficiência, novamente, com os tratamentos simultâneo e posterior ao distúrbio, sendo o posterior o de melhor poder de recuperação.

Contudo, em Ozokutan et al. (2001) e Sonmez et al. (2016), o tratamento não foi eficiente em realizar melhoras significativas nos danos histopatológicos observados. Em Yilmaz et al. (2006), a ligadura da artéria espermática resultou em necrose completa e surgimento de calcificação, especialmente nas áreas periféricas. Os resultados da ligadura da artéria espermática foram, então, insatisfatórios e a atrofia testicular se desenvolveu em todos os grupos experimentais, a qual não pôde ser totalmente revertida pela pentoxifilina.

De acordo com Savas et al. (2002), uma das fontes de radicais livres no tecido pós-isquêmico envolve a explosão respiratória pelos neutrófilos. A pentoxifilina inibe os efeitos mediados pelos neutrófilos, como a produção de peróxidos, quimiotaxia, fagocitose e produção do fator de necrose tumoral (TNF) (HORTON; WHITE, 1993; SAVAS et al., 2002a). Além disso, ela também pode atenuar a resposta sistêmica mediada pelos neutrófilos à injúria de isquemia-reperfusão através da inibição da IL-2 e do TNF (BRADBURY et al., 1993; SAVAS et al., 2002a). Nesse estudo, a pentoxifilina pode ter atenuado os danos da isquemia-reperfusão no testículo através dos seus efeitos estabilizadores de neutrófilo.

A mieloperoxidase é uma das várias proteínas citotóxicas produzidas pelos neutrófilos em seu estado ativado. De acordo com o trabalho de Takhtfooladi et al. (2015), a reperfusão de um membro após a isquemia leva à resposta inflamatória e à injúria aos órgãos remotos através da liberação sistêmica dos mediadores inflamatórios e das ROS. No estudo de tais autores, a atividade da mieloperoxidase foi mensurada, de maneira a avaliar a atividade dos leucócitos polimorfonucleares infiltrados e os níveis de injúria testicular. Após o tratamento com a pentoxifilina, a atividade da mieloperoxidase foi significativamente reduzida.

As células de Sertoli possuem um citoesqueleto altamente organizado e ativo, que desempenha importante papel na manutenção e diferenciação das células germinativas. A vimentina, uma proteína da família dos filamentos intermediários, é um importante componente do citoesqueleto das células de Sertoli. Uma alterada distribuição dos filamentos de vimentina na célula de Sertoli está relacionada com o aumento da apoptose das células germinativas (WANG et al., 2002). No estudo de Yao et al. (2016), a exposição à hipóxia hipobárica intermitente levou à redução na expressão da vimentina, com o desaparecimento da estruturação característica dos filamentos que partem da membrana basal até o lúmen. O tratamento proposto com a pentoxifilina resultou no aumento da expressão da proteína e no reestabelecimento da sua estruturação característica.

Em Savas et al. (2002b), foi avaliado o fluxo sanguíneo testicular ao longo dos procedimentos de isquemia/reperfusão testicular. O tratamento com a droga não apresentou efeitos durante a torção, mas durante a distorção, a administração de pentoxifilina aumentou significativamente o fluxo de sangue para ambos os testículos. Os autores sugerem que tal melhora deve-se aos efeitos da droga no aumento da flexibilidade dos glóbulos vermelhos e brancos e na redução da viscosidade do sangue, pela redução das concentrações de fibrinogênio plasmático, da agregação plaquetária e da formação de trombos (SONKIN et al., 1992; SAVAS et al., 2002b). Além disso, a melhora também observada para o testículo contralateral durante a distorção sugere um efeito vasodilatador.

No estudo de Saad et al. (2004), a pentoxifilina também reduziu a acumulação da platina no interior do testículo para valores 40% menores do que os animais sem tratamento, o que contribuiu para atenuar os efeitos induzidos à gônada.

O epidídimo e as glândulas sexuais acessórias (próstata e vesícula), os quais desempenham papel fundamental na garantia da fertilidade, foram avaliados em relação ao seu peso apenas no estudo realizado por Zakaria e Al-Busadah (2015). Tais pesquisadores observaram a redução do peso dos órgãos em todos os grupos experimentais expostos ao cádmio, apesar do tratamento com a pentoxifilina. Contudo, foi observada uma redução menos acentuada nos grupos em que o tratamento ocorreu conjuntamente ou após a exposição.

A partir dos resultados de todos os estudos pode-se concluir que a pentoxifilina, além de desempenhar um importante papel na reprodução assistida, também pode atuar no organismo de maneira a proteger o parênquima e a função testicular dos danos causados por distúrbios variados. Contudo, parâmetros como dose e tempo de aplicação precisam ser melhor padronizados em cada caso de maneira a proporcionar o maior potencial protetor da droga. Além disso, pode-se observar que a característica mais importante para o bom desempenho da pentoxifilina nos estudos analisados está na sua capacidade de manutenção da homeostase redox, com a inibição da geração das espécies reativas de oxigênio e pelo estímulo às enzimas antioxidantes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referências

- Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN & Banerjee SK, Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from south indian patients. *PLoS One* 10 (2015) e0173179.
- Ahmed N, Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67 (2005) 3.
- Akgür FM, Kiliç K & Aktuğ T, Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res* 21 (1993) 395.
- Aloisi AM, Pari G, Ceccarelli I, Vecchi I, Ietta F, Lodi L & Paulesu L, Gender related effects of chronic non-malignant pain and opioid therapy on plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Pain* 115 (2005) 142.
- Arabi M & Moshtaghi H, Influence of cigarette smoking on spermatozoa via seminal plasma. *Andrologia* 37 (2005) 119.
- Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A & Bulmuş O, Chemoprotective effect of melatonin against cisplatininduced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 41 (2006) 21.
- Ayala A, Muñoz MF & Argüelles S, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014 (2014) 360438.
- Barbosa JHP, Oliveira SL & Seara LT, The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52 (2008) 940.
- Basbaum AI & Fields HL, Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol* 4 (1978) 451.
- Beshay E & Prud'homme GJ, Inhibitors of phosphodiesterase isoforms III or IV suppress islet-cell nitric oxide production. *Lab Invest* 81 (2001) 1109.
- Blank ML, O'Neill PJ, Steigman CK, Cobb LM, Wilde RA, Havenstein PJ & Chaudry IH, Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepubertal rats. *Urol Res* 21 (1993) 389.

Bradbury AW, Murie JA & Ruckley CV, Role of the leukocyte in the pathogenesis of vascular disease. *Br J Surg* 80 (1993) 1503.

Brito J, *Hipoxia hipobárica intermitente crónica en gran altura: construcción de la historia natural de una nueva situación epidemiológica y biológica*, Ph.D. thesis, Autonomous University of Madrid, Madrid, 2007.

Burgu B, Baker LA & Docimo SG, Cryptorchidism. In: *Pediatric Urology*, edited by Gearhart J, Rink R & Mouriquand P (Saunders, Philadelphia) 2009, 563-576.

Calogero AE, Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Hum Reprod* 13 (1998) 911.

Carneiro SCS, Medeiros R, Magalhaes GM, Alves C, Cuzzi T & Sotto MN, Ação da pentoxifilina nos dendrócitos dérmicos FXIIIa de placas de psoríase. *An Bras Dermatol* 80 (2005) 314.

Chatterjee K, Ali KM, De D, Bera TK, Jana K, Maiti S, Ghosh A & Ghosh D, Hyperglycemia-induced alteration in reproductive profile and its amelioration by the polyherbal formulation MTEC (modified) in streptozotocin induced diabetic albino rats. *Biomark Genomic Med* 5 (2013) 54.

Ciftci O, Beytur A, Cakir O, Gurbuz N & Vardi N, Comparison of reproductive toxicity caused by cisplatin and novel platinum-N-heterocyclic carbene complex in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109 (2011) 328.

Clermont Y, Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52 (1972) 198.

Colameco S & Coren JS, Opioid-induced endocrinopathy. *J Am Osteopath Assoc* 109 (2009) 20.

Dávila-Esqueda ME & Martínez-Morales F, Pentoxifylline diminishes the oxidative damage to renal tissue induced by streptozotocin in the rat. *Exp Diabetes Res* 5 (2004) 245.

De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR & Zaneveld LJ, Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* 258 (1991) 113.

Dickerson SM, Walker DM, Reveron ME, Duvauchelle CL & Gore AC, The recreational drug ecstasy disrupts the hypothalamic-pituitary-gonadal reproductive axis in adult male rats. *Neuroendocrinology* 88 (2008) 95.

Esteves SC, Spaine DM & Cedenho AP, Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Braz J Med Biol Res* 40 (2007) 985.

Farias JG, Bustos-Obregón E, Orellana R, Bucarey JL, Quiroz E & Reyes JG, Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia* 37 (2005) 47.

Farias JG, Puebla M, Acevedo A, Tapia PJ, Gutierrez E, Zepeda A, Calaf G, Juantok C & Reyes JG, Oxidative stress in rat testis and epididymis under intermittent hypobaric hypoxia: protective role of ascorbate supplementation. *J Androl* 31 (2010) 314.

Feyli SA, Ghanbari A & Keshtmand Z, Therapeutic effect of pentoxifylline on reproductive parameters in diabetic male mice. *Andrologia* (2017).

Fowler R & Stephens FD. The role of testicular vascular anatomy in the salvage of high undescended testes. *Aust N Z J Surg* 29 (1959) 92.

Gaines GC, Welborn III MB, Moldawer LL, Huber TS, Harward TRS & Seeger JM, Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. *J Vasc Surg* 29 (1999) 370.

Gore AC & Terasawa E, Neural circuits regulating pulsatile luteinizing hormone release in the female guinea-pig: opioid, adrenergic and serotonergic interactions. *J Neuroendocrinol* 13 (2001) 239.

Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RR, Martin I, Avanzi BR, Dellaqua Jr JA & Papa FO, Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. *J Equine Vet Sci* 33 (2013) 1153.

Hay SA, Collateral circulation after spermatic vessel ligation for abdominal testis and its impact on staged laparoscopically assisted orchiopexy. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 17 (2007) 124.

Horton JW & White DJ, Free radical scavengers prevent intestinal ischemia-reperfusion-mediated cardiac dysfunction. *J Surg Res* 55 (1993) 282.

- Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A & Somay A, Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod* 24 (2009) 1717.
- Jakus V & Rietbrock N, Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 53 (2004) 131.
- Janson W & Stein C, Peripheral opioid analgesia. *Curr Pharm Biotechnol* 4 (2003) 270.
- Järup L & Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 238 (2009) 201.
- Joshi MS, Ponthier JL & Lancaster JR, Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 27 (1999) 1357.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M & Korthuis RJ, Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 298 (2012) 229.
- Korfanty J, Stokowy T, Widlak P, Gogler-Pigłowska A, Handschuh L, Podkowinski J, Vydra N, Naumowicz A, Toma-Jonik A & Widlak W. Crosstalk between HSF1 and HSF2 during the heat shock response in mouse testes. *International J Biochem Cell Biol* 57 (2014) 76.
- Lirdi LC, Stumpp T, Sasso-Cerri E & Miraglia SM, Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *Anat Rec* 291 (2008) 797.
- Maiti P, Singh SB, Sharma AK, Muthuraju S, Banerjee PK & Ilavazhagan G, Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int* 49 (2006) 709.
- Matson PL, Yovich JM, Edirisinghe WR, Junk SM & Yovich JL, An argument for the past and continued use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 10 (1995) 67.
- Maxwell DT, Jacobson JD, King A & Chan PJ, Effect of pentoxifylline on tumor suppressor and proto-oncogene apoptosis in sperm. *J Assist Reprod Genet* 19 (2002) 279.
- McCord JM, Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312 (1985) 159.
- Mieusset R & Bujan L, Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 18 (1995) 169.
- Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, Valsecchi G, Lucotti P, Pozza G, Bernardinelli L, Casari G & Piatti P, Endothelial nitric oxide synthase

polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 52 (2003) 1270.

Moradi M, Mahmoodi M, Raoofi A & Ghanbari A, Chorionic morphine, naltrexone and pentoxifylline effect on hypophyso-gonadal hormones of male rats. *Bratisl. Lek Listy* 116 (2015) 276.

Moraes TAP, Jasset PF, Torres SM, Moraes AV, Silva Júnior VA & Guerra MMP, Efeito do uso de pentoxifilina no período neonatal sobre a produção espermática em ratos Wistar adultos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61 (2009) 80.

Mostafa T, Cigarette smoking and male infertility. *J Adv Res* 1 (2010) 179.

Nakai A, Suzuki M & Tanabe M, Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 19 (2000) 1545.

Nouri M, Movassaghi S, Foroumadi A, Soleimani M & Sharifi ZN, Protective effect of pentoxifylline on male Wistar rat testicular germ cell apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Iran J Basic Med Sci* 19 (2016) 646.

Oliveira WRS, Cavassani SS, Maganhin CC, Carbonel AAF, Simões MJ, Simões RS, Junqueira VBC & Oliveira-Júnior IS, Aspectos histomorfológicos e respiratórios em modelo de lesão pulmonar aguda por sepse em ratos tratados com pentoxifilina. *Rev Assoc Med Bras*, 55 (2009) 127.

Ozkan L, Yardimoglu M, Ozkurkcuoglu C, Costur P, Yilmaz H & Isken T, Protective effects of pentoxifylline on the seminiferous tubules morphology in smoking rats. *Research WebPub* 1 (2013) 1.

Özokutan BH, Küçükaydin M, Muhtaroglu S & Tekin Y, The role of calcium channel blocker and pentoxifylline in testicular ischemia reperfusion injury. *Intern Med J* 8 (2001) 135.

Peppas M, Uribarri J & Vlassara H, Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clin Diabetes* 21 (2003) 186.

Ponce AA, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD, Vincenti LM, Santillá ME, Stutz G & Lacuara JL, Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. *Arch Androl* 43 (1999) 77.

Porter AG & Janicke RU, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6 (1999) 99.

- Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ & Jefferies TM, Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 423 (1999) 103.
- Queiroz GCD, Oliveira VVG, Gueiros OG, Torres SM, Maia FCL, Tenorio BM, Morais RN & Silva Junior VA, Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. *Anim Reprod* 10 (2013) 45.
- Rajpurkar A, Dhabuwala CB, Jiang Y & Li H, Chronic cigarette smoking induces an oxidant/antioxidant imbalance in the testis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19 (2000) 369.
- Ransley PG, Vordermark JS, Caldamone AA & Bellinger MF, Preliminary ligation of the gonadal vessels prior to orchiopexy for the intra-abdominal testicle: a staged Fowler-Stephens procedure. *World J Urol* 2 (1984) 226.
- Reilly PM, Schiller HJ & Bulkley GB, Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 161 (1991) 488.
- Renke M, Tylicki L, Rutkowski P, Knap N, Zietkiewicz M, Neuwelt A, Aleksandrowicz E, Łysiak-Szydłowska W, Woźniak M & Rutkowski B, Effect of pentoxifylline on proteinuria, markers of tubular injury and oxidative stress in non-diabetic patients, with chronic kidney disease placebo controlled, randomized, cross-over study. *Acta Biochim Pol* 57 (2010) 119.
- Russell LD, Sinhá-Hikim AP, Ettlin RA & Clegg ED, *Histological and histopathological evaluation of the testis*. (Cache River Press, Clearwater), 1990.
- Saad SY, Najjar TAO & Alashari M, Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31 (2004) 862.
- Savas C, Dindar H, Bilgehan A, Ataoglu O & Yucesan S, Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. *Scand J Urol Nephrol* 36 (2002) 65.
- Savas C, Dindar H, Aras T & Yucesan S, Pentoxifylline improves blood flow to both testes in testicular torsion. *Int Urol Nephrol* 33 (2002) 81.
- Setchell BP, The effects of heat on the testes of mammals. *Anim Reprod* 3 (2006) 81.
- Shen HM, Chia SE, Ni ZY, New AL, Lee BL & Ong CN, Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol* 11 (1997) 675.

- Sherif IO, Abdel-Aziz A & Sarhan OM, Cisplatin-induced testicular toxicity in rats: the protective effect of arjunolic acid. *J Biochem Mol Toxicol* 28 (2014) 515.
- Shiekh GA, Ayub T, Khan SN, Dar R & Andrabi KI, Reduced nitrate level in individuals with hypertension and diabetes. *J Cardiovasc Dis Res* 2 (2011) 172.
- Silva ACMBA, Ortiz V, Silva RA & Tognini JR, Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão. *Acta Cir Bras* 20 (2005).
- Siu ER, Mruk DD, Porto CS & Cheng CY, Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 238 (2009) 240.
- Smith HS & Elliot JA, Opioid-induced androgen deficiency (OPIAD). *Pain Physician* 15 (2012) 145.
- Soares S, Cigarette smoking and fertility. *Reprod Biol Insights* 2 (2009) 39.
- Sonkin PL, Chen LE, Seaber AV & Hatchell DL, Vasodilator action of pentoxifylline on microcirculation of rat cremaster muscle. *Angiology* 43 (1992) 462.
- Sönmez MF, Kılıç E, Karabulut D, Çilenk K, Deligönül E & DüNDAR M, Nitric oxide synthase in diabetic rat testicular tissue and the effects of pentoxifylline therapy. *Syst Biol Reprod Med* 62 (2016) 22.
- Stajin A, Zikić RV, Ognjanović B, Saicić ZS, Pavlović SZ, Kostić MM & Petrović VM, Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 117 (1997) 167.
- Stedman RL, The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 68 (1968) 153.
- Takashiba KS, Segatelli TM, Moraes SMF & Natali MRM, Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. *Acta Sci Health Sci* 33 (2011) 25.
- Takhtfooladi MA, Moayer F & Takhtfooladi HA, Beneficial effect of pentoxifylline into the testis of rats in an experimental model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *Int Braz J Urol* 41 (2015) 576.
- Taran I & Elder JS, Results of orchiopexy for the undescended testis. *World J Urol* 24 (2006) 231.

- Tournaye H, Devroey P, Camus M, Van der Linden M, Janssens R & Van Steirteghem A, Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 10 (1995) 71.
- Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Ceribaşı AO & Yüce A, Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 89 (2008) 1474.
- Turner RMO, Pathogenesis, diagnosis, and management of testicular degeneration in stallions. *Clin Tech Equine Pract* 6 (2007) 278.
- Urt Filho A, Inouye CM, Pontes JCDV, Silva ACBA, Silva GVR & Santos CHM, Propofol effects on the morphology of rat testes subjected to testicular ischemia/reperfusion. *Acta Cir Bras* 27 (2012) 172.
- Von Hoff DD & Rosencweig M, cis-Diamminedichloroplatinum (II): a metal complex with significant anticancer activity. *Adv Pharmacol Chemother* 16 (1979) 273.
- Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A & Itano T, Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. *J Pediatr Surg* 37 (2002) 648.
- Ward A & Clissold SP, Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy. *Drugs* 34 (1987) 50.
- Wong CH, Mruk DD, Lui WY & Cheng CY, Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *J Cell Sci* 117 (2004) 783.
- Yao C, Li G, Qian Y, Cai M, Yin H, Xiao L, Tang W, Guo F & Shi B, Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. *Oxi Med Cell Longev* 2016 (2016) 1.
- Yilmaz O, Genc A, Taneli F, Demireli P, Kocakoc ID, Sencan A, Gunsar C, Mir E & Taneli C, Long-term effect of pentoxifylline and NG-nitro-L-arginine methylester on testicular function in spermatic artery ligation. *Scand J Urol Nephrol* 40 (2006) 12.
- Yin H, Xu L & Porter NA, Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 111 (2011) 5944.
- Yovich JL, Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod* 8 (1993) 1786.

Yunes R, Fernández P, Doncel GF & Acosta AA, Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition increases tyrosine phosphorylation and hyper motility in normal and pathological human spermatozoa. *Biocell* 29 (2005) 287.

Zakaria A & Al-Busadah KA, Pentoxifylline efficiency in protecting testes against cadmium toxicity. *J Anim Vet Adv* 14 (2015) 18.

Zavos PM & Zarmakoupis-Zavos PN, Impact of cigarette smoking on human reproduction: its effects on male and female fecundity. *Technology* 6 (1999) 9.

Zepeda AB, Figueroa CA, Calaf GN & Farías JG, Male reproductive system and antioxidants in oxidative stress induced by hypobaric hypoxia. *Andrologia* 46 (2014) 1.

9.3. Artigo científico publicado em periódico