



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL

ALLUANAN ADELSON DO NASCIMENTO SILVA

Influência do tratamento com metformina, pentoxifilina e melatonina sobre os parâmetros reprodutivos e metabolismo glicídico e lipídico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos ao diabetes mellitus.

RECIFE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL

ALLUANAN ADELSON DO NASCIMENTO SILVA

Influência do tratamento com metformina, pentoxifilina e melatonina sobre os parâmetros reprodutivos e metabolismo glicídico e lipídico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos ao diabetes mellitus.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociência Animal da UFRPE, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Prof, Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Co-orientadora: Laura Cristina Jardim Porto Pimenta

RECIFE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL

ALLUANAN ADELSON DO NASCIMENTO SILVA

Influência do tratamento com metformina, pentoxifilina e melatonina sobre os parâmetros reprodutivos e metabolismo glicídico e lipídico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos ao diabetes mellitus.

Tese defendida e apresentada pela comissão examinadora:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Presidente)

Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório (Membro externo)

Profa. Dra. Sandra Maria de Torres (Membro externo)

Profa. Dra. Carina Scanoni Maia (Membro externo)

Prof. Dr. Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira (Membro externo)

RECIFE

2018

Para Josefa Martins, José Ferreira, Sandra
Regina e Joaquim Francisco com todo amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, nossa senhora e todos os seres de luz que sempre estão me acompanhando em todos os momentos da minha vida. À Sandra Regina (Mãe), Joaquim Francisco (Pai), José Ferreira (Avô), Josefa Martins (Avó), Maria Letícia (Tia), por sempre terem me apoiado em todas as minhas escolhas e por todo amor e dedicação depositados em mim. À Taynan (cachorra) por sempre me fazer companhia enquanto estudava e escrevia a tese.

Ao meu pai científico, Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior, por todo o esforço, apoio, confiança e ensinamentos durante todos esses anos. Sempre disponível, estando ao meu lado em todos os momentos que precisei.

Aos animais, que doaram suas vidas para que esse experimento fosse realizado.

A todos os integrantes do laboratório de patologia: Fabiana, Katharyne, Kelly, Jacilene, Suellen, Ebla, Yanik por toda a amizade e apoio na execução desse trabalho.

À Giselle Woolley, te conhecer foi um presente e sua amizade, apesar de pouco tempo, tem crescido bastante e é muito importante para mim.

A equipe do diabetes (Jessica e Simone), nosso trabalho em equipe e amizade foram cruciais para o desenvolvimento dos nossos experimentos. Foram muitos dias de conversas, cantorias e veneninhos.

Aos integrantes do laboratório de bacterioses: Muller, Giva, Ceça e Renata por nunca terem medido esforços para me ajudar quando precisei usar os equipamentos do laboratório.

À Thiago Araújo por todos os ensinamentos e ajuda que recebi para realização das análises.

À profa. Dra. Laura Porto pela parceria e coorientação no trabalho.

À Fernanda Dias, por toda amizade e apoio recebido todos esses anos. Pelas preciosas dicas para melhoria do meu projeto. À profa. Dra. Elizabeth Neves por ter me iniciado na carreira científica.

À Emanuel, por ter me auxiliado nas dosagens hormonais.

À Farmácia Roval pela disponibilização dos fármacos utilizados para a realização do experimento.

À Renata e André por cuidar dos animais e pela amizade construída no tempo que passei indo ao biotério.

Sou muito grato a todas as amigas que conquistei, durante todos esses 10 anos na UFRPE, foram muitos ensinamentos, muitas amigas, muitas conversas e idas ao restaurante universitário.

Àos integrantes do departamento de morfologia e fisiologia animal, todos os amigos que conquistei nas salas de aula e toda aprendizagem que recebi pelos professores que fazem parte. À Edna Cherias, que sempre me ajudou e orientou quanto às regras da pós-graduação em biociência animal.

À Joeliton Paulo por toda paciência e carinho em toda a fase de estresse no término das análises. Tenho muita gratidão por você ter estado ao meu lado.

À Patrícia Regina por todo amor, amizade e carinho todos esses anos, sei que estou com uma pendência, mas vamos resolver. Você sempre acreditou em mim e me deu forças para continuar seguindo em frente.

A todos os meus amigos, que me apoiaram em todos os momentos, sempre me incentivando a seguir em frente e conquistar meus objetivos. A todo amor recebido em cada iburafolia, em cada saída e em cada conselho que recebi. Em especial a Natalia Iunskoski, Soraia Jácome, Alexandre Jr que sempre acreditaram no meu potencial e pelos momentos de descontração com cervejas artesanais e shade gratuito.

RESUMO

A administração de dietas ricas em lipídios pode promover o estabelecimento de sobrepeso e obesidade, que são definidos como o acúmulo de gordura corporal anormal ou excessivo aumentando os riscos no desenvolvimento de vários danos, como: hipertensão, dislipidemias, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, disfunção sexual, problemas respiratórios e câncer. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da administração de metformina, associada ou não, com melatonina e pentoxifilina no metabolismo glicídico, lipídico e parâmetros reprodutivos de animais alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos ao diabetes mellitus. Foram utilizados 30 ratos Wistar adultos, divididos em seis grupos experimentais, que foram alimentados durante 60 dias com dieta hiperlipídica. No 30º dia, os animais foram induzidos ao diabetes por estreptozotocina (35 mg/kg). Após a confirmação do diabetes, foi realizado o tratamento com metformina (500 mg/kg), isolada ou em associação com melatonina (5 mg/kg) e/ou pentoxifilina (100 mg/kg) em um período de 30 dias. Após o tratamento, os animais foram pesados, anestesiados com quetamina e xilazina e encaminhados para procedimentos de eutanásia. O sangue dos animais foi coletado para dosagem hormonal e análises moleculares. Fragmentos de tecido testicular foram coletados, armazenados em refrigerador, para dosagem de marcadores de estresse oxidativo, e também encaminhados para processamento histológico em resina. Os níveis de TNF-alfa, IL-6 e corticosterona foram elevados nos animais diabéticos. A associação de metformina com melatonina foi eficiente na redução dos níveis das citocinas inflamatórias. Por outro lado, quando os dois fármacos foram administrados conjuntamente não houve melhoria nesses parâmetros. Com relação ao estresse oxidativo testicular, os níveis de superóxido dismutase, glutatona e malondialdeído, elevados nos animais diabéticos, foram reduzidos significativamente com a administração de metformina isolada e conjuntamente com pentoxifilina e/ou melatonina. Adicionalmente, os parâmetros quantitativos testiculares avaliados também tiveram melhor resposta ao tratamento com metformina e melatonina. Pode-se concluir que a ação da metformina como tratamento para manutenção do diabetes pode ser potencializado com a administração de melatonina exógena, trazendo melhoria na qualidade de vida de indivíduos diabéticos.

Palavras-chave: estresse oxidativo; testículo; inflamação; túbulo seminífero; células de Leydig

ABSTRACT

The administration of high-fat diets can promote the establishment of overweight and obesity, that are defined as the accumulation of abnormal or excessive body fat that increase the risks in the development of various damages such as: hypertension, dyslipidemias, diabetes mellitus, cardiovascular diseases, sexual dysfunction, respiratory problems and cancer. The objective of this study was to evaluate the effects of melatonin and pentoxifylline administration of metformin on glucose, lipid metabolism and reproductive parameters of animals fed a hyperlipidemic diet and induced diabetes mellitus. Thirty adult Wistar rats, divided into six experimental groups, were fed 60 days of hyperlipid diet. On the 30th day, the animals were induced to diabetes by streptozotocin (35 mg / kg). After confirmation of diabetes, metformin (500 mg / kg) was administered alone or in combination with melatonin (5 mg / kg) and / or pentoxifylline (100 mg / kg) over a period of 30 days. After treatment, the animals were weighed, anesthetized with ketamine and xylazine and referred for euthanasia procedures. Blood from the animals was collected for hormonal dosing and molecular analyzes. Testicular tissue fragments were collected, stored in a refrigerator, for the determination of oxidative stress markers, and also submitted to histological resin processing. Levels of TNF-alpha, IL-6 and corticosterone were elevated in diabetic animals. A combination of drugs with metformin was effective in reducing the levels of inflammatory cytokines. Regarding testicular oxidative stress, levels of superoxide dismutase, glutathione and malondialdehyde, elevated in diabetic animals were significantly reduced with metformin alone and in combination with pentoxifylline and / or melatonin. In addition, quantitative indicators test the ability to respond to treatment with metformin and melatonin. It can be concluded that the action of metformin as a treatment for the maintenance of diabetes can be potentiated with an administration of exogenous melatonin, bringing improvement in the life quality in diabetics.

Key Words: oxidative stress, testis, inflammation, seminiferous tubule; Leydig cells

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Sobrepeso, obesidade e síndrome metabólica.....	14
2.2. Tecido adiposo e suas propriedades.	15
2.3. Fisiopatologia da obesidade e resistência insulínica	18
2.4. Diabetes mellitus.....	20
2.5. Sistema Reprodutor Masculino	21
2.6. Estresse oxidativo.....	26
2.6.1 Lipoperoxidação	28
2.6.2 Superóxido dismutase (SOD).....	29
2.6.3 Glutathione reduzida (GSH)	30
2.6.4 Glutathione redutase (GR)	30
2.6.5 Glutathione peroxidase (GPx)	31
2.6.6 α -tocoferol (Vitamina E)	32
2.7. Metformina.....	32
2.8. Melatonina	33
2.9. Pentoxifilina	34
3. OBJETIVO GERAL	36
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. REFERÊNCIAS	37
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
6.1. Animais e grupos experimentais	44
6.2. Procedimentos experimentais	45
6.3. Eutanásia e coleta de material.....	46
6.4. Avaliação quantitativa, qualitativa e histológica testicular.....	46
6.5. Dosagem de testosterona plasmática.....	48
6.6. Determinação de indicadores de estresse oxidativo	48
6.7. Avaliações bioquímicas e hormonais	49
6.8. Análise Estatística	49
7. RESULTADOS.....	50
7.1. Índice glicêmico, peso corporal, testicular, epididimal, prostático e da glândula seminal.....	50
7.2. Níveis de marcadores de estresse oxidativo	55
7.3. Análises moleculares	57
7.4. Avaliação quantitativa, qualitativa e histológica testicular.....	58

8. DISCUSSÃO	68
9. CONCLUSÃO	74
10. REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

A alta ingestão de alimentos ricos em calorias é comum no estilo de vida moderno, gerando um desequilíbrio energético entre a quantidade de energia consumida e a energia gasta com as atividades diárias. Isso pode ocorrer devido a vários fatores como: sedentarismo, fatores genéticos, fatores culturais e tabagismo (Young et al., 2007; Spurlock et al., 2008, Rosini et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o aumento de peso em excesso é um problema mundial que, além de atingir países de alta renda, está em crescimento em países de baixa e média renda. Em 2014, aproximadamente 39 % e 13 % dos adultos, a partir dos 18 anos, apresentavam-se com sobrepeso e obesidade, respectivamente.

Sobrepeso e obesidade são definidos como o acúmulo de gordura corporal anormal ou excessivo que aumentam os riscos do desenvolvimento de vários problemas de saúde, como: hipertensão, dislipidemias, *Diabetes Mellitus do tipo II*, doenças cardiovasculares, problemas respiratórios e câncer. Tais alterações podem se relacionar intimamente, configurando o quadro de síndrome metabólica (SM) (Buijs; Kreier, 2006; Ostrander et al., 2006; Furukawa et al., 2014).

Diante disso, vários estudos vêm utilizando-se de modelos experimentais voltados ao desenvolvimento de resistência insulínica e obesidade com respostas metabólicas semelhantes à dos humanos (Spurlock et al., 2008; Kanakasi; Koya, 2011; Nilsson et al., 2012; Rosini et al., 2012). A administração da dieta hiperlipídica promove imperfeições no metabolismo da glicose, podendo levar à diminuição da sensibilidade tecidual à insulina, que é característica do diabetes mellitus do tipo II. Tais alterações geram uma série de danos ao organismo, que, ao longo do tempo, podem levar ao desenvolvimento de várias complicações, como: nefropatia, neuropatia, retinopatia, doenças cardiovasculares e impotência sexual (Estadella et al., 2011; Kanakasi; Koya, 2011).

Além disso, o estabelecimento do diabetes promove o aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROs) e consequente perda do poder antioxidante natural do organismo, levando a um desequilíbrio denominado de estresse oxidativo, comum na fisiopatologia do diabetes mellitus e obesidade (Barbosa et al., 2010). Na obesidade, devido à expansão do tecido adiposo visceral, ocorre o aumento na produção de ROs, pelos adipócitos, além da expressão de citocinas inflamatórias, acentuando os danos oxidativos (Burlamaqui et al., 2012; Aroor; Demarco, 2014, Furukawa et al., 2014).

Com isso, novas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas, como a administração de extratos de plantas e fármacos, com o intuito de prevenir ou amenizar os efeitos deletérios que o estabelecimento do diabetes e obesidade promovem na homeostase metabólica (Oliveira et al., 2017; Dantas-Ferreira et al., 2018).

A melatonina é um hormônio produzido pelas células da pineal, durante o período noturno, e desempenha função no controle do ritmo circadiano. Além disso, a melatonina possui funções imunomodulatórias, anti-inflamatórias, antiapoptóticas e antioxidantes (Neto; Castro, 2008; Yonei et al., 2010). Na fisiopatologia do diabetes, ocorrem falhas na funcionalidade dos receptores para melatonina, acarretando em baixas concentrações séricas do hormônio e desregulação do ritmo circadiano que, por sua vez, possui relação direta com o metabolismo da glicose (Espino et al., 2011).

Nesse sentido, o uso de melatonina exógena tem se mostrado importante para manutenção da proteção antioxidante do organismo de animais diabéticos, a fim de promover melhorias na sensibilidade à insulina, controle glicêmico, redução do conteúdo de ácidos graxos livres e colesterol total (Yonei et al., 2010; Espino et al., 2011; Gobbo et al., 2015). Adicionalmente, sabe-se que a melatonina possui relação com a liberação de hormônios sexuais, através do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, exercendo também influencia na produção de espermatozoides (Guneli et al., 2008; Gobbo et al., 2015; Li ;Zhou, 2015).

Por sua vez, a pentoxifilina, derivada da metilxantina, é um inibidor de fosfodiesterase que possui papel importante na manutenção de alterações do sistema vascular, através do bloqueio da expressão de genes inflamatórios, aumento do fluxo sanguíneo, elevação da oxigenação dos tecidos e diminuição a capacidade de formação de radicais livres (Radfar et al., 2005; Zang et al., 2015; Luo et al., 2015; Navarro-gonzales et al., 2015). Isso ocorre por meio do aumento intracelular de AMP cíclico, que é um mecanismo utilizado por várias drogas para o tratamento de doenças cardiovasculares e respiratórias (Takhtfooladi et al., 2015). Além disso, a pentoxifilina tem influencia na melhora da fertilidade, promovendo elevação dos níveis de FSH, LH e testosterona, além de aumentar a mobilidade espermática (Safarinejad, 2011; Moradi et al., 2015).

Para o tratamento dos altos níveis glicêmicos e aumento na sensibilidade tecidual à insulina, é comum o uso de várias classes de drogas orais, dentre elas: alfa-glucosidase, tiazolidenionas, inibidores de lipase intestinal e biguanides (Inzucchi, 2002; Gross et al., 2011; Nilsson et al., 2012). A metformina é o hipoglicemiante oral mais utilizado para o tratamento do diabetes mellitus do tipo II. Este fármaco age através do bloqueio da produção de glicose, a partir do tecido hepático, e desempenha melhora na sensibilidade tecidual à insulina, principalmente, no tecido muscular (Grossi et al., 2011).

Diante do exposto, acreditamos que a administração de pentoxifilina e melatonina, em combinação com metformina, podem potencializar os efeitos antidiabéticos que os fármacos possuem individualmente e, assim, melhorar os danos que a fisiopatologia da doença promove no metabolismo. Para isso, avaliamos os efeitos das combinações de metformina com pentoxifilina e/ou melatonina nos níveis de marcadores inflamatórios, marcadores oxidativos testiculares, histologia e morfometria testicular de ratos submetidos ao diabetes mellitus e alimentados com dieta rica em lipídios.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sobrepeso, obesidade e síndrome metabólica

A partir da segunda metade do século XX, os padrões socioeconômicos e culturais da população vêm sofrendo diversas transformações, alterando de forma significativa o estilo de vida da humanidade (MENDONÇA et al., 2004). A característica básica entre os países foi o aumento de dietas calóricas e ricas em gorduras, principalmente a saturada, sódio, açúcares, alimentos refinados e a redução da ingestão de alimentos fontes de carboidratos complexos e fibras (POPKIN, 2001). Este quadro configura-se por conta do aumento no consumo de carnes, ovos, leite e seus derivados (iogurte e queijos *petit suisse*), mistura para bolo, sobremesas prontas geleificadas, suco de frutas concentrado de açúcar, margarina, *fast foods*, alimentos industrializados, refrigerantes, congelados e enlatados e do declínio de cereais, leguminosas, raízes e tubérculos, hortaliças e frutas (MONTEIRO et al., 2000; WHO, 2003). Concomitante à isso, observa-se aumento do sedentarismo e mudanças substanciais na alimentação (BRASIL, 2008).

A ingestão de alimentos ricos em calorias, comum no estilo de vida moderno, leva a um aumento desproporcional na quantidade de energia consumida em relação à energia gasta com atividades do dia a dia. Isso gera um desequilíbrio energético, o qual promove alterações metabólicas relacionadas principalmente com deposição de energia em forma de gordura. Além disso, a inatividade física, fatores genéticos, fatores culturais e tabagismo podem contribuir para acentuar esse quadro (YANG et al., 2007; SPURLOCK et al., 2008, ROSINI et al., 2012).

Uma forma de mensurar o excesso de peso corpóreo está relação entre o peso corporal (kg) e o quadrado da altura (m^2) denominado de índice de massa corporal (IMC). O aumento de gordura corporal pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas como o sobrepeso e a obesidade, quando o IMC está em uma média de 25 a 29 kg/m^2 e acima de 30 kg/m^2 , respectivamente (Guedes et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o aumento de peso em excesso é um problema mundial que, além de atingir países de alta renda, está em crescimento em países de baixa e média renda. Em 2014, aproximadamente 39 % e 13 % dos adultos, a partir dos 18 anos, apresentavam-se com sobrepeso e obesidade, respectivamente. Através da interação de fatores genéticos e ambientais, a obesidade expressa alterações no organismo representadas pelo aumento da atividade simpática, alterações do sistema renina angiotensina e

aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (LOPES, 2005). Essas alterações resultam em distúrbios orgânicos com alta correlação com as doenças cardiovasculares.

A obesidade central, a glicemia de jejum alterada, a intolerância à glicose, o aumento da fração LDL-colesterol (*low density protein*) e dos triglicérides (TG), a diminuição da fração HDL-colesterol (*high density lipoprotein*), o aumento da pressão arterial, distúrbios da coagulação sanguínea, a disfunção endotelial e a microalbuminúria são os principais distúrbios orgânicos que contribuem para a instalação de hipertensão arterial, diabetes, hiperglicemia arterial e dislipidemias, quadro esse característico da síndrome metabólica (CERCATO et al., 2000; LOPES, 2005). A síndrome metabólica é um transtorno complexo, representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular e renal, usualmente relacionados à deposição central de gordura corporal e a resistência à insulina (RI) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

1.2. Tecido adiposo e suas propriedades.

Na maioria dos mamíferos, a energia é estocada na forma de gordura e distribuída pelo corpo de acordo com a necessidade do animal. Essa distribuição é intimamente relacionada com a faixa etária, sexo, temperatura e nutrição do organismo (Bonet; Ribot; Palou, 2012). O estoque energético é realizado sob a forma de triacilglicerol em células que compõem o tecido adiposo, denominadas adipócitos. Além disso, a energia pode ser armazenada nas células hepáticas e no músculo esquelético sob a forma de glicogênio (Belmonte e Aoki, 2005).

As células adiposas podem estar localizadas nos compartimentos subcutâneo ou visceral e são distribuídas, de forma isolada, em pequenos ou grandes agregados celulares em dois tipos principais: tecido adiposo amarelo ou unilocular (com apenas uma gotícula lipídica ocupando o espaço citoplasmático) e tecido adiposo pardo ou multilocular (com várias gotículas de lipídios e grande quantidade de mitocôndrias) (Mirancea e Mirancea, 2011).

Além das diferenças morfológicas, os adipócitos também diferem entre si de acordo com a sua função, sendo o tecido adiposo amarelo responsável pela liberação de energia dos ácidos graxos, para suprir as necessidades do organismo, e o tecido adiposo pardo pela oxidação dos triglicerídeos para produção de calor (Belmonte e Aoki, 2005).

O tecido adiposo tem a propriedade de renovação contínua, respondendo a estímulos nervosos e hormonais. Além da função de estocagem, também é responsável por inúmeras funções adicionais como: modelagem da superfície corporal, proteção contra choques,

isolamento térmico do corpo, além de secretar várias moléculas importantes como leptina e adiponectina (Rezaee e Dashty, 2013).

Quando há necessidade energética, ocorre a ativação de duas enzimas principais: a lipase sensível a hormônio (HSL) e lipase monoacilglicerol, e possui como produto a liberação de três moléculas de ácidos graxos e uma porção de glicerol em um processo denominado lipólise. Os ácidos graxos são transportados pela albumina para serem utilizados em tecidos como músculo e fígado, enquanto que o glicerol está envolvido com a gliconeogênese hepática. No entanto, para evitar o acúmulo de ácidos graxos circulantes, e consequente perda energética, a síntese e hidrólise do triacilglicerol são reguladas através de fatores como: secreções hormonais do sistema endócrino, secreções de neurotransmissores do sistema nervoso simpático, cascatas de sinais, tendo como alvo a HSL (Caminhotto; Campana; Lima, 2014).

Circundando as gotículas de lipídios existem proteínas como perilipinas, lipotransinas e adipofilinas que possuem a função de proteção contra a lipólise acentuada e auxilia no acúmulo de lipídios na célula. Quando a HSL é ativada, ocorre a fosforilação e movimentação das proteínas, favorecendo a lipólise. A mobilização de energia pode ocorrer, principalmente, através da ativação de receptores (β e α adrenérgicos) e insulina por inervação simpática e parassimpática, respectivamente. As catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) são liberadas na corrente sanguínea após a estimulação do sistema nervoso simpático e seus efeitos são mediados por esses adrenorreceptores existentes na membrana das células adiposas (Fonzeca-Alaniza et al., 2007).

Para que ocorra a utilização de gotículas lipídicas, há a conversão de moléculas de ATP em AMPc através da enzima adenilil ciclase. Essa enzima é ativada após ocorrer a estimulação dos receptores beta adrenérgicos, e essa cascata tem como resultado a fosforilação do HSL, perilipinas e ativação da proteína quinase A. Por outro lado, a ativação do receptor alfa adrenérgico possui efeito inibitório da lipólise, bloqueando a atividade da adenilil ciclase e consequentemente reduzindo a concentração de AMPc (Caminhotto; Campana; Lima, 2014).

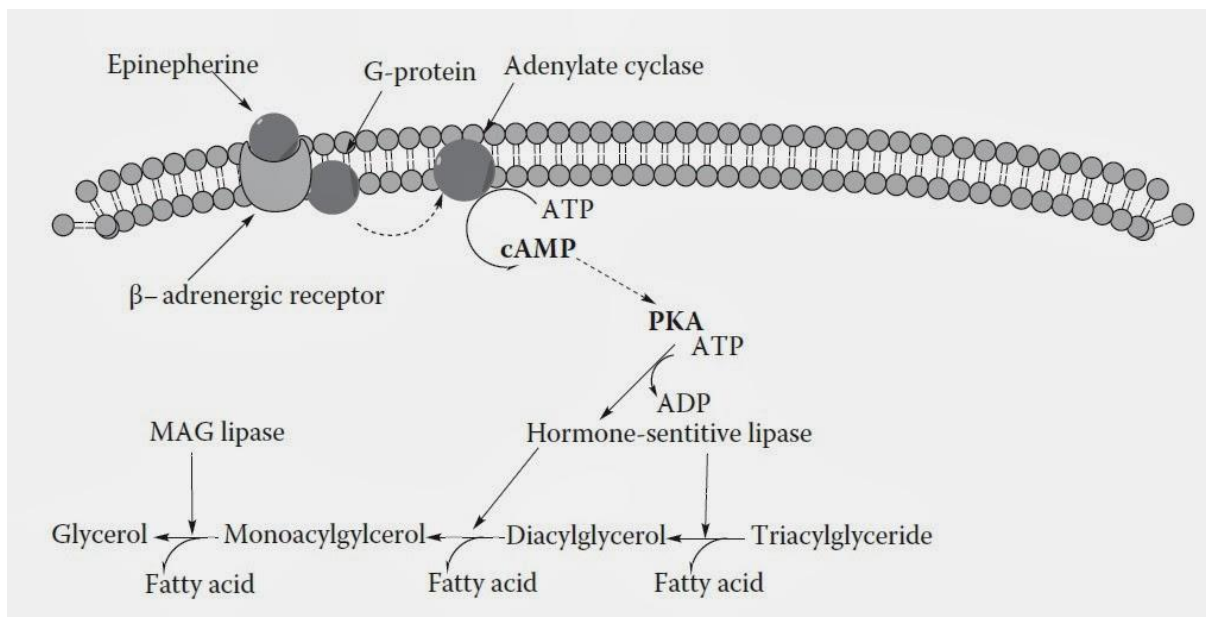


Figura 1. Esquema acerca da cascata de eventos que ocorrem após a estimulação da lipólise. Fonte: Campbell, 2016.

O glucagon é um hormônio secretado pelo pâncreas quando os níveis plasmáticos de glicose estão baixos. Esse hormônio também possui efeito estimulatório a lipólise por mecanismos semelhantes aos das catecolaminas (Fonzeca-Alaniza et al., 2007).

Dentre os mecanismos de regulação da mobilização de ácidos graxos, a testosterona possui um efeito positivo no aumento da sensibilidade dos receptores beta adrenérgicos às catecolaminas. Em animais submetidos a procedimento de castração, a lipólise foi reduzida, voltando a aumentar após tratamento com testosterona exógena (Lee; Lee; Cho 2013).

O tecido adiposo também possui propriedades endócrinas, pois produz peptídeos, hormônios e citocinas responsáveis pelo controle do metabolismo lipídico e glicídico, pressão sanguínea e modulação hormonal. As adipocinas são citocinas, secretadas pelos adipócitos, com função de modulação do estado inflamatório, regulação do apetite por feedback, consumo alimentar, uso da glicose e gasto energético. Esses produtos podem agir de forma parácrina e autócrina, induzindo a reutilização do tecido adiposo, adipogênese e angiogênese (Waki e Tontonoz, 2007; Rezaee e Dashty, 2013).

A leptina é um hormônio produzido, principalmente, pelo tecido adiposo subcutâneo e age no nível do sistema nervoso central, regulando o consumo alimentar, sendo conhecido como o hormônio da saciedade. Este hormônio pode atuar em vários tipos celulares, possui função imunitária, hematopoiética, angiogênica e são necessários níveis normais para uma boa função do sistema reprodutor. O seu mecanismo de ação envolve a estimulação de vias

catabólicas através da ativação de cinases dependentes de AMP (Fernandez Sanchez et al. 2011).

A adiponectina possui uma atividade inversa às demais adipocinas, estando em níveis circulantes baixos quando há uma grande quantidade de energia acumulada. Confere proteção contra a aterosclerose, diminui a gliconeogênese hepática, além de realizar ação conjunta com a insulina ao melhorar a absorção de glicose no músculo e oxidação de ácidos graxos (Ruan e Dong, 2016).

1.3. Fisiopatologia da Obesidade e Resistência Insulínica

O excesso de nutrientes, característico da obesidade, promove a desregulação entre a energia consumida e a gasta, podendo levar a mudanças estruturais nas células do tecido adiposo. A hipertrofia é caracterizada pelo distendimento dos adipócitos, por meio da deposição exagerada de triglicerídeos, que pode levar a morte celular. Apesar disso, esse fenômeno ocorre como uma adaptação do organismo a quantidade excessiva de energia disponível, na tentativa de evitar que ocorra a lipotoxicidade nos outros tecidos (Muir et al., 2016).

Na hiperplasia, há o aumento no número de adipócitos, através da estimulação de sua produção por fatores como IGF-1, que tem sua produção acentuada nos adipócitos hipertróficos. Quando o adipócito chega ao limite de expansão, há o recrutamento de pré-adipócitos para a diferenciação em adipócitos maduros (Wernstedt et al., 2014; Crewe et al. 2016).

Conjuntamente com a hiperplasia, o excesso de nutrientes inibe a liberação normal do óxido nítrico no endotélio. Essa mudança promove insuficiência no sistema vascular, aumentando os riscos no aparecimento de doenças vasculares. Além disso, pode levar a hipóxia e consequente produção de espécies reativas de oxigênio, danos celulares e inflamação (Wernstedt, et al., 2014; Muir et al., 2016).

A obesidade é considerada uma doença inflamatória com a expressão de adipocinas pró-inflamatórias como TNF- α , interleucina 6 (IL-6), leptina e baixa expressão de citocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina. A alta produção de adipocinas, na obesidade, possui interferência direta no estabelecimento da resistência à insulina e ocorre, principalmente, pela infiltração de macrófagos no tecido adiposo (Fernandez Sanchez et al. 2011; Crewe et al., 2016).

As adipocinas podem exercer função parácrina, aumentando a inflamação local no tecido adiposo e também atuam de maneira endócrina, através de estimulação da resistência

insulínica e disfunções vasculares. Em condições de insulino-resistência, o bloqueio na ação de insulina plasmática limita a captação de nutrientes e facilita a lipólise. A liberação dos ácidos graxos acumulados atinge outros tecidos e promove o estado inflamatório, através do recrutamento de macrófagos para absorção dos produtos da lise dos adipócitos. Esse mecanismo ocorre devido à ativação das quinases, as quais impedem a fosforilação do receptor para insulina e levam a diminuição de sua sensibilidade (Boutens e Stienstra, 2016).

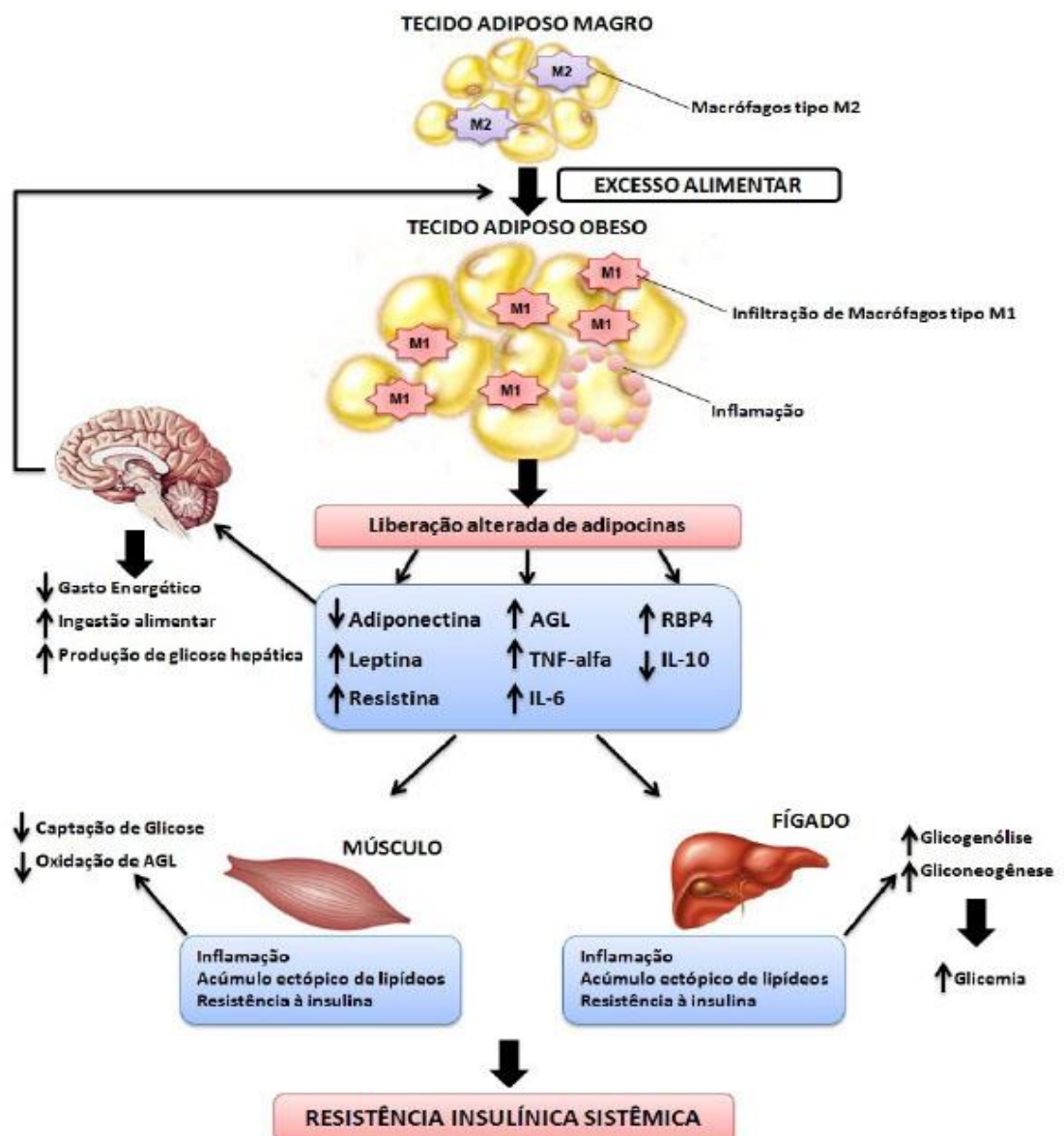


Figura 2. Esquema mostrando as etapas que levam ao estabelecimento da resistência insulínica. Fonte: adaptado de Speretta et al. (2014).

1.4.Diabetes Mellitus

Nos últimos tempos, o número de indivíduos diabéticos vem aumentando consideravelmente em todo o mundo. No ano de 2010, foi observado que aproximadamente 285 milhões de pessoas possuíam a doença, e esse número tende a aumentar, podendo chegar a 438 milhões no ano de 2030 (Who, 2018).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2006), o diabetes mellitus possui vários tipos, sendo os mais comumente citados: diabetes tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos mais específicos. Na fisiopatologia do diabetes do tipo 1 ocorre a destruição das células beta pancreáticas, levando a deficiência na produção de insulina. Já no diabetes do tipo 2, ocorre uma resistência tecidual à insulina e é geralmente associada com a obesidade.

Um indivíduo é considerado diabético quando possui níveis glicêmicos com valores maiores que 126 mg/dL, enquanto que os níveis normais são valores abaixo de 100 mg/dL. Ao longo do tempo, com a persistência de níveis glicêmicos altos, o diabetes promove uma série de alterações como retinopatia, nefropatia, sintomas cardiovasculares e disfunção sexual (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2006).

Com isso, vários estudos vêm sendo realizados com diabetes induzido experimentalmente, através da administração de drogas como a estreptozotocina e aloxano (Dias, 2005). A Estreptozotocina é uma substância química antibacteriana derivada da bactéria *Streptomyces griseus* que possui propriedades diabetogênicas, antitumorais e antimicrobianas (Furlan, 2001). Sua principal característica está na especificidade às células beta pancreáticas, promovendo uma série de reações que levam a quebra no DNA, depleção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e formação de radicais livres. Devido a isso, ocorre a inibição da biossíntese e secreção de insulina por meio de carência. (Dias, 2005; Kirsten *et al*, 2010).

Ao ser administrada, a estreptozotocina possui um comportamento trifásico com relação ao nível de glicose: inicialmente ocorre uma hiperglicemia acentuada devido à depleção do glicogênio hepático, após isso uma hipoglicemia relacionada com a liberação de insulina através da ação de macrófagos nas células necrotizadas e uma terceira fase onde a hiperglicemia permanente é instalada (Junod *et al*, 1969; Furlan, 2001).

A sensibilidade à droga é variável em nível de espécie e a gravidade está relacionada com a dosagem estabelecida de acordo com o peso corporal do animal com doses variando de 50 a 100 mg/kg ou através de pequenas doses (Junod *et al*., 1969; Dias, 2005).

1.5. Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino é composto por um conjunto de órgãos (testículos, vias espermáticas, glândulas acessórias e pênis) que estão envolvidos na produção, maturação e liberação do gameta sexual masculino, além da produção de hormônios androgênicos (Russell et al. 1993).

Os testículos são órgãos pares, localizados no interior do escroto, responsáveis pela produção dos espermatozoides e testosterona. Do ponto de vista histológico, o testículo é coberto externamente por uma camada de tecido conjuntivo, denominada túnica albugínea. Essa túnica possui em sua região dorsal, um local com um grau maior de espessura, chamado de mediastino, que é o ponto inicial para o desenvolvimento de septos que compõem a região testicular. No interior desses septos incompletos, estão os túbulos seminíferos (Russell et al. 1993).



Figura 3. Esquema mostrando os órgãos que compõem o sistema reprodutor masculino.

Fonte: Ribeiro (2018).

O compartimento tubular é a parte do testículo preenchida por um emaranhado de túbulos dobrados em si, denominados de túbulos seminíferos. A membrana basal é um conjunto de células que circundam o túbulo seminífero e delimitam a divisão do compartimento tubular para o intersticial. Além disso, essas células possuem propriedade contrátil e está envolvida na

movimentação de espermatozoides e fluidos no túbulo seminífero (Maekawa; Kamimura; Nagano 1996).

O túbulo seminífero possui dois tipos celulares que compõem o epitélio seminífero: as células de Sertoli e as células germinativas. As células de Sertoli são responsáveis pela nutrição das células germinativas e possuem especializações de membrana que funcionam como um suporte para o desenvolvimento das mesmas. Além disso, secretam o hormônio anti mulleriano e a inibina (GENDT et al. 2004; Griswold, 2018). Por meio de junções intercelulares, as células de Sertoli formam uma proteção para regular a entrada de biomoléculas no túbulo seminífero, chamada barreira de células de Sertoli. Estudos, que avaliaram a integridade desta barreira, observaram que substâncias que são aplicadas como teste ficam localizadas no compartimento intersticial e na lâmina própria, sem atingir o compartimento adluminal (Wen et al., 2018; Griswold, 2018).

Adicionalmente, a formação da barreira promove uma divisão do epitélio seminífero em dois compartimentos: basal e adluminal. A parte basal é composta por células de Sertoli, células mióides e espermatogônias e a parte adluminal é composta pelas células da linhagem espermatogênica (Wen et al., 2018).

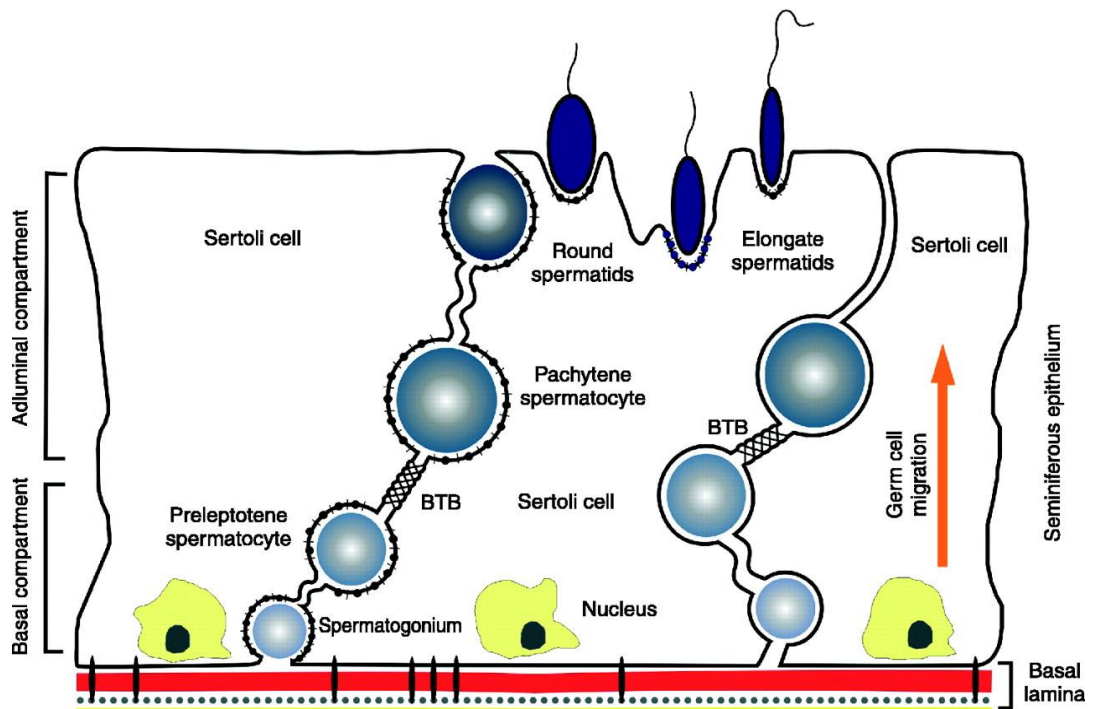


Figura 4. Esquema mostrando a lâmina basal e as divisões do epitélio seminífero nos compartimentos basal e adluminal. No compartimento basal, estão as células de Sertoli, espermatogônias e espermatócitos pré-leptótenos. No compartimento adluminal, estão os prolongamentos das células de Sertoli, sustentando o espermatócito em paquíteno, as espermatídes arredondadas e as espermatídes alongadas. Entre os compartimentos, é evidenciada as ligações entre as células de Sertoli para formar a barreira de células de Sertoli. Fonte: adaptado de Wagner et al. (2008).

As células de Leydig são responsáveis pela produção do hormônio sexual masculino, a testosterona, através da utilização de moléculas de colesterol. São células ovais com grande concentração de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias, conferindo o papel na produção de hormônios esteroides (Mori e Christensen, 1980). Além disso, apresentam cromatina descondensada e vários nucléolos (Ballester et al., 2005). O citoplasma possui aparência glandular e cerca de 60% dessa área é ocupada pelo retículo endoplasmático liso, onde estão localizadas as enzimas envolvidas na esteroidogênese. Tais enzimas também são encontradas na membrana interna das mitocôndrias (Mori e Christensen, 1980).

Em mamíferos, a célula de Leydig é o tipo celular mais abundante desse compartimento contendo em uma população com cerca de 22 milhões de células por grama de testículo, variável de acordo com a idade e a espécie, formando grupos irregulares entre os túbulos seminíferos (França e Russel, 1998).

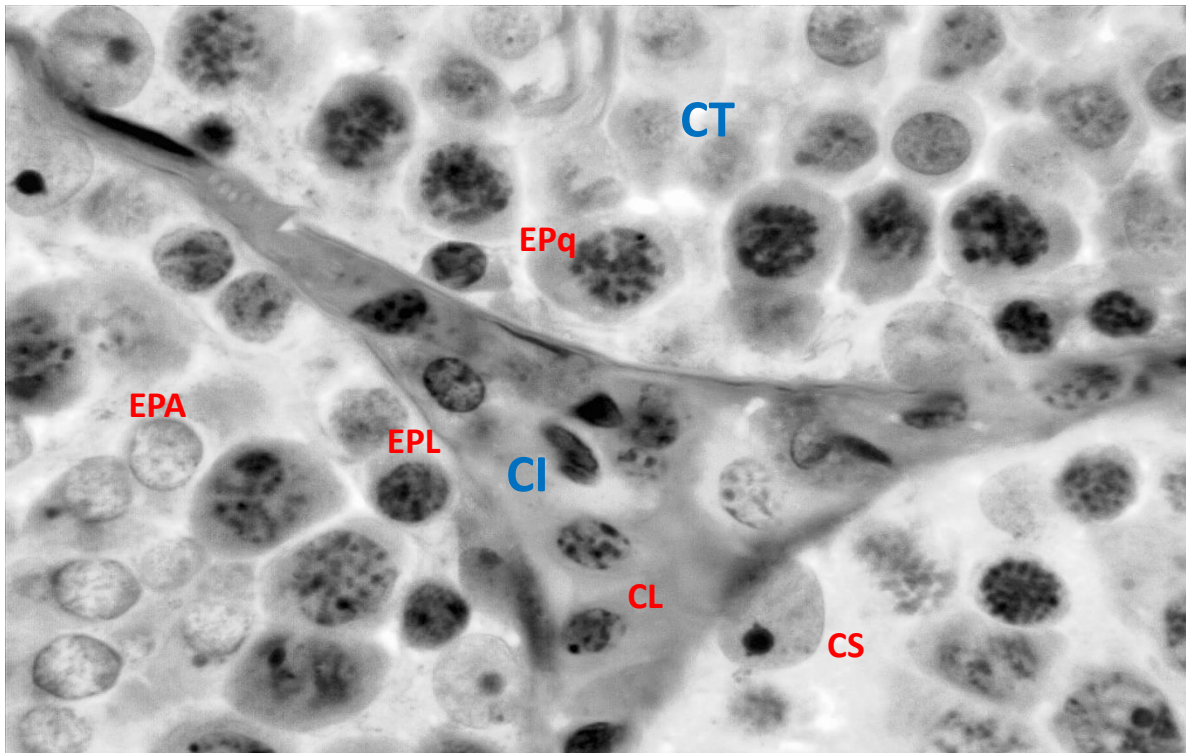


Figura 5. Fotomicrografia evidenciando o compartimento tubular (CT) e intertubular (CI) testicular. CL: células de Leydig; CS: célula de Sertoli; EPL: espermátocito pré-leptóteno; EPq: espermátocito paquíteno; EPA: espermátides arredondadas. Aumento: 1000x. Fonte: arquivo pessoal.

O ciclo do epitélio seminífero é um processo sincronizado de diferenciação de células germinativas em espermatozoides. Esse processo ocorre desde a membrana basal até o lúmen do túbulo seminífero e possui mecanismos que envolvem o código genético das células, além de comunicação intercelular e com células somáticas presentes no testículo (Nishimura e L'hernault, 2017; Verhoeven et al., 2007). A partir de espermatogônias do tipo B, por via mitótica, são formados espermátocitos primários tetraploides que, através da meiose I, originam espermátocitos secundários diploides, e, por sua vez, sofrem meiose II e formam as espermátides haploides. Após isso, as espermátides sofrem uma série de mudanças estruturais

tornando-se espermatozoides em um processo denominado espermiogênese (Nishimura e L'hernault, 2017)

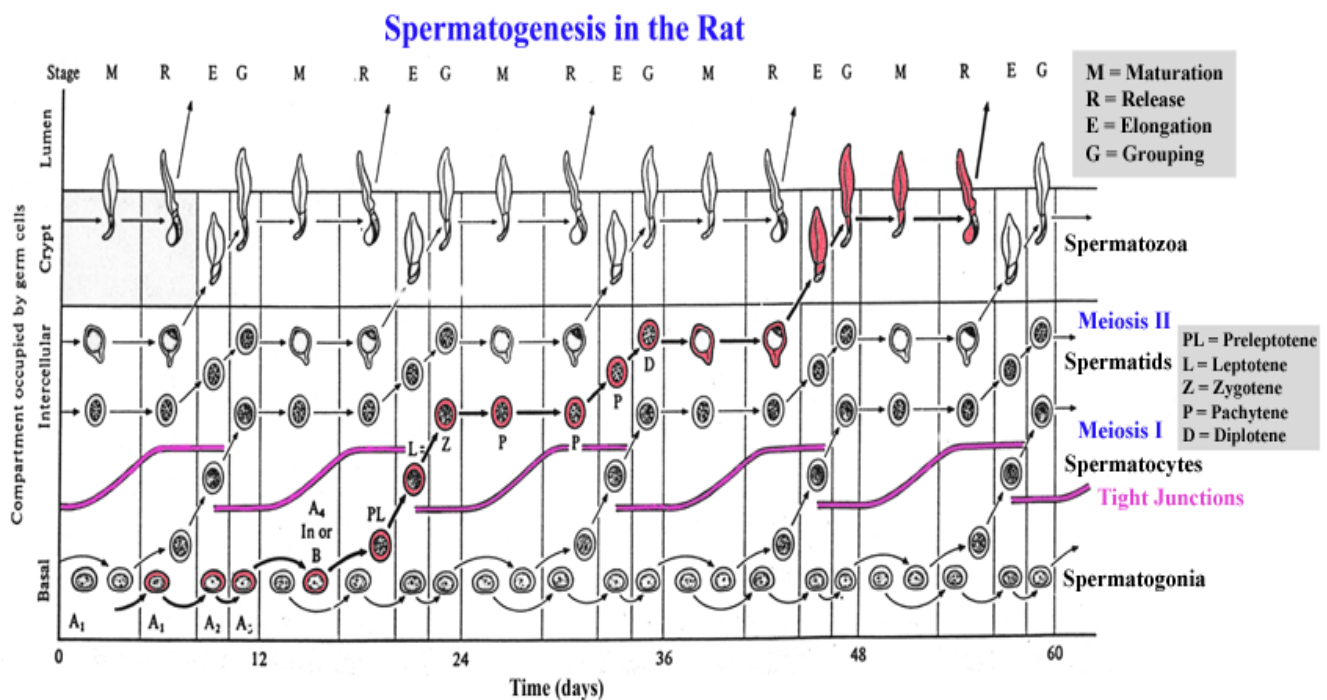


Figura 6. Esquema mostrando a espermatogênese do rato que tem duração de 58 dias. Em vermelho, observa-se o ciclo do epitélio seminífero desde a espermatogônia do tipo B até a formação de espermátides alongadas, passando por processos de divisão celular (mitose, meiose I e meiose II). Em rosa, as junções que formam a barreira de células de Sertoli. Fonte: adaptado por Campbell (2016).

Esse processo de diferenciação das células germinativas em espermatozoides tem duração entre 30 e 75 dias na maioria dos mamíferos, e 58 dias no rato (França et al., 1998; França e Chiarini-Garcia, 2005). As células germinativas são encontradas nos túbulos seminíferos em associações distintas chamadas de estádios, que podem ser classificados através dos métodos de morfologia tubular (França e Russel, 1998) e pelo método do sistema acrossômico (Russel et al., 1990). O processo espermatogênico é regulado através de uma rede de interação endócrina, parácrina e autócrina que ocorre entre os diversos tipos celulares existentes (Skinner et al. 1991).

Os principais hormônios reguladores da função testicular são: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). São secretados pela hipófise através de estimulação hipotalâmica, e seguem o eixo denominado de hipotalâmico hipofisário gonadal (Ramaswamy e Weinbauer, 2015). O FSH possui a propriedade de estimular as células de

Sertoli para desempenho de suas funções e determinar o número dessas células no testículo. Por sua vez, a quantidade de células de Sertoli é um fator determinante da produção espermática diária (Johnson et al. 1994).

O hormônio luteinizante (LH) é responsável por estimular a produção de testosterona, a partir da interação com receptores existentes nas células de Leydig. A testosterona é o hormônio sexual masculino responsável pelo início da espermatogênese, e também controle funcional do epidídimo, próstata e glândula seminal (Ramaswamy e Weinbauer, 2015). Esse hormônio é transportado, através das células de Sertoli, em sua forma convertida chamada de diidrosterona para o interior do túbulo, onde desempenha a função de estímulo no ciclo do epitélio seminífero. A elevação nos níveis de testosterona promove efeito contrário nos níveis circulantes de LH em um processo denominado retroalimentação negativa (Preston et al., 2012). Além de ser importante para a espermatogênese, a testosterona também possui papel no desenvolvimento de caracteres secundários masculinos (Cox; Stenquist; Calsbeek, 2009).

1.6. Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é caracterizado pelo estado onde há o desequilíbrio entre a oxidação e os sistemas oxidantes no corpo secundário (Yoshikawa & Naito, 2002). O desemparelhamento de elétrons torna as moléculas reativas, permitindo que haja ligações com outros compostos. Essas ligações promovem a formação de moléculas novas que podem ser tóxicas ao organismo, denominadas radicais livres (Santos, 2009).

Inúmeras patologias, incluindo o diabetes, exposição à radiação ionizante, estímulos tóxicos e diferentes tipos de xenobióticos estimulam a formação de radicais livres no organismo (Yoshikawa & Naito, 2002; Santos 2009; Comporti, 1989; Gillham et al., 1997, Barreiros et al., 2006).

Com relação a reprodução masculina, no testículo existe um conjunto de enzimas antioxidantes necessárias para garantir o sucesso na produção de hormônios esteroides e bom desempenho na formação de espermatozoides. Esse sistema de defesa possui um papel muito importante dentro do metabolismo testicular, visto que, o dano peroxidativo é um dos principais motivos de redução da funcionalidade do testículo (Aitken & Roman, 2008).

Estudos mostram que o estabelecimento do estresse oxidativo está relacionado a causas de infertilidade no macho. O ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS) pode interferir na

motilidade espermática e reduzir a capacidade de sustentar um desenvolvimento embrionário normal (Aitken & Baker, 2006; Kumar, 1999).

A capacidade na produção de hormônios esteroides pelas células de Leydig pode ser impedida pelo estresse oxidativo testicular, reduzindo a capacidade do epitélio germinativo na formação de espermatozoides saudáveis (Hales et al., 2005; Naughton et al., 2001). O aumento na ação de agentes oxidantes com relação à proteção antioxidantes leva a uma reação em cadeia que promove danos no DNA, proteína e lipídeos, gerando disfunção espermática (Maneesh e Jayalekshni, 2006; Zini e Libman, 2006; Marchesi e Feng, 2007; Sies 1993; Sanocka e Kurpisz, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são os agentes oxidantes mais comuns envolvidos nos processos patológicos por possuírem um curto tempo de vida. Os principais tipos de ERO são distribuídos em dois grupos, as radicais: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$), peróxila ($ROO^{\bullet}$) e alcóxila ($RO^{\bullet}$); e as não-radicalares: oxigênio “singlet” (O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HClO$). Entre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), o óxido nítrico (N_2O) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), dentre outros (Barreiros et al., 2006).

Apesar disso, o estresse oxidativo possui papel fundamental na fisiologia normal do organismo tendo influência na adaptação e regulação da transdução de sinalização intracelular (Yoshikawa & Naito, 2002). De acordo com o modo de ação, os agentes antioxidantes podem ser classificados de duas formas: ação detoxificadora e ação reparadora. Quando os agentes oxidantes se ligam aos radicais livres, impedindo a formação de novos agentes oxidantes, antes que ocorra a lesão celular é um processo chamado detoxificador. Estão envolvidos nesse processo antioxidantes como a glutatona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutatona-peroxidase (GPx) e vitamina E (Hebbel, 1986; Ross e Moldeus, 1991).

A ação reparadora ocorre quando há a mobilização de agentes antioxidantes com um intuito de reparar uma célula lesada, estando envolvidos: o ácido ascórbico, glutatona redutase (GR), GPx, dentre outros. Todos esses tipos de antioxidantes são encontrados a nível intracelular, exceto a vitamina E (α - tocoferol), que age a nível de membrana (Hebbel, 1986; Ross e Moldeus, 1991).

As EROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em sua grande totalidade, ela sofre redução tetravalente, através da ação da citocromo oxidase, acrescentando quatro elétrons (Figura 1) a cada O_2 para gerar duas moléculas de H_2O (Beneš et al. 1999). Apesar disso, na cadeia respiratória, aproximadamente 5% do conteúdo de oxigênio pode se

transformar em intermediários da reação, se modificando em superóxido, peróxido e hidroxila (Santos, 2009; Simonin & Galina, 2013; Cohen, 1989).

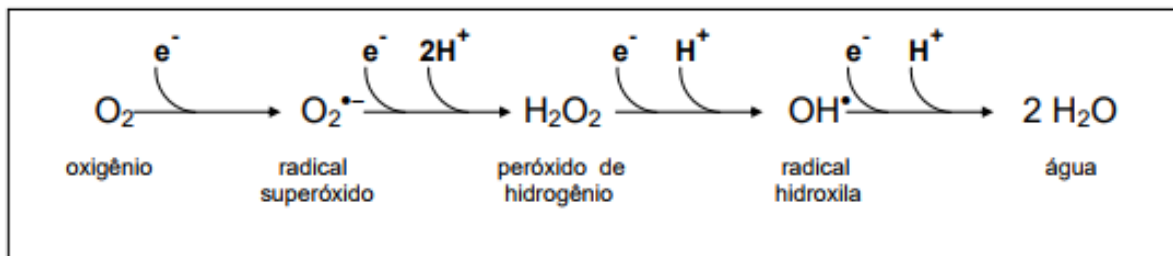


Figura 7. Redução tetraivalente do Oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até formação da água. Adaptado de: Boveris, 1998.

2.6.1 Lipoperoxidação

Na membrana das células ocorre naturalmente um processo fisiológico que auxilia no processo de renovação celular, pinocitose, fagocitose e contribui na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, esse processo é denominado de lipoperoxidação (Salganik, 2001; Noori, 2001).

No entanto, as membranas são mais vulneráveis à oxidação, por serem formadas por proteínas e lipídeos. Quando ocorre a multiplicação intensa das espécies reativas, além da defesa antioxidante presente, há danos graves na estrutura da membrana, alterando a permeabilidade, provocando perda de seletividade, extravasamento do conteúdo das organelas e formação de conteúdos citotóxicos (malondialdeído e 4- hidroxinonenal) (Mello Filho et al., 1983; Hershko, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1990; Shan et al., 1990; Ross e Moldeus, 1991; Ferreira e Matsubara, 1997).

O processo de lipoperoxidação é dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 2). Ocorre a iniciação quando um lipídeo de membrana é atacado, na maioria das vezes, pela radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), que é uma espécie reativa o bastante para capturar um hidrogênio e denominada de iniciadora da lipoperoxidação.

Quando o hidrogênio é capturado, há a formação de água e um radical livre lipídico que tende a ligar-se com um O_2 , formando um radical peroxila ($LOO^{\bullet}$). Estes radicais tem a capacidade de remover um próton de outra molécula lipídica em um processo denominado fase de propagação. A peroxila retira um hidrogênio de um lipídeo e forma o hidroperóxido

lipídico (LOOH). A fase de terminação ocorre quando dois radicais produzidos durante as etapas anteriores se ligam e formam produto estável (Halliwell e Gutteridge, 2015).

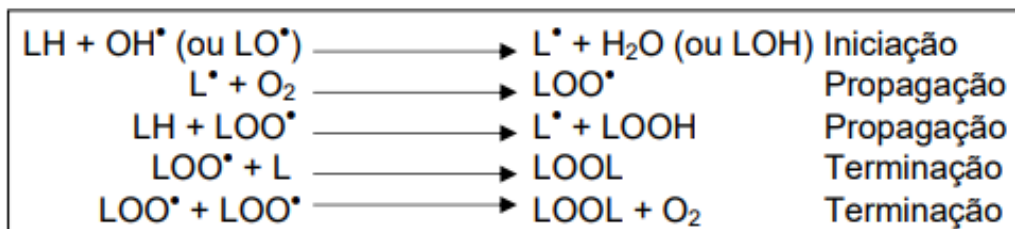


Figura 8. Reações de iniciação, propagação e terminação na peroxidação. Adaptado de: Ferreira e Matsubara (1997)

2.6.2. Superóxido Dismutase (SOD)

O íon superóxido é o maior fator de toxicidade do O_2 , além de ser o mais reativo dos íons. O SOD é responsável pela defesa deste íon atuando como scavenger do íon superóxido (Halliwell & Gutteridge, 2015)

Os radicais superóxidos podem ser produzidos de diversas formas auto oxidação das catecolaminas, hidroquinonas, tetraidropterianas, assim como ação catalítica de enzimas como xantina oxidase e aldeído oxidase (Fridovich 1975)

Apesar de apresentar diferentes tipos de metaloenzima, a reação de catalisação do superóxido ocorre da mesma forma: Aumento da aceleração da dismutação do $O_2^\bullet$, formando peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 3) (Fridovich e McCord 1969; Bernes et al., 1999, Halliwell e Gutteridge, 1999).

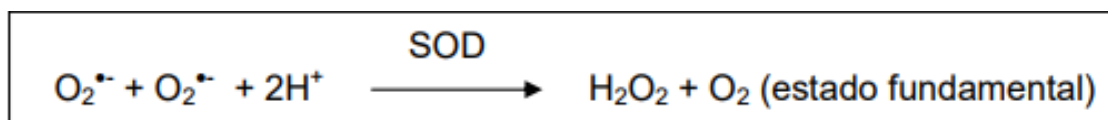


Figura 9. Reação de dismutação do radical superóxido. Adaptado por: Halliwell e Gutteridge (2015)

2.6.3 Glutathiona reduzida (GSH)

É considerada o agente antioxidante mais importante protegendo a célula contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta. O grupamento tiol (-SH), encontrado com maior frequência no meio intracelular, é o responsável pela sua capacidade redutora (Santos,2009)

A glutathiona é participa da detoxificação de agentes químicos e desempenha papel fundamental na lipoperoxidação, já que elimina produtos intermediários que são tóxicos ao metabolismo. Além disso, é importante na síntese do DNA, na formação de algumas prostaglandinas e algumas proteínas (Meister e Anderson, 1983; Deneke e Fanburg, 1989; Shan, 1990; Galleano e Puntarulo, 1995).

2.6.4 Glutathiona Redutase (GR)

A GR possui a capacidade de regenerar a glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH). Para que essa reação ocorra é necessário a presença de uma molécula de NADPH para cada molécula de GSH (Figura 5) (Chance et al.,1979; Ward e Peters, 1995). Devido a ação de regeneração da GR, é possível manter a GSH em sua forma redutora, o que é essencial para o sistema biológico (Pederzoli,2008).

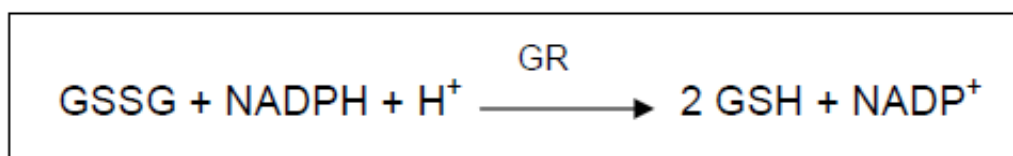


Figura 10. Regeneração da glutathiona reduzida (GSH) a partir da glutathiona oxidada (GSSH) através da enzima glutathiona redutase. Adaptado: Halliwell e Guteridge (2015).

Por ser dependente das vias da pentose, a GR sofre um déficit em sua atuação quando ocorre a diminuição no fornecimento de NADPH e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Shan, 1990; Ross e Moldeus, 1991; Matsubara et al., 1992).

2.6.5. Glutathione Peroxidase (GPx)

Atua removendo o H_2O_2 e outros peróxidos, ocorre de forma que ocorre a redução do peróxido até a molécula de H_2O ao mesmo tempo que realiza a oxidação do GSH (Figura 6) (Pederzoli, 2008).

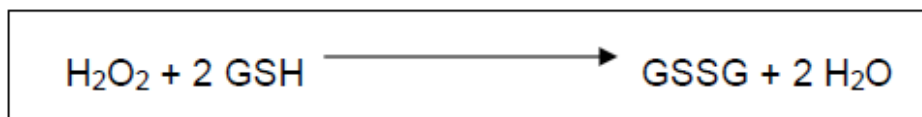


Figura 11. Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) até água molécula de água (H_2O) em conjunto a oxidação da glutathione reduzida (GSH). Adaptado: Halliwell e Gutteridge (2015).

Geralmente está localizado em membranas, atua como doador de hidrogênio para o GSH, é considerado um potente antioxidante, sendo eficaz na defesa contra a lipoperoxidação (Wendel, 1981). A ação da GPx exerce função sobre hiperperóxido de ácidos graxos, hidroperóxidos de tert- butil e do 7- β - hidroperóxido de colesterol servindo como catalisador no acoplamento do peróxido com o GSH. Nestes casos a reação de redução irá sempre resultar na formação de um álcool específico ao peróxido. (Figura 7).

No entanto, o GPx não exerce nenhuma função em lipoproteínas, membranas nem peróxidos de ácidos graxos esterificados a moléculas lipídicas, lipoproteína ou membrana, pois antes da ação da GPx é necessário que estas passem pela ação de lipases (Halliwell e Gutteridge, 1999; Pederzoli, 2008).

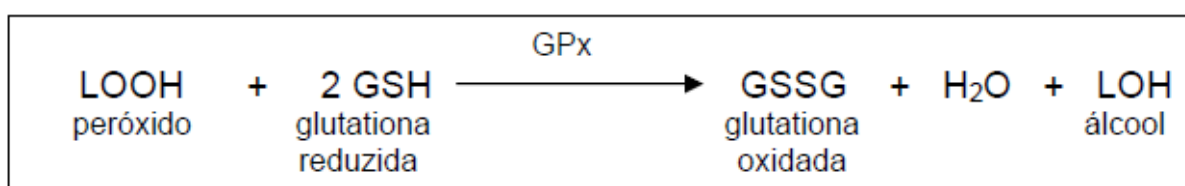


Figura 12. Reação de redução dos peróxidos a álcoois, catalisada pelo GPx. Halliwell e Gutteridge (1999).

2.6.6. α Tocoferol (Vitamina E)

É um antioxidante classificado como não enzimático, é uma vitamina lipossolúvel, ou seja, encontrada em membranas, mitocôndrias e lipoproteínas. Se liga a radicais livres formando o tocoferoxil podendo ter esta ação revertida a partir da ação do ácido ascórbico e do GSH (Sokol,1989; Ward e Peters, 1995; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Potente antioxidante com capacidade de se ligar a peroxilas, convertendo em tocoferoxilas. Quando apresentadas no formato desta molécula diminuem a possibilidade da continuação da liperoxidação, evitando que ocorra uma reação em cadeia formando compostos tóxicos ao sistema (Halliwell,2001).

1.7.Metformina

A metformina (N, N-Dimetilbiguanida) é um medicamento oral que possui efeito anti-hiperglicemiante, sendo o fármaco mais utilizado para o tratamento de diabetes do tipo II, principalmente, pela eficácia do tratamento e toxicidade baixa ao organismo. Está incluído na listagem de medicamentos voltados aos principais agravos e programas de saúde da atenção básica em forma de comprimido e concentração de 500 mg e 850 mg (Santomauro Jr et al. 2008).

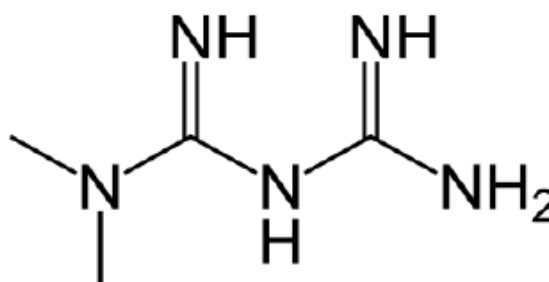


Figure 13. Estrutura molecular da metformina. Fonte: Fonseca (2013).

É uma droga derivada da guanidina, que é um composto extraído de uma planta medicinal da família Fabaceae (*Galega officinalis*). Possui papel relevante na redução na produção hepática de glicose (gliconeogênese), além disso, possui relação na diminuição de ácidos graxos livres, estimulação da captação de glicose pelos tecidos periféricos (através da

ativação da tirosina quinase), aumento da sensibilidade à insulina e efeito protetor nas células beta pancreáticas (evitando a apoptose) (Santomauro Jr et al. 2008; Bailey, 2017).

O uso da metformina tornou-se mais comum, após estudos demonstrarem a diminuição dos riscos de doenças vasculares, independente do controle glicêmico, em indivíduos com excesso de massa corpórea e acometidos do diabetes do tipo II (Lammana et al., 2011). Apesar disso, faz-se necessária a redução na ingestão de açúcares e calorias de modo complementar ao tratamento com o fármaco. O mecanismo de ação da droga, isoladamente, não é relacionado com efeitos hipoglicêmicos e ganho de peso, e minimiza os riscos no desenvolvimento do câncer, que é outra importante causa de morte em pacientes com diabetes. A droga age ativando os níveis de AMPK celular, incentivando uma maior captação de glicose (Bailey, 2017).

Apesar de suas vias de efeito ainda não estarem completamente elucidadas, acredita-se que a droga possua eficácia na redução nos níveis de mediadores apoptóticos. Em estudo realizado por Kim et al. (2017), a diminuição de marcadores que estimulam a apoptose foi observada em ratos diabéticos tratados com metformina, conferindo proteção a danos celulares na retina.

1.8.Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal e está envolvida em inúmeros eventos fisiológicos com efeitos imunomodulatórios, antiinflamatórios, antitumorais, antioxidantes e cronobiológicos (Xie et al., 2017; Neto e Castro, 2008). Este hormônio é sintetizado, a partir do aminoácido triptofano, e liberado na circulação durante o período noturno, onde atinge níveis mais elevados. Essa produção é dependente da ação de duas enzimas: arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) e a triptofano hidroxilase (TPH) e é regulada através do ritmo circadiano e a ação da luz (Favero et al, 2017).

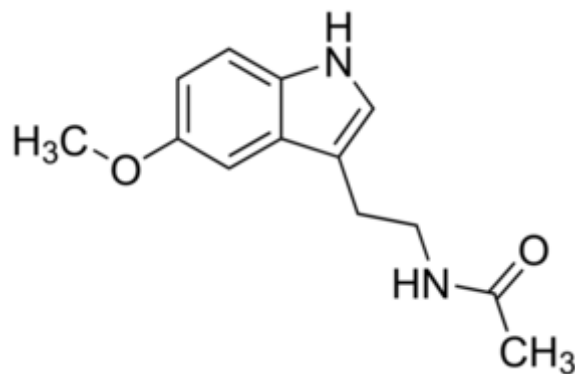


Figura 14. Estrutura molecular da melatonina. Fonte: Poeggeler (1993).

Vários estudos vêm relacionando a administração exógena de melatonina com redução no estresse oxidativo de animais (Colares et al., 2016). Os mecanismos envolvidos na melhoria da capacidade de defesa do organismo envolvem a diminuição da ativação do fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) e aumento na expressão de Nrf-2 (fator importante na transcrição de genes codificadores de enzimas antioxidantes) (Favero et al. 2017).

Nesse sentido, a melatonina é uma forma alternativa para manutenção do estresse oxidativo no tratamento de animais diabéticos. A administração do fármaco age no aumento da expressão de antioxidantes por meio da ação da superóxido dismutase (SOD) e glutational peroxidase (GPx), além da estimulação da produção de glutational reduzida (GSH) (Neto e Castro, 2008; Colares et al, 2016).

Além disso, a melatonina possui influência no sistema reprodutor masculino através da ligação com receptores celulares em várias espécies. Estudos mostram que a administração de melatonina promove recuperação de danos espermáticos e aumento nos níveis séricos de testosterona (Li et al, 2015).

1.9.Pentoxifilina

A pentoxifilina é um inibidor de fosfodiesterase, derivado de metil xantina, que possui ações anti-inflamatórias e poder antioxidante. É um fármaco de baixo custo, utilizado como fator inibidor de elementos envolvidos na inflamação, como o TNF- α (RADFAR et al., 2005; ZANG et al., 2015; LUO et al., 2015; NAVARRO-GONZALES et al., 2015).

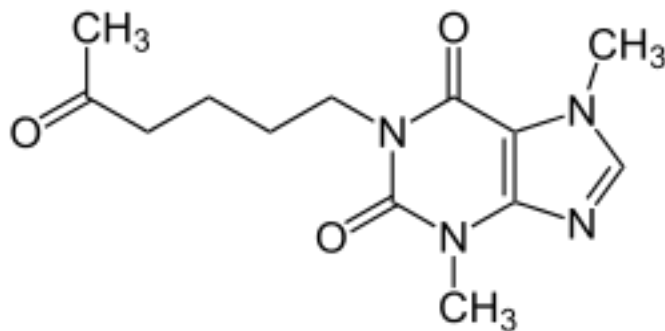


Figura 15. Estrutura molecular da pentoxifilina. Fonte: Poeggeler et al. (1993).

O mecanismo de ação do fármaco consiste basicamente pela ativação de cascatas e consequente aumento intracelular nos níveis de AMP cíclico. Dentre todas as ações que promove no organismo estão a inibição na expressão de genes inflamatórios, elevação no fluxo sanguíneo e oxigenação dos tecidos, além de diminuir a capacidade da formação de radicais livres (TAKHTFOOLADI et al., 2015).

No tecido testicular, a pentoxifilina atua no controle endócrino da espermatogênese, possuindo papel importante nos níveis de FSH, LH e testosterona, além de promover um aumento na mobilidade espermática (SAFARINEJAD, 2011; MORADI et al., 2015).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração de metformina, melatonina e pentoxifilina sob parâmetros reprodutivos e o metabolismo glicídico e lipídico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos ao diabetes mellitus.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o peso corporal e testicular dos ratos.
- Avaliar a morfologia e morfometria das células de Sertoli e células espermatogênicas.
- Analisar a morfologia e morfometria das células de Leydig.
- Calcular a proporção volumétrica dos compartimentos testiculares.
- Determinar o comprimento total de túbulos seminíferos, produção espermática diária e produção espermática diária por grama de testículo.
- Determinar os níveis plasmáticos de testosterona.
- Avaliar histologicamente os testículos dos animais.
- Determinar os níveis de TBARS, glutathione reduzida e superóxido dismutase no tecido testicular dos ratos.
- Determinar a expressão de citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-6, no tecido muscular e tecido adiposo epididimal e retroperitoneal.
- Determinar os níveis séricos de glicose, insulina e corticosterona.

4. REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2008, v. 1, p. 15-24.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*. 2006, v. 250, p. 66–69.
- ARROR, A.R., DeMARCO, V.G. Oxidative stress and obesity: the chicken or the egg? *Diabetes*, v. 63, p. 2216-2218, 2014.
- BALLESTER, J.; DOMINGUEZ, J.; MUNOZ, M.C.; SENSAT, M.; RIGAU, T.; GUINOVART, J.J. RODRIGUEZ-GIL, J.E. Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. *J Androl*, 2005, v. 26, p. 706.
- BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., De PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J. Oxidative stress: the concept, implications and factors modulating. *Rev Nutr*, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, ALBS. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 2006, v. 29, p. 113-126.
- BAILEY, C.J. Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 2017. DOI: 10.1007/s00125-017-4318-z
- BELMONTE, M.A.; AOKI, M.S. Intramuscular triacylglycerol: an important energetic substrate for endurance exercise *Rev Bras Med Esporte*, 2015, V.11.
- BENEŠ, L., ĎURAČKOVÁ, Z., FERENČIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences*, 1999, v.65, p. 1865-1874.
- BONET, M.L.; RIBOT, J.; PALOU, A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta*, 2012, v. 1, p. 177-89.
- BOUTENS, L.; STIENSTRA, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*, 2016, v. 59, p. 879-894.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Diretrizes e recomendações para o cuidado integral de doenças crônicas não transmissíveis. Brasília, 2008.
- BUIJS, R.M., KREIER, F. The metabolic syndrome: a brain disease? *J Neuroendocrinol.*, v. 18, p. 715-6, 2006.
- BURLAMAQUI, I.M.B., DORNELAS, C.A., VALENÇA JUNIOR, J.T., MOTA, D.M.C., MESQUITA, F.J.C., VERAS, L.B., VASCONCELOS, P.R.L., RODRIGUES, L.V. Effect of a hyperlipidic diet rich in omegas 3, 6 and 9 on aberrant crypt formation in rat colonic mucosa. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 27, 2012.
- CAMINHOTTO, R.O.; CAMPANA, A.B.; LIMA, F.B. Inibição da lipólise como alvo terapêutico na síndrome metabólica, *Arq Bras Endocrinol Metab.*, 2014, v. 1.
- CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S. *Bioquímica*. São Paulo: Cengage Learning, 2016.
- CERCATO C, SILVA S, SATO A, et al. Risco Cardiovascular em uma População de Obesos. *Arq Bra de Endocrinol e Metab*. 2000;44(1).

COHEN, MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann Intern Med*, 1989, v. 111, p. 918- 931.

COLARES, J.R.; SCHEMITT, E.G.; HARTMANN, R.M.; LICKS, F.; SOARES, M.C.; BOSCO, A.D.; MARRONI, N.P. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonina in na experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. *World J Gastroenterol*, 2016, v. 40, p. 8918-8928.

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact*, v. 72, p. 1-56. 1989.

COX, R.M.; STENQUIST, D.S.; CALSBEEK, R. Testosterone, growth and the evolution of sexual size dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology*, 2009, v. 22, p. 1586-1598.

CREWE, C.; AARON, Y.; SCHERER, P.E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest*. 2017, v. 1, p. 74-82. doi:10.1172/JCI88883.

DENEKE, SM; FANBURG, BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, v. 257, p. 163-173. 1989.

ESPINO, J., PARIENTE, J.A., RODRIGUEZ, A.B. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. *World J Diabetes*, v. 2, p. 82-91, 2011.

ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., BUENO, A.A., HABITANTE, C.A., SOUZA, G.I., RIBEIRO, E.B., MOTOYAMA, C.S.M., NASCIMENTO, C.M.O. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. *Lipids in health and disease*, v. 10, 2011.

FAVERO, G.; FRANCESCHETTI, L.; BONOMINI, F.; RODELLA, L.F.; REZZANI, R. Melatonin as na anti-inflammatory agent modulating inflammasome activation. *International Journal of Endocrinology*, 2017, v. 2017, p. 13.

FERNANDEZ-SANCHEZ, A.; MADRIGAL SANTILLAN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; MORALES GONZALES, A.; ESQUIVEL CHIRINO, C.; DURANTE MONTIEL, I.; SANCHEZ RIVERA. G.; VALADEZ VEJA, C.; MORALES GONZALEZ, J.A. Inflammation, oxidative stress and obesity. 2011, *Int J Mol Sci*, v. 5, p. 3117-3132

FONSECA-ALANIZA, M.H. TAKADA, J.; ALONSO VALE, M.I.; LIMA, F.B. Adipose tissue as na endocrine organ: From theory to practice. *J Pediatr*, v. 5, p. 192–203, 2007.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTINEZGARCIA, F.; REGADERA, J. (Eds.), *Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview*, Churchill Livingstone; Madrid, p. 197-219, 1998.

FRANÇA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. *Células uma abordagem multidisciplinar*. (Ed. Manole: Barueri-SP), 2005, 302.

FRANCISCHI RPP, PEREIRA LO, FREITAS CS, et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev Nutr*. 2000;13(1):17-28.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 1975, v. 44, p. 147-159.

- FURUKAWA, S., FUJITA, T., SHIMABUKURO, M., IWAKI, M., YAMADA, Y., NAKAIMA, Y., NAKAYAMA, O., MAKISHIMA, M., MATSUDA, M., SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The journal of clinical investigation*, v.114, 2014.
- GALLEANO, M; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1995, v. 1271, p. 321-326.
- GENDT, K.D.; SWINNEN, J.V.; SAUNDERS, P.T.K.; SCHOONJANS, L.; DEWERCHIN, M.; DEVOS, A.; TAN, K.; ATANASSOVA, N.; CLAESSENS, C.L.; HEYNS, W.; CARMELIET, P.; GUILLOU, F.; SHARPE, R.M.; VERHOEVEN, G. A Sertoli cell selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. 2004, v. 5, p. 1327-1332.
- GILLHAM, B. et al. *Wills: biochemical basis of medicine*. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997, p. 196- 202.
- GOBBO, M.G.; COSTA, C.F.P.; SILVA, D.G.H.; ALMEIDA, E.A.; GÓES, R.M. Effect of Melatonin Intake on Oxidative Stress Biomarkers in Male Reproductive Organs of Rats under Experimental Diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, 2015.
- GRISWOLD, M.D. 50 years of Spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with Germ cells. *Biol Reprod*, 2018, doi: 10.1093/biolre/iy027.
- GROSS, J.L. et al. Effect of antihyperglycemic agents added to metformin and a sulfonylurea on glycemic control and weight gain in type 2 diabetes: a network meta-analysis. *Ann Intern Med*, v. 154, p. 672-9, 2011.
- GUEDES, A.C.F.; BISCUOLA, A.P.; LIMA, M.C.C. Comparação entre índice de massa corporal e índice de adiposidade corporal em adultos do sexo masculino. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 9, p. 235-242, 2015.
- GUNELI, E.; TUGYAN, K.; OZTURK, H.; GUMUSTEKIN, M.; CILAKER, S.; UYSAL, N. Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats, *Eur Surg Res*, v. 40, p. 354-360, 2008.
- HALES DB, ALLEN JA, SHANKARA T, et al. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, v. 1061, p. 120–134.
- HALLIWEL, B; GUTTERIDGE, JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 1990, v. 186, p. 1-85.
- HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research*, 1999, v. 31, p. 261-272.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA, 2015.
- HEBBEL, RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med*, 1986, v. 107, p. 401-404.
- HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol*, 1989, v. 26, p. 277-285.
- JOHNSON, L.; CARTER, G.K.; VAMER, D.D.; TAYLOR, T.S.; BLANCHARD, T.L.; REMBERT, M.S. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia, *J Reprod Fertil* 1994, v. 1, p. 315-21.

- KANAKASI, K., KOYA, D. Biology of obesity: lessons from animals models of obesity. *Journal of biomedicin and biotechnology* (2011), p. 1-11, 2011.
- KUMAR TR, MURALIDHARA Male-mediated dominant lethal mutations in mice following prooxidant treatment. *Mutat Res*, 1999, v. 444, p. 145–149.
- LABAZI, H., WYNNE, B.M., TOSTES, R., WEBB, R.C. Metformin treatment improves erectile function in an angiotensin II model of erectile dysfunction. *J Sex Med* 2013; 10: 2154–2164.
- LAMANNA, C.; MONAMI, M.; MARCHIONNI, N.; MANNUCCI, E. Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab*, 2011, 13:221–228
- LEE, H.K.; LEE, J.K.; CHO, B. The role of androgen in the adipose tissue of males. *J Mens Health*, v. 31, p. 136–140.
- LI, C.; ZHOU, X. Melatonin and male reproduction, *Clinica Chimica Acta*, v. 446, p. 175-180, 2015.
- LOPES HF. Hipertensão, obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica. *Ver Bras Hipertens*, 2005;12(3):154-158.
- LUO, M.; DONG, L.; LI, J.; WANG, Y.; SHANG, B. Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 8, p. 8990-8996, 2015.
- MAEKAWA, M.; KAMIMURA, K.; NAGANO, T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol*, 1996, v. 1, p. 1-13.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, v. 244, p. 6049-6055.
- MEISTER, A; ANDERSON, ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 1983, v.52, p. 711-760.
- MELLO FILHO, AC. et al. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J*, 1983, v. 218, p. 273- 275.
- MENDONÇA CP, ANJOS LA. Aspectos das práticas alimentares e a atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2004;20(3):698-709.
- MIRANCEA, N.; MIRANCEA, D. The ultrastructure of the White subcutaneous adipose tissue. *Proc. Rom. Acad.*, 2011, v. 3, p. 206–211.
- MONTEIRO CA, MONDINI L, COSTA RBL. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). *Rev Saude Publica*. 2000;34(3):251-258.
- MORADI, M.; MAHMOODI, M.; RAOOFI, A.; GHANBARI, A. Chorionic morphine, naltrexone and pentoxifylline effect on hypophyso-gonadal hormones of male rats. *Bratisl Lek Listy*, v. 116, p. 276-9, 2015.
- MORI, H; CHRISTENSEN, K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol*, 1980, v. 84, p. 340.
- MUECKLER, M. Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. *The journal of clinical investigation*, v. 107, p. 1211-1213, 2001.

NAUGHTON CK, NANGIA AK, AGARWAL A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*, 2001, v. 7, p. 473–481

NAVARRO-GONZALEZ, J.F. et al. Effect of pentoxifylline on renal function and Urinary albumin excretion in patients with diabetic kidney disease: the Prediant Trial, *J Am Soc Nephrol*, v. 26, p. 220-229, 2015.

NETO, J.A.S.; CASTRO, B.F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura, *Rev Bras Neurol*, v. 44, p. 5-11, 2008

NETO, J.A.S.; DE CASTRO, B.F. Melatonina, ritmos biológicos e sono – uma revisão da literatura, *Rev Bras Neurol*, 2008, v. 44, p. 5-11.

NILSSON, C., RAUN, K., YAN, F.F., LARSEN, M.O. CHRISTENSEN, M.T. Laboratory animals as surrogate models of human obesity, *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 33, p. 173–181, 2012.

NISHIMURA, H.; L'HERNAULT, S.W. Spermatogenesis. *Curr. Biol*, 2017, v. 18, p. 988-994.

NOORI, S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open access scientific reports*, 2012, v. 1, p. 1-9.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em: 25/03/2018.

OSTRANDER, M.M., ULRICH-LAI, Y.M., CHOI, D.C., RICHTAND, N.M., HERMAN, J.P. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*, v. 147, p. 2008-20017, 2006.

PEDERZOLLI, C. D. Papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade da 5-oxoprolina e do ácido N-acetilaspártico em encéfalo de ratos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 2008.

POEGGELER, B.; REITER, R.J.; TAN, D.X., CHEN, L.D.; MANCHESTER, L.C. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis“. *J. Pineal Res*, v. 14, p. 151–6, 1993.

POPKIN BM. The nutrition transition and obesity in the developing world. *J Nutr*. 2001;22:355-375.

PRESTON, B.T.; STEVENSON, I.R.; LINCOLN, G.A.; MONFORT, S.L.; PILKINGTON, J.G.; WILSON, K. Testes size, testosterone production and reproductive behaviour in a natural mammalian mating system. *J Anim Ecol*, 2012, p. 296-305.

RADFAR, M.; LARIJANI, B.; HADJIBABAIE, M.; RAJABIPOUR, B; MOJTAHEDI, A.; ABDOLLAHI, M. 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. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 59, issue 6, pp. 302-306, 2005.

RAMASWAMY, S.; WEINBAUER, G. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis*, 2014, v. 2, doi: [10.1080/21565562.2014.996025](https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025)

REZAEI, F.; DASHTY, M. Role of Adipose Tissue in Metabolic System Disorders Adipose Tissue is the Initiator of Metabolic Diseases, *J Diabetes Metab*, 2013, S13: 008, doi:10.4172/2155-6156.S13-008.

- ROSINI, T.C., SILVA, A.S.R., MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras*, v. 58, p. 383-387, 2012.
- ROSS, D; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press 1991; 151-70.
- RUAN, H.; DONG, L.Q. Adiponectin signalling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol* , 2016.
- RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. In: *Histological and histopathological evaluation of the testis*. RUSSEL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED, editor. Clearwater: Cache River Press. 1990.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; AMIYA, P.S.H.; CLEGG. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International Journal of Andrology*, v. 16, p. 83, 1993.
- SAFARINEJAD, M.R. Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Int Urol Nephrol*, v. 43, p. 315–328, 2011.
- SALGANIK, R. I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition*, 2001, v. 20, p. 464-472.
- SHAN, W., CHEN, B., ZHU, S., JIANG, L., ZHOU, Y. Effects of GLUT4 expression on insulin resistance in patients with advanced liver cirrhosis. *Biomed & Biotechnol*, v. 12, p. 677-682, 2011.
- SHAN, X. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther*, 1990, v. 47, p. 61-71.
- SPERETTA, F.; LEITE, R.D.; DUARTE, A.C.G.O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. *Revista HUPE*, v. 13, p. 61-69, doi:10.12957/rhupe.2014.9807, 2014.
- SIMONIN, V.; GALINA, A. Nitric oxide inhibits succinate dehydrogenase-driven oxygen consumption in potato tuber mitochondria in an oxygen tension-independent manner. *Biochemical Journal*, 2013, v. 449, p. 263-273.
- SKINNER, M.K.; NORTON, J.N.; MULLANEY, B.P.; ROSSELLI, M.; WHALEY, P.D.; ANTHONY, C.T. Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, p. 354-63.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Sociedade Brasileira de Hipertensão. I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. *Arq Bras Cardiol*. 2005;84(Supl 1):1-28.
- SPURLOCK, M.E., GABLER, N.K. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of Nutrition*, v. 138, p. 397-402, 2008.
- TAKHTFOOLADI, M.A.; MOAYER, F.; TAKHTFOOLADI, H.A. Beneficial effect of pentoxifylline into the testis of rats in an experimental model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury, *Int Braz J Urol*, v. 41, p. 576-8, 2015.
- WAKI, H.; TONTONNOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Ver Pathol Mech Dis*, 2007, v. 2, p. 31-56.

- WARD, R. J.; PETERS, T. J. Free radicals. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. New York: Churchill Livingstone, 765-777.
- WEN, Q.; TANG, E.L.; GAO, Y.; JESUS, T.T.; CHU, D.S.; LEE, W.M.; WONG, C.K.C; LIU, Y.X.; XIAO, X.; SILVESTRINI, B.; CHENG, C.Y. Signaling pathways regulating blood tissue barriers- lesson from the testis. *Biochim Biophys Acta*. 2018, v. 1, p. 141-153.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 1981.
- WERNSTEDT. A.I, et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab*. 2014, v. 1, p. 103–118.
- WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, 2003 (Technical Report Series 916).
- XIE, Z.; CHEN, F.; LI, W.A.; GENG, X.; LI, C.; MENG, X. A review of sleep disorders and melatonin, 2017.
- YANG, Q., GRAHAM, T.E., MODY, N., PREITNER, F., PERONI, O.D., ZABOLOTNY, J.M., KOTANIL, K., QUADRO, L., KAHN, B.B. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, v. 436, p. 356-362, 2005.
- YANG, W., KELLY, T., HE, J. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev*, v. 29, p. 49-61, 2007.
- YONEI, Y.; HATTORI, A.; TSUTSUI, K.; OKAWA, M.; ISHIZUKA, B. Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications, *Anti-Aging Medicine*, v. 7, p. 85-91, 2010
- YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. What is oxidative stress?. *Japan medical association journal*, 2002, v. 45, p. 271-276.
- YOUNG ME, BRAY MS. Potential role for peripheral circadian clock dyssynchrony in the pathogenesis of cardiovascular dysfunction. *Sleep Med*. 2007; 8(6):656-67. 2020822.
- ZANG, Z. et al. Pentoxifylline prevents dexamethasone-induced myocardial fibrosis and apoptosis in rats, *Int Heart J*, v. 56, p. 651-5, 2015.

5. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 30 ratos machos, da linhagem *Wistar*, livres de patógenos específicos, com idade de 60 dias, fornecidos e mantidos no Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno coletivas, a temperatura média de 22 ± 2 °C, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro), durante o período de aclimação de 15 dias. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco com processo n° 23082/20034/2016-29.

Ao final do décimo quinto dia, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos experimentais com seis animais cada:

Grupo Diabético (GD): animais alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos ao diabetes do tipo II.

- **Grupo Diabético + Metformina (GM):** animais alimentados com dieta hiperlipídica, induzidos ao diabetes do tipo II e tratados com metformina (500 mg/kg).
- **Grupo Diabético + Metformina + Pentoxifilina (GMP):** animais alimentados com dieta hiperlipídica, induzidos ao diabetes do tipo II e tratados com metformina (500 mg/kg) e pentoxifilina (100 mg/kg).
- **Grupo Diabético + Metformina + Melatonina (GMM):** animais alimentados com dieta hiperlipídica, induzidos experimentalmente ao diabetes do tipo II e tratados com metformina (500 mg/kg) e melatonina (5 mg/kg).
- **Grupo Diabético + Metformina + Pentoxifilina + Melatonina (GMPM):** animais alimentados com dieta hiperlipídica, induzidos experimentalmente ao diabetes do tipo II e tratados com metformina (500 mg/kg), pentoxifilina (100 mg/kg) e melatonina (5 mg/kg).

Durante o período experimental, os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica (Tabela 1) e água de torneira fornecida *ad libitum*. A dieta foi preparada de acordo com a American Institute of Nutrition (AIN).

Tabela 1. Lista de ingredientes utilizados para a preparação da dieta hiperlipídica de acordo com Franco et al., (2009).

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

5.2.Procedimentos experimentais

Os animais foram pesados semanalmente e no dia da eutanásia para a determinação do ganho de peso diário. A indução ao diabetes foi realizada através da administração de estreptozotocina (35 mg/kg) diluída em tampão citrato de sódio, por via intraperitoneal, após um jejum de 12 horas (SRINIVASAN et al., 2005). A verificação da glicose sanguínea ocorreu após o jejum de 12 horas e o estabelecimento do diabetes foi confirmado 7 e 14 dias após a indução, sendo incluídos no experimento apenas aqueles animais que possuíram glicemia acima de 126 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active). Após isso, a glicose sanguínea foi verificada (tiras reagentes Accu-Chek Active) semanalmente em todos os grupos através da coleta de gotas de sangue da ponta da cauda dos animais. Após a confirmação do diabetes, os animais foram submetidos a tratamentos diários com metformina (500 mg/kg), em combinação com melatonina (5 mg/kg) e pentoxifilina (100 mg/kg), via gavagem, durante 30 dias. Neste período, os animais continuaram recebendo a dieta hiperlipídica até o dia da eutanásia. Os animais do grupo controle receberam água destilada, a fim de igualar o estresse causado pela gavagem.

5.3.Eutanásia e coleta de material

Ao final do período experimental, os animais foram pesados, e anestesiados por injeção intraperitoneal de quetamina associada à xilazina na mesma seringa e aprofundamento anestésico com tiopental (FANTONI; CORTOPASSI, 1994). Posteriormente foi realizada

coleta sangue total e acondicionamento de duas alíquotas de 1 ml de plasma sangüíneo em microtubos à -20 °C, para dosagem hormonal. Após a coleta de sangue, foi realizada perfusão intracardiaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, por aproximadamente 1 minuto e 30 segundos para eliminar o sangue dos vasos. Neste período, foi observado o clareamento dos testículos.

Nesse momento, fragmentos do tecido adiposo epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR), tecido muscular esquelético (M) e fígado (F) foram coletados com o auxílio de instrumentos estéreis. Cada fragmento coletado foi armazenado em microtubos, com rótulos identificados individualmente, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer (-80 °C) para posteriores análises.

Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído a 4 %, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos. Neste período observou-se o enrijecimento dos testículos, que indica macroscopicamente a fixação testicular. Foi realizada uma incisão mediana ao longo do eixo longitudinal do escroto, para realização da orquiectomia. Após este procedimento, cada testículo foi pesado, pós-fixado por imersão na mesma solução fixadora e direcionado para processamento histológico.

5.4.Avaliação qualitativa, quantitativa e histológica testicular

Para os estudos ao microscópio de campo claro, os fragmentos foram processados para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA). Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em hematoxilina-floxina e foram realizadas análises morfológicas e morfométricas.

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidos em aumento de 100X usando um sistema de captura de imagem acoplado a um microscópio óptico Olympus BX-51 (Tóquio, Japão). O diâmetro tubular médio para cada rato foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos com perfis redondos ou arredondados, escolhidos de forma aleatória, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero. Os valores encontrados foram resultantes da média de duas retas diametralmente opostas.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos através da contagem de pontos por meio de um retículo micrométrico (Olympus) com 441 pontos de intersecção, acoplado ao microscópio de luz, sobre a preparação histológica de testículo em

aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6.615 pontos para cada animal.

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir da razão entre o volume absoluto ocupado pelos túbulos seminíferos (VATS) no testículo por R^2 (onde R = diâmetro tubular /2) e o valor de π : $CT = VATS/\pi R^2$. (ATTAL e COUROT, 1963).

Foi realizada a contagem de espermatogônias, espermatócitos I em estágio de pré-leptóteno e paquíteno, espermátides arredondadas e nucléolos de células de Sertoli em cinco túbulos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero. A população de células de Sertoli foi obtida através da contagem do número de tais células presentes com o nucléolo visível. Após isso, foi realizada a correção do número obtido utilizando a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962), conforme segue:

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

O diâmetro nucleolar médio (DM) representa a média dos diâmetros de 05 nucléolos de células de Sertoli para cada animal dos grupos. A população foi estabelecida através do resultado da multiplicação do número corrigido pelo comprimento total dos túbulos seminíferos em micrômetros (μm) e dividido pela espessura do corte.

A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Júnior et al. (2006): $PED = N^{\circ} \text{ total de células de Sertoli por testículo} \times \text{a proporção de espermátides redondas no estágio VII} \times \text{estágio VII com frequência relativa} / \text{duração do estágio (dias)}$.

O diâmetro nuclear das células de Leydig foi obtido através da média de duas retas diametralmente opostas em aumento de 1000x. Foram mensurados 30 núcleos por animal e foi aplicada a fórmula do volume da esfera ($4/3\pi R^3$) para a obtenção do volume individual da célula. A proporção volumétrica de núcleo/citoplasma foi realizada através da contagem de 1000 pontos entre citoplasma e núcleo, utilizando um retículo com 441 intersecções no aumento de 1000x. A partir dessa proporção, foi calculado o volume citoplasmático e o volume celular.

O volume citoplasmático foi calculado pela multiplicação da porcentagem de citoplasma pelo volume nuclear, e dividido pela porcentagem nuclear. O volume individual da célula de Leydig foi estimado através da soma entre os valores do volume nuclear e volume citoplasmático (MORAIS et al., 2014).

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig por testículo, encontrou-se a população dessas células por testículo. Posteriormente, esse valor foi dividido pelo peso líquido para obtenção da população por grama de testículo.

6.5. Dosagem de testosterona plasmática

A dosagem foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA- Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm, conforme descrito por BROWN et al. (2004).

6.6. Determinação de indicadores do estresse oxidativo em homogeneizado de testículo

O testículo foi obtido, pesado imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 ° C até o uso. As amostras 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 a seguinte análise: enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST); marcador de estresse oxidativo Malondialdeído (MDA). Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. As análises foram realizadas em duplicado. 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 superóxido dismutase (SOD) foi mensurada através do protocolo de Siddiqui et al. (1990). A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Os níveis de malondialdeído (MDA) que é o resultado da peroxidação lipídica, 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). A concentração de

proteína total das amostras foi mensurada utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão.

6.7. Avaliações bioquímicas e hormonais

As dosagens de Insulina, adiponectina, corticosterona, TNF-alfa e IL-6 no plasma foram determinadas pelo método de ELISA, utilizando “kit” comercial específico para rato (Millipore, Billerica, MA, EUA, Life Technology, Grand Island, NY, EUA, ABCAM, Cambridge, MA, USA, respectivamente).

6.8. Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (EPM). Após teste de normalidade e homogeneidade das variâncias, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (one way-ANOVA), utilizando-se o programa estatístico Statistic Pacckage for the Social Sciences (SPSS), versão 17.0 para Windows, seguida de teste de Newman-Keuls’ para avaliar as diferenças entre as médias dos resultados obtidos nos grupos analisados. Os gráficos foram elaborados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6.0. O nível de significância adotado será de 0,05.

7. RESULTADOS

7.1. Índice glicêmico, peso corporal, testicular, epididimal, prostático e da glândula seminal

De acordo com a tabela 2, os índices glicêmicos dos animais diabéticos sem tratamento (GD) foram maiores ($p<0,001$) em relação aos demais grupos. A taxa de glicose reduziu nos grupos tratados ($p<0,001$) com metformina, de forma isolada, ou em combinação com pentoxifilina e/ou melatonina quando feita a comparação com os animais do GD (Figura 16).

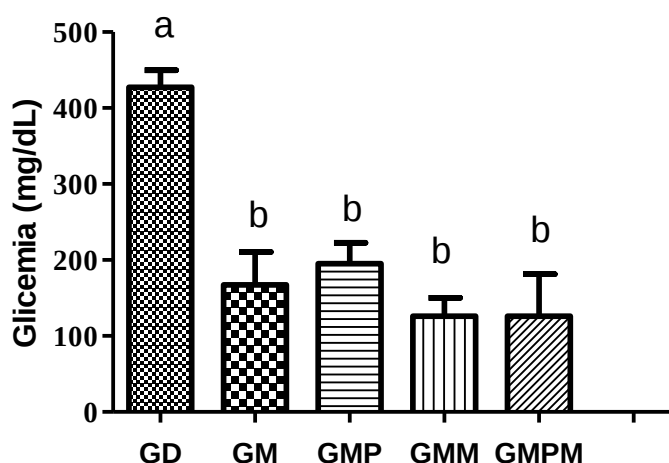


Figura 16. Níveis de glicose de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Com relação ao peso corporal, os animais do grupo diabético tiveram redução deste parâmetro, de forma significativa, quando comparados ao grupo tratado com a associação de metformina, melatonina e pentoxifilina (Figura 17).

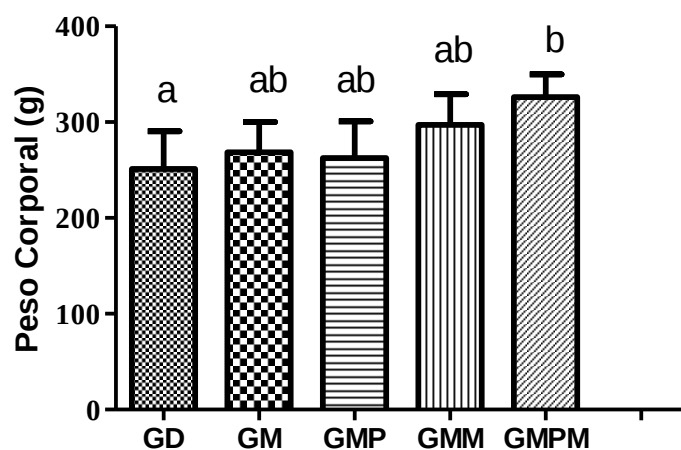


Figura 17. Peso corporal de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Como mostra a figura 18, os índices glicêmicos tiveram uma alta correlação negativa ($r = -0,65533$; $p = 0,0005$) com o peso corporal dos animais.

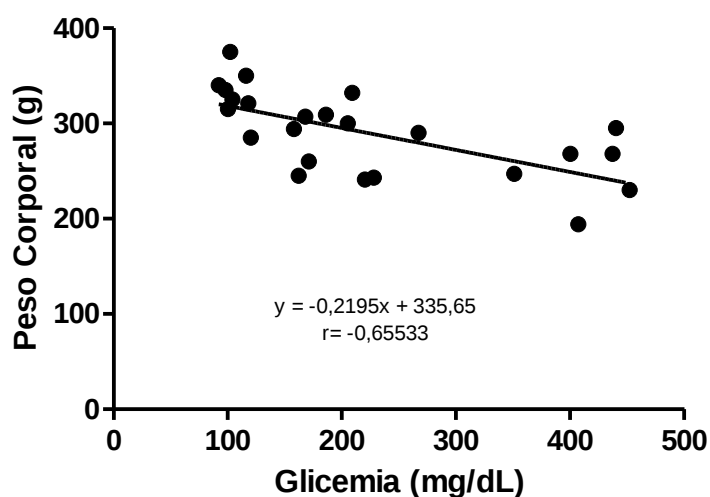


Figura 18. Correlação entre níveis glicêmicos (mg/dL) e peso corporal (g) de de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

O peso testicular dos animais diabéticos sem tratamento reduziu com relação ao GM ($p=0,001$), GMP ($p=0,029$), GMM ($p<0,001$) e GMPM ($p=0,042$). Com isso, os tratamentos com metformina, isolada ou associada com melatonina e/ou pentoxifilina resultou na elevação deste parâmetro (Figura 19).

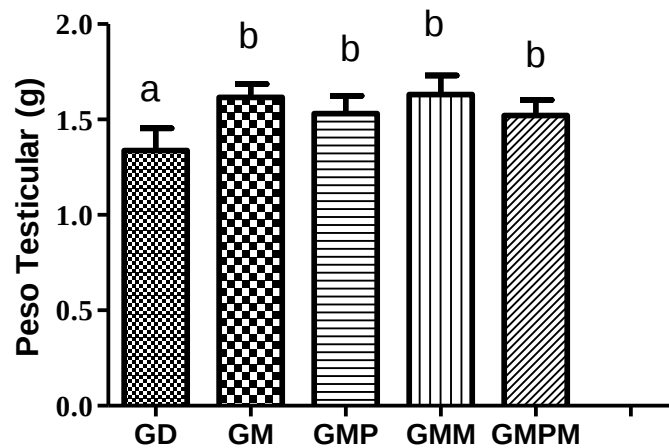


Figura 19. Peso testicular de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Com relação ao índice gonadosomático, não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Figura 20).

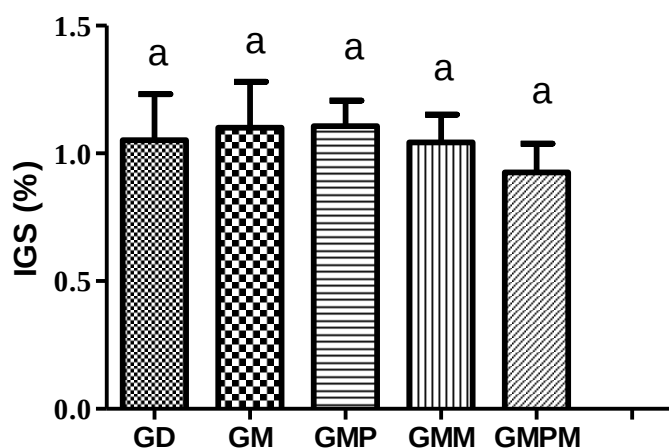


Figura 20. Índice gonadosomático de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Tabela 2. Índice glicêmico, peso corporal, peso testicular e índice gonadossomático (IGS) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

	Glicemia (mg/dL)	Peso corporal (g)	Peso testicular(g)	IGS (%)
GD	427,2±22,5a	251,0±39,4a	1,35±0,14a	1,05±0,18a
GM	167,4±43,3b	268,0±31,5ab	1,62±0,07b	1,10±0,18a
GMP	195,0±27,3b	262,0±38,3ab	1,49±0,15b	1,10±0,09a
GMM	126,0±24,4b	297,0±32,0ab	1,55±0,24b	1,04±0,10a
GMPM	126,0±55,4b	326,0±24,0b	1,50±0,12b	0,92±0,11a

Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística.

Como mostra a tabela 3, o peso do epidídimo dos animais diabéticos não tratados reduziu significativamente ($p<0,001$) quando comparados aos demais grupos experimentais. Os variados tratamentos realizados com metformina, pentoxifilina e melatonina foram eficientes para promover o aumento do peso epididimal (Figura 21).

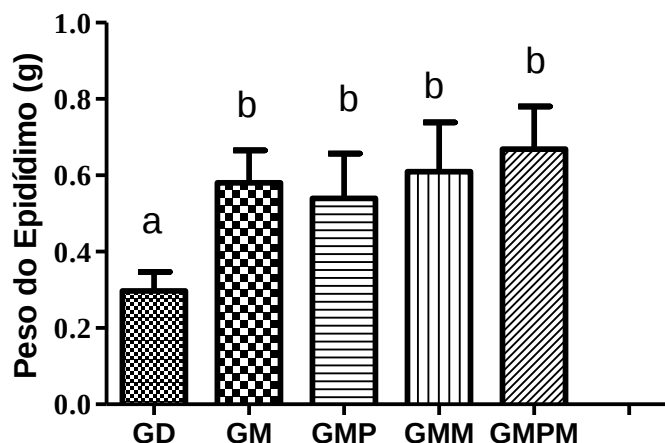


Figura 21. Peso epididimal de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

O peso prostático dos animais diabéticos sem tratamento e do GMP foram significativamente menores quando relacionados com GM, GMM e GMPM ($p<0,001$). O grupo que recebeu metformina, pentoxifilina e melatonina (GMPM) teve melhor resposta a esse parâmetro, quando relacionado com o GD e GMP (Figura 22).

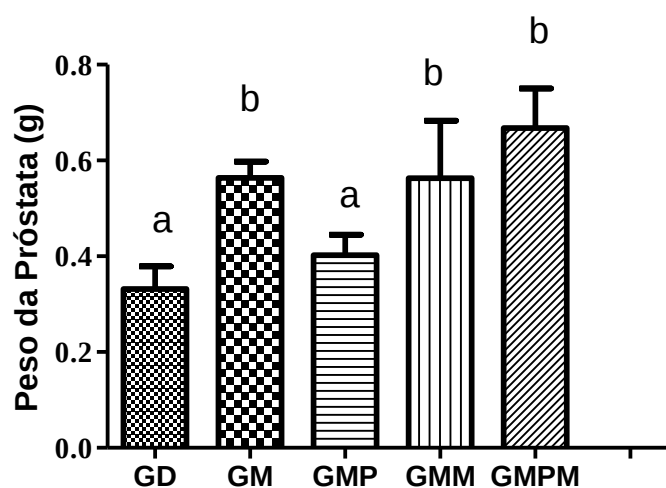


Figura 22. Peso prostático de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

O peso da glândula seminal foi estatisticamente menor ($p=0,041$) nos animais do GD, com relação ao GM (Figura 23).

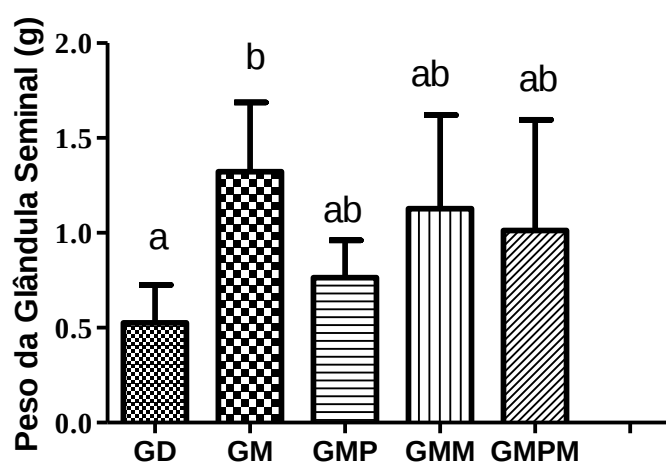


Figura 23. Peso da glândula seminal de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Tabela 3. Pesos das próstatas, epidídimos e glândulas seminais de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

	Epidídimo (g)	Glândula Seminal (g)	Próstata (g)
GD	0,297±0,05a	0,526±0,20a	0,332±0,08a
GM	0,580±0,08b	1,322±0,36b	0,564±0,25b
GMP	0,540±0,12b	0,763±0,20ab	0,402±0,04a
GMM	0,609±0,13b	1,128±0,50ab	0,563±0,49b
GMPM	0,668±0,11b	0,1012±0,58ab	0,668±0,18b

Diferentes letras na mesma coluna indica diferença estatística.

7.2. Níveis de marcadores de estresse oxidativo testicular

De acordo com a figura 24, foram mensurados os níveis de marcadores de estresse oxidativo no tecido testicular dos animais. Os níveis de MDA foram mais elevados nos animais do grupo diabético sem tratamento, quando relacionados com GM, GMP, GMM e GMPM ($p=0,006$). Os tratamentos realizados com metformina, melatonina e pentoxifilina foram eficientes na redução dos níveis de peroxidação lipídica.

Por sua vez, os níveis testiculares de superóxido dismutase foram maiores nos animais do grupo GD com relação aos grupos GMM e GMPM ($p=0,016$). Apesar disso, os demais grupos que foram submetidos as variadas formas de tratamento tiveram redução na concentração desta enzima.

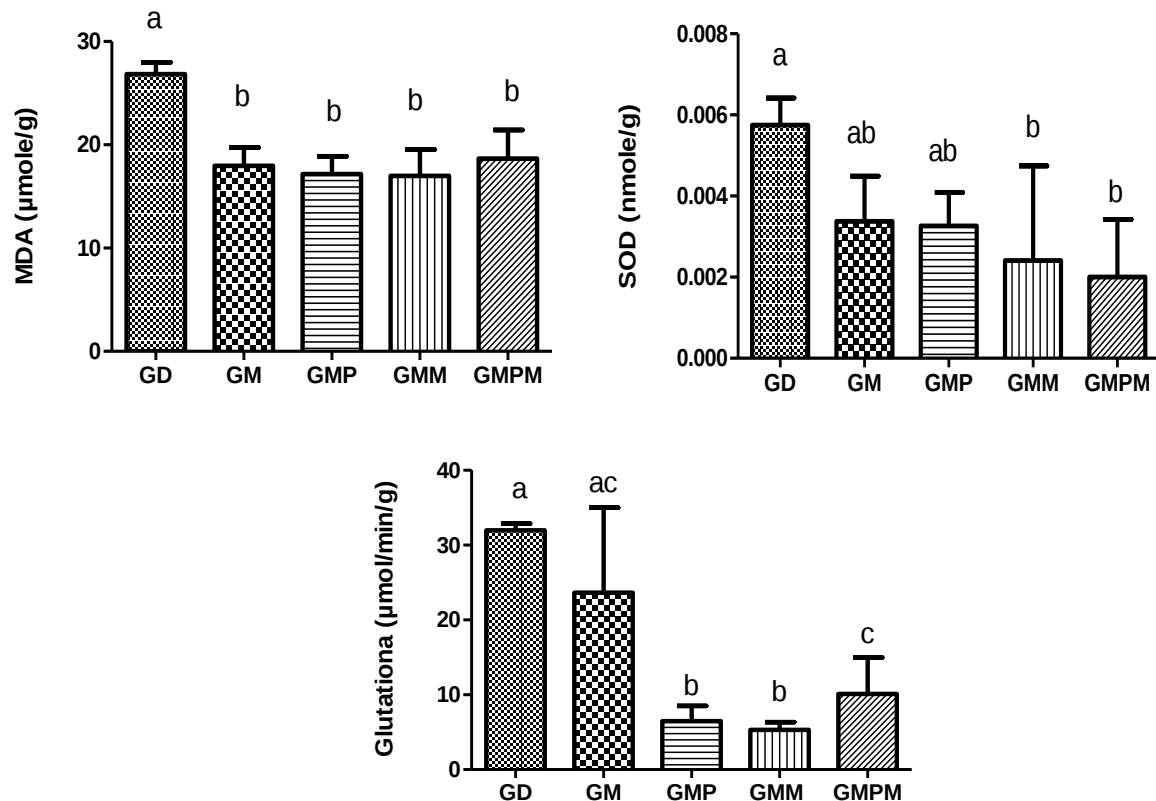


Figura 24. Níveis testiculares de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Os níveis de glutathiona foram elevados significativamente ($p=0,006$) nos animais com ausência de tratamento, quando comparados com os níveis dos ratos de GMP, GMM e GMPM. Também houve diferença estatística entre os animais do GM com relação aos animais do GMP e GMM. Com isso, o tratamento adicional com melatonina e/ou pentoxifilina promoveu uma melhor resposta com relação a GD e GM.

7.3. Análises Moleculares

Com relação aos níveis plasmáticos de corticosterona, o grupo submetido ao tratamento com metformina e melatonina (GMM) teve uma redução significativa ($p=0,006$) quando comparados a GD, GM e GMPM (Figura 25).

Os níveis séricos de insulina foram mais elevados no grupo tratado com metformina e pentoxifilina (GMP), quando comparados a GD, GM, GMM e GMPM ($p<0,001$).

Já o tratamento com metformina e melatonina (GMM) teve maior eficácia na redução dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ ($p<0,001$) quando comparado a GD, GM, GMM e GMPM.

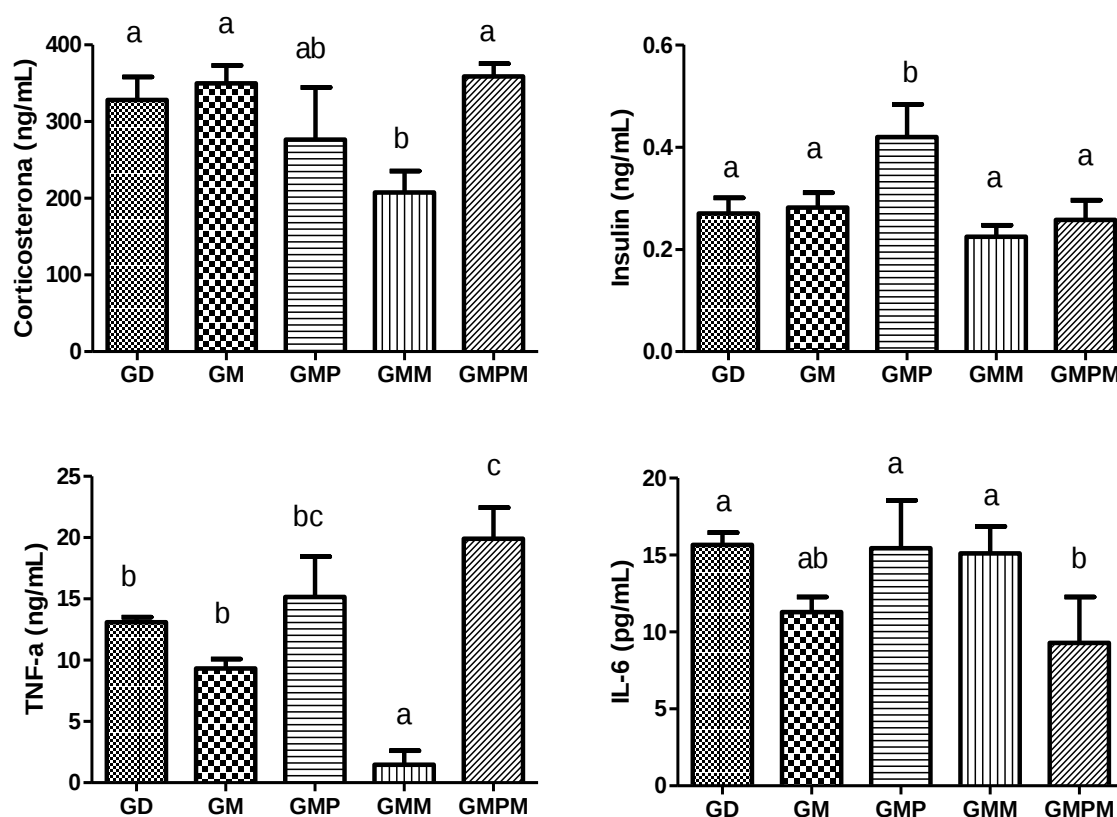


Figura 25. Níveis séricos de corticosterona, insulina, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

De acordo com a figura 25, os níveis de IL-6 foram altos nos animais que não foram submetidos a tratamento. Os animais tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina, em

conjunto, reduziram os níveis da citocina significativamente ($P=0.014$) com relação a GD, GMP e GMM.

7.4. Avaliação qualitativa, quantitativa e histológica testicular

Com relação aos compartimentos testiculares, houve aumento significativo ($p= 0,0236$) no compartimento tubular (Figura 26) dos animais tratados apenas com metformina, quando relacionados aos animais do GD. O grupo tratado com a combinação de metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM) teve redução no conteúdo intersticial (Figura 27) quando comparados aos animais diabéticos não tratados ($p=0,028$) e aqueles submetidos a tratamento com metformina e pentoxifilina ($p=0,039$).

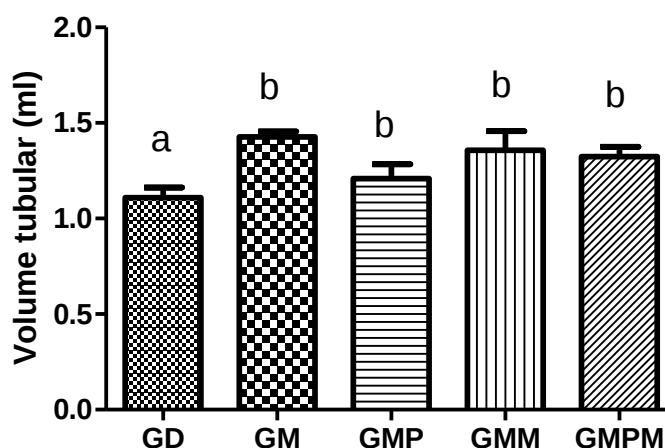


Figura 26. Volume do compartimento tubular (ml) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

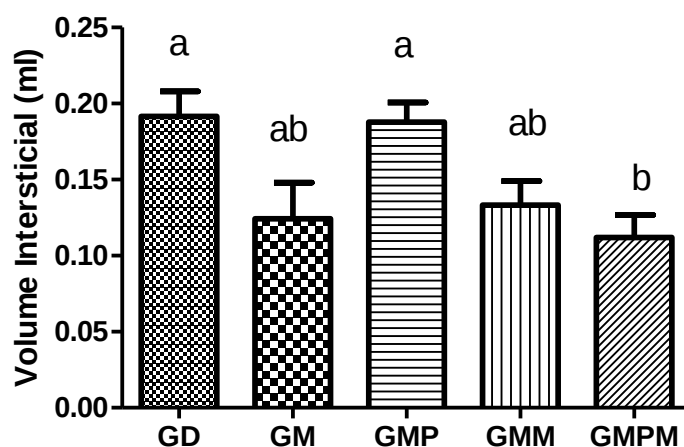


Figura 27. Volume do compartimento intersticial (ml) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Não houve diferença estatística significativa no diâmetro tubular entre os grupos experimentais (Figura 28). O comprimento total dos túbulos seminíferos aumentou nos animais de GM, GMM, GMP e GMPM ($P=0,030$), quando comparados ao grupo diabético sem tratamento.

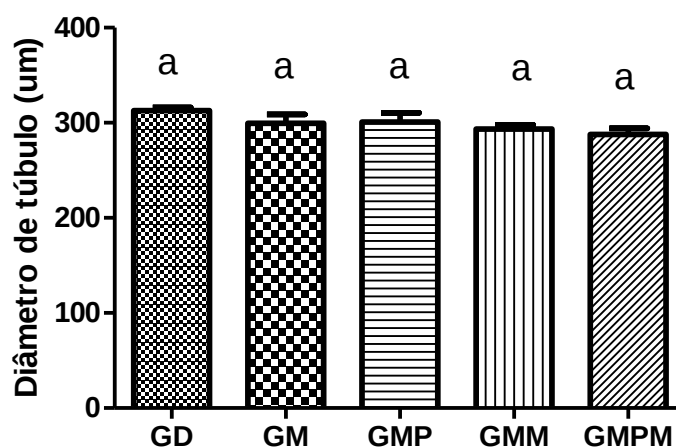


Figura 28. Diâmetro tubular (um) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

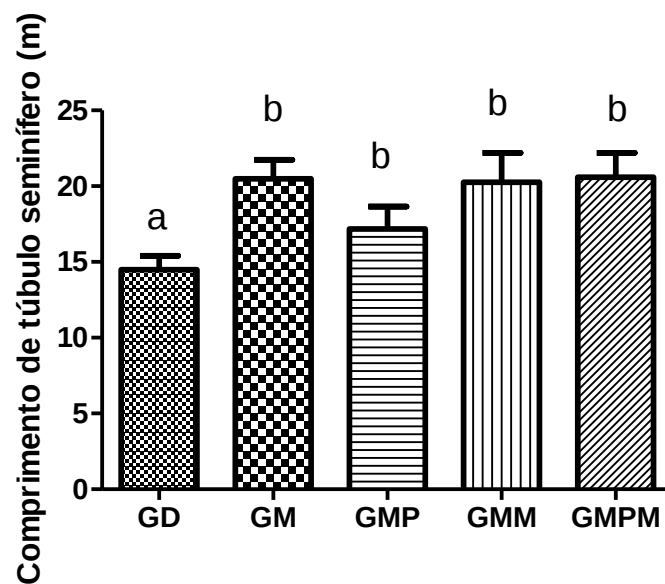


Figura 29. Comprimento do túbulo seminífero (m) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

A população de células de Sertoli (Figura 30) foi mais elevada ($p=0,009$) nos animais do grupo tratado com metformina + melatonina em comparação ao grupo diabético sem tratamento ($p=0,013$) e aos tratados com a associação entre metformina + pentoxifilina ($p=0,044$).

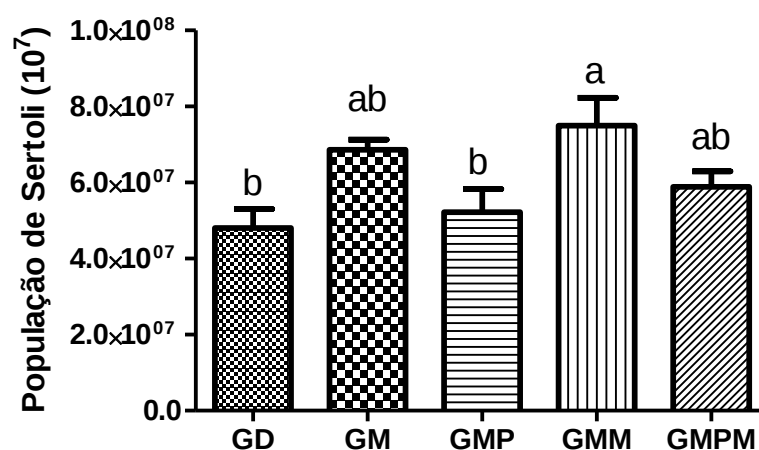


Figura 30. População de células de Sertoli (10^7) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

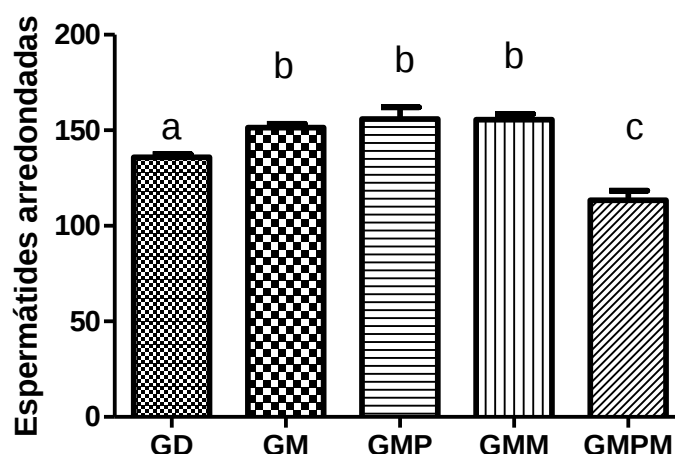


Figura 31. Contagem de espermátides arredondadas de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

A quantidade de espermátides arredondadas foi significativamente maior ($p < 0,001$) nos animais dos grupos GM, GMP e GMM, quando comparados com os animais diabéticos sem tratamento. A associação entre metformina + melatonina + pentoxifilina promoveu redução significativa ($p < 0,001$) neste parâmetro.

A produção espermática diária ($p = 0,017$) foi significativamente maior nos grupos GM e GMM com relação ao grupo diabético sem tratamento.

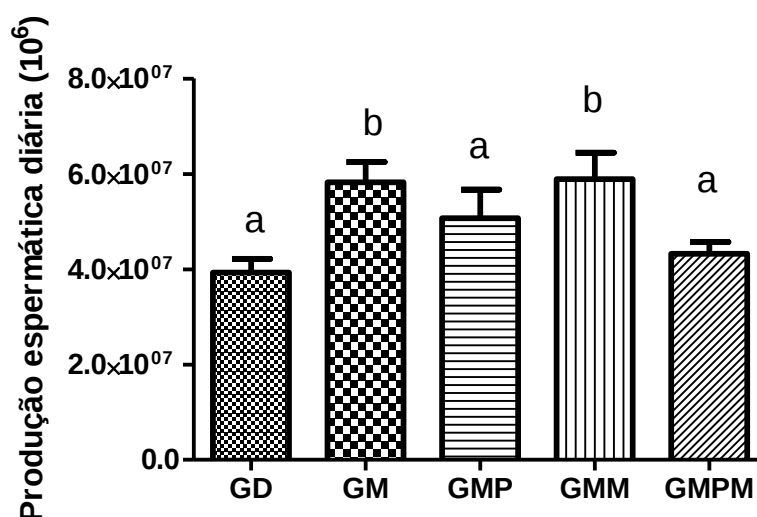


Figura 32. Produção espermática diária (10^6) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Como mostra a figura 33, o diâmetro nuclear das células de Leydig foi maior ($p<0,001$) nos grupos GM, GMM e GMPM quando comparados ao grupo diabético sem tratamento (GD).

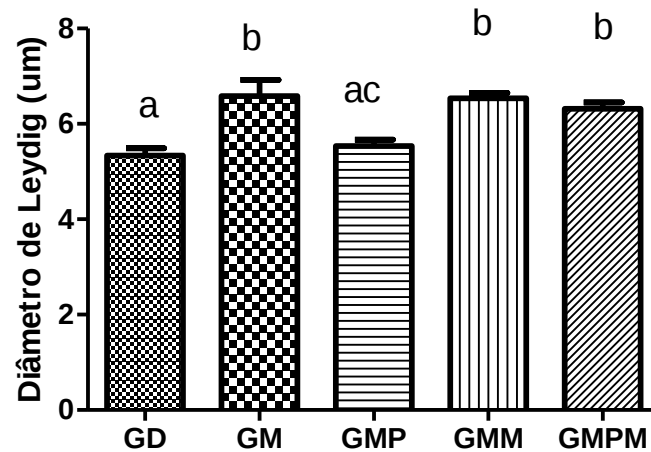


Figura 33. Diâmetro nuclear de células de Leydig (um) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Com relação ao volume individual da célula de Leydig, os animais dos grupos GM, GMM e GMPM tiveram aumento significativo ($p<0,001$) deste parâmetro, quando relacionados aos animais do GD e GMP. (Figura 34).

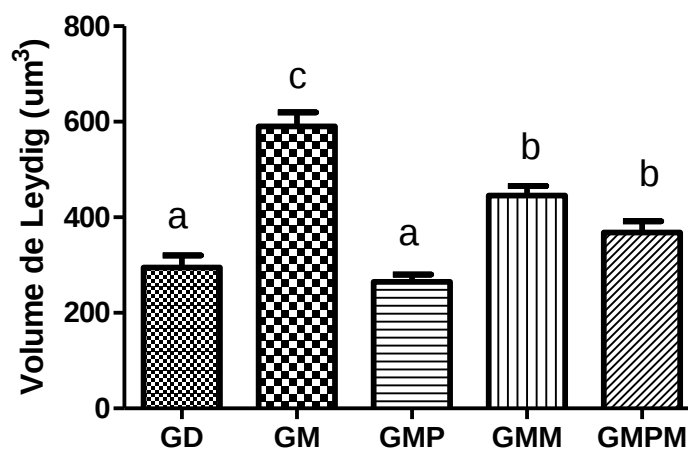


Figura 34. Volume individual de célula de Leydig (um³) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

Já a população de células de Leydig (Figura 35) aumentou ($p=0,004$) no GMP, quando relacionados com os grupos GM ($p=0,006$), GMM ($p=0,037$) e GMPM ($p=0,038$).

Com relação aos níveis de testosterona (Figura 36), houve aumento significativo nos animais submetidos ao tratamento com metformina + melatonina com relação aos grupos GD ($p < 0,001$), GM ($p < 0,001$), GMP ($p = 0,015$), GMPM ($p=0,004$).

Na figura 37, fotomicrografias do parênquima testicular podem ser visualizados, evidenciando o compartimento tubular e intersticial com ênfase na morfologia das células de Leydig nos diversos tratamentos realizados.

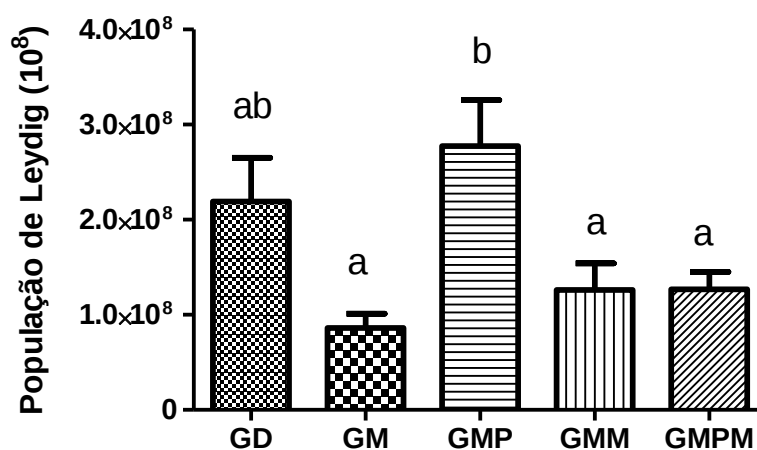


Figura 35. População de células de Leydig (10^8) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

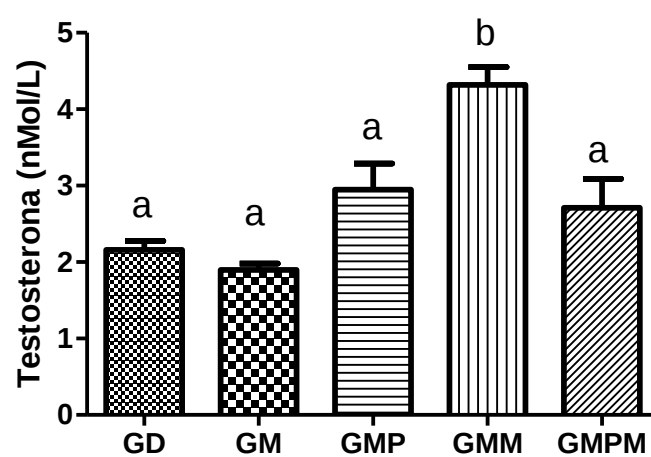


Figura 36. Níveis séricos de testosterona (nMol/L) de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM).

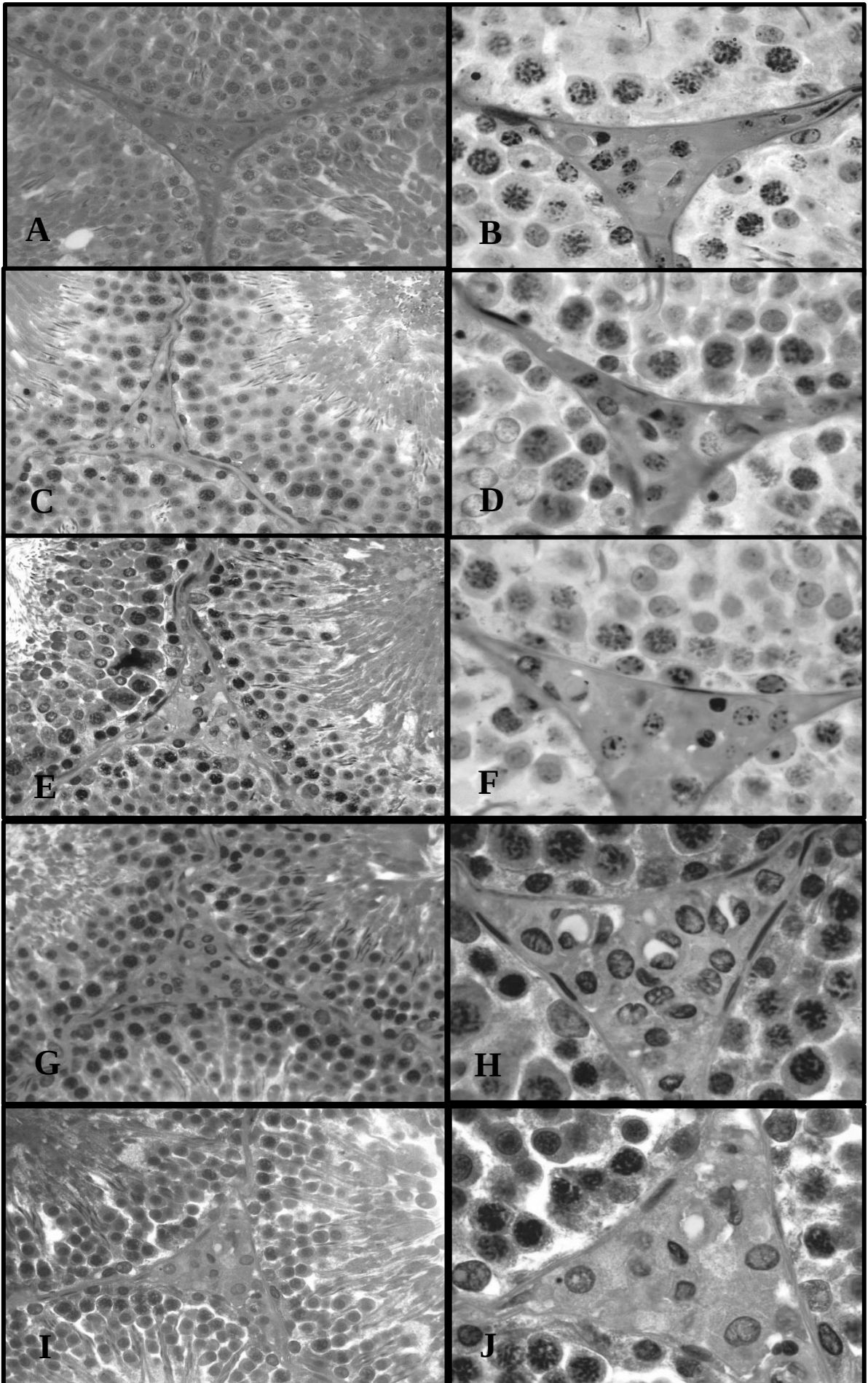


Figura 37. Fotomicrografias do parênquima testicular de animais do grupo diabético (GD) e grupos diabéticos tratados com metformina (GM), metformina e pentoxifilina (GMP), metformina e melatonina (GMM) e metformina, melatonina e pentoxifilina (GMPM). Grupo diabético (A, B); Grupo Metformina (C, D); Grupo Metformina + pentoxifilina (E, F); Grupo Metformina + Melatonina (G, H); Grupo metformina + melatonina + pentoxifilina (I, J). Aumento: 400x (esquerda), 1000x (direita).

8. DISCUSSÃO

A permanência de altos níveis glicêmicos é uma característica comum da fisiopatologia do diabetes mellitus, e a ausência de controle, promove uma série de danos ao organismo, como: lesões hepáticas, riscos cardiovasculares e disfunção sexual (Ballester et al, 2005; Mallick et al, 2007; Navarro-Casado et al. 2010). A glicemia alta foi persistente nos animais do presente experimento, mostrando que, mesmo em dosagem baixa, a estreptozotocina foi capaz de promover o estabelecimento da doença.

Nesse experimento, o tratamento realizado isoladamente com metformina foi eficaz no controle da hiperglicemia. Vários trabalhos relatam que o uso da metformina é eficiente na melhoria da sensibilidade tecidual à insulina e consequente aumento na captação de glicose, agindo, principalmente, no tecido hepático e muscular. Embora não bem elucidado, o mecanismo de ação do fármaco pode ocorrer através da potencialização na atividade da enzima tirosina quinase dos receptores insulínicos, ativação da enzima glicogênio sintase e/ou inibição da enzima glicogênio fosforilase, de forma a reduzir os níveis circulantes de glicose (Hundal et al, 2000; Santomauro Jr et al, 2008; Ighodaro e Akinloye, 2017; Bailey, 2017).

O tratamento adicional de metformina com melatonina e/ou pentoxifilina resultou em uma eficácia maior no controle dos níveis glicêmicos. A atividade da melatonina e pentoxifilina, administradas isoladamente, na manutenção da glicemia em animais diabéticos foi comprovada em estudo realizado por Sekeroglu et al. (2017). Apesar disso, a ação conjunta de ambos os antioxidantes com metformina desempenha em uma melhor resposta para esse parâmetro.

A correlação negativa observada entre a elevação dos níveis de glicose e o peso corporal dos animais, observada neste experimento, corrobora estudo realizado por Nagarchi et al. (2015). Vários estudos relatam a perda do peso corporal e dos órgãos em animais induzidos ao diabetes mellitus. Isso pode ocorrer devido a acentuada perda de água e eletrólitos na urina, comum na condição diabética.

O peso testicular é um parâmetro macroscópico inicial que possui relação com comprimento total de túbulos seminíferos, população de células de Sertoli e produção espermática. Neste experimento, os animais diabéticos tiveram uma redução significativa neste parâmetro, corroborando vários autores (França et al, 1998; França, 2005). A perda de massa testicular foi observada em estudo realizado por Griffeth et al. (2013) em camundongos com mutação nos genes envolvidos na expressão de receptores insulínicos. Diante disso, sabe-se que

a insulina possui um papel importante no sistema reprodutor masculino e o aumento na sensibilidade ao hormônio, pela administração de metformina, foi eficiente na recuperação do peso testicular.

Adicionalmente, foram observadas reduções no volume do compartimento tubular, comprimento do túbulo seminífero nos animais diabéticos sem tratamento. A perda de células germinativas por apoptose, atrofia tubular, redução no diâmetro dos túbulos seminíferos, mudança na arquitetura tubular e danos no processo espermatogenico já foram relatados em animais induzidos ao diabetes mellitus (Cai et al., 2000; Ricci et al., 2009).

Sabe-se que o número de células de Sertoli é determinante para a produção espermática, pois, essa célula oferece suporte para o desenvolvimento das células germinativas. Nesse experimento, houve redução na população de células de Sertoli, espermátides arredondadas e consequente queda na produção espermática diária nos diabéticos. Níveis séricos de FSH são reduzidos nos animais com diabetes, comprometendo a funcionalidade das células de Sertoli (Ballester et al., 2004; Alves et al., 2013). Em estudo realizado por Liu et al. (2016), foram comprovadas falhas na função secretória de células de Sertoli, sendo relacionadas com danos na espermatogênese. Adicionalmente, a partir de análises ultraestruturais, Trindade et al. (2013) observaram o aparecimento de vacúolos no citoplasma das células de Sertoli, após um mês do desenvolvimento do diabetes mellitus, que podem promover falhas na capacidade suporte e protetora às células germinativas de animais diabéticos (Alves et al., 2013).

O tratamento com metformina + melatonina foi eficiente na melhoria dos parâmetros tubulares avaliados no presente experimento. Em estudo realizado por Guneli et al., 2007, a melatonina, de forma isolada, promoveu redução em imperfeições no epitélio seminífero e queda no número de células germinativas em apoptose, mostrando a influência da aplicação exógena de melatonina no parênquima testicular. Nas células de Sertoli, a melatonina possui influencia no crescimento celular, proliferação e metabolismo energético, possuindo papel importante na manutenção do ciclo do epitélio seminífero (Frungieri et al., 2017).

Já a administração de metformina + pentoxifilina não teve a mesma eficácia do GMM para a melhoria dos parâmetros tubulares, através da avaliação quantitativa. Apesar disso, estudos mostram a influencia positiva da admistração de pentoxifilina no aumento do escore da espermatogênese em animais induzidos ao diabetes com estreptozotocina (Pirayei et al., 2015).

Esses danos no epitélio germinativo podem ocorrer devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, levando a falhas no processo espermatogênico. Estudos relatam distúrbios testiculares e falha na produção espermática em indivíduos com baixo potencial

antioxidante (Oliveira et al., 2017). Com isso, no presente experimento, o tecido testicular do grupo diabético sem tratamento apresentou-se com lesão oxidativa, confirmado a partir da elevação nos níveis de MDA, glutathiona e SOD. Isso ocorre, pois o tecido testicular e os espermatozoides possuem alto número de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas, sendo mais suscetíveis a ação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (Takhtfooladi et al., 2015; Asadi et al. 2017). As principais enzimas envolvidas na manutenção do potencial antioxidante testicular (SOD e CAT) estão em baixa nos indivíduos diabéticos, no entanto, há uma maior expressão de genes envolvidos no processo apoptótico (Singh et al., 2013).

Os níveis de marcadores de estresse oxidativo foram reduzidos nos animais tratados apenas com metformina. Já foi relatada que a metformina possui capacidade antioxidante, além da habitual melhora da sensibilidade à insulina, promovendo redução na produção de espécies reativas de oxigênio através do bloqueio no complexo mitocondrial I (Labazi et al., 2013).

No entanto, os grupos tratados com metformina + melatonina, no presente experimento, tiveram bons resultados na redução dos níveis dos marcadores de estresse oxidativo. O uso da melatonina exógena, com doses variando entre 5 mg a 150 mg/kg, proporciona melhoras no estado redox testicular, demonstrando suas propriedades anti apoptóticas e antioxidantes em células somáticas e germinativas (Ferreira et al, 2010; Hatzis et al., 2013). Em estudo realizado por Zhang et al. (2017), o tratamento com melatonina em animais induzidos ao estresse crônico foi eficiente na redução dos níveis de glutathiona e superóxido dismutase no tecido testicular. Estes dados mostram que a melatonina promove proteção testicular por modular o estado inflamatório e o balanço oxidante/antioxidante no parênquima testicular.

A pentoxifilina exerce papel importante na melhoria da capacidade antioxidante testicular em indivíduos diabéticos melhorando o fluxo de sangue, reduzindo a quantidade de células germinativas em apoptose e diminuição na peroxidação lipídica (Yao et al., 2016). Em estudo realizado por Egin et al. (2016), a administração de pentoxifilina foi eficaz na redução no estresse oxidativo no tecido pulmonar de ratos. A atividade antioxidante do fármaco está na inibição na funcionalidade da enzima xantina oxidase, fazendo com que haja uma queda na ação de radicais envolvidos no estresse oxidativo. Segundo Feyli et al. (2016), a pentoxifilina foi eficiente na proteção antioxidante testicular, inibindo o processo apoptótico de células germinativas. O mecanismo de ação de metformina + melatonina + pentoxifilina, em conjunto, ainda não está descrito na literatura, mas de acordo com os dados observados, as combinações

foram eficientes na redução nos níveis de glutathiona, superóxido dismutase e na peroxidação lipídica testicular.

A perda de libido, disfunção erétil e redução na concentração e motilidade de espermatozoides é amplamente relatada na fisiopatologia do diabetes (Alves et al., 2013). Essas alterações estão relacionadas com a queda nos níveis de hormônios como FSH, LH e testosterona, afetando o controle endócrino da espermatogênese. No presente experimento, houve redução nos níveis séricos de testosterona nos animais diabéticos. Devido a essa desregulação hormonal, órgãos dependentes de testosterona como os testículos, epidídimos, próstata e glândula seminal sofrem redução no peso em condições hiperglicêmicas (Ballester et al., 2005; Kianifard et al., 2011; Gobbo et al., 2015).

Conforme já mencionado, a desregulação endócrina do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e redução nos níveis de LH, FSH e testosterona são vistos em animais com diabetes (Agbaje et al., 2007; Guo et al., 2016). Baixos níveis de LH promovem falhas na funcionalidade das células produtoras de testosterona, ocasionando em redução na sua capacidade esteroidogênica (Ballester et al. 2005; Ricci et al. 2009). Com isso, a redução nos níveis de testosterona vista neste experimento corrobora a literatura.

Devido à queda nos níveis de testosterona, houve também redução no diâmetro nuclear e volume individual de células de Leydig. O retículo endoplasmático liso das células produtoras de testosterona ocupa a maior parte do citoplasma, compreendendo cerca de 60% (Mori e Christensen, 1980). A redução nesses parâmetros pode ocorrer devido um decréscimo na região ocupada por essa organela. Além disso, o retículo endoplasmático liso age como sítio importante para enzimas envolvidas na esteroidogênese (Mori e Christensen, 1980; Kianifard et al., 2012).

Nesse experimento, a metformina, de forma isolada, foi eficiente na melhoria dos parâmetros quantitativos das células de Leydig. A utilização da metformina como tratamento, em indivíduos alimentados com dieta rica em lipídios, foi eficaz no aumento do peso testicular, redução no número de células apoptóticas e regulação dos níveis de hormônios envolvidos na espermatogênese em ratos (Yan et al., 2015).

Nos animais submetidos a tratamento com metformina + melatonina os parâmetros das células de Leydig foram aumentados. Isso mostra que a melatonina atua na modulação funcional das células produtoras de testosterona, estando envolvida na esteroidogênese (Frunguieri et al., 2017).

Com isso, a população de células de Leydig e volume intersticial foram aumentados em indivíduos diabéticos. Isso pode ter ocorrido, devido ao aumento na deposição de matriz extracelular e na parede dos vasos já relatados em indivíduos diabéticos (Nascimento et al., 2014). Essas mudanças hormonais e estruturais podem desencadear um mecanismo compensatório, no compartimento intersticial, tendo como resultado o aumento na população dessas células. Vários estudos relacionam danos no tamanho, arquitetura de células de Leydig e redução nos níveis circulantes de testosterona com alterações no número dessas células em indivíduos com diabetes (Sanguinetti et al., 2005; Hassen et al., 2007; Khaki et al., 2010; Schoeller et al., 2012).

Devido a redução no diâmetro nuclear e volume individual da célula de Leydig, tanto o grupo diabético sem tratamento, como o grupo tratado com metformina + pentoxifilina tiveram aumento na população de células de Leydig no compartimento intersticial. Esses achados são condizentes com o estudo realizado por Najar et al. (2013), onde foi visto o aumento na contagem de células de Leydig em ratos diabéticos submetidos a tratamento com pentoxifilina. O aumento populacional de célula de Leydig possuiu relação direta com os níveis séricos de testosterona, que também se mostrou com elevação acentuada.

A administração de dieta hiperlipídica e o estabelecimento do diabetes promove o aumento na expressão de genes de agentes pró-inflamatórios, como TNF-alfa, IL-6 e cortisol, levando ao estado inflamatório característico da fisiopatologia da doença (Sartori et al., 2009; Borowska et al., 2016). Alguns estudos relatam que, no diabetes, ocorre também a redução nos níveis de melatonina plasmática, promovendo alterações negativas no ritmo circadiano dos animais. Essas alterações levam a uma potencialização da intolerância a glicose, redução na funcionalidade normal de células beta pancreáticas e acentuação da inflamação (Kurose, Yabe e Inagaki, 2011; Sharma et al., 2015; Qian e Scheer, 2016).

Diante disso, novas estratégias terapêuticas têm sido adicionadas ao tratamento comumente realizado com metformina para obtenção de melhores respostas tanto no controle glicêmico como no combate à produção acelerada de agentes mediadores de inflamação (Moreira et al., 2008; Chen, Liu e Ye, 2016). Em estudo realizado por Thomas et al. (2016), tendo como foco os transtornos causados pela ruptura do ritmo circadiano em ratos diabéticos, foi observado que a administração conjunta de melatonina e metformina promoveu melhoria na funcionalidade das células beta pancreáticas e captação de glicose, como consequência do controle do ritmo circadiano e regulação metabólica efetuado pelos fármacos.

Adicionalmente, no nosso experimento houve redução nos níveis de marcadores da inflamação como TNF-alfa, corticosterona e Il-6 nos ratos submetidos ao tratamento com metformina e melatonina, mostrando a ação eficaz dos dois fármacos, em conjunto, para controle do estado inflamatório da doença. Apesar disso, o mecanismo exato que os fármacos agem para promover a melhoria do diabetes ainda não é conhecido (Thomas et al., 2018).

Apesar de a pentoxifilina ser conhecida por suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (Han et al., 2015), neste experimento a utilização do fármaco em conjunto com metformina não foi eficaz na redução dos níveis séricos de citocinas inflamatórias. Em experimento realizado por Garcia et al. (2004), houve redução nos níveis de TNF-alfa no tecido pancreático de animais com pancreatite aguda. Isso indica que a pentoxifilina pode ter um maior poder de atuação quando tratados à nível tecidual, não havendo mudanças visíveis à nível sérico.

Os mecanismos de ação da pentoxifilina envolvem o aumento nos níveis de AMPc, isso faz com que haja a estimulação da secreção insulínica como forma de compensação para o aumento dos níveis glicêmicos, característicos da doença (Han, Kim e Lee, 2015; Malekifard et al, 2015). A pentoxifilina pode ter exercido um papel de proteção às células beta pancreáticas, as tornando mais viáveis para produção de insulina (Malekifard et al. 2015). Neste experimento, os níveis séricos de insulina foram maiores nos animais tratados com metformina e pentoxifilina, com relação aos demais grupos. Dessa forma, este tratamento foi eficaz tanto na liberação de insulina circulante, como na diminuição da resistência à insulina, sendo uma estratégia eficaz para o controle glicêmico.

Baixos níveis de melatonina sérica são comuns em indivíduos diabéticos, pois ocorrem falhas na função de seus receptores celulares. Estudos indicam que essas alterações nos níveis de melatonina possuem influencia direta no aumento da resistência tecidual à insulina (Mc Mullan et al. 2013; Thomas et al., 2016). No trabalho realizado por Dantas-Ferreira et al. (2018), os animais submetidos à dieta rica em carboidratos e tratados com metformina e melatonina tiveram redução nos níveis de insulina circulante, corroborando os resultados encontrados nesse experimento. Isso pode ter ocorrido, pois a melatonina age através da redução nos níveis de AMPc nas ilhotas pancreáticas, promovendo a inibição na secreção de insulina e, conseqüentemente, reduzindo a resistência insulínica (Mc Mullan et al., 2013; Dantas-Ferreira et al., 2018).

9. CONCLUSÃO

Pode-se concluir, a partir dos resultados apresentados, que a administração de metformina associada com melatonina, durante 30 dias, possui uma melhor resposta na melhoria dos danos promovidos pelo estabelecimento da inflamação e estresse oxidativo, característicos da fisiopatologia do diabetes mellitus. Adicionalmente, o tratamento promove elevação nos níveis de testosterona e consequente aumento na produção espermática dos ratos diabéticos. A redução nos níveis de citocinas pró inflamatórias, níveis de marcadores de estresse oxidativo e melhora nos parâmetros reprodutivos analisados mostram que este tratamento pode ser aplicado como modelo terapêutico alternativo para a melhoria da qualidade de vida de diabéticos.

10. REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *The Anatomical Record*, v. 94, p. 238-248, 1946.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. *Method Enzym* v. 105, p. 121- 126, 1984.
- ALVES, M.G.; MARTINS, A.D.; CAVACO, J.E.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue Barriers*, 2016, v. 2.
- AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science Home*, v. 45, p. 774-781, 1962.
- ARROR, A.R., DeMARCO, V.G. Oxidative stress and obesity: the chicken or the egg? *Diabetes*, v. 63, p. 2216-2218, 2014.
- ASADI, N.; BAHMANI, M.; KHERADMAND, A.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *J Clin Diagn Res.*, 2017, v. 11, 1-5.
- ATTAL, J.; COUROT, M.; Développement testicular ET établissement de la spermatofénèse chez le taureau. *Ann. Boil. Anim. Biochi. Biophys.*, v.8, n. 3, pp. 219-241, 1963.
- BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., De PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J. Oxidative stress: the concept, implications and factors modulating. *Rev Nutr*, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BEHMER, O.A; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, 1976. cap. 1-9, p. 27-80, 257 p.
- BONORA, E., TARGHER, G., ALBERICHE, M., BONADONNA, R.C., SAGGIANI, F., ZENERE, M.B., MONAUNI, T., MUGGEO, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*, v. 23, n. 1, p. 57-63, 2000.
- BOYNE, A.F.; ELLMAN, G.L. A methodology for analysis of tissue sulphydryl components. *Anal. Biochem.*, v. 46: p. 639-653, 1972..
- BRADFORD, M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.*, v.72, pp.248-254, 1976.
- BROWN, J.; WALKER, S. E.; STEINMAIN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA, 2004.
- BUIJS, R.M., KREIER, F. The metabolic syndrome: a brain disease? *J Neuroendocrinol.*, v. 18, p. 715-6, 2006.
- BURLAMAQUI, I.M.B., DORNELAS, C.A., VALENÇA JUNIOR, J.T., MOTA, D.M.C., MESQUITA, F.J.C., VERAS, L.B., VASCONCELOS, P.R.L., RODRIGUES, L.V. Effect of a hyperlipidic diet rich in omegas 3, 6 and 9 on aberrant crypt formation in rat colonic mucosa. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 27, 2012.

CHEN, W.; LIU, X.; YE, S. Effects of metformin on blood and urine pro-inflammatory mediators in patients with type 2 diabetes. *J Inflamm*, v. 13, 2016.

DANTAS-FERREIRA, R.F.; RAINGARD, H.; DUMONT, S.; SCHUSTER-KLEIN, C.; GUARDIOTA-LEMAITRE, B.; PEVET, P.; CHALLET, E. Melatonin potentiates the effects of metformin on glucose metabolism and food intake in high fat fed rats. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*, doi: <https://doi.org/10.1002/edm2.39>, 2018.

DETANICO, B.C.; PIATO, A.L.; FREITAS, J.J.; LHULLIER, F.L.; HIDALGO, M.P.; CAUMO, W.; ELISABETSAKY, E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Europ Journ of Pharmacol*, 2009, v. 607, p. 121-125.

ESPINO, J., PARIENTE, J.A., RODRIGUEZ, A.B. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. *World J Diabetes*, v. 2, p. 82-91, 2011.

ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., BUENO, A.A., HABITANTE, C.A., SOUZA, G.I., RIBEIRO, E.B., MOTOYAMA, C.S.M., NASCIMENTO, C.M.O. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. *Lipids in health and disease*, v. 10, 2011.

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: LUCA, R.R. *Manual para técnicos de biotério*. São Paulo: Cobeia, 1994.

FERREIRA, C.S.; MAGANHIN, C.C.; SIMOES, R.S.; GIRAO, M.J.B.C.; BARACAT, E.C.; SOARES-JR, M. Melatonina: modulador de morte celular. *Ver Assoc Med Bras*, 2010, v. 56.

FRANCO, L.D.P., CAMPOS, J.A.D.B., DEMONTE, A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. *Revista de Nutrição*, v. 22, p. 359-366, 2009.

FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.*, v.18, pp.499-502, 1972.

FURUKAWA, S., FUJITA, T., SHIMABUKURO, M., IWAKI, M., YAMADA, Y., NAKAIMA, Y., NAKAYAMA, O., MAKISHIMA, M., MATSUDA, M., SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The journal of clinical investigation*, v.114, 2014.

GARCIA, F.A; PINTO, S.F.; CAVALCANTE, A.F.; LUCETTI, L.T.; MENEZES, S.M.; FELIPE, C.F. Pentoxifylline decreases glycemia levels and TNF-alpha, iNOS and COX-2 expressions in diabetic rat pancreas. *Springerplus*, v. 3, 2014.

GOBBO, M.G.; COSTA, C.F.P.; SILVA, D.G.H.; ALMEIDA, E.A.; GÓES, R.M. Effect of Melatonin Intake on Oxidative Stress Biomarkers in Male Reproductive Organs of Rats under Experimental Diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, 2015.

GROSS, J.L. et al. Effect of antihyperglycemic agents added to metformin and a sulfonylurea on glycemic control and weight gain in type 2 diabetes: a network meta-analysis. *Ann Intern Med*, v. 154, p. 672-9, 2011.

GUNELI, E.; TUGYAN, K.; OZTURK, H.; GUMUSTEKIN, M.; CILAKER, S.; UYSAL, N. Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats, *Eur Surg Res*, v. 40, p. 354-360, 2008.

HAN, S.J.; KIM, H.J.; KIM, D.J. et al. Effects of pentoxifylline on proteinuria and glucose control in patients with type 2 diabetes: a prospective randomized double-blind multicenter study. *Diabetol Metab Syndr*, v. 7, 2015.

- HASSID, W. Z.; ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharide I. Determination of glycogen and starch - Determination of glycogen with the anthron reagent. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods of Enzymology* 3, New York: Academic Press; 1957. 35-6.
- HATZIS, G.; ZIAKAS, P.; KAVANTZAS, N.; TRIANTATYLLOU, A.; SIGALAS, P.; ANDREADOU, I.; IPANNIDIS, K.; CHATZIS, S.; EILIS, K.; PANALAMOROS, A.; SIGALA, F. Melatonin attenuates high fat diet-induced fatty liver disease in rats. *World J Hepatol*, 2013, v. 5, p. 160-169.
- HUNDAL, RS, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000. v. 49, p. 2063-2069.
- IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A. Anti-diabetic potential of *Sapium ellipticum* (Hochst) Pax leaf extract in Streptozotocin(STZ)-induced diabetic Wistar rats. *BMC Complement Altern Med*. 2017; v. 17, p. 525.
- INZUCCHI S.E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *JAMA*, v. 287, p. 360-372, 2002.
- JACQUES-SILVA, M.C., NOGUEIRA, C.W., BROCH, L.C., FLORES, E.M., ROCHA, J.B. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol*, v. 88, p. 119-125. 2001.
- KANAKASI, K., KOYA, D. Biology of obesity: lessons from animals models of obesity. *Journal of biomedicin and biotechnology* (2011), p. 1-11, 2011.
- KUROSE, T.; YABE, D.; INAGAKI, N. "Circadian Rhythms and Diabetes." *Journal of Diabetes Investigation*, v. 2, p. 176-177, 2011.
- L. ZHANG, H.L. GUO, H.Q. ZHANG, T.Q. XU, B. HE, Z.H. WANG, ET AL. Melatonin prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: role of oxidative stress and balance between GABAergic and glutamatergic transmission
- LABAZI, H., WYNNE, B.M., TOSTES, R., WEBB, R.C. Metformin treatment improves erectile function in an angiotensin II model of erectile dysfunction. *J Sex Med* 2013; 10: 2154-2164.
- LI, C.; ZHOU, X. Melatonin and male reproduction, *Clinica Chimica Acta*, v. 446, p. 175-180, 2015.
- LIU, B.; ZHANG, X.; QIN, M.; SONG, A.; CUI, T.; WANG, C. Malfunction of Sertoli cell secretion leads to testicular damage in diabetic rats. *Int J Clin Exp Med*, 2016, v. 6, p. 9316-9321.
- LUO, M.; DONG, L.; LI, J.; WANG, Y.; SHANG, B. Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 8, p. 8990-8996, 2015.
- MALEKIFARD F, DELIREZH N, HOBENAGHI R, MALEKINEJAD H: Immunotherapeutic effects of pentoxifylline in type 1 diabetic mice and its role in the response of T-helper lymphocytes. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18:247-252.
- MALLICK C, MANDAL S, BARIK B, BHATTACHARYA A AND GHOSH D. Protection of testicular dysfunctions by MTEC, a formulated herbal drug, in streptozotocin induced diabetic rat. *Biol Pharm Bull*, 30 (2007) 84.

- MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.
- McMULLAN, C.J.; SCHERNHAMMER, E.S.; RIMM, E.B.; HU, F.B.; FORMAN, J.P. Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA*, v. 309, p. 1388-96, 2013.
- MORADI, M.; MAHMOODI, M.; RAOOFI, A.; GHANBARI, A. Chorionic morphine, naltrexone and pentoxifylline effect on hypophyso-gonadal hormones of male rats. *Bratisl Lek Listy*, v. 116, p. 276-9, 2015.
- MORAIS, D. B.; BARROS, M. S.; FREITAS, M. B. D.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturnira lilium*. *Animal Reproduction Science*, v. 147, p. 180-186, 2014.
- MOREIRA, H.G.; SETTE, J.B.C.; KEIRALLA, L.C.B.; ALVES, S.G.; PIMENTA, E.; SOUSA, M.; CORDEIRO, A.; PASSARELLI, O.; BORELLI, F.A.O.; AMODEO, C. Diabetes mellitus , hipertensão arterial e doença renal crônica: estratégias terapêuticas e suas limitações. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 15, p. 111-116, 2008.
- MUECKLER, M. Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. *The journal of clinical investigation*, v. 107, p. 1211-1213, 2001.
- NAVARRO-CASADO L, JUNCOS-TOBARRA MA, CHAFER-RUDILLA M, DE ONZONO LI, BLAZQUEZ-CABRERA JA AND MIRALLES-GARCIA JM. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity: study in rats. *J Androl*, 31 (2010) 584.
- NAVARRO-GONZALEZ, J.F. et al. Effect of pentoxifylline on renal function and Urinary albumin excretion in patients with diabetic kidney disease: the Prediant Trial, *J Am Soc Nephrol*, v. 26, p. 220-229, 2015.
- NETO, J.A.S.; CASTRO, B.F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura, *Rev Bras Neurol*, v. 44, p. 5-11, 2008
- NILSSON, C., RAUN, K., YAN, F.F., LARSEN, M.O. CHRISTENSEN, M.T. Laboratory animals as surrogate models of human obesity, *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 33, p. 173–181, 2012.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em: 25/01/2018.
- OSTRANDER, M.M., ULRICH-LAI, Y.M., CHOI, D.C., RICHTAND, N.M., HERMAN, J.P. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*, v. 147, p. 2008-20017, 2006.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. et al. *Afip laboratory methods in histotechnology*. Washington: American Registry of Pathology, 1992. 278p.
- RADFAR, M.; LARIJANI, B.; HADJIBABAIE, M.; RAJABIPOUR, B; MOJTAHEDI, A.; ABDOLLAHI, M. 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. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 59, issue 6, pp. 302-306, 2005.

- ROCHA, D. M. C.; MIRANDA, J. R.; DEBELJUK, L. et al. Testis size, Sertoli cell population and daily sperm production in adult Wistar rats treated neonatally with FSH and PTU. In: TESTIS WORKSHOP, 15., 1999, Louisville. The testis: from stem cell to sperm function. Norwell: Sero Symposia USA, 1999. pp.60 (II-16)a.
- ROSINI, T.C., SILVA, A.S.R., MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras*, v. 58, p. 383-387, 2012.
- SAFARINEJAD, M.R. Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Int Urol Nephrol*, v. 43, p. 315–328, 2011.
- SHARMA, S.; SINGH, H.; AHMAD, N.; MISHRA, P.. TIWARI, A. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. *Arch Endocrinol Metab*, v. 59, p.391–399, 2015.
- SEKEROGLU, M.R.; HUYUI, Z.; COKJUK, E.; OZBEK, H.; ALP, H.H. The susceptibility to autoxidation of erythrocytes in diabetic mice: Effects of melatonin and pentoxifylline. *J Biochem Mol Toxicol*. 2017, v. 12, doi: 10.1002/jbt.21976.
- SARTORI C, DESSEN P, MATHIEU C, MONNEY A, BLOCH J, NICOD P, SCHERRER U, DUPLAIN H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology*. 2009;150(12):5311-7.
- SHAN, W., CHEN, B., ZHU, S., JIANG, L., ZHOU, Y. Effects of GLUT4 expression on insulin resistance in patients with advanced liver cirrhosis. *Biomed & Biotechnol*, v. 12, p. 677-682, 2011.
- SILVA JUNIOR, V. A.; VIEIRA, A. C.; PINTO, C. F.; DE PAULA, T. A.; PALMA, M. B.; LINS AMORIM, M. J.; AMORIM JUNIOR, A. A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reproduction Nutrition Development*, v.46(2), pp.157-166, 2006.
- SPURLOCK, M.E., GABLER, N.K. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of Nutrition*, v. 138, p. 397-402, 2008.
- SRINIVASAN, K., VISWANAD, B., ASRAT, L., KAUL, C.L., RAMARAO, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*, v. 52, p. 313-320, 2005.
- TAKHTFOOLADI, M.A.; MOAYER, F.; TAKHTFOOLADI, H.A. Beneficial effect of pentoxifylline into the testis of rats in an experimental model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury, *Int Braz J Urol*, v. 41, p. 576-8, 2015.
- THOMAS, A. P.; HOANG, J.; VONGBUNYONG, K.; NGUYEN, A.; RAKSHIT, K.; MATVEYENKO, A. V. Administration of Melatonin and Metformin Prevents Deleterious Effects of Circadian Disruption and Obesity in Male Rats. *Endocrinology*, v. 157, n. 12, p. 4720-4731, 2016.
- YANG, Q., GRAHAM, T.E., MODY, N., PREITNER, F., PERONI, O.D., ZABOLOTNY, J.M., KOTANIL, K., QUADRO, L., KAHN, B.B. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, v. 436, p. 356-362, 2005.
- YANG, W., KELLY, T., HE, J. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev*, v. 29, p. 49-61, 2007.

- YAN, W.; MU, Y.; YU, N.; YI, T.; ZHANG, Y.; PANG, X.; CHENG, D.; YANG, J. Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat-diet. *J Assist Reprod Genet*, 2015, v. 32, p. 1097-1104.
- 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 intermitente hypobaric hypoxia, *Oxid Med Cell Longev*, 2016, doi: 3406802.
- YONEI, Y.; HATTORI, A.; TSUTSUI, K.; OKAWA, M.; ISHIZUKA, B. Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications, *Anti-Aging Medicine*, v. 7, p. 85-91, 2010
- ZANG, Z. et al. Pentoxifylline prevents driamycin-induced myocardial fibrosis and apoptosis in rats, *Int Heart J*, v. 56, p. 651-5, 2015.

