



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAYANE PRISCILA DOS SANTOS

**EFEITO DA HIPERHOMOCISTEÍNEMIA E DO EXERCÍCIO
FÍSICO, ISOLADOS OU ASSOCIADOS, SOBRE O SISTEMA
GENITAL DE CAMUNDONGOS MACHOS ADULTOS**

Londrina
2019

DAYANE PRISCILA DOS SANTOS

**EFEITO DA HIPERHOMOCISTEÍNEMIA E DO EXERCÍCIO
FÍSICO, ISOLADOS OU ASSOCIADOS, SOBRE O SISTEMA
GENITAL DE CAMUNDONGOS MACHOS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Glaura Scantamburlo
Alves Fernandes.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Deminice

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Dayane Priscila.

Efeito da hiperhomocisteïnemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre o sistema genital de camundongos machos adultos / Dayane Priscila Santos. - Londrina, 2019.

102 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Coorientador: Rafael Deminice.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Sistema reprodutor masculino - Tese. 2. Reprodução - Tese. 3. Homocisteína - Tese. 4. Exercício físico - Tese. I. Fernandes, Glaura Scantamburlo Alves. II. Deminice, Rafael. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

DAYANE PRISCILA DOS SANTOS

EFEITO DA HIPERHOMOCISTEÍNEMIA E DO EXERCÍCIO FÍSICO, ISOLADOS OU ASSOCIADOS, SOBRE O SISTEMA GENITAL DE CAMUNDONGOS MACHOS ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra Glaura Scantamburlo
Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Idessania Nazareth Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de abril de 2019.

Dedico este trabalho,
Ao meu amado filho, que me acompanha
nessa trajetória e com toda sua inocência
me mostra que eu tenho coisas a aprender
diariamente e me incentiva a sempre lutar
por meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que desde minha concepção tem provado que para Ele nada é impossível. Sou grata pela vida, pela saúde, pela família e pelos amigos que o Senhor me concedeu. Através de todos os pequenos milagres que o Senhor opera em minha vida diariamente foi possível chegar até aqui. Obrigada Deus por todas as portas que me abristes e por todo amparo que destes, pois sem ti jamais teria forças para trilhar este caminho.

Agradeço ao Professor Dr. Eduardo José de Almeida Araújo por notar em mim um potencial que eu desconhecia. Muito obrigada professor por me incentivar à prestar o processo seletivo do programa. Foi devido ao seu gesto que todo essa jornada começou e eu sou extremamente grata a isso.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes por me fornecer essa oportunidade. Sem você nada disso seria possível. Obrigada pela confiança, pelo apoio, pela orientação, pela paciência, pelos desafios e por acreditar em mim mesmo quando eu mesma não acreditava. Não posso deixar de agradecer pelo carinho e pela sensibilidade com que você lida comigo e com todos os seus orientados, sempre nos confortando nos momentos difíceis e nos motivando a superar nossas limitações. Tenho imensa admiração e respeito por você.

Agradeço ao meu coorientador, Professor Dr. Rafael Deminice por conceder a oportunidade de trabalharmos em equipe. Agradeço pela confiança, pelas orientações, pela paciência, por abrir as portas e me acolher em seu laboratório e principalmente pelo conhecimento que me transmitiu.

Agradeço a professora Dra. Graziela Ceravolo e a professora Dra. Idessania Costa por comporem minha banca de defesa do mestrado. Obrigada por se disporem tão prontamente a participar desta etapa comigo, por toda a flexibilidade e pela colaboração com este trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Fábio Goulart de Andrade e professor Dr. Eduardo José de Almeida Araújo por comporem minha banca de qualificação ao mestrado. É uma honra ter o auxílio de vocês para aprimorar este trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Fábio Seiva por prontamente se dispor a ajudar. Muito obrigada pela sua colaboração com as análises de estresse oxidativo e colesterol, foram de grande valia para este trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Waldiceu Verri Junior e a Dra. Larissa Ferrari pela colaboração e parceria com a análise da atividade de mieloperoxidase.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pela oportunidade e pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram.

Agradeço ao Coordenador do programa, professor Dr. Wander Pavanelli, pela competência e por sempre buscar as ferramentas necessárias para proporcionar um programa de qualidade. Agradeço também aos professores do programa de pós-graduação pelo conhecimento que me foi transmitido e por contribuírem com a formação e enriquecimento do meu conhecimento científico.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Agradeço à minha turma de mestrado, pela dedicação e união. Em especial, agradeço à Aedra, Camila, Suellen e Telma por todo companheirismo durante as disciplinas e trabalhos. Obrigada meninas por me ajudarem nos estudos, nos trabalhos, por tirarem as minhas dúvidas e por dividirem essa experiência comigo. Não posso deixar de agradecer a vocês pelos conselhos, incentivos, compreensão e puxões de orelha nesses dois anos, vocês foram fundamentais nessa etapa.

Agradeço ao Diogo, Daniel e Ícaro pelo companheirismo e paciência durante os dias no biotério. Obrigado pelo respeito e dedicação para com o tratamento dos animais durante todo o período experimental e por sempre se disporem para as mais variadas atividades que se decorreram durante este período.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução, vocês são importantíssimos para mim. Ana, Dani, Duda, Felipe, Glaucia, Giovanna e Ivana sou muito grata pelo auxílio de cada um, pois todos vocês se envolveram e se empenharam de alguma forma para que este trabalho fosse realizado. Agradeço em especial a Rafaela e a Suellen pela amizade e por contribuírem mais intimamente para o enriquecimento deste trabalho. Além disso, vocês me ensinaram lições para a vida e eu sou muito grata a vocês.

Agradeço a família que Deus colocou em minha vida. Sonia, Agostinho, Igor, Larissa e Ryan obrigada por vocês não medirem esforços para me ajudar nessa caminhada. Obrigada por ampararem meu filho quando o laboratório exigia mais do meu tempo, por me incentivarem e por sempre me dar apoio. Vocês me fizeram sentir confiante e me acolheram na ausência da minha família biológica. Isso faz

toda a diferença. Não tenho palavras pra expressar o tamanho da minha gratidão por vocês.

Por fim, agradeço imensamente a minha família. Vocês são a minha maior riqueza. Danieli minha irmã, obrigada pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que realmente sou. Obrigada por estar sempre presente mesmo com a distância, por zelar pela nossa família na minha ausência e por entender os motivos de eu estar ausente. Agradeço ao meu pai Marcio "*in memoriam*" por ter sido sempre exemplo para mim, por ter me ensinado a lutar, a não desistir e sempre agradecer mesmo quando não entendemos os propósitos de Deus em nossas vidas. Pai obrigada por ter sido forte até o ultimo momento e por todo amor que me deu. Agradeço a minha mãe Maria Célia por desde sempre lutar por mim. Obrigada mãe por me ensinar que é preciso ir em busca dos meus objetivos, por me dar auxilio, pela confiança e por abraçar os meus sonhos comigo. Você me faz sentir forte e eu não seria nada sem você. Agradeço a meu filho Luiz, a luz da minha vida. Obrigada meu amor por ser paciente mesmo quando a mamãe está estragando suas férias. O amor de vocês é combustível para a minha alma e contar com o apoio de todos vocês faz qualquer barreira parecer pequena. Amo vocês!

"Gratidão é a memória do coração"

**“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

SANTOS, Dayane Priscila. **Efeito da hiperhomocisteinemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre o sistema genital de camundongos machos adultos**. 2019. 102 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A hiperhomocisteinemia é caracterizada pela elevação dos níveis plasmáticos de homocisteína devido ao desequilíbrio ou comprometimento em seu metabolismo. Defeitos nas enzimas envolvidas na via de remetilização e na via de transulfuração, assim como deficiência nos níveis de vitaminas do complexo B ou outros fatores nutricionais são as principais causas da hiperhomocisteinemia. A hiperhomocisteinemia induz ao estresse oxidativo e por isso tem sido associada a deficiência na espermatogênese e função espermática. No entanto, pouco se sabe sobre sua interação com os órgãos do sistema genital masculino. Outro fator relacionado ao estresse oxidativo e mudanças no sistema de defesa antioxidante é o exercício físico. As funções testiculares (espermatogênese e esteroidogênese) podem ser prejudicadas ou favorecidas, de acordo com o tipo, intensidade e duração do exercício físico. Neste contexto, o estudo buscou avaliar os efeitos da hiperhomocisteinemia e do exercício físico, isolados ou associados, desde a fase puberal até a fase adulta sobre os órgãos do sistema genital masculino de camundongos Swiss. Para isso, 48 camundongos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (C, H, E e H+E) e tratados durante 52 dias. Para indução de hiperhomocisteinemia os animais receberam diariamente via gavagem 1g/Kg de peso de dl-homocisteína thiolactona (diluída em água filtrada) e o exercício físico foi realizado por corrida voluntária em rodas de exercício adaptadas às caixas de biotério. Ao fim do período experimental os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano e submetidos à eutanásia. O sangue foi coletado para determinação da concentração de testosterona. Os testículos e epidídimos foram coletados, pesados e utilizados para contagem espermática, análises morfológicas e histopatológicas, determinação do perfil inflamatório, avaliação da peroxidação lipídica e atividade da catalase. Além disso, foi realizada dosagem de colesterol testicular. Os ductos deferentes foram coletados, pesados e deles foram obtidos espermatozoides para análises de morfologia, integridade acrossômica, atividade mitocondrial e motilidade. As próstatas e tecido adiposo periepididimal foram coletados, pesados e descartados. A hiperhomocisteinemia, isolada ou associada ao exercício físico, causou alterações morfométricas e histopatológicas no testículo. Não houve aumento atividade de mieloperoxidase, aumento da lipoperoxidação ou comprometimento da atividade da catalase no testículo, porém houve elevação nas concentrações de colesterol. No epidídimo, independente do tratamento houveram alterações morfométricas na região da cabeça. Não houve aumento atividade de mieloperoxidase, aumento da lipoperoxidação ou comprometimento da atividade da catalase no epidídimo. Apesar das alterações teciduais, a produção de testosterona e a qualidade espermática não foi prejudicada. Conclui-se que a hiperhomocisteinemia, isolada ou associada ao exercício físico, desde a fase puberal até a fase adulta causa alterações estruturais testiculares. Essas alterações não estão relacionadas com aumento de lipoperoxidação e comprometimento da atividade da enzima catalase. Desta forma, propomos que as alterações observadas

estão relacionadas ao processo de homocisteinização. Além disso, a hiperhomocisteinemia e o exercício físico, isolados ou associados, acarretam em modificações teciduais na cabeça epididimária. Apesar das alterações estruturais observadas, a fisiologia testicular e epididimária não foram alteradas e a qualidade espermática foi preservada.

Palavras-chave: Testículo. Epidídimo. Espermatozoide. Homocisteína. exercício físico.

SANTOS, Dayane Priscila. **Effect of hyperhomocysteinemia and physical exercise, isolated or associated, on the genital system of adult male mice.** 2019. 102 pages. Master's Degree Dissertation – Experimental Pathology Postgraduation Program – State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Hyperhomocysteinemia is characterized by increase plasma levels of homocysteine due to imbalance or impaired metabolism. Defects in the enzymes involved in the remethylation and transsulfuration pathway, as well as deficiency in B-vitamin levels or other nutritional factors are the main causes of hyperhomocysteinemia. The hyperhomocysteinemia induces oxidative stress, therefore, has been associated with spermatogenesis and sperm function deficient. However, little is known about their interaction with the organs of the male genital system. Physical exercise is another factor related to oxidative stress and changes in the antioxidant defense system. Testicular functions (spermatogenesis and steroidogenesis) may be impaired or favored, according to the type, intensity and duration of physical exercise. In this context, the study aimed to evaluate the effects of hyperhomocysteinemia and physical exercise, isolated or associated, during the pubertal and adult phases on the male genital system organs of adult Swiss mice. For this, 48 mice were randomly distributed into four experimental groups (C, H, E, H+E) and treated for 52 days. For hyperhomocysteinemia induction the animals received daily via gavage 1 g/kg of weight of dl-homocysteine thiolactone (diluted in filtered water) and physical exercise was performed by voluntary running on exercise wheels adapted to the cages. After the experimental period the animals were anesthetized by isoflurane inhalation and euthanized. Blood was collected for determination of testosterone concentration. The testis and epididymis were removed, weighed and used for sperm count, morphological and histopathological analyzes, determination of inflammatory profile, lipid peroxidation and activity of catalase evaluation. In addition, testicular cholesterol was measured. The vas deferens were removed, weighed and from them were obtained spermatozoa for analysis of morphology, acrosome integrity, mitochondrial activity and motility. Prostates and periepididimal adipose tissue were collected, weighed and discarded. Hyperhomocysteinemia, isolated or associated to physical exercise, caused morphometric and histopathological alterations in the testis. There was no increase in myeloperoxidase activity, increased lipoperoxidation or impairment of catalase activity in the testis, but there was an increase in cholesterol concentrations. In the epididymis, independent of the treatment, there were morphometric changes in the head region. There was no increased myeloperoxidase activity, increased lipoperoxidation or impairment of catalase activity in the epididymis. Despite the tissue changes, testosterone production and sperm quality were not impaired. Concludes that hyperhomocysteinemia, isolated or associated with physical exercise, from pubertal to adult phases causes testicular structural changes. These changes are not related to increase of lipoperoxidation and impairment of the activity of the catalase enzyme. Thus, we propose that the observed changes are related to the homocysteining process. In addition, hyperhomocysteinemia and physical exercise, isolated or associated, lead to tissue changes in the epididymal head. Despite the structural changes observed, testicular and epididymal physiology were not altered and sperm quality was preserved.

Key words: Testicles, epididymis, spermatozoa, homocysteine, physical exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Órgãos do sistema genital de rato Wistar	16
Figura 2 – Representação das estruturas do testículo e epidídimo.....	17
Figura 3 – Representação de túbulo seminífero e tecido intersticial	18
Figura 4 – Eventos moleculares envolvidos na produção de testosterona pelas células de Leydig	22
Figura 5 – Subdivisão das regiões epididimárias em zonas histológicas	23
Figura 6 – Organização dos principais tipos celulares presentes no epitélio epididimal	25
Figura 7 – Metabolismo da homocisteína.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17-KSR	17-beta hidroxisteróide desidrogenase
17- α -OH-lase	17-alfa hidroxilase
3 β -HSD	3-beta hidroxisteróide desidrogenase
5,10-metil THF	5,10-metiltetrahidrofolato
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CBS	Cistationina beta sintase
CH ₃	Grupo metil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FSH	Hormônio folículo estimulante
HGnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H ⁺ ATPase	H ⁺ -adenosina trifosfatase
Hcy	Homocisteína
HHcy	Hiperhomocisteíemia
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
LH	Hormônio luteinizante
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
Odf-1	Fibras densas externas-1
P450 _{scc}	Enzima de clivagem de cadeia lateral P450
PBR	Receptor de benzodiazepina periférico
PON-1	Paraoxonase-1
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SDH	Sorbitol desidrogenase
S-metil THF	5,10-metiltetrahidrofolato redutase
StAR	Proteína reguladora esteroidogênica

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- α	Fator de crescimento transformador-alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformador-beta
THF	Tretahidrofolato
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRAP	Capacidade antioxidante total
VO _{2 max}	Consumo de oxigênio máximo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	SISTEMA GENITAL MASCULINO: CONSIDERAÇÕES GERAIS E MORFOFISIOLOGIA DO SISTEMA GENITAL MASCULINO	16
1.1.1	Testículo	17
1.1.2	Epidídimo.....	23
1.1.3	Ducto Deferente.....	27
1.1.4	Glândulas Acessórias: Vesícula Seminal e Próstata	27
1.2	HOMOCISTEÍNA	28
1.2.1	Hiperhomocisteínemia	30
1.2.2	Hiperhomocisteínemia e o Sistema Genital Masculino	32
1.3	EXERCÍCIO FÍSICO	32
1.3.1	Exercício Físico e o Sistema Genital Masculino	34
1.3.2	Exercício Físico e a hiperhomocisteínemia.....	36
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	GERAL	39
3.2	ESPECÍFICOS	39
4	ARTIGO	40
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO	89
	ANEXO A.....	100
	ANEXO B.....	101
	APÊNDICE A.....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA GENITAL MASCULINO: CONSIDERAÇÕES GERAIS E MORFOFISIOLOGIA DO SISTEMA GENITAL MASCULINO

O sistema genital masculino consiste em um conjunto de órgãos responsáveis pela produção do gameta masculino (espermatozoide) e componentes seminiais. Além disso, proporciona a condução desses compostos para o sistema genital feminino com a finalidade de permitir a reprodução, através de uma série de eventos (DANGELO & FANTTINI, 2011). A reprodução ocorre através da união do gameta masculino com o gameta feminino (fertilização) e desenvolvimento de um novo indivíduo com um conjunto cromossômico completo e único. Portanto, o sistema genital tem como finalidade produzir componentes necessários para a reprodução e, dessa forma, garantir a preservação e perpetuação da espécie (SHEERWOOD, 2016).

O sistema genital masculino dos mamíferos, inclusive dos humanos, é um sistema andrógeno-dependente, constituído por um par de testículos (gônadas masculinas), por um sistema de ductos composto por um par de epidídimos, um par de ductos deferentes, um par de ductos ejaculatórios e uretra. Também fazem parte desse sistema um conjunto de glândulas acessórias composto por vesículas seminiais, vesículas bulbouretrais e próstata, além do órgão copulador denominado pênis (Figura 1) (TORTORA; NIELSEN, 2013; ROBAIRE; HENDERSON, 2006).

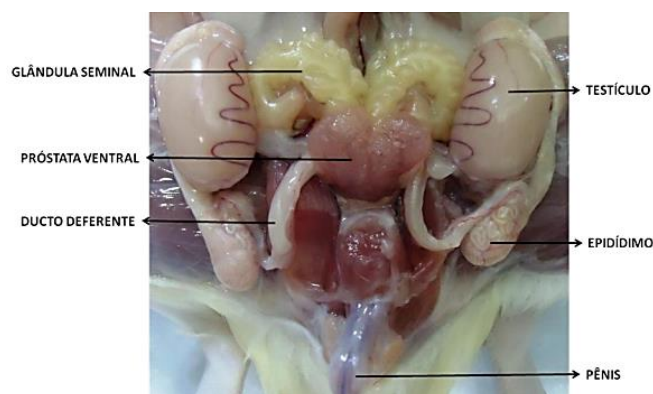


Figura 1. Órgãos do sistema genital de rato Wistar. A imagem mostra a visualização macroscópica dos componentes do sistema genital. Fonte: BORGES, 2013.

1.1.1 Testículo

Os testículos são órgãos ovais localizados no interior do escroto. Esses órgãos são recobertos por uma cápsula fibrosa denominada túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo denso não modelado. Externamente a essa túnica encontra-se a túnica vaginal, uma membrana serosa derivada do peritônio que recobre parcialmente o testículo. Em humanos, a partir da túnica albugínea partem septos fibrosos que adentram os testículos organizando-os em lóbulos que se comunicam entre si (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; TORTORA; NIELSEN, 2013).

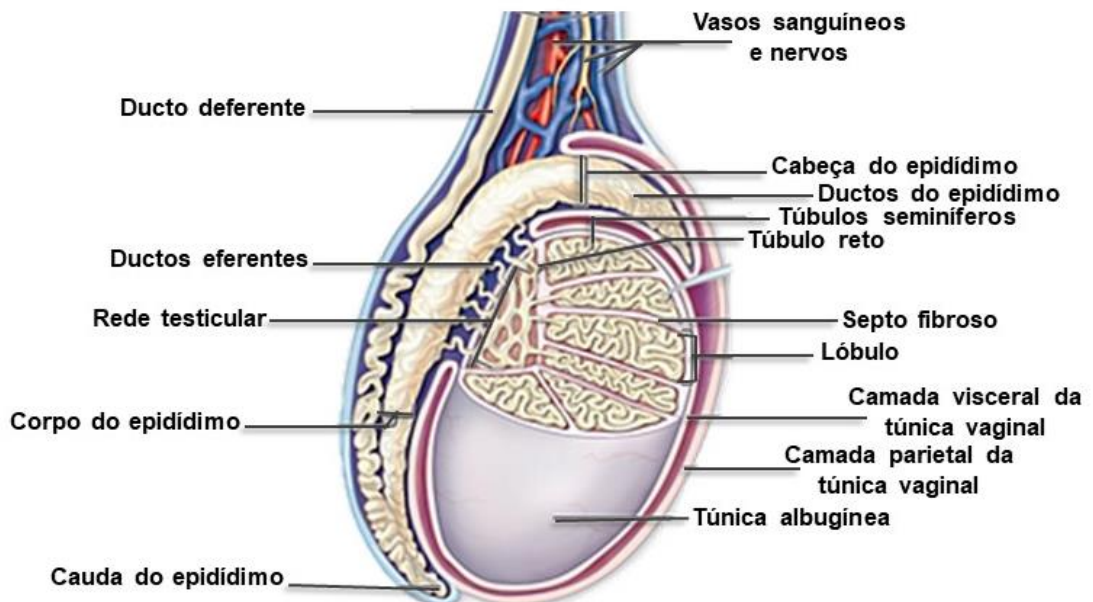


Figura 2. Representação das estruturas do testículo e epidídimo. A figura demonstra a distribuição e localização dos compartimentos testiculares e epididimários vistos de um corte transversal. Adaptado de MESCHER, 2016.

Nos lóbulos testiculares encontram-se dois compartimentos funcional e morfologicamente distintos: o compartimento tubular e o compartimento intersticial responsáveis, respectivamente, pela espermatogênese e esteroidogênese (Figura 3). Uma série de relações entre o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a testosterona com o compartimento intersticial e compartimento tubular são responsáveis por manter a funcionalidade do órgão (WEINBAUER et al., 2010; SOKOL, 1997). A interação coordenada do eixo hipotalâmico – hipofisário – testicular é fundamental

para esse sistema, uma vez que o desequilíbrio nesse eixo pode levar a prejuízos no sistema genital, sobretudo na fertilidade do indivíduo (SOKOL, 1997).

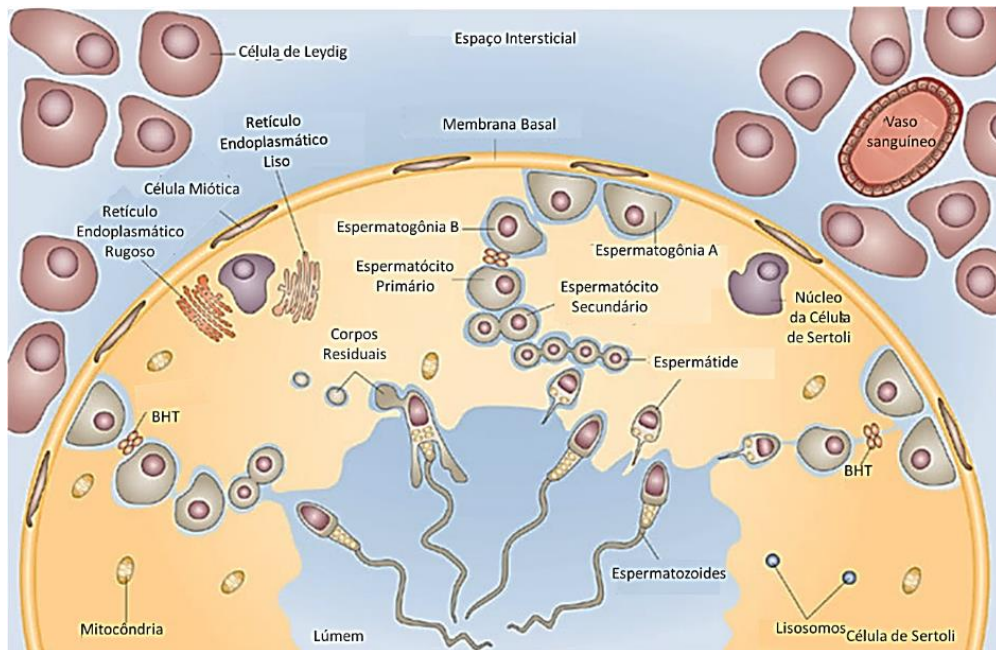


Figura 3. Representação de túbulo seminífero e tecido intersticial. A figura demonstra a localização das células somáticas tubulares (células de Sertoli e células mióides peritubulares) e células de linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides) presentes no túbulo seminífero. Também podem ser observadas células somáticas do tecido intersticial (células de Leydig) e a diferenciação das células germinativas até a formação do espermatozoide no tecido tubular. Adaptado de RATO et al., 2012.

O compartimento tubular compreende um sistema de túbulos seminíferos constituídos por células germinativas e células somáticas. Existem três tipos de células germinativas nos túbulos: espermatogônias, espermatócitos e espermátides, enquanto as células somáticas são as células mióides peritubulares e as células de Sertoli (JOHNSON et al., 2010).

No epitélio germinativo de indivíduos sexualmente maduros ocorre o processo denominado espermatogênese em que uma célula tronco germinativa (espermatogônia) se diferencia em células germinativas masculinas altamente especializadas e diferenciadas (espermatozoides) (HESS; FRANCA, 2009; MRUK; CHENG, 2004). A espermatogênese pode ser dividida em três fases: mitótica, meiótica e espermiogênese (CLERMONT, 1972). A fase mitótica é caracterizada pela proliferação de células tronco espermatogoniais. Trata-se de células diploides ($2n$) localizadas no compartimento basal dos túbulos seminíferos que sofrem divisões mitóticas regularmente, podendo se auto renovar e manter um estoque de

células tronco espermatogoniais (espermatogônias A) ou se dividir sucessivas vezes, de acordo com a espécie, originando espermatogônias B. As espermatogônias B, por sua vez, são destinadas à diferenciação e sofrem a última divisão mitótica para originar os espermatócitos primários (JAN et al., 2012; KOLASA et al., 2012; DE ROOIJ, 1998). Ao fim da fase mitótica tem início a fase meiótica, onde os espermatócitos primários (ainda diploides) sofrem a primeira divisão meiótica originando os espermatócitos secundários (células haploides). Os espermatócitos secundários rapidamente sofrem a segunda divisão meiótica originando espermatídes arredondadas. A partir deste momento tem início o processo de diferenciação morfológica das espermatídes denominado de espermiogênese. A espermiogênese é caracterizada por eventos de condensação do material genético das espermatídes, formação do acrossoma, reposicionamento das mitocôndrias, perda de citoplasma e formação do flagelo que tem como finalidade originar espermatídes tardias. As espermatídes tardias sofrem então o processo de espermição, onde são liberadas das células de Sertoli para o lúmen dos túbulos seminíferos. Neste momento essas células são imóveis e passam a ser denominadas espermatozoides (JAN et al., 2012; O'DONNELL, 2011; CLERMONT, 1972).

As células mioídes peritubulares circundam e determinam o limite externo dos túbulos seminíferos. Uma função muito importante dessas células é a produção de componentes de matriz extracelular como fibronectina, colágeno e proteoglicanos que proporcionam integridade estrutural para os túbulos seminíferos (MAEKAWA et al., 1996). Além de proporcionar suporte estrutural para os túbulos, essas células também apresentam capacidade contrátil, uma característica importantíssima para o transporte de espermatozoides e de fluido ao longo do lúmen tubular em direção ao epidídimo. Diversos fatores envolvidos na contração celular são produzidos por células mioídes peritubulares, como desmina, gelsolina, miosina e actina (HOLSTEIN et al., 1996). A contração dessas células ocorre de maneira rítmica, fraca e lenta mediada principalmente pela endotelina e seu efeito é modulado pela adrenomedulina, um peptídeo relaxante produzido pelas células de Sertoli (JOHNSON et al., 2010; WEINBAUER et al., 2010; ROMANO et al., 2005). Na membrana celular estão presentes receptores de andrógenos (AR) e, alguns estudos sugerem que, a sinalização destes receptores através das células mioídes peritubulares está relacionada com a manutenção de algumas funções das células

de Sertoli (por exemplo a secreção de transferrina e da proteína de ligação a andrógeno) e consequente manutenção da espermatogênese (WELSH et al., 2009).

As células de Sertoli são células altamente especializadas cruciais para a formação testicular durante a fase embrionária e a espermatogênese durante a vida adulta. Na fase embrionária, as células de Sertoli são as primeiras células diferenciadas reconhecíveis na gônada fetal e, juntamente com células mioides peritubulares, são requeridas para a formação dos cordões testiculares. As células de Sertoli ainda sequestram células germinativas dos túbulos seminíferos recentemente formados e impedem que as mesmas entrem em meiose, além de estimular a diferenciação e função das células de Leydig (SHARPE, 2003; GRISWOLD, 1998). Durante a puberdade, as células de Sertoli têm sua função alterada para dar suporte à espermatogênese. Nesta fase, as células de Sertoli proporcionam suporte estrutural e trófico para o epitélio germinativo, realizam o transporte de espermátides maduras para o lúmen dos túbulos seminíferos, produzem substâncias de ação parácrina ou endócrina e ainda se intercomunicam com as células de Leydig responsáveis pela produção de testosterona (PASCHALIA et al., 2015).

As células de Sertoli estão apoiadas na membrana basal dos túbulos seminíferos e se estendem ao longo de toda a altura do epitélio germinativo projetando-se em direção ao lúmen (WEINBAUER et al., 2010). Essas células se conectam entre si através de junções de membrana em zonas específicas que dividem o epitélio germinativo em compartimento basal e compartimento adluminal, formando a barreira hemato-testicular (PASCHALIA et al., 2015; JOHNSON et al., 2010). Nessa divisão, as células germinativas diploides ficam localizadas no compartimento basal, enquanto as células germinativas haploides estão contidas no compartimento adluminal. Durante o desenvolvimento das células germinativas ocorre a migração de células do compartimento basal para o compartimento adluminal através da dissociação e reagrupação sincronizada das junções entre as células de Sertoli. Essa barreira é extremamente importante para impedir que células haploides sejam reconhecidas como antigênicas pelo sistema imunológico, além de proporcionar um ambiente adequado para o processo meiótico e desenvolvimento espermático (PASCHALIA et al., 2015; JOHNSON et al., 2010; WEINBAUER et al., 2010).

Além do suporte estrutural e de barreira, as células de Sertoli fornecem substâncias necessárias para o desenvolvimento de células germinativas em espermatozoides. Alterações no número, estrutura e função deste tipo celular podem prejudicar a espermatogênese (BOEKELHEID; JOHNSON; RICHBURG, 2004; GRISWOLD, 1998). Essas células secretam nutrientes (carboidratos, lipídios, aminoácidos, vitaminas e íons metálicos), fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblastos, fator de células-tronco, fatores de crescimento transformadores alfa e beta, fator de crescimento semelhante à insulina-I e fator de crescimento epidérmico), bem como, fatores necessários para o metabolismo das células germinativas (lactato, transferrina e proteína de ligação a andrógenos) (SKINNER; ANWAY, 2005; MRUK; CHENG, 2004). Esses fatores participam da transdução dos sinais provenientes do FSH e da testosterona e estão intimamente envolvidos com o processo de espermição, fagocitose dos corpos residuais, secreção de hormônios importantes para a espermatogênese e secreção fluidos para o lúmen dos túbulos seminíferos com a finalidade de facilitar a migração dos espermatozoides para o epidídimo (WALKER; CHENG, 2005; FOLEY, 2001; GRISWOLD, 1998).

O tecido intersticial localiza-se entre os túbulos seminíferos e apresenta importante papel no transporte de nutrientes, hormônios e produção de andrógenos. Este tecido é composto por células de Leydig, células do sistema imunológico (macrófagos e mastócitos), vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas, fibroblastos e tecido conjuntivo frouxo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; JOHNSON et al., 2010). As células de Leydig podem ser consideradas as principais células do tecido intersticial por serem responsáveis pela síntese e secreção de testosterona. Essas células apresentam grande quantidade de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares e a cooperação entre enzimas presentes nessas duas organelas resulta na produção da testosterona. Além disso, essas células ainda apresentam outros componentes importantes como gotículas de lipídios, essenciais para os estágios iniciais da síntese de testosterona (JOHNSON et al., 2010; WEINBAUER et al., 2010).

A produção de testosterona pelas células de Leydig é regulada pelo LH (WEINBAUER et al., 2010; ZIRKIN; CHEN, 2000). Esse hormônio hipofisário se liga a seus receptores presentes na membrana plasmática das células de Leydig e dá início a uma cascata de eventos que levam a formação da testosterona. Inicialmente

ocorre a ativação da enzima adenilato ciclase, responsável pela transformação de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O aumento da formação do fator de sinalização AMPc intracelular estimula a síntese da proteína reguladora esteroidogênica (StAR), assim como a translocação do colesterol para a mitocôndria. Na mitocôndria ocorre a associação do colesterol com a enzima de clivagem de cadeia lateral P450 (P450scc). O resultado desse evento é a conversão do colesterol em pregnenolona que na sequência é translocada da mitocôndria para o retículo endoplasmático liso onde, através de uma série de reações, a pregnenolona é convertida em testosterona (Figura 4) (ZIRKIN; CHEN, 2000).

Após ser produzida, uma porção de testosterona é dirigida aos túbulos seminíferos onde desempenha um importante papel estimulando a espermatogênese, enquanto o restante de testosterona é secretado nos vasos sanguíneos e transportado para seus sítios de ação. Logo, além da estimulação da espermatogênese, a testosterona também desempenha outros papéis importantes, como por exemplo o desenvolvimento das características sexuais secundárias (SHEERWOOD, 2016).

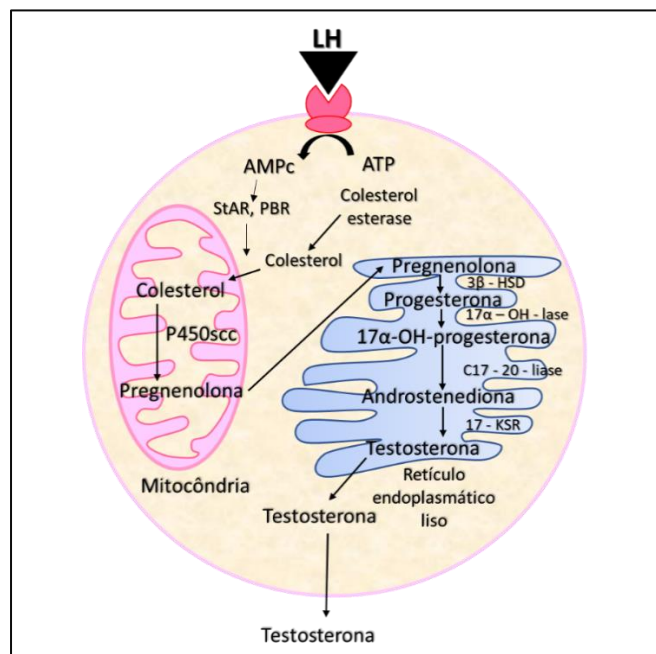


Figura 4. Eventos moleculares envolvidos na produção de testosterona pelas células de Leydig. A figura esquematiza a sequência de eventos intracelulares estimulados pela ligação do LH ao seu receptor que levam a produção de testosterona. AMPc: adenosina monofosfato cíclico; ATP: adenosina trifosfato; StAR: proteína reguladora esteroidogênica; PBR: Receptor de benzodiazepina periférico; P450scc: enzima de clivagem de cadeia lateral P450; 3β-HSD: 3β hidroxisteróide desidrogenase; 17α-OH-lase: 17α hidroxilase, 17-KSR: 17β-hidroxisteróide desidrogenase. Fonte: Dayane Priscila dos Santos.

1.1.2 Epidídimo

Os túbulos seminíferos do testículo se convergem dando origem à rede testicular que por sua vez tem continuidade com os ductos eferentes (Figura 2). Os ductos eferentes formam um ducto único e altamente enovelado denominado epidídimo. O epidídimo é extremamente longo e seu comprimento varia de acordo com a espécie, medindo cerca de 1 metro em camundongos, 3 metros em ratos e de 3 a 6 metros em humanos (ROBAIRE et al., 2006).

O epidídimo de humanos é dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (TURNER, 2008). Já o epidídimo de roedores é dividido em quatro regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (ROBAIRE; HINTON, 2015). Essas regiões são histologicamente subdivididas em zonas de acordo com a altura do epitélio, distribuição e quantidade dos seus tipos de celulares (Figura 5). A região da cabeça é dividida em zonas 1A, 1B, 2A, 2B, 3A e 3B, a região do corpo é dividida em zonas 4A e 4B e a região da cauda é dividida em zonas 5A, 5B, 6A e 6B (HERMO; ROBAIRE, 2002; MILLER; KILLIAN, 1987; CLELAND, 1957).

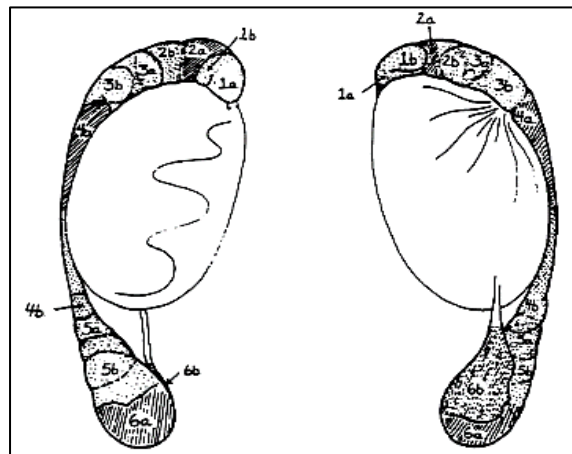


Figura 5. Subdivisão das regiões epididimárias em zonas histológicas. A imagem exhibe a distribuição das zonas histológicas nas regiões epididimárias. Região da cabeça: zonas 1, 2 e 3; Região do corpo: zonas 4; Região da cauda: zonas 5 e 6. Fonte: MILLER; KILLIAN, 1987.

Ao sair dos testículos, os espermatozoides são morfologicamente completos, porém não possuem motilidade e são incapazes de fecundar um ovócito II (DACHEUX; DACHEUX, 2014). Visto isso, o epidídimo desempenha quatro funções primordiais executadas dentro dos diferentes ambientes luminiais presentes ao longo do ducto epididimário: transporte de espermatozoides, desenvolvimento da

motilidade espermática, desenvolvimento da capacidade de fertilização dos espermatozoides e a criação de um ambiente luminal especializado que conduz ao processo de maturação através das atividades absorptivas e secretoras do epitélio epididimal (ROBAIRE et al., 2006; RODRIGUEZ; KIRBY; HINTON, 2002).

A interação altamente regulada entre a lâmina própria, as células epiteliais e o fluido luminal que banha os espermatozoides é responsável pelo sucesso no processo de maturação espermática (KEMPINAS; KLINEFELTER, 2010; BEDFORD, 1975; ORGEBIN-CRIST et al., 1975). Nesse processo ocorre o remodelamento da membrana plasmática do espermatozoide, onde proteínas de origem testicular são removidas ou modificadas e proteínas epididimárias são secretadas e adsorvidas à membrana espermática ou apenas interagem com o gameta, para que sua capacidade funcional seja adquirida (BARRIOS, 2005; DA ROS et al., 2004; CUASNICÚ et al., 2002).

O ducto epididimal é formado por um epitélio, composto por diferentes tipos de células epiteliais, sendo elas as células basais, células principais, células apicais, células estreitas, células claras e células halo (Figura 6). Algumas destas células estão localizadas em toda extensão do epidídimo, enquanto outras encontram-se em regiões específicas do ducto epididimal devido a funções desempenhadas pelas mesmas (SMITH et al., 2014; ROBAIRE et al., 2006). As células epiteliais se apoiam em uma lâmina basal que é envolvida por células musculares lisas e tecido conjuntivo frouxo. A contração realizada pelas células musculares auxilia no transporte dos espermatozoides através do ducto no tempo adequado para a maturação espermática (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

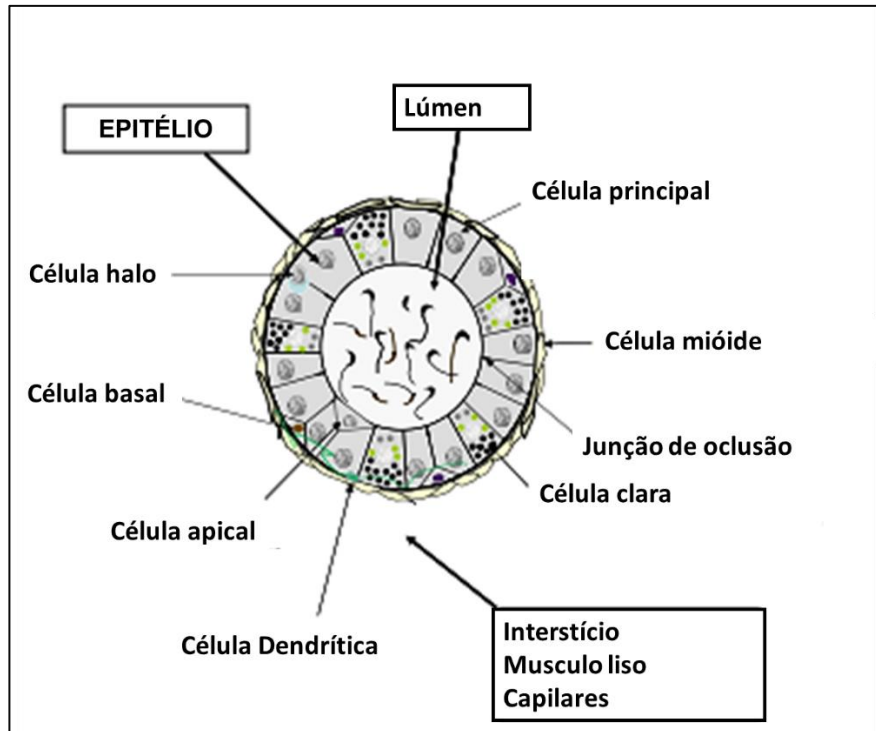


Figura 6. Organização dos principais tipos celulares presentes no epitélio epididimal. A figura aponta os três compartimentos epididimários (luminal, epitelial e intersticial) bem como a posição e distribuição dos principais tipos celulares que constituem o epitélio epididimal. Adaptado de ROBAIRE; HINTON, 2015.

As células basais localizam-se na membrana basal do ducto epididimal por toda sua extensão. Esse tipo celular apresenta aparência côncava e não tem contato direto com o compartimento luminal do ducto (HERMO et al., 1994). Elas possuem aparato endocítico com a presença escassa de endossomos, corpos multivesiculares e lisossomos voltados para membrana plasmática basal sugerindo que estas células realizam endocitose de fatores derivados do sangue ou das células principais mediada por receptores. O complexo de Golgi das células basais é bastante desenvolvido, porém poucos grânulos de secreção são observados no citoplasma celular, sugerindo atividade secretora que pode estar relacionada com a regulação de atividades das células principais ou liberação de fatores na circulação sanguínea para finalidades ainda não determinadas (ROBAIRE; HINTON, 2015; HERMO et al., 1994)

A célula principal é o tipo celular mais abundante no epitélio epididimal, e está presente em todas as regiões do epidídimo (ROBAIRE; VIGER, 1995). Essas células são colunares, possuem retículo endoplasmático, complexo de Golgi e grânulos de secreção altamente organizados e desenvolvidos caracterizando sua maquinaria secretora. Além disso, as células principais apresentam um aparato

endocítico especializado caracterizado pela presença de endossomos, corpos multivesiculares e lisossomos. Devido a essas características, as principais funções desempenhadas pelas células principais são a síntese de proteínas e glicoproteínas que podem ser secretadas no compartimento luminal ou retidas na própria célula e a endocitose de proteínas presentes no conteúdo luminal (ROBAIRE; HINTON, 2015; HERMO et al., 1994).

As células apicais são comumente encontradas no segmento inicial. Essas células são colunares, de núcleo arredondado e encontram-se na metade luminal do epitélio epididimal, portanto não estão em contato com a membrana basal (ADAMALI; HERMO, 1996; SUN; FLICKINGER, 1980). Essa célula realiza endocitose e degradação de proteínas do conteúdo luminal através das enzimas catepsina D e β -hexosaminidase que estão presentes em seus lisossomos (ADAMALI; HERMO, 1996).

Assim como as células apicais, as células estreitas também são encontradas no segmento inicial. Essas células são delgadas e de aspecto alongado, seu núcleo é levemente achatado e se posiciona na metade luminal do epitélio epididimal. A região apical das células estreitas apresenta diversas vesículas em forma de taça que estão envolvidas na endocitose e as enzimas catepsina D e β -hexosaminidase também estão presentes. Além disso, as células estreitas atuam na secreção de íons H^+ no lúmen (ROBAIRE et al., 2006; ADAMALI; HERMO, 1996).

As células claras estão presentes nas regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo de muitas espécies, inclusive nos humanos. Essas células apresentam uma região apical que contém diversas vesículas, endossomos, corpos multivesiculares e lisossomos, enquanto a região basal apresenta o núcleo e gotículas lipídicas (HERMO et al., 1988). Essas células são consideradas as principais células endocíticas presentes no epitélio epididimal. Além de realizar a endocitose de diversas proteínas presentes no conteúdo luminal as células claras também são responsáveis pela endocitose do conteúdo da gota citoplasmática liberada pelos espermatozoides enquanto atravessam o epidídimo (ROBAIRE; HINTON, 2015). A acidificação do conteúdo luminal também é realizada pelas células claras. Essa característica se dá principalmente pela presença das proteínas H^+ -adenosina trifosfatase (H^+ ATPase), anidrase carbônica II e adenilato ciclase solúvel que se acumulam na região apical dessas células em resposta ao pH

alcalino do conteúdo luminal (ISNARD-BAGNIS et al. 2003; PASTOR-SOLER et al., 2003; JENSEN et al., 1999)

As células halo estão presentes em toda a extensão do ducto epididimal. São as células imunológicas primárias do epidídimo, caracterizadas como células pequenas, de margem estreita, citoplasma claro e núcleo condensado localizadas na base do epitélio epididimal. Em animais jovens adultos as células halo consistem exclusivamente em linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e monócitos. Com o decorrer do tempo, há um aumento no número de cada um destes tipos celulares, assim como o aparecimento ocasional de eosinófilos e linfócitos B (ROBAIRE; HINTON, 2015; SERRE; ROBAIRE, 1999).

O microambiente intraluminal do epidídimo é altamente regulado pela atividade secretora e absorviva das células epiteliais (ROBAIRE et al., 2006). Cada etapa da maturação é decisiva para a qualidade espermática e não está sob o controle genômico das células germinativas (DACHEUX et al., 2005; ROBERTS, 1995).

1.1.3 Ducto Deferente

O ducto deferente conecta o epidídimo à uretra prostática. Uma de suas principais funções é o transporte dos espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo para o ducto ejaculatório que adentra a próstata e desemboca na uretra prostática. Além disso, o tecido epitelial do ducto deferente auxilia no término do processo de maturação espermática (KOMÁREK, 2000). Este ducto é caracterizado por um lúmen estreito e uma camada de células musculares lisas bastante espessa. O epitélio é secretor e mantém os espermatozoides banhados enquanto estão no lúmen, já a camada muscular realiza fortes contrações que são responsáveis pela impulsão dos espermatozoides para o ejaculado durante o momento da ejaculação (DIXON et al., 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

1.1.4 Glândulas Acessórias: Vesícula Seminal e Próstata

A vesícula seminal é um ducto altamente enovelado, apresenta uma mucosa pregueada com epitélio cuboide ou pseudoestratificado colunar envolvida por uma espessa camada de músculo liso. Essa vesícula não armazena espermatozoides,

mas produz uma secreção viscosa de pH ácido que contém substâncias fundamentais para viabilidade dos espermatozoides após a ejaculação como frutose, prostaglandinas e proteínas coagulantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RISBRIDGER, 2006).

A próstata, considerada a maior glândula sexual acessória, é constituída por um conjunto de glândulas túbulo-alveolares ramificadas formadas por um epitélio cuboide ou pseudoestratificado que envolvem a uretra prostática e desembocam na mesma. Além disso, a próstata ainda apresenta um estroma fibromuscular ao redor das glândulas e é revestida por uma cápsula rica em células musculares lisas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Essa glândula produz uma secreção que contém fibrinolisinase, uma substância que auxilia a dissolver o plug ejaculatório produzido pelos fluidos da glândula seminal tornando o sêmen liquefeito. A secreção prostática também contém citrato, fosfatase ácida e amilase que servem como meio para a otimização da motilidade e viabilidade espermática (JOHNSON et al., 2010; PENNEFATHER et al., 2000).

Em mamíferos o sêmen é depositado dentro do lúmen vaginal por ejaculação realizada pelo órgão copulador (pênis). Durante o ato sexual, esse evento ocorre devido à resposta do arco reflexo que leva à estimulação sensorial do pênis, seguida de estimulação motora simpática do músculo liso do sistema genital masculino e estimulação motora somática da musculatura associada à musculatura tubular do sistema genital masculino (STEERS, 1994). Todos esses eventos têm por finalidade permitir a união do gameta masculino com o gameta feminino e para que posteriormente a reprodução aconteça (SHEERWOOD, 2016).

1.2 HOMOCISTEÍNA

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina. A metionina, por sua vez, é um aminoácido essencial presente nas proteínas alimentares principalmente de origem animal (DE LA CALLE et al., 2003). Na síntese da Hcy, com gasto de ATP em uma reação catalisada pela enzima S-adenosilmetionina sintase uma considerável proporção de metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM). A SAM atua primariamente como doador universal de metila, envolvendo uma série de aceitadores e o subproduto dessa reação de metilação é chamado S-adenosilhomocisteína (SAH).

Na sequência a SAH é hidrolisada gerando adenosina e Hcy. Essa sequência de reações é conhecida como transmetilação e ocorre em todas as células do corpo (SELHUB, 1999).

A Hcy interage com duas vias de biotransformação: remetilação e transulfuração (Figura 7) (DE LA CALLE et al., 2003). A remetilação de Hcy para metionina envolve a participação das enzimas metionina sintase e betaína homocisteína metiltransferase. A primeira utiliza o N-5-metiltetrahydrofolato como doador de metila e a vitamina B12 como cofator. Essa reação ocorre em todos os tecidos do corpo de forma dependente da vitamina B12 (BROSNAN et al., 2004; FINKELSTEIN, 2000). Já a reação catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase emprega betaína, um produto obrigatório da oxidação da colina, como doador de metila. Essa reação não é dependente de vitamina B-12 e ocorre exclusivamente no fígado (BROSNAN et al., 2004; DE LA CALLE et al., 2003).

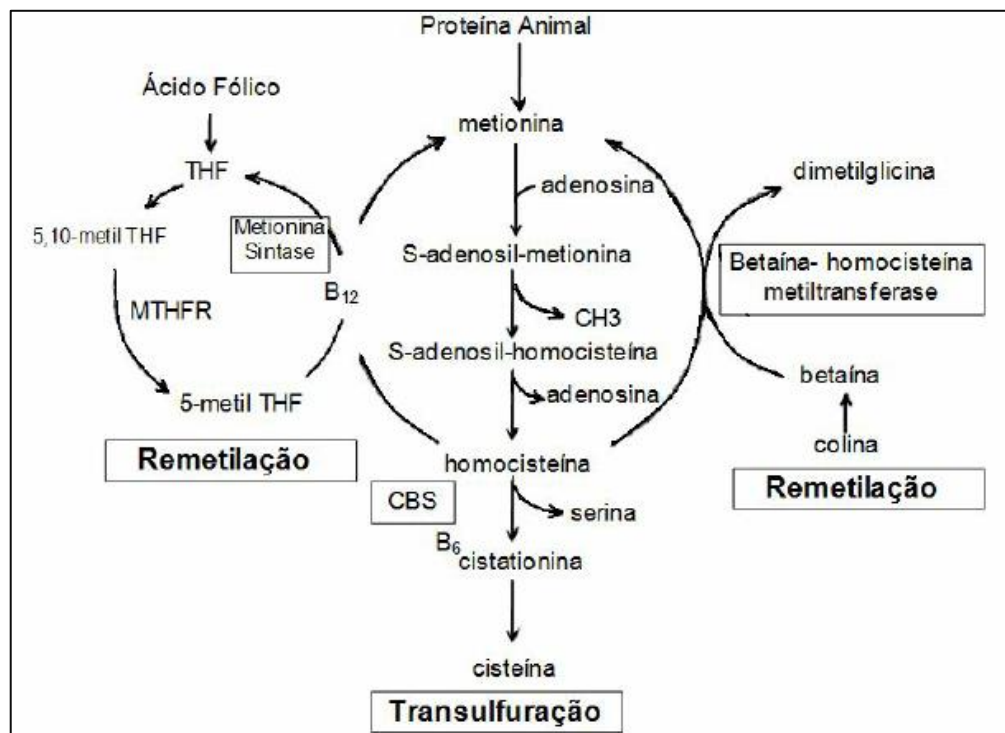


Figura 7. Metabolismo da homocisteína. A figura demonstra os eventos envolvidos na transmetilação, remetilação (dependente e independente de vitamina B) e transulfuração. CH3: metil; CBS: cistationina- β -sintase; 5-metil THF: N-5-metiltetrahydrofolato; MTHFR: 5,10-metiltetrahydrofolato redutase; 5,10 -metil THF: 5,10-metilenotetrahydrofolato; THF: tetrahydrofolato. Fonte: AMORIM et al., 2011.

Na transulfuração, a Hcy é transformada em cisteína por duas reações que envolvem a cistationina- β -sintase (CBS) e a vitamina B6 como cofator. O excesso de

cisteína é oxidada para taurina ou excretada na urina (BROSNAN et al., 2004). Além da importância da síntese da cisteína, a transulfuração participa catabolizando o excesso de Hcy que não foi requerido para metilação (SELHUB, 1999). O processo de transulfuração tem distribuição limitada por acontecer apenas no fígado, rins, intestino delgado e pâncreas (BROSNAN et al., 2004).

As reações de remetilação e transulfuração são reguladas pela diferença de afinidade entre as enzimas envolvidas nessas duas vias metabólicas pela Hcy. A metionina sintase apresenta baixo valor de Km para a Hcy (<0,1mM), ou seja, alta afinidade para esse aminoácido. A CBS por sua vez, apresenta um alto valor de Km para a Hcy (>1 mM), indicando baixa afinidade pelo aminoácido. Deste modo, quando a Hcy se apresenta em baixas concentrações intracelulares a conservação da metionina é favorecida pela alta afinidade da enzima metionina sintase pela Hcy, enquanto em altas concentrações intracelulares de Hcy a via de transulfuração é estimulada (AMORIM et al., 2011).

Os aminoácidos doadores do grupo metil são extremamente importantes para a síntese e metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (KIM, 2004). A manutenção adequada da via de remetilação, onde a Hcy é remetilada à metionina, é essencial para manter o equilíbrio da concentração plasmática de Hcy e está associada a reações de conversão entre as formas disponíveis de folato intracelular e consequente geração de substratos moleculares para a síntese de DNA e RNA (BAILEY, 2010; KIM, 2004). Além disso, a SAH pode inibir o processo de metilação intracelular, pois possui alta afinidade a região catalítica das metiltransferases (JAMES et al., 2002; HU et al., 1999). Desta forma, sua conversão em Hcy e adenosina é necessária para manter as reações de metilação intracelular e consequente manutenção da fisiologia e função celular (TEHLIVETS et al., 2013).

1.2.1 Hiperhomocisteinemia

O desequilíbrio ou comprometimento no metabolismo da Hcy pode elevar seus níveis plasmáticos caracterizando a hiperhomocisteinemia (HHcy). Diversos fatores podem estar relacionados com níveis plasmáticos elevados de Hcy. Dentre eles, podemos citar defeitos genéticos em enzimas relacionadas às vias de transulfuração e remetilação, como a deficiência hereditária da CBS denominada homocistinúria clássica, defeitos genéticos na 5,10-metiltetrahydrofolato redutase e

metionina sintase. Além disso, a HHcy também está relacionada a baixos níveis de vitaminas do complexo B, seja por carência nutricional ou pela ingestão de medicamentos que levam à diminuição dos níveis plasmáticos dessas vitaminas como, por exemplo, medicamentos anticonvulsivos (MORETTI; CARUSO, 2019; SMITH; REFSUM, 2016).

A HHcy é considerada prejudicial às células de diversos sistemas. Estudos utilizando modelos experimentais de HHcy e em células endoteliais encubadas com Hcy indicam que elevados níveis desse aminoácido podem promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente o ânion superóxido (O_2^-) através da auto-oxidação da Hcy ou da cisteína, podendo causar peroxidação lipídica e danos celulares (STRECK et al., 2003; WEISS, 2005; HOGG, 1999). A HHcy também pode causar distúrbios importantes no sistema de defesa antioxidante (BLUNDELL et al., 1996). Streck et al. (2003) demonstraram que a HHcy aumenta as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e diminuem a capacidade antioxidante total dos tecidos (TRAP) in vitro. Essas evidências sugerem que as alterações induzidas pela HHcy são resultado de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, indicando que a HHcy pode promover além do estresse oxidativo, distúrbios importantes no sistema de defesa antioxidante e conseqüentemente desencadear processos pró-inflamatórios.

Existem três hipóteses principais sobre a toxicidade celular causada pela HHcy: homocisteinização de proteínas, indução de estresse oxidativo e ativação de fatores pró-inflamatórios (JI; KAPLOWITZ, 2004). A homocisteinização de proteínas ocorre através da incorporação de Hcy na proteína ocasionando mudanças em sua sequência primária e na fisiologia celular. Essa incorporação pode causar o rompimento do dobramento de proteínas, criação de proteínas alteradas com interações recém-adquiridas ou induzir a respostas autoimunes. Todos esses eventos podem induzir morte celular, seja por estresse do retículo endoplasmático, aumento da degradação proteica, ou até mesmo por indução de uma resposta inflamatória autoimune (JAKUBOWSKI, 2008). O estresse oxidativo induzido por HHcy tem sido explicado por cinco mecanismos distintos: inibição da atividade de enzimas antioxidantes pela Hcy, auto-oxidação da Hcy, geração do ânion superóxido através do desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ruptura da superóxido dismutase extracelular de superfícies endoteliais e ativação de NADPH oxidases. Esses mecanismos levam a disfunções proteicas e celulares, aumentam a

oxidação proteica e peroxidação lipídica (PETRAS et al., 2014; POSTEA et al., 2006). Além disso, a Hcy promove o aumento da produção de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, assim como promove o aumento da ativação do fator de necrose- κ B (NF- κ B) e aumento da expressão da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (JI; KAPLOWITZ, 2004).

Devido a essas evidências a HHcy está associada a doenças vasculares, doenças neurológicas, doença renal crônica, osteoporose, distúrbios gastrointestinais, câncer e defeitos congênitos durante o desenvolvimento embrionário (RIZZO; SCIORSCI, 2019).

1.2.2 Hiperhomocisteínemia e o Sistema Genital Masculino

Pouco se sabe sobre a HHcy e sua interação com o sistema genital masculino. A presença de elevados níveis de Hcy no plasma e no ejaculado tem sido associada a disfunções na espermatogênese levando à infertilidade masculina (GE et al., 2008; EBISCH et al., 2006). Aitken et al. (2016) sugerem que a HHcy se correlaciona com deficiência na função espermática devido a indução da formação de EROs, consideradas as maiores contribuidoras para esta condição por gerar danos ao DNA e peroxidação lipídica. O aumento da peroxidação lipídica é prejudicial aos espermatozoides por afetar a fluidez da membrana plasmática resultando em prejuízos tanto na concentração, quanto na motilidade e morfometria espermática (CHEN et al., 2001). Em um estudo recente, Aitken et al. (2016) observaram que a exposição de espermatozoides à Hcy prejudica tanto a sua motilidade, quanto a capacidade de fertilização, uma vez que os espermatozoides após a exposição apresentam fortes sinais de geração de EROs pela mitocôndria, além de apresentar evidências de diminuição da atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON-1). Os baixos níveis de PON-1 também têm sido associados com prejuízos nos parâmetros de concentração, motilidade e morfologia espermática (VERIT et al., 2009).

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO

Segundo Caspersen (1985), atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelo músculo esquelético que resulta em gasto

energético. O exercício físico é considerado um subconjunto da atividade física, caracterizado pela aplicação de atividades planejadas, estruturadas e repetitivas com a finalidade de melhorar ou manter a aptidão física. Deste modo, o exercício físico tem como finalidade melhorar ou manter a habilidade do indivíduo de executar tarefas diárias com vigor e prontidão, sem indevida fadiga e com ampla energia (CASPERSEN, 1985).

A prática regular de exercícios físicos tem sido associada à melhor qualidade de vida e saúde. Indivíduos que realizam exercício físico regularmente apresentam menor incidência de doenças como aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, acidente vascular encefálico, doença vascular periférica, obesidade, diabetes mellitus tipo II, osteoporose e osteoartrose, alguns tipos de câncer, ansiedade e depressão (CARVALHO et al., 1996). Recentemente, a prática de exercício físico tem sido associada a redução do declínio cognitivo e do risco de demência tanto em modelos animais, quanto em humanos (BROWN et al., 2019).

Para realização do exercício físico é requerido um aumento na oxigenação tecidual, na necessidade de ATP e aumento no metabolismo aeróbico e anaeróbico. Por isso, o fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos pode ser aumentado em até cem vezes durante a prática do exercício. Conseqüentemente, o aporte sanguíneo para outros órgãos como fígado, rins e testículos é diminuído (RADACK et al., 2018). O exercício físico ainda induz a um aumento na formação de EROs que causam danos oxidativos a lipídeos, proteínas e DNA. No entanto, a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo é diminuída em indivíduos que realizam a prática regular de exercício (RADACK et al., 2008; PACKER et al., 2008). Esse fato está associado a adaptações induzidas pelo exercício, que envolve o aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante, aumento da resistência ao estresse oxidativo, menor dano oxidativo e manutenção do equilíbrio redox (RADACK et al., 2018; BOUZID et al., 2015).

Os mecanismos envolvidos na adaptação metabólica induzida pelo exercício englobam mudanças progressivas no conteúdo proteico e atividade enzimática. O exercício físico, principalmente o aeróbico, é responsável por melhorar a capacidade respiratória do indivíduo, refletindo melhora no funcionamento do sistema cardiovascular e sistema respiratório (ROSADO-PEREZ; MENDOZA-NÚÑEZ, 2018). A maior capacidade respiratória está associada com uma melhor resistência ao estresse oxidativo. Tem-se observado que resposta adaptativa é refletida através de

uma relação positiva entre o maior consumo máximo de oxigênio ($VO_2 \text{ max}$) e a citocina anti-inflamatória IL-10, assim como uma relação negativa entre maior $VO_2 \text{ max}$ e o marcador de inflamação fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (PEDERSEN, 2017; ALLEN et al., 2015; ROSADO-PEREZ; MENDOZA-NÚÑEZ, 2018). Essas adaptações também refletem um aumento na concentração de proteínas envolvidas na produção de ATP mitocondrial, no ciclo do ácido tricarboxílico, na mobilização, no transporte e oxidação de ácidos graxos, no metabolismo glicolítico, na capacidade antioxidante, no transporte de glicose e síntese de glicogênio e também na liberação e extração de oxigênio do músculo esquelético (EGAN; ZIERATH, 2013).

Adaptações morfológicas e neurológicas também são geradas pelo exercício, principalmente pelo exercício de resistência, contribuindo para melhor desempenho nos parâmetros de tamanho, força e potência (FOLLAND; WILLIAMS, 2013). A adaptação morfológica envolve o aumento no tamanho do músculo, chamado de hipertrofia muscular e pode estar relacionado com o aumento da força, que se refere à capacidade de mover uma carga externa. As adaptações neurológicas favorecem o aumento da força muscular através de melhorias na ativação da unidade motora, frequência de disparo e sincronia das unidades motoras de alto limiar (EGAN; ZIERATH, 2013; SALE, 1988). Essas adaptações melhoram a função musculoesquelética e podem compensar a perda de força e massa muscular observadas no envelhecimento e em algumas doenças, como a caquexia (BOUZID, 2015).

Os eventos envolvidos na adaptação induzida pelo exercício resultam na melhoria da aptidão aeróbica e da função musculoesquelética, fatores que podem melhorar a disfunção metabólica e prevenir doenças crônicas devido à extensa remodelação metabólica e molecular do músculo esquelético gerada pelo exercício físico (EGAN; ZIERATH, 2013).

1.3.1 Exercício Físico e o Sistema Genital Masculino

Os efeitos do exercício físico sobre o sistema genital masculino são controversos. As funções testiculares (espermatogênese e esteroidogênese) podem ser prejudicadas pelo exercício físico, porém essas alterações podem variar de acordo com o tipo de exercício, intensidade e duração. No exercício crônico é observada uma diminuição na atividade de enzima sorbitol desidrogenase (SDH).

Essa enzima é responsável pela conversão de sorbitol em frutose, uma das principais fontes energéticas das espermatogônias e espermatozoides. Conseqüentemente, a espermatogênese pode ser prejudicada em decorrência da carência energética gerada por esse evento (GOMES et al., 2015).

As fibras densas externas-1 (Odf-1) também são alteradas pelo exercício físico, podendo levar a prejuízos morfológicos aos espermatozoides. Níveis diminuídos de Odf-1 são observados no testículo de ratos submetidos a exercício físico de alta intensidade, enquanto níveis aumentados de Odf-1 são observados no testículo de ratos submetidos a exercício físico de baixa intensidade. As Odf-1 fazem parte dos constituintes da cauda do espermatozoide e são responsáveis por fornecer um recuo elástico para a cauda que auxilia na motilidade espermática e garante proteção ao espermatozoide contra as forças de cisalhamento, impedindo que a cabeça se separe da cauda. Neste contexto, a diminuição dos níveis de Odf-1 pode comprometer a morfologia espermática (TORMA et al., 2014).

A prática de exercício físico de alta intensidade pode acarretar em mudanças no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. As mudanças geradas nesse eixo são influenciadas por três parâmetros principais: características do exercício físico (tipo de exercício, intensidade e duração), fatores individuais (status genético, nutrição, hidratação, composição corporal, estresse psicológico, ansiedade, motivação e doenças endócrinas) e respostas dos hormônios do estresse associados ao exercício (catecolaminas, hormônio do crescimento, cortisol) (SGRÒ; DI LUIGI, 2017, ELIAKIM; NEMET, 2006).

Em geral, a prática de exercício físico agudo de alta intensidade resulta em aumento gradual dos níveis de testosterona, que tendem a retornar aos níveis iniciais após um período de repouso (HACKNEY, 1996). O exercício físico crônico, por sua vez, leva a diminuição dos níveis de testosterona. Baixos níveis de secreção de LH em homens que realizam exercício crônico são observados após desafio com GnRH exógeno. Nesse contexto, é proposto que o mecanismo envolvido na diminuição dos níveis de testosterona induzido pelo exercício físico crônico está relacionado com o desenvolvimento de uma possível resistência hipofisária ao GnRH ou comprometimento na capacidade de produção de LH nesses indivíduos. Como consequência, a biossíntese de testosterona pelas células de Leydig é diminuída e a espermatogênese prejudicada (HACKNEY, 2008; DI LUIGI et al., 2012).

1.3.2 Exercício Físico e a hiperhomocisteínemia

O exercício físico é considerado como uma estratégia importante para reduzir os riscos de doenças cardiovasculares. No entanto, não está claro seu efeito sobre a concentração de Hcy plasmática (MAROTO-SÁNCHEZ et al., 2016). Diversos estudos demonstram alterações nas concentrações plasmáticas de Hcy de seres humanos (DEMINICE et al., 2013; VINCENT et al., 2006) e roedores (NEUMAN et al., 2013; DEMINICE et al., 2011). Esta alteração está relacionada, em parte, à modificação na demanda energética causada pelo exercício que, por sua vez, pode refletir em uma modulação das reações de metilação e subseqüentes modificações nas concentrações plasmáticas de Hcy (DEMINICE et al., 2013).

Nesse sentido, estudos demonstraram que modificações na concentração de Hcy plasmática são dependentes do tipo, volume e intensidade de exercício, bem como da idade e do nível de condicionamento físico do indivíduo (HERRMANN et al. 2003; KÖNIG et al. 2003; GELECEK et al. 2007; DEMINICE et al. 2011). Em um recente estudo de meta-análise Deminice et al. (2016) identificaram que exercícios agudos de baixa e moderada intensidade por um período prolongado de tempo causaram elevação na nos níveis plasmáticos de Hcy após a sessão aguda de exercício. Da mesma forma, quando o exercício é realizado de forma aguda em alta intensidade por um período prolongado também é encontrada uma elevação da Hcy ao fim da sessão. Em um terceiro desfecho, onde ambas as intensidades foram analisadas em conjunto, houve aumento da Hcy plasmática após a sessão aguda de exercício, independentemente do tipo de exercício executado.

Por outro lado, Okura et al. (2006), observaram respostas diferentes de acordo com a dosagem de Hcy plasmática antes do início do exercício. Em indivíduos com níveis normais de Hcy plasmática no início do estudo houve um aumento na concentração de Hcy após o treinamento. Em contraste, o efeito contrário foi observado em indivíduos com hiperhomocisteínemia no início do estudo, em que a Hcy plasmática diminuiu após o exercício físico. No entanto, Deminice et.al. (2016) em sua meta-análise e Silva et.al (2014) em sua revisão sistemática ainda não conseguiram chegar à um consenso sobre os efeitos que o treinamento físico exerce sobre este metabolismo.

Assim, a HHcy tem sido hoje relacionada a diversas doenças e complicações na saúde, principalmente devido à alta toxicidade celular. Apesar do exercício físico

ser considerado um adjuvante na terapia de diversas doenças crônico-degenerativas, pouco se sabe sobre o efeito exercício físico na toxicidade induzida por HHcy.

2 JUSTIFICATIVA

Evidências têm demonstrado que a HHcy resulta em danos oxidativos, peroxidação lipídica e afeta o sistema de defesa antioxidante gerando lesões celulares. Os eventos promovidos pela HHcy estão intimamente ligados à deficiência na função espermática, refletindo em prejuízos na concentração, motilidade, morfologia e capacidade de fertilização desses espermatozoides. Devido aos diversos prejuízos gerados pela HHcy aos espermatozoides, ela tem sido considerada um fator prejudicial à fertilidade masculina. Alguns estudos têm evidenciado os efeitos da HHcy diretamente nos espermatozoides, no entanto, ainda é necessária uma melhor compreensão sobre o efeito da HHcy nos órgãos do sistema genital masculino.

A prática regular de exercícios físicos está associada à melhor qualidade de vida e saúde. Os eventos envolvidos na adaptação induzida pelo exercício resultam na melhoria da aptidão aeróbica e da função musculoesquelética, podendo melhorar a disfunção metabólica e prevenir doenças crônicas. No entanto, o exercício físico de alta intensidade induz a prejuízos na espermatogênese e desequilíbrio no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, prejudicando a funcionalidade do sistema genital. Do mesmo modo, alterações nas concentrações plasmáticas de Hcy são relatadas após a prática do exercício físico.

Apesar dos diversos estudos envolvendo o exercício físico, os resultados de seus efeitos sobre o sistema genital masculino são controversos. Da mesma maneira, o efeito da associação da HHcy e exercício físico ao sistema genital masculino ainda é desconhecido. Portanto, este estudo contribui para o entendimento dos efeitos da HHcy e do exercício físico, isolados ou associados, desde a fase puberal até a fase adulta sobre o sistema genital masculino em camundongos Swiss adultos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da hiperhomocisteínemia induzida experimentalmente por sobredosagem de dl-homocisteína thiolactona e do exercício físico, isolados ou associados, desde a fase puberal até a fase adulta sobre os órgãos do sistema genital masculino de camundongos Swiss adultos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar se a hiperhomocisteínemia e o exercício físico, isolados ou associados, promovem alterações estruturais nos órgãos do sistema genital;
- Determinar se ocorrem danos funcionais no testículo e epidídimo em decorrência da exposição a esses fatores;
- Determinar se esses fatores causam alterações no perfil inflamatório e níveis de estresse oxidativo do testículo e epidídimo;
- Avaliar se a produção de testosterona é prejudicada em decorrência da hiperhomocisteínemia, do exercício ou associação de ambos.
- Avaliar se a hiperhomocisteínemia e o exercício, isolados ou associados, geram alterações morfológicas, funcionais e perda de viabilidade nos espermatozoides;
- Contribuir com dados sobre os efeitos de ação da hiperhomocisteínemia, do exercício físico e da associação de ambos sobre o sistema genital.

4 ARTIGO

A exposição à hiperhomocisteïnemia e ao exercício físico, isolados ou associados, desde a fase puberal até a fase adulta alteram parâmetros testiculares e epididimários em camundongos Swiss

Artigo será submetido à revista — “Reproductive Sciences”

ISSN: 1933-7191;

F.I. 2017: 2.548

Qualis CAPES 2013-2016 (Medicina II): B1

A exposição à hiperhomocisteínemia e ao exercício físico, isolados ou associados, desde a fase puberal até a fase adulta alteram parâmetros testiculares e epididimários em camundongos Swiss

Dayane P. Santos^{1,2}, Diogo F. Ribeiro³, Giovanna F. Frigoli¹, Rafaela P. Erthal^{1,2}, Suellen R. S. Scarton^{1,2}, Gláucia E. M. L. Siervo^{1,2}, Fábio R. F. Seiva⁴, Larissa S. Ferrari², Waldiceu A. Verri Junior², Rafael Deminice³, Glaura S. A. Fernandes^{1*}

1 – Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil

2 – Departamento de Patologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil

3 – Departamento de Educação Física, Centro de Educação Física e Esporte, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil

4 – Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, Bandeirantes, Paraná, Brasil

Universidade Estadual de Londrina

***Corresponding author**

Tel.: +55 43 33714417

E-mail address: glaura@uel.br (G.S. A. Fernandes)

Resumo

A hiperhomocisteínemia induz ao estresse oxidativo e por isso tem sido associada a deficiência na espermatogênese e função espermática. No entanto, pouco se sabe sobre sua interação com os órgãos do sistema genital masculino. Outro fator relacionado ao estresse oxidativo e mudanças no sistema de defesa antioxidante é o exercício físico. As funções testiculares podem ser prejudicadas ou favorecidas, de acordo com o tipo, intensidade e duração do exercício físico. Além disso, após o exercício físico podem ser geradas elevações nas concentrações plasmáticas de homocisteína. Portanto, este estudo buscou avaliar os efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, desde a fase puberal até a fase adulta sobre os órgãos do sistema genital masculino de camundongos Swiss. Para isso, 48 camundongos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (controle, hiperhomocisteínemia, exercício físico e hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico). A indução de hiperhomocisteínemia ocorreu pela administração diária de dl-homocisteína thiolactona via gavagem durante todo o período experimental (DPN28 ao DPN80). O exercício físico foi realizado através de corrida voluntária em rodas de exercício. Após o período experimental o sangue foi coletado para determinação da concentração de testosterona. Os testículos e epidídimos foram coletados, pesados e utilizados para contagem espermática, análises morfológicas e histopatológicas, determinação da atividade da mieloperoxidase, avaliação da lipoperoxidação e atividade da catalase. Além disso, foi realizada dosagem de colesterol testicular. Os ductos deferentes foram coletados, pesados e deles foram obtidos espermatozoides para análises de morfologia, integridade acrossômica, atividade mitocondrial e motilidade. As próstatas e tecido adiposo periepididimal foram coletados, pesados e descartados. A hiperhomocisteínemia, isolada ou associada ao exercício físico, causou alterações morfométricas e histopatológicas no testículo. No epidídimo, houve remodelação tecidual na região da cabeça induzida por ambos fatores. Não houve aumento atividade de mieloperoxidase, aumento da lipoperoxidação ou comprometimento da atividade da catalase no testículo e epidídimo, porém a concentração de colesterol testicular foi elevada. A produção de testosterona e a qualidade espermática não foi prejudicada. Conclui-se que a hiperhomocisteínemia, isolada ou associada ao exercício físico, desde a fase puberal até a fase adulta causa alterações estruturais testiculares. Propomos que essas alterações estão relacionadas ao processo de homocisteinização. Além disso, a

hiperhomocisteínemia e o exercício físico, isolados ou associados, acarretam em modificações teciduais na cabeça epididimária. Apesar das alterações estruturais observadas, a fisiologia testicular e epididimária não foram alteradas e a qualidade espermática foi preservada.

Palavras-chave: Sistema reprodutor masculino, reprodução, homocisteína, exercício físico

1. Introdução

O processo de desmetilação da metionina, aminoácido essencial presente nas proteínas alimentares principalmente de origem animal, resulta na formação de homocisteína. A homocisteína interage com duas vias de biotransformação, a remetilação e a transulfuração, responsáveis pela conversão de homocisteína em metionina e cisteína respectivamente (DE LA CALLE et al., 2003). A via de remetilação ocorre em todo o organismo e envolve a participação da enzima metionina sintase que utiliza a vitamina B12 como cofator. Essa via também pode ocorrer pela ação da enzima betaína homocisteína metiltransferase que emprega betaína como doador de metila em uma reação independente de vitamina B12, ocorrendo exclusivamente no fígado (BROSNAN et al., 2004; FINKELSTEIN, 2000; DE LA CALLE et al., 2003). A via de transulfuração envolve a enzima cistationina- β -sintase (CBS) e que utiliza a vitamina B6 como cofator (BROSNAN et al., 2004).

Alterações nas enzimas envolvidas na via de remetilação e na via de transulfuração, assim como deficiência nos níveis de vitaminas do complexo B ou outros fatores nutricionais podem gerar desequilíbrio ou comprometimento no metabolismo da homocisteína. Como resultado, os níveis plasmáticos de homocisteína se elevam caracterizando a hiperhomocisteinemia (MORETTI; CARUSO, 2019; SMITH; REFSUM, 2016).

A hiperhomocisteinemia é prejudicial às células e está associada a doenças vasculares, doenças neurológicas, doença renal crônica, osteoporose, distúrbios gastrointestinais, câncer e defeitos congênitos durante o desenvolvimento embrionário (RIZZO; SCIORSCI, 2019). Três hipóteses principais são propostas para explicar a toxicidade celular causada pela hiperhomocisteinemia: (1)

homocisteinização de proteínas, (2) indução de estresse oxidativo e (3) ativação de fatores pró-inflamatórios (JI; KAPLOWITZ, 2004).

A detecção de elevados níveis de homocisteína no plasma e no ejaculado tem sido associada a disfunções na espermatogênese (GE et al., 2008; EBISCH et al., 2006). Aitken et al. (2016) sugerem que a hiperhomocisteïnemia está relacionada à deficiência na função espermática devido à indução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são responsáveis por gerar danos ao DNA e causar peroxidação lipídica, resultando em prejuízos tanto na concentração, como na motilidade e morfometria espermática (CHEN et al., 2001).

A prática regular de exercícios físicos está associada à menor incidência de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, obesidade, diabetes mellitus tipo II, osteoporose, osteoartrose, alguns tipos de câncer, ansiedade e depressão refletindo uma melhor qualidade de vida e saúde nesses indivíduos (BROWN et al., 2019; CARVALHO et al., 1996). O exercício físico agudo de alta intensidade está associado a elevações nas concentrações plasmáticas de homocisteína em seres humanos (DEMINICE et al., 2013; VINCENT et al., 2006) e roedores (NEUMAN et al., 2013; DEMINICE et al., 2011). Porém, não há um consenso sobre os efeitos que o treinamento físico exerce sobre o metabolismo desse aminoácido (Deminice et.al. 2016; Silva et.al, 2014). Além disso, apesar de os efeitos do exercício físico sobre o sistema genital masculino terem sido bastante estudados nos últimos anos, as informações ainda são bastante controversas. As funções testiculares (espermatogênese e esteroidogênese) podem ser prejudicadas ou favorecidas, de acordo com o tipo, com a intensidade e com a duração do exercício físico (GOMES et al., 2015).

Deste modo, este estudo buscou avaliar os efeitos da hiperhomocisteínemia induzida experimentalmente por sobredosagem de dl-homocisteína thiolactona e do exercício físico, isolados ou associados, desde a fase puberal até a fase adulta sobre os órgãos do sistema genital masculino de camundongos Swiss adultos.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e condições experimentais

Camundongos Swiss machos foram obtidos no dia pós-natal 21 (DPN 21) do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (CCB-UEL) e foram mantidos por 7 dias no Biotério do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução para aclimatação ao novo ambiente antes do início do período experimental. Os animais foram distribuídos individualmente em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm) durante todo o experimento e receberam ração e água *ad libitum*. A temperatura ambiente e luz foram controladas ($\pm 23^{\circ}\text{C}$; fotoperíodo com ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, luzes desligadas às 19 horas). A massa corporal, consumo de água e ração foram mensurados três vezes por semana. O cuidado com os animais e procedimentos de manipulação seguiram as recomendações do Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório e o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina - Ofício Circular CEUA nº102/2017 (Anexo A).

2.2. Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos randomicamente em quatro grupos experimentais: Controle (C, n=13), Hiperhomocisteínemia (H, n=12), Exercício Físico

(E, n=11) e Hiperhomocisteïnemia associada ao exercício físico (H+E, n=12). A indução de hiperhomocisteïnemia ocorreu para os grupos H e H+E através da administração via gavagem de 1g/kg de massa do animal/dia do aminoácido dl-homocisteína thiolactona (Sigma Aldrich®) diluído em 100 µL de água filtrada (veículo) (CELOTTO et al., 2010). A fim de reduzir possíveis interferentes de manipulação os animais dos grupos C e E também foram submetidos diariamente a gavagem, porém contendo apenas 100 µL de água filtrada (veículo). A administração da solução de dl-homocisteína thiolactona para os grupos H e H+E e água filtrada para os grupos C e E ocorreu durante todo o período experimental, iniciado no DPN28 e finalizado no DPN80 (52 dias consecutivos). O período experimental foi iniciado na fase puberal e se estendeu até a fase adulta (JEAN-FAUCHER et al., 1983). Os camundongos dos grupos E e H+E realizaram exercício físico durante todo o período experimental através de corrida voluntária realizada em rodas de exercício específicas para camundongos. Este modelo permite avaliar o desempenho físico e resistência do animal, simulando o treinamento de resistência em humanos. As rodas de exercício foram adaptadas às caixas de biotério convencionais e a distância percorrida foi anotada diariamente utilizando odômetros adaptados às rodas de exercício (GOH; LADIGES, 2015) (Apêndice A).

2.3. Coleta de materiais biológicos

Ao fim do período experimental, no 53^o dia, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (BioChimico®) em câmara de inalação e submetidos a eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado em tubo heparinizado (Hemofol®) e a partir dele foi obtido plasma para dosagem de testosterona. Os testículos direitos foram coletados, pesados em balança analítica de precisão e utilizados para

contagem espermática, análise de estresse oxidativo, dosagem de colesterol e avaliação da atividade de mieloperoxidase (n=6 por grupo para cada análise). Os testículos esquerdos foram destinados à análise morfométrica, histopatológica, cinética da espermatogênese e contagem do número de células de Sertoli (n=6 por grupo para cada análise). Os epidídimos direitos foram coletados, pesados em balança de precisão e utilizados para contagem espermática, análises de estresse oxidativo, dosagem de colesterol e avaliação da atividade de mieloperoxidase (n=6 por grupo para cada análise). Os epidídimos esquerdos foram destinados à análise estereológica e histopatológica (n=6 por grupo para cada análise). Os ductos deferentes foram coletados, pesados e deles foram retirados espermatozoides para análise morfológica (n=10 por grupo), integridade acrossômica (n=5 por grupo), atividade mitocondrial (n=5 por grupo) e de motilidade espermática (n=10 por grupo). As próstatas e tecido adiposo periepididimal foram coletados, pesados e descartados.

2.4. Processamento histológico do testículo e epidídimo

Os testículos e epidídimos foram coletados e fixados durante 6 horas em fixador modificado de Davidson (MDF – 30% de formalina 40%, 15% de álcool absoluto, 5% de ácido acético e 50% de água deionizada) a 4°C e pós fixados por 18 horas em paraformaldeído 4% (PFA - 4g de paraformaldeído, 100 ml de tampão fosfato salino [pH 7,4; 0,1M]) a 4°C (WANG et al., 2016). Os testículos e epidídimos foram incluídos em Paraplast® e cortes semi-seriados foram obtidos em 5µm. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e examinadas sob microscopia de luz para análise morfométrica, histopatológica, dinâmica da espermatogênese e contagem do número de células de Sertoli do testículo e

análise estereológica e histopatológica do epidídimo, como descritas por Fernandes et al. (2011).

2.4.1 Diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio germinativo

Dez cortes de túbulos seminíferos aleatórios, por animal, no estágio IX do ciclo do epitélio germinativo foram fotodocumentados e examinados. As imagens foram obtidas através de um fotomicroscópio Opton sob ampliação de 100x e o software BELview versão 6.2.3.0 (BEL Engineering) foi utilizado para analisar as imagens. Os mesmos túbulos descritos acima foram utilizados para analisar o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio germinativo. Em cada túbulo seminífero foi calculada a média de quatro medidas para o diâmetro e para a altura do epitélio e as médias foram utilizadas na análise estatística.

2.4.2 Análise histopatológica dos testículos

A avaliação histopatológica foi realizada de modo quantitativo utilizando-se cortes semi-seriados transversais do órgão. Para cada animal foram analisados 100 cortes de túbulos seminíferos classificados em normais ou anormais. Os túbulos foram considerados anormais frente à presença de células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, vacuolização do epitélio ou presença de células imaturas no lúmen tubular.

2.4.3 Avaliação do processo espermatogênético (cinética da espermatogênese)

Para avaliação do processo espermatogênico 100 túbulos seminíferos aleatórios por animal foram classificados em quatro categorias: Estágios I-VI, VII-

VIII, IX-XI e XII do ciclo do epitélio germinativo, de acordo com Leblond e Clermont, 1952, sob um microscópio de luz (Opton) com ampliação de 100x.

2.4.4 Contagem do número de células de Sertoli

Para determinação do número de células de Sertoli foram contados, sob microscopia de luz, os núcleos das células de Sertoli em 20 túbulos seminíferos por camundongo no estágio VII da espermatogênese (FAVARETO et al., 2011).

2.4.5 Análise estereológica e histopatológica do epidídimo

Para análise estereológica, foram fotodocumentadas 10 secções aleatórias, por animal, da região da cabeça (Região 2A) e da cauda (Região 5A/B) do epidídimo (MILLER; KILLIAN, 1987). As imagens foram capturadas usando um fotomicroscópio (Opton) e software BELView versão 6.2.3.0 (BEL Engineering) para Windows sob ampliação de 100x. Esta análise foi realizada usando a grade multifuncional de Weibel com 168 pontos (WEIBEL, 1963) para quantificar os componentes teciduais do epidídimo (epitélio, estroma e luz).

A análise histopatológica epididimária foi realizada de modo qualitativo utilizando-se secções transversais das regiões de cabeça e da cauda usando um microscópio Opton (ampliação de 100x).

2.5. Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços para avaliar a migração de neutrófilos para o testículo e epidídimo de acordo com Casagrande et al. (2006). As amostras de tecido foram coletadas em tampão de K_2HPO_4 (pH 6,0), contendo 0,5% HTAB, homogeneizadas com auxílio de Polytron® (PT3100) e centrifugadas a

12.300 rpm à 4°C, por 2 minutos. Após a centrifugação, 10 µl de amostra do sobrenadante foram misturadas com 200 µl de solução tampão de fosfato 50 mM (pH 6,0), contendo 0,167 mg/ml de dihidroclorato de O-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A reação foi lida por espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm, e a atividade da MPO foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos.

2.6. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade da catalase

Amostras de testículo e epidídimo foram homogeneizadas em L-Beader com esferas de zircônio utilizando-se fosfato de sódio gelado (10 mM; pH 7,4). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 8.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e utilizado para as dosagens de proteínas, por meio de kit comercial (Analisa©). Como marcador da lipoperoxidação foi determinada a concentração de malondialdeído (MDA) pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) com base na metodologia de Slater e Sawyer (1971). As amostras geladas foram centrifugadas em meio ácido com ácido tricloroacético 10%, durante 10 minutos à 7.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e combinado com TBA 0,67%. As amostras foram aquecidas a 95°C durante 10 minutos e em seguida rapidamente resfriadas. As leituras foram feitas em 535 nm e comparadas com uma curva de padrão de MDA em meio ácido.

A atividade da catalase foi determinada pelo consumo de peróxido de hidrogênio e expressa em µmol/min/mg proteína. O meio foi composto por tampão fosfato de potássio 50mmol/L e H₂O₂ 10mmol/L. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 240 nm de acordo com Beers e Sizer (1952).

2.7. Concentração de colesterol

Amostras de testículo foram homogeneizadas em L-Beader com esferas de zircônio utilizando-se fosfato de sódio gelado (10 mM; pH 7,4). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 8.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e utilizado para as dosagens de colesterol por meio de kit comercial (Analisa©).

2.8. Produção diária de espermatozoides e tempo de trânsito

Para avaliar a produção diária de espermatozoides (PDE) e tempo de trânsito espermático, os testículos e epidídimos foram pesados e homogeneizados, conforme descrito por Fernandes et al. (2007). Após a diluição do homogenato, um pequeno volume de amostra foi transferido para uma câmara de Neubauer (quatro campos por animal) para a contagem de espermátides resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermatogênese). Para calcular a PDE, a concentração de espermátides por testículo foi dividida por 4,84, que se refere ao número de dias para os quais as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero. Para calcular o tempo de trânsito dos espermatozoides através do epidídimo, o número de espermatozoides presentes no epidídimo foi dividido pelo valor de PDE de cada animal.

2.9. Morfologia espermática

Esta análise foi realizada conforme descrito por Fernandes et al. (2007). O conteúdo dos ductos deferentes foi removido por lavagem interna com 0,3 mL de solução salina formol a 10%. A partir desta solução foram preparados esfregaços em lâminas histológicas e observados com um fotomicroscópio Opton (aumento de

400x). Duzentos espermatozoides por animal foram classificados em três categorias gerais: morfologia normal, anormalidades da cabeça (sem curvatura característica ou forma isolada, isto é, sem cauda ligada) e anormalidades da cauda (quebradas, enroladas em espiral ou isoladas, isto é, sem cabeça ligada).

2.10. Análise da integridade do acrossôma de espermatozoides

Para a avaliação da integridade de acrossôma foi utilizado um método baseado na reação do PNA-FITC com componentes da membrana acrossomal externa do espermatozoide de acordo com CHENG et al. (1996). Os espermatozoides foram coletados em meio fluido tubário humano modificado (HTF) e a partir dessa solução foi realizado um esfregaço. A lâmina foi permeabilizada com metanol absoluto e em seguida corada com a solução de PNA-FITC 40µg/ml em tampão PBS. Cem espermatozoides foram analisados em microscópio de fluorescência (Microscópio fotônico Axio Zeiss) e as células foram classificadas em espermatozoides com acrossôma integro ou espermatozoides com dano de acrossôma.

2.11. Motilidade espermática

A motilidade espermática foi avaliada de acordo com os métodos descritos por Siervo et al. (2015). Resumidamente, o ducto deferente foi lavado com 0,3 mL de HTF modificado contendo gentamicina (Irvine Scientific) a 34°C-36°C para obtenção de espermatozoides. Uma alíquota de 10 µL da solução contendo espermatozoides foi transferida para uma câmara de contagem de Makler aquecida (Sefi-Medical, Haifa, Israel). A motilidade dos espermatozoides foi avaliada por estimativa visual (100 espermatozoides por animal) sob um microscópio de luz (Motic) com uma

ampliação de 100x. Os espermatozoides foram classificados como móveis ou imóveis.

2.12. Análise de atividade mitocondrial de espermatozoides

Para avaliação da atividade mitocondrial de espermatozoides utilizou-se um método baseado na incorporação seletiva do corante DAB pelas mitocôndrias ativas presentes na peça intermediária do espermatozoide (HRUDKA, 1987). Os espermatozoides foram coletados do ducto deferente em 300µL PBS. Uma alíquota de 100µL da solução foi adicionada a 200µL de solução corante de DAB (3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro). A mistura foi incubada por uma hora a 37°C. Após a incubação um esfregaço foi preparado, fixado em PBS com formaldeído (10%) e 200 células foram analisadas e classificadas em DAB classe I (peça intermediária totalmente corada), DAB classe II (peça intermediária parcialmente corada) e DAB classe III (ausência de coloração na peça intermediária).

2.13. Dosagem de testosterona plasmática

Para dosagem de testosterona plasmática as amostras de sangue foram centrifugadas a 2400 rpm por 20 minutos. As concentrações plasmáticas foram dosadas através do plasma pela técnica de ELISA de competição utilizando kit Testosterone ELISA (Cayman Chemical, item N° 582701).

2.14. Análise estatística

A distribuição dos dados foi avaliada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi avaliada através do teste de Levene. Os dados que não apresentaram distribuição gaussiana foram transformados em logaritmo natural (Ln) e testados novamente para normalidade.

Dados paramétricos foram avaliados pelo teste t de Student ou pelo teste de análise de variância (ANOVA) com teste *a posteriori* de Dunnett e os dados foram expressos como média (\pm E.P.M). Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *a posteriori* de Dunn e os dados foram expressos como mediana (Q1-Q3). Os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa IBM® SPSS® Statistics versão 20.0 (International Business Corporation 1989,2011).

3. Resultados

3.1 Massa corporal, massa dos órgãos e consumo de ração e água

Não houve diferença significativa na massa corporal inicial e final dos camundongos entre os grupos experimentais. Do mesmo modo, os tratamentos não influenciaram nas massas do testículo, epidídimo, ducto deferente e próstata. Entretanto, o exercício físico, tanto isolado como associado à hiperhomocisteínemia, diminuiu a massa do tecido adiposo periepididimal em relação ao grupo controle (Tabela 1).

O consumo de ração e água dos animais dos grupos H, E e H+E apresentou similaridade com os animais do grupo controle (dados não mostrados).

3.2 Distância percorrida durante o exercício

Em relação a distância média percorrida pelos animais com acesso a rodas de exercício observou-se similaridade entre os grupos experimentais (E e H+E) durante todo o período experimental (Tabela 2). Embora diferenças significativas não tenham sido observadas, o grupo H+E percorreu em geral distâncias 21% menores que o grupo E no decorrer do período experimental.

3.3 Análise morfométrica e dinâmica da espermatogênese

A análise morfométrica evidenciou que houve redução no diâmetro dos túbulos seminíferos do grupo H em relação ao grupo controle (Tabela 3). O exercício físico, assim como a sua associação a hiperhomocisteínemia, não alterou o diâmetro dos túbulos. Em relação à altura do epitélio germinativo (Tabela 3), foi observado que a hiperhomocisteínemia, exercício físico e a associação de ambos causou redução significativa em relação ao grupo controle.

Embora alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio germinativo tenham sido observadas, a cinética da espermatogênese manteve-se inalterada entre grupos experimentais (Tabela 3).

3.4 Análise histopatológica testicular e número de células de Sertoli

A análise histopatológica mostrou um aumento significativo no número de túbulos seminíferos que apresentaram alterações histopatológicas apenas nos grupos H e H+E em relação ao grupo controle (Figura 1). As alterações histopatológicas observadas correspondem à presença de células imaturas no lúmen tubular, presença de células acidófilas e presença de vacúolos no epitélio tubular. Além disso, o grupo H+E apresentou diminuição do número de células de Sertoli em relação ao grupo controle (Figura 2).

3.5 Análise estereológica e histopatológica do epidídimo

A análise estereológica da região da cabeça do epidídimo (Tabela 4) evidenciou que houve diminuição no percentual do compartimento luminal dos grupos H, E e H+E em relação ao grupo controle. Por outro lado, houve aumento no percentual do compartimento epitelial desses mesmos grupos. Nessa mesma região

houve aumento no percentual do compartimento estromal apenas dos grupos H e H+E em relação ao grupo controle.

A análise estereológica da região da cauda epididimal (Tabela 4) não apontou diferenças no percentual dos compartimentos luminal, estromal e epitelial, sendo similar entre os grupos.

A hiperhomocisteïnemia e o exercício físico, isolados ou associados, não induziram alterações histopatológicas no epidídimo (cabeça e cauda) (dados não mostrados). Em todos os grupos o tecido estromal e epitelial apresentaram aspecto aparentemente normal, assim como o lúmen apresentou apenas espermatozoides em seu conteúdo.

3.6 Atividade da mieloperoxidase

A análise da atividade de mieloperoxidase não evidenciou diferenças significativas na migração de neutrófilos para o testículo e epidídimo dos grupos H, E e H+E em relação ao grupo controle (Figura 3).

3.7 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e atividade de catalase

A análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no testículo não mostrou alterações nas concentrações de malondialdeído entre os grupos experimentais. No entanto, no epidídimo houve diminuição na concentração de malondialdeído no grupo H em relação ao grupo controle (Figura 4).

A análise da atividade de catalase no testículo evidenciou redução da atividade da catalase no grupo E em relação ao grupo controle. Neste órgão não foram observadas alterações na atividade desta enzima nos demais grupos

experimentais. Contudo, no epidídimo houve aumento da atividade da catalase apenas no grupo H+E (Figura 4).

3.8 Concentração de colesterol

A dosagem de colesterol no testículo evidenciou que a hiperhomocisteínemia assim como a sua associação ao exercício físico causou elevação na concentração de colesterol em relação ao grupo controle (Figura 5).

3.9 Parâmetros espermáticos

Os resultados das análises espermáticas estão expressos na Figura 6 e Tabela 5. Os tratamentos não causaram alteração no número de espermátides maduras resistentes a homogeneização e produção diária de espermatozoides pelos testículos entre os grupos experimentais. Do mesmo modo, o percentual de espermatozoides morfologicamente anormais manteve-se inalterado após o período experimental. A integridade do acrossoma não foi prejudicada, uma vez que não houve diferença no número de espermatozoides com dano no acrossoma em resposta aos tratamentos.

A hiperhomocisteínemia, assim como o exercício físico e a associação de ambos, não ocasionou diferenças no tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo em relação ao grupo controle. Por consequência, não houve diferença no número de espermatozoides imóveis entre os grupos. A análise de atividade mitocondrial (Tabela 5) não evidenciou prejuízo no percentual de mitocôndrias ativas nos espermatozoides entre os grupos. Portanto, não houve diferenças nos percentuais de espermatozoides classificados como DAB classe I, DAB classe II e DAB classe III.

3.9 Testosterona plasmática

A dosagem de testosterona plasmática mostrou que os níveis desse hormônio foram similares entre os grupos, indicando que os tratamentos não influenciaram na produção de testosterona (Figura 7).

4. Discussão

O presente estudo traz novos achados em relação aos efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, assim como a associação dos mesmos, sobre o sistema genital masculino de camundongos Swiss. Nosso delineamento e nossas técnicas possibilitaram trazer informações não apenas sobre os efeitos da hiperhomocisteínemia na qualidade espermática, mas também sobre os efeitos da mimetização deste distúrbio metabólico diretamente na fisiologia e estrutura do testículo e epidídimo. Além disso, para avaliação dos efeitos do exercício físico este trabalho utilizou como modelo a corrida voluntária em rodas que, dentre outras vantagens, permite eliminar interferentes de estresse gerado pela manipulação dos animais e exercício forçado.

O modelo de exercício utilizado neste estudo consistiu em permitir aos animais acesso livre a rodas de corrida e possibilita que os camundongos corram espontaneamente (GOH; LADIGES, 2015). Este modelo apresenta vantagens em relação ao modelo de exercício forçado, pois possibilita um padrão de corrida semelhante ao comportamento de corrida natural dos camundongos. Além disso, a realização do exercício físico ocorre em condições não estressantes e respeita o ritmo de atividade do animal, uma vez que os camundongos apresentam preferência para a atividade noturna (MANZANARES et al., 2019; DE BONO et al., 2006).

A similaridade no ganho de massa corporal durante o período experimental está associada com a similaridade no consumo de ração e água pelos animais dos diferentes grupos experimentais no presente estudo. Entretanto, a redução de aproximadamente 40% na massa do tecido adiposo periepídidimo nos grupos que realizaram exercício físico, isolado ou associado a hiperhomocisteinemia está de acordo com o estudo prévio de Lee (2018). Estes autores evidenciaram que a corrida voluntária em rodas de exercício por 6 semanas causa redução de 40% na massa do tecido adiposo periepídidimo em camundongos C57BL/6J machos. O resultado pode estar associado a uma modulação adaptativa, onde o exercício físico induz a liberação de catecolaminas que, por sua vez, estimulam a lipólise. Estudos afirmam que ocorre aumento dos níveis e atividade das enzimas lipase de triacilglicerol dos adipócitos e lipase hormônio-sensível em animais exercitados. Essas enzimas estão envolvidas no primeiro ponto de hidrólise do triacilglicerol nos adipócitos e translocação da gota lipídica respectivamente (NOKURA et al., 2015; OGASAWARA et al., 2012).

O tecido adiposo periepídidimo é responsável pela síntese e secreção de adipocinas, que atuam como fatores endócrinos responsáveis por modular diversos processos fisiológicos, dentre eles a manutenção do eixo reprodutivo (KAWWASS et al., 2015). Um exemplo dessas adipocinas é a leptina que é sintetizada de forma proporcional a massa do tecido adiposo. A leptina atua como um sinal metabólico para o sistema genital informando que existem reservas lipídicas disponíveis para atender as demandas calóricas da reprodução (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; BARASH et al., 1996). Desta forma, redução na disponibilidade desses fatores poderia resultar em prejuízos ao sistema genital masculino (MATHEW et al., 2018). Apesar da redução na massa do tecido adiposo periepídidimo, o presente estudo

não evidenciou alterações nos parâmetros espermáticos e dosagem de testosterona plasmática, indicando que não houveram alterações nas funções endócrinas do tecido adiposo.

A integridade dos parâmetros espermáticos evidenciada em todos os grupos experimentais mostra que, apesar dos tratamentos, a qualidade espermática dos camundongos foi mantida. A manutenção da qualidade espermática está associada à integridade da fisiologia do testículo e epidídimo confirmada pelos resultados de produção espermática diária e tempo de trânsito espermático, assim como a cinética da espermatogênese e as dosagens de testosterona plasmática. Similarmente, Gonçalves et al. (2016), observaram que o exercício físico de resistência durante 13 semanas não alterou a cinética da espermatogênese e concentração de testosterona plasmática de ratos UChB. No entanto, nossos resultados em relação a hiperhomocisteinemia diferem dos resultados descritos por Sönmez et al. (2007), onde a administração intraperitoneal de 0,71 mg/kg/dia de homocisteína por 6 semanas em ratos Wistar adultos resultou em redução do percentual de espermatozoides móveis e na concentração plasmática de testosterona. Do mesmo modo, Aitken et al. (2016) mostraram que a incubação de espermatozoides de humanos com 0,5 mM de homocisteína thiolactona por 24 e 48 horas resulta em perda de motilidade espermática devido a aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e subsequente aumento da peroxidação lipídica.

Embora a fisiologia tenha sido mantida, alterações estruturais no testículo e epidídimo foram observadas. No testículo, a hiperhomocisteinemia, isolada ou associada ao exercício físico, foi a principal responsável pelos danos estruturais observados. Essas alterações não estão relacionados a retardo no desenvolvimento dos túbulos seminíferos, uma vez que a cinética da espermatogênese não

evidenciou estagnação dos estágios do epitélio germinativo. Nossas análises também evidenciaram que os danos estruturais testiculares não estão relacionados com aumento no níveis de lipoperoxidação e comprometimento da atividade da enzima catalase. Entretanto, Akkaya et al. (2016) observaram que a indução de hiperhomocisteínemia em ratos Wistar por administração oral de 1g/kg/dia de metionina por 30 dias prejudicou a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no testículo e aumentou o número de células apoptóticas nesse tecido.

O colesterol é um abundante componente da membrana plasmática das células. No testículo o colesterol desempenha importante papel no desenvolvimento das células germinativas e atua como precursor de testosterona (FON TRACER et al., 2010). As células de Sertoli possuem a capacidade de sintetizar o colesterol a partir do acetato, no entanto, devido as altas necessidades celulares essa biossíntese não é suficiente para suprir a espermatogênese (AKPOVI et al., 2014). Assim, as células de Sertoli captam moléculas de colesterol HDL, oriundas da circulação sanguínea, e realizam o seu transporte para o compartimento adluminal dos túbulos seminíferos. Além disso, ocorre a reciclagem de colesterol nos túbulos seminíferos através da fagocitose pelas células de Sertoli de células germinativas apoptóticas e corpos residuais contendo colesterol. Mecanismos regulatórios, envolvendo influxo e efluxo de colesterol, mantêm suas concentrações equivalentes no compartimento intersticial e nos túbulos seminíferos (AKPOVI et al., 2014; KEBER et al., 2013; HERMO et al., 2010). Desta forma, o aumento na concentração de colesterol no testículo pode ocorrer como resultado do aumento da fagocitose de células germinativas apoptóticas pelas células de Sertoli (APKOVI et al., 2006).

Nossas análises indicam que os danos estruturais gerados pela hiperhomocisteínemia nos testículos não foram causados por aumento no níveis de lipoperoxidação ou comprometimento da atividade da enzima catalase. Deste modo, devido ao aumento da concentração de colesterol testicular causada pela hiperhomocisteínemia, propomos que os danos estruturais no testículo foram gerados pelo processo de homocisteinização. A homocisteinização pode levar ao aumento da apoptose de células germinativas e consequente aumento da fagocitose dessas células pelas células de Sertoli, refletindo no aumento do colesterol. A homocisteinização de proteínas ocorre através da incorporação da homocisteína em proteínas intracelulares ocasionando mudanças em sua sequência primária e na fisiologia celular (JI; KAPLOWITZ, 2004). Essa incorporação pode causar o rompimento do dobramento de proteínas, criação de proteínas alteradas com interações recém-adquiridas ou induzir a respostas autoimunes. Todos esses eventos podem induzir morte celular apoptótica, seja por estresse do retículo endoplasmático, por aumento da degradação proteica ou pela indução de respostas autoimunes (JAKUBOWSKI, 2008; JI; KAPLOWITZ, 2004).

No epidídimo, a hiperhomocisteínemia e o exercício físico, isolados ou associados, foram responsáveis por alterações estruturais que acarretaram em remodelação da região da cabeça evidenciada pela análise estereológica. Como nossas análises não evidenciaram aumento da lipoperoxidação e comprometimento da atividade da enzima catalase, as alterações estruturais observadas não estão associadas a esses eventos. A região da cabeça do epidídimo é responsável por realizar eventos iniciais e tardios de maturação dos espermatozoides (CORNWALL, 2009). As células epiteliais são as principais responsáveis pelo remodelamento da membrana plasmática do espermatozoide, onde proteínas de origem testicular são

removidas ou modificadas e proteínas epididimárias são secretadas e adsorvidas à membrana espermática ou apenas interagem com o gameta, para que sua capacidade funcional seja adquirida (BARRIOS, 2005; CUASNICÚ et al., 2002; DA ROS et al., 2004). Com base na função do tecido epitelial epididimal, propomos que o aumento na proporção do compartimento epitelial e consequente redução do compartimento luminal observado ocorreu como um mecanismo adaptativo para que o processo de maturação espermática fosse mantido. Colaborando com essa hipótese, evidencia-se a manutenção no tempo de trânsito espermático pelo epidídimo, motilidade espermática e atividade mitocondrial espermática. Entretanto, a região da cauda epididimária se mostrou mais resistente aos efeitos da hiperhomocisteinemia e do exercício, uma vez que, as proporções dos compartimentos luminal, epitelial e estromal não foram alteradas. Dessa forma, as características adquiridas pelos espermatozoides durante o processo de maturação espermática foram mantidas.

5. Conclusão

Com base no presente estudo conclui-se que a hiperhomocisteinemia durante as fases puberal e adulta prejudica o testículo, isolada ou associada ao exercício físico. Esses danos não estão relacionadas com aumento de lipoperoxidação e comprometimento da atividade da enzima catalase. Desta forma, propomos que as alterações observadas estão relacionadas ao processo de homocisteinização. Nessas condições experimentais a hiperhomocisteinemia e o exercício físico, isolados ou associados, acarretaram em modificações teciduais na cabeça epididimária. Apesar das alterações estruturais observadas, a fisiologia testicular e epididimária não foram alteradas e a qualidade espermática foi preservada.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não houveram conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Estado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Estudos de Pós-Graduação em Ensino Superior) por fornecer bolsa de mestrado a Dayane Priscila dos Santos.

Referências

AITKEN, R. J. et al. **Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function.** *Andrology*, v.4(2), p.345–360, 2016.

AKKAYA, H. et al. **Investigation of the effects of kisspeptin-10 in methionine-induced lipid peroxidation in testicle tissue of young rats.** *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v.31(5), p.e21881, 2016.

AKPOVI, C. D. et al. **Dysregulation of Testicular Cholesterol Metabolism Following Spontaneous Mutation of the Niemann-Pick C1 Gene in Mice.** *Biology of Reproduction*, v.91(2), p.1-8, 2014.

AKPOVI, C. D. et al. **The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels not apoptosis in mink testis.** *The Journal of Lipid Research*, v.47, p.2233-2247, 2006.

BARASH, I. A. et al. **Leptin is a Metabolic Signal to the Reproductive System.** *Endocrinology*, v.137(7), p.3144–3147, 1996.

BARRIOS, B. **Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock.** *Journal of Andrology*, v. 26(4), p.539–549, 2005.

BEERS, R. F.; SIZER I. W. JR. **A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.** *The Journal of Biological Chemistry*, v.195(1), p.133-140, 1952.

BELTRAME, F. L. et al. **Vitamin B12 Supplement Exerts a Beneficial Effect on the Seminiferous Epithelium of Cimetidine-Treated Rats.** *Cells Tissues Organs*, v.193(3), p.184–194, 2011.

BOEKELHEID, K. et al. **Sertoli cell toxicants.** In: SKINNER, M.; GRISWOLD, M.; GRISWOLD, M. (Eds). *Sertoli cell Biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 1.ed., p. 345–382, 2004.

BROSNAN, J. T. et al. **Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism.** *Acta Biochimica Polonica*, v.51(2), p.405-413, 2004.

BROWN, B. M. **Exploring the relationship between physical activity, beta-amyloid and tau: A narrative review.** *Ageing Research Reviews*, v.50, p.9-18, 2019.

CARVALHO, T. et al. **Posição oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: atividade física e saúde.** *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 2(4), p79-81, 1996.

CASAGRANDE, R. et al. **Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice.** *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Byology*. v.84(1), p.21-27, 2006.

CELOTTO, A. C. et al. **Chronic hyperhomocysteinemia impairs vascular function in ovariectomized rat carotid arteries.** *Amino Acids*, v.38, p.1515-1522, 2010.

CHEN, Z. et al. **Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinaemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition.** *Human Molecular Genetics*, v.10(5), p.433-443, 2001.

CHENG, F. P. et al. **Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.** *Journal of Andrology*, v. 17, p. 674–682, 1996.

CORNWALL, G. A. **New insights into epididymal biology and function.** *Human Reproduction Update*, v.15(2), p.213–227, 2009.

- CUASNICÚ, P. S. et al. **Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation.** In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice.* Springer: Boston, p.389-403, 2002.
- DA ROS, V. G. et al. **Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability.** *Biology of reproduction*, v.70(5), p.1325–1332, 2004.
- DE BONO, J. P. et al. **Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models.** *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.290(4), p.R926 –R934, 2006.
- DE LA CALLE, M. et al. **Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.107(2), p.125-134, 2003.
- DEMINICE, R. et al. **Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans.** *Nutrition*, v.29(9), p.1127-1132, 2013.
- DEMINICE, R. et al. **The Effects of Acute Exercise and Exercise Training on Plasma Homocysteine: A Meta-Analysis.** *PLoS one*, v.11(3), p.e0151653, 2016.
- DEMINICE, R., H. et al. **Creatine supplementation reduces increased homocysteine concentration induced by acute exercise in rats.** *European Journal of Applied Physiology*, v.111(11), p.2663-2670, 2011.
- EBISCH, I. M. et al. **Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple.** *Human Reproduction*, v.21(7), p.1725-1733, 2006.
- FAVARETO, A. P. A. et al. **Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats.** *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, v.32(4), p.425–433, 2011.
- FERNANDES, G. S. et al. **Reproductive effects in male rats exposed to diuron.** *Reproductive Toxicology*, v.23, p.106-112, 2007.

FERNANDES, G. S. et al. **Vitamin C partially attenuates male reproductive deficits in hyperglycemic rats.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.9, p.100, 2011.

FINKELSTEIN, J. D. **Pathways and Regulation of Homocysteine Metabolism in Mammals.** *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v.26(3), p.219–226, 2000.

FON TACER, K. et al. **Adaptation of cholesterol synthesis to fasting and TNF- α : Profiling cholesterol intermediates in the liver, brain, and testis.** *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.121(3-5), p.619–625, 2010.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. **Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice.** *Jornal de Pedriatria*, v.83(5), p.S192-S203, 2007.

GE, Y. F. et al. **Determination of plasma homocysteine in oligospermia and/or asthenospermia patients.** *Zhonghua Nan Ke Xue*, v.14(12), p.1112–1114, 2008.

GOH, J.; LADIGES, W. **Voluntary Wheel Running in Mice.** *Current protocols in mouse biology*, v.5(4), p.283-290, 2015.

GOMES, M. **Physical Activity, Exercise, and Mammalian Testis Function: Emerging Preclinical Protein Biomarker and Integrative Biology Insights.** *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, v.19(9), p.499–511, 2015.

GONÇALVES, G. D. et al. **Role of resistance physical exercise in preventing testicular damage caused by chronic ethanol consumption in UChB rats.** *Microscopy Research and Technique*, v.80, p.378–386, 2017.

GRISWOLD, M. D. **The central role of Sertoli cells in spermatogenesis.** *Seminars in: Cell & Developmental Biology*, v.9(4), p.411–416, 1998.

HERMO, L. et al. **Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 5: Intercellular Junctions and Contacts Between Germs Cells and Sertoli Cells and Their Regulatory Interactions, Testicular Cholesterol, and Genes/Proteins Associated With More Than One Germ Cell Generation.** *Microscopy Research and Technique*, v.73, p.409–494, 2010.

HRUDKA, F. **Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress.** International Journal of Andrology, v.10(6), p.809–828, 1987.

JAKUBOWSKI, H. **The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease.** Journal of Physiology and Pharmacology, v.59(9), p.155-167, 2008.

JEAN-FAUCHER, C. et al. **Ontogeny of the secretory pattern of LH and FSH in male mice during sexual maturation.** International Journal of Andrology, v.6, p.575-584, 1983.

JI, C.; KAPLOWITZ, N. **Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury.** World Journal of Gastroenterology. V.10(12), p.1699-1708, 2004.

KAWWASS, J. F. et al. **Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: a critical review.** Molecular Human Reproduction, v.21(8), p.617–632, 2015.

KEBER, R. et al. **Sterols in spermatogenesis and sperm maturation.** Journal of Lipid Research, v.54(1), p.20–33, 2013.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. **Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique.** The American Journal of Anatomy, v.90(2), p.167-215, 1952.

LEE, H. J. **Exercise training regulates angiogenic gene expression in white adipose tissue.** Journal of Exercise Rehabilitation, v.14(1), p.16–23, 2018.

MANZANARES G. et al. **Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.52(1), p.e7830-7839, 2019.

MATHEW, H. et al. **Adipose tissue and reproductive health.** Metabolism, v.86, p.18-32, 2018.

MILLER, R. J.; KILLIAN, G. J. **Morphometric Analyses of the Epididymis from Normal and Vasectomized Rats.** Journal of Andrology, v. 8(5), p.279–291, 1987.

- MOHAMMAD, F. et al. **Stereological, Morphometric and Morphological assessment of Changes Induced by Bilateral Epididymal Lipectomy in Mouse Testicular Histoarchitecture.** Journal of Kermanshah University of Medical Science, v.20(4), p.141-146, 2017.
- MORETTI, R.; CARUSO, P. **The Controversial Role of Homocysteine in Neurology: From Labs to Clinical Practice.** International Journal of Molecular Sciences, v.20(1), p.231, 2019.
- NEUMAN, J. C. et al. **Exercise prevents hyperhomocysteinemia in a dietary folate-restricted mouse model.** Nutrition Research, v.33(6), p.487-493, 2013.
- NOMURA, S. et al. **Possible mechanisms by which adipocyte lipolysis is enhanced in exercise-trained rats.** Biochemical and Biophysical Research Communication, v.295(2), p.236-42, 2002.
- OGASAWARA, J. et al. **Higher Levels of ATGL Are Associated with Exercise-Induced Enhancement of Lipolysis in Rat Epididymal Adipocytes.** PLoS One, v.7(7), p.e40876, 2012.
- RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L. **Role of homocysteine metabolism in animal reproduction: A review.** Research in Veterinary Science, v.122, p.29-35, 2019.
- ROBB, G. W. et al. **Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats.** Journal of Reproduction and Fertility, v. 54(1), p. 103–107, 1978.
- SIERVO, G. E. M. L. et al. **Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone.** Toxicology, v. 330, p. 1–8, 2015.
- SILVA, A. D. S.; DA MOTA, M. P. G. **Effects of physical activity and training programs on plasma homocysteine levels: a systematic review.** Amino acids, v.46(8), p.1795-1804, 2014.
- SLATER, T. F.; SAWYER B. C. **The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. General features of the systems used.** The Biochemical Journal, v.123(5), p.805-814, 1971.

SMITH, A. D.; REFSUM, H. **Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment.** Annual Review of Nutrition, v.36, p.211-239, 2016.

SÖNMEZ, M. et al. **The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats.** Reproductive Toxicology, v.23(2), p.226–231, 2007.

VINCENT, H. K. et al. **Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults.** Obesity, v.14(11), p.1921-1930, 2006.

WANG, H. et al. **Different fixative methods influence histological morphology and TUNEL staining in mouse testes.** Reproductive Toxicology, v.60, p.53-61, 2016.

WEIBEL, E. R. **Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs.** Laboratory Investigation, v.12, p.131-155, 1963.

Legenda de tabelas

Tabela 1

Efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre a massa corporal e de órgãos do sistema genital de camundongos

¹Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. ²Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 2

Distância percorrida por camundongos em rodas de exercício físico no decorrer de 7 semanas de período experimental.

Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste t de student. E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 3

Efeitos da hiperhomocisteínemia e exercício físico, isolados ou associados, sobre o diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio germinativo e cinética da espermatogênese

¹Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. ²Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 4

Efeitos da hiperhomocisteínemia e exercício físico, isolados ou associados, sobre a proporção dos compartimentos luminal, estromal e epitelial do epidídimo

Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn. *** $p < 0,001$. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 5

Efeitos da hiperhomocisteínemia e exercício físico, isolados ou associados, sobre a atividade mitocondrial de espermatozoides

Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia combinada ao exercício físico.

Legenda de figuras

Figura 1**Análise histopatológica do testículo de camundongos expostos a hiperhomocisteíemia e exercício físico, isolados ou associados.**

(A) Porcentagem de túbulos seminíferos anormais. Fotomicrografias de secções de testículo do (B) grupo C, (C) grupo E, (D-F) grupo H e (G-I) grupo H+E. (B e C) Observa-se o epitélio seminífero com aspecto normal. (D e G) Nota-se a presença de células imaturas no lúmen tubular (asterisco). (E e H) Mostram a presença de células acidófilas (cabeça de seta) e (F e I) presença de vacúolos (seta) no epitélio seminífero. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteíemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteíemia associada ao exercício físico. Coloração hematoxilina e eosina. Ep, epitélio; It, interstício, L, lúmen. Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. *** $p < 0,001$.

Figura 2**Efeito da hiperhomocisteíemia e exercício físico, isolados ou associados, sobre o número de células de Sertoli no túbulos seminíferos.**

Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteíemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteíemia associada ao exercício físico.

Figura 3**Efeito da hiperhomocisteíemia e exercício físico, isolados ou associados, sobre a migração de neutrófilos para o testículo e epidídimo.**

Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteíemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteíemia associada ao exercício físico.

Figura 4**Efeitos da hiperhomocisteíemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre a lipoperoxidação e atividade da catalase no testículo e epidídimo.**

(A) Concentração de malondialdeído no testículo. (B) Concentração de malondialdeído no epidídimo. (C) Atividade da catalase no testículo. (D) Atividade da catalase no epidídimo. Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteíemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteíemia associada ao exercício físico.

Figura 5**Efeitos da hiperhomocisteíemia e do exercício físico, isolados ou associados sobre a concentração de colesterol no testículo.**

Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteíemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteíemia associada ao exercício físico.

Figura 6**Efeitos da hiperhomocisteíemia e exercício físico, isolados ou combinados, sobre espermatozoides.**

(A) Número de espermátides maduras resistentes a homogeneização (n=6 por grupo); (B) Produção diária de espermatozoides pelo testículo (n=6 por grupo); (C) Morfologia espermática (n=10 por grupo); (D) Integridade de acrossoma (n=6 por

grupo); (E) Tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo (n=6 por grupo); (F) Motilidade espermática (n=10 por grupo); Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Figura 7

Efeitos da hiperhomocisteínemia e exercício físico, isolados ou associados, sobre a testosterona plasmática.

Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 1. Efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre a massa corporal e de órgãos do sistema genital de camundongos

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C (n=13)	H (n=12)	E (n=11)	H+E (n=12)
Massa (g)				
¹Corporal inicial	25 ±1	25 ±1	24 ±1	24 ±1
¹Corporal final	39 ±1	40 ±1	38 ±1	37 ±1
¹Testículo	0,1157 ±0,0051	0,1167 ±0,0043	0,1143 ±0,0047	0,1029 ±0,0067
¹Epidídimo	0,0493 ±0,0026	0,0537 ±0,0023	0,0484 ±0,0020	0,0442 ±0,0019
²Ducto deferente	0,0135 [0,0118- 0,0150]	0,0150 [0,0127- 0,0166]	0,0119 [0,0102- 0,0136]	0,0125 [0,0111- 0,0143]
¹Próstata	0,0292 ±0,0038	0,0263 ±0,0033	0,0270 ±0,0037	0,0238 ±0,0040
²Tecido adiposo periepididimal	0,6362 [0,5509- 0,6806]	0,5994 [0,4999- 0,7689]	0,3542 [0,3397- 0,3662]**	0,3783 [0,3344- 0,4115]*

¹Valores expressos em média ±E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. ²Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn. *p<0,05; **p <0,01. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 2. Distância percorrida por camundongos em rodas de exercício físico no decorrer de 7 semanas de período experimental.

Distância (Km)	Grupos experimentais	
	E (n=11)	H+E (n=12)
Semana 1	15 ±4	12 ±3
Semana 2	32 ±5	26 ±6
Semana 3	38 ±7	23 ±5
Semana 4	46 ±6	31 ±8
Semana 5	34 ±5	30 ±7
Semana 6	35 ±4	29 ±6
Semana 7	29 ±5	26 ±5

Valores expressos em média ±E.P.M. Teste t de student. E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 3. Efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre o diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio germinativo e cinética da espermatogênese

	Grupos experimentais			
	C (n=6)	H (n=6)	E (n=6)	H+E (n=6)
Morfometria (μm)				
² Diâmetro dos túbulos seminíferos	237,52 [224,35-262,49]	218,74 [207,01-244,47]**	246,28 [237,01-263,96]	230,87 [225,42-251,44]
¹ Altura do epitélio germinativo	79,53 \pm 1,22	65,00 \pm 1,33***	74,72 \pm 1,49*	65,92 \pm 1,30***
Cinética da espermatogênese (n^o)				
² I – VI	43 [37-47]	38 [35-46]	40 [38-40]	39 [37-44]
² VII – VIII	40 [37-45]	42 [38-45]	43 [42-43]	42 [38-47]
² IX – XI	15 [14-16]	16 [12-20]	16 [16-17]	17 [13-18]
² XII	2 [1-2]	4 [2-4]	1 [0-2]	2 [1-4]

¹Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. ²Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn.*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 4. Efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre a proporção dos compartimentos luminal, estromal e epitelial do epidídimo

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C (n=6)	H (n=6)	E (n=6)	H+E (n=6)
Cabeça				
(%)				
Lúmen	47 [42-56]	37 [31-43]***	39 [33-43]***	39 [29-45]***
Estroma	12 [9-15]	17 [13-20]***	13 [10-15]	16 [12-21]***
Epitélio	41 [33-45]	46 [43-51]***	48 [44-53]***	45 [41-52]***
Cauda				
(%)				
Lúmen	67 [60-70]	66 [60-70]	63 [58-68]	62 [58-68]
Estroma	19 [14-26]	19 [13-24]	22 [17-26]	24 [15-27]
Epitélio	14 [11-17]	15 [13-18]	15 [12-19]	14 [11-19]

Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn. *** $p < 0,001$. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico.

Tabela 5. Efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre a atividade mitocondrial de espermatozoides

Parâmetros (nº)	Grupos experimentais			
	C (n=6)	H (n=6)	E (n=6)	H+E (n=6)
DAB I	185 [176 - 184]	184 [98 - 196]	188 [173 - 197]	190 [73 - 193]
DAB II	11 [12 - 22]	15 [4 - 97]	12 [2 - 27]	9 [6 - 126]
DAB III	4 [2 - 4]	1 [0 - 5]	0 [0 - 1]	1 [1 - 1]

Valores expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Kruskal-Wallis, teste *a posteriori* de Dunn. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteínemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteínemia combinada ao exercício físico.

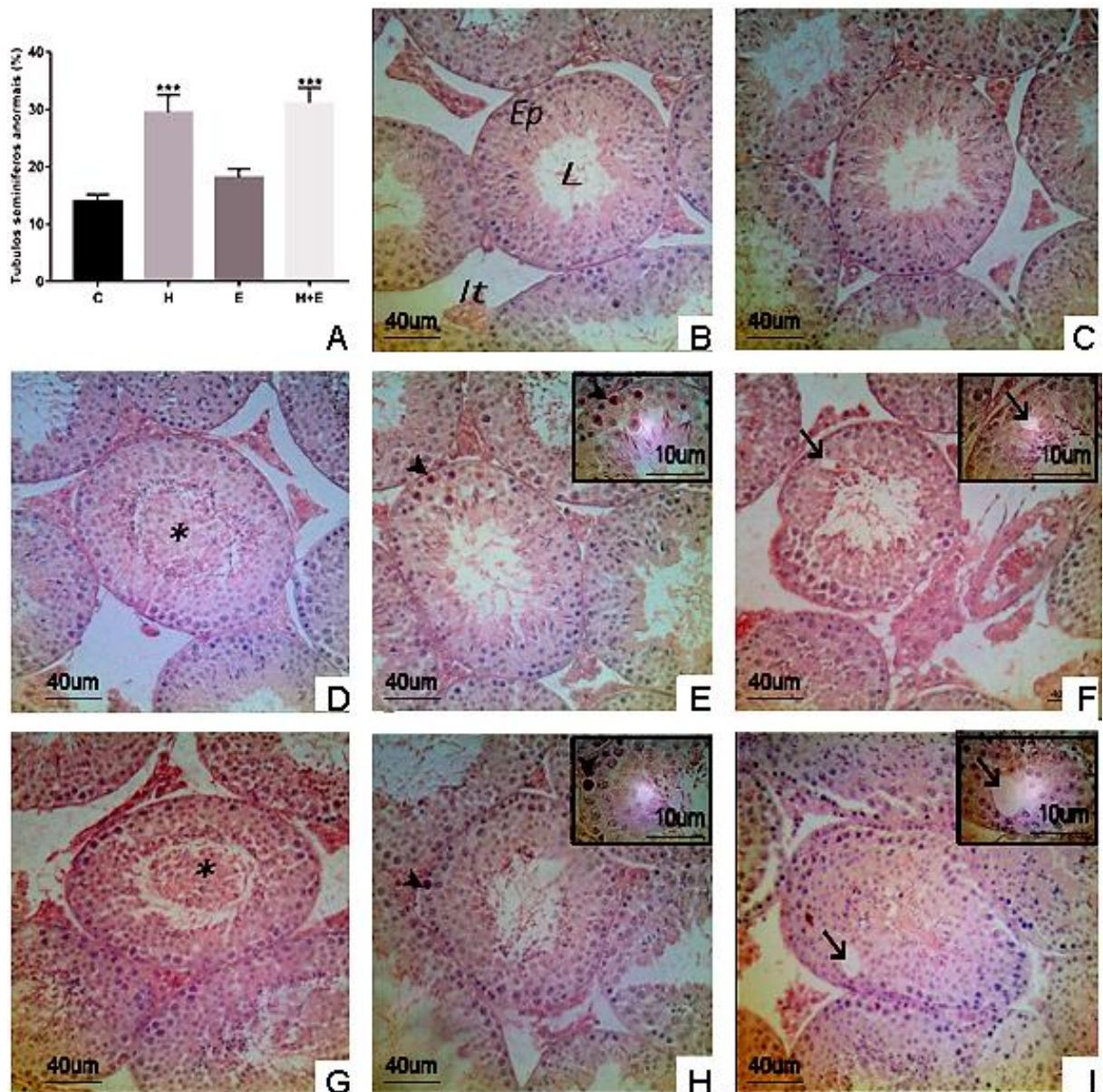


Figura 1 – Análise histopatológica do testículo de camundongos expostos a hiperhomocisteínemia e exercício físico, isolados ou associados. (A) Porcentagem de túbulos seminíferos anormais. Fotomicrografias representativas de secções de testículo do (B) grupo C, (C) grupo E, (D-F) grupo H e (G-I) grupo H+E. (B e C) Observa-se o epitélio seminífero com aspecto normal. (D e G) Nota-se a presença de células arredondadas no lúmen tubular (asterisco). (E e H) Mostram a presença de células acidófilas (cabeça de seta) e (F e I) presença de vacúolos (seta) no epitélio seminífero. C= grupo controle (n=6); H= grupo hiperhomocisteínemia (n=6); E= grupo exercício físico (n=6); H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico (n=6). Coloração hematoxilina e

eosina. Ep, epitélio; It, interstício, L, lúmen. Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. *** $p < 0,001$.

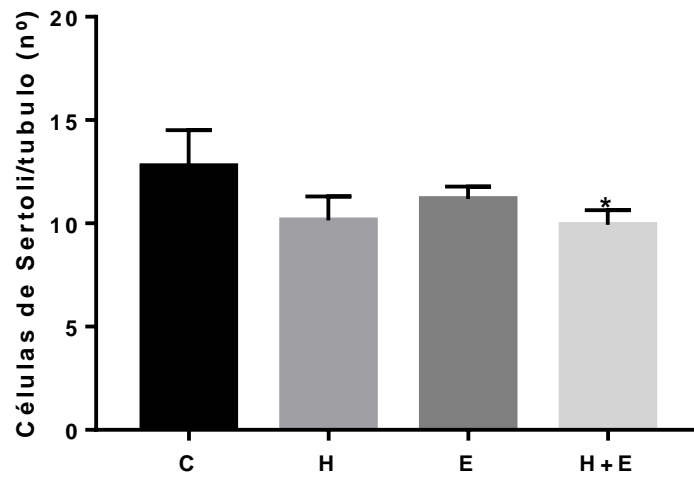


Figura 2. Efeito da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre o número de células de Sertoli no túbulo seminífero. Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. * $p < 0,05$. C= grupo controle (n=6); H= grupo hiperhomocisteínemia (n=6); E= grupo exercício físico (n=6); H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico (n=6).

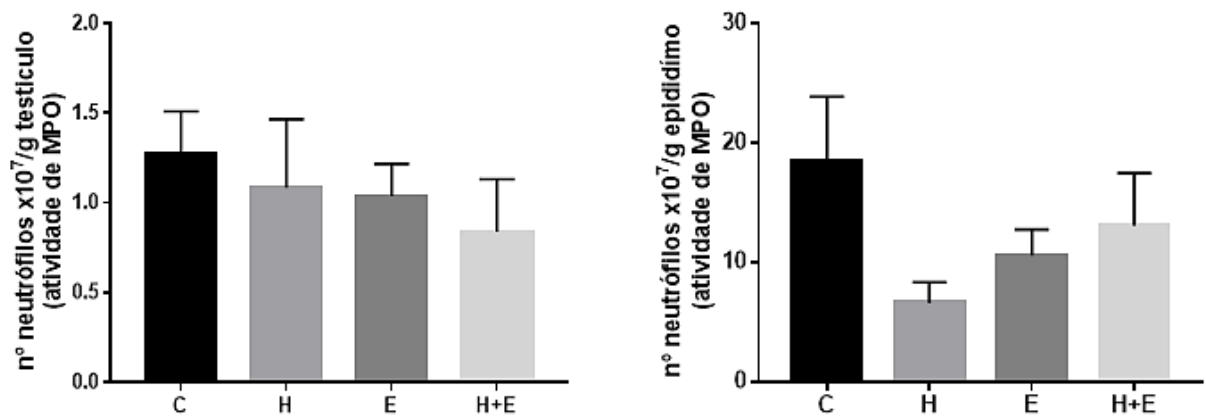


Figura 3 – Efeito da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre a migração de neutrófilos para o testículo e epidídimo. Valores expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle (n=6); H= grupo hiperhomocisteínemia (n=6); E= grupo exercício físico (n=6); H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico (n=6).

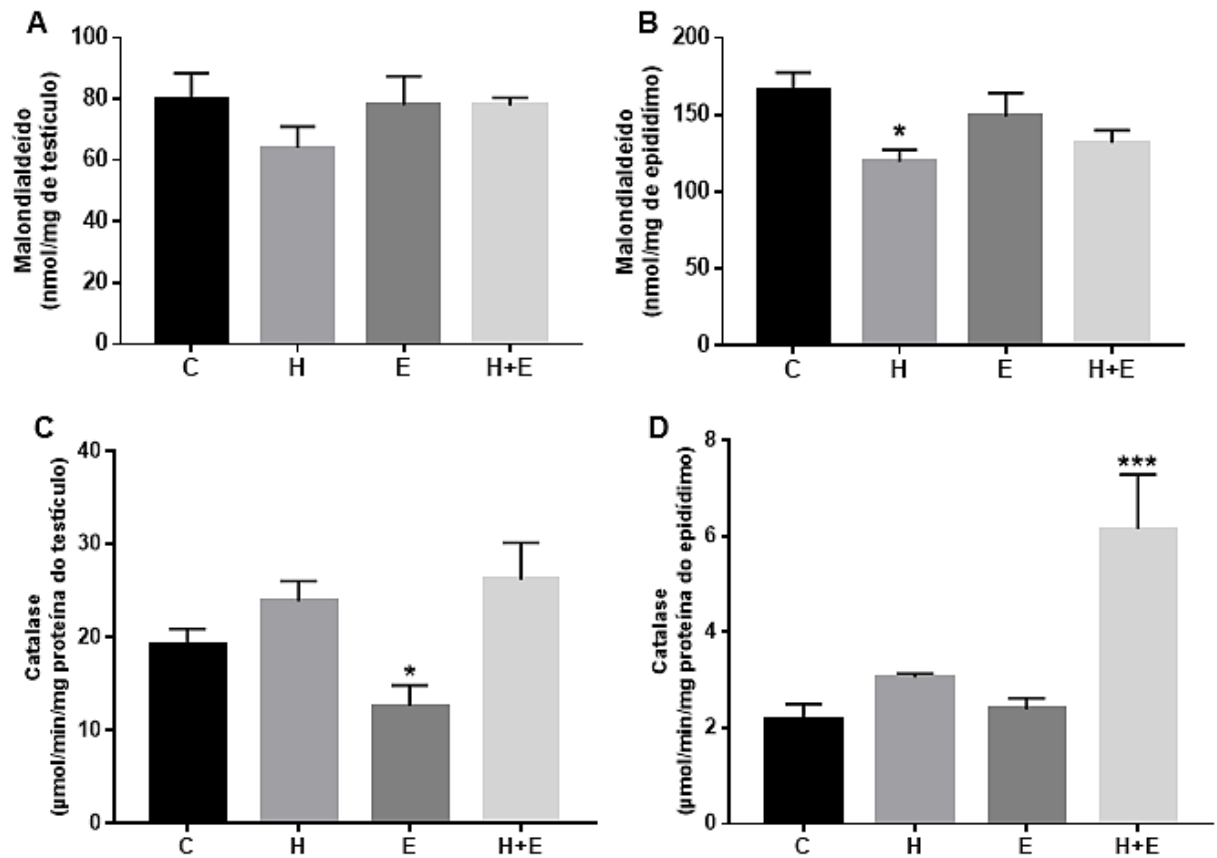


Figura 4. Efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados, sobre a lipoperoxidação e atividade da catalase no testículo e epidídimo. (A) Concentração de malondialdeído no testículo. (B) Concentração de malondialdeído no epidídimo. (C) Atividade da catalase no testículo. (D) Atividade da catalase no epidídimo. Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. C= grupo controle (n=6); H= grupo hiperhomocisteínemia (n=6); E= grupo exercício físico (n=6); H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico (n=6).

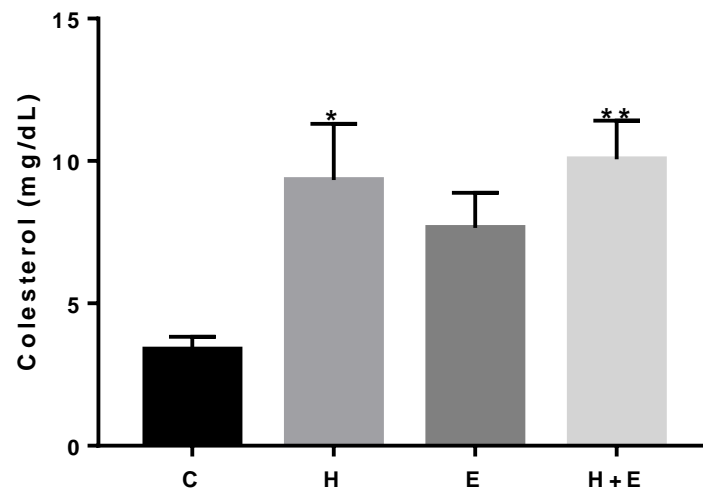


Figura 5. Efeitos da hiperhomocisteínemia e do exercício físico, isolados ou associados sobre a concentração de colesterol no testículo. Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. C= grupo controle (n=6); H= grupo hiperhomocisteínemia (n=6); E= grupo exercício físico (n=6); H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico (n=6).

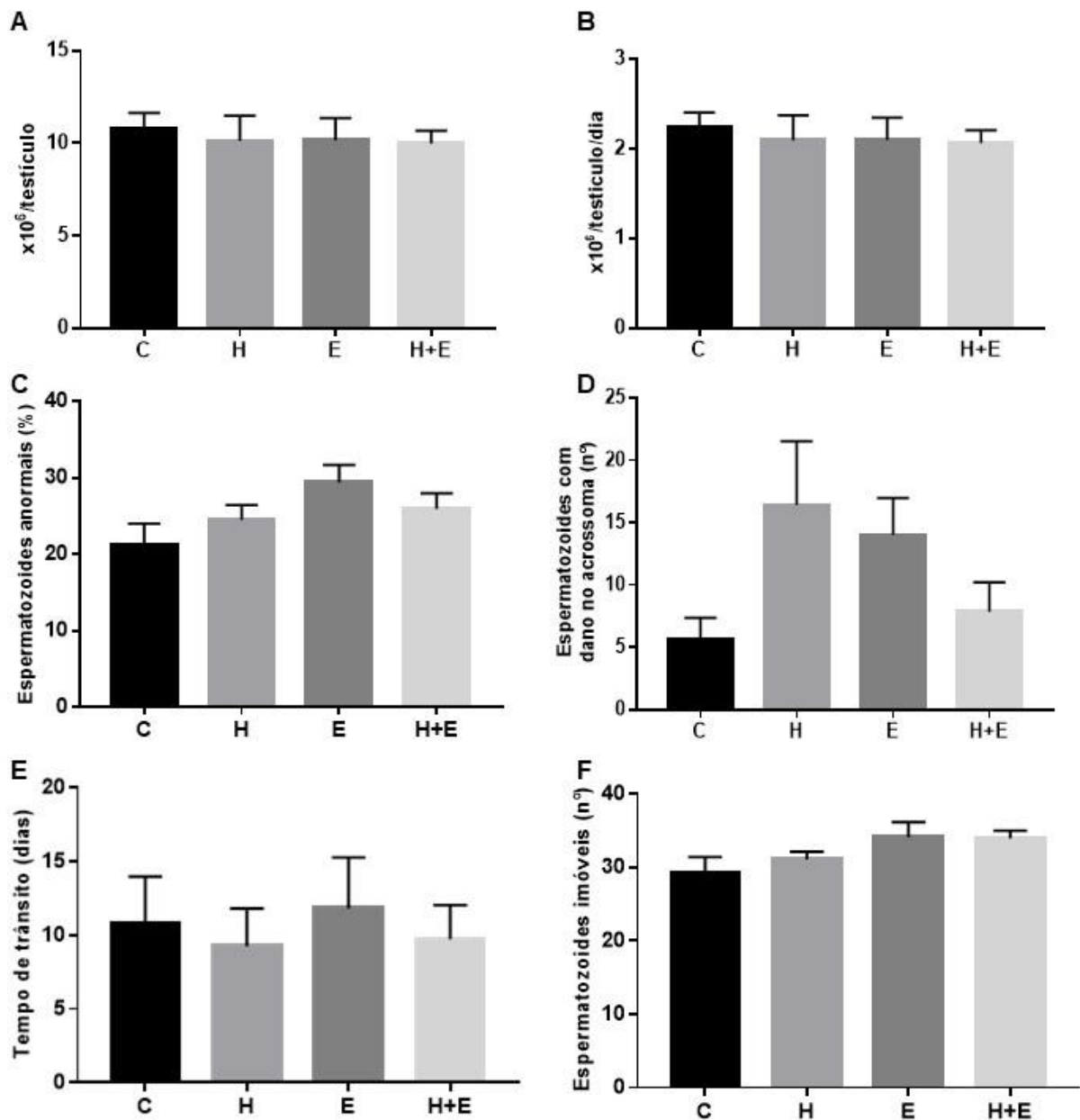


Figura 6. Efeitos da hiperhomocisteinemia e exercício físico, isolados ou combinados, sobre espermatozoides. (A) Número de espermátides maduras resistentes a homogeneização (n=6 por grupo); (B) Produção diária de espermatozoides pelo testículo (n=6 por grupo); (C) Morfologia espermática (n=10 por grupo); (D) Integridade de acrossoma (n=6 por grupo); (E) Tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo (n=6 por grupo); (F) Motilidade espermática (n=10 por grupo); Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle; H= grupo hiperhomocisteinemia; E= grupo exercício físico; H+E= grupo hiperhomocisteinemia associada ao exercício físico.

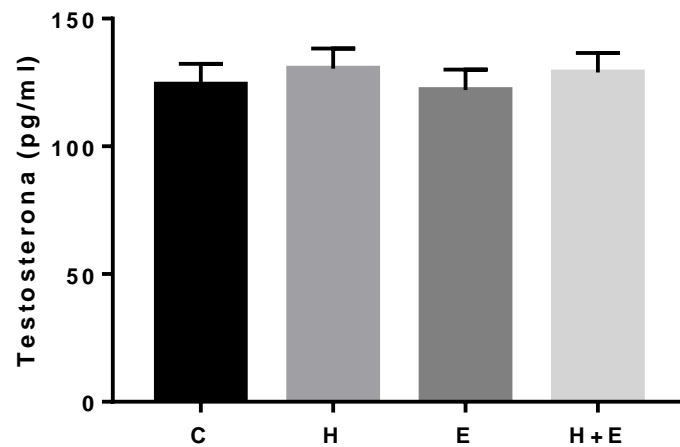


Figura 7. Efeitos da hiperhomocisteínemia e exercício físico, isolados ou associados, sobre a testosterona plasmática. Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste de ANOVA one-way, teste *a posteriori* de Dunnet. C= grupo controle (n=13); H= grupo hiperhomocisteínemia (n=12); E= grupo exercício físico (n=11); H+E= grupo hiperhomocisteínemia associada ao exercício físico (n=12).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a hiperhomocisteïnemia, isolada ou associada ao exercício físico, desde a fase puberal até a fase adulta causa alterações estruturais testiculares. Essas alterações não estão relacionadas com aumento de lipoperoxidação e comprometimento da atividade da enzima catalase. Desta forma, propomos que as alterações observadas estão relacionadas ao processo de homocisteinização. Além disso, a hiperhomocisteïnemia e o exercício físico, isolados ou associados, acarretam em modificações teciduais na cabeça epididimária. Apesar das alterações estruturais observadas, a fisiologia testicular e epididimária não foram alteradas e a qualidade espermática foi preservada.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO DA INTRODUÇÃO

ADAMALI, H. I.; HERMO, L. **Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution and functions in the adult rat epididymis.** Journal of Andrology, v.17(3), p. 208-222, 1996.

AITKEN, R. J. et al. **Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function.** Andrology, v.4(2), p.345–360, 2016.

ALLEN, J. et al. **Exercise and the Regulation of Inflammatory Responses.** In: BOUCHARD, C. (Ed). Progress in Molecular Biology and Translational Science, v.135, p.337-354, 2015.

AMORIM, F. G. et al. **Bioquímica clínica da aterosclerose provocada por hiperhomocisteinemia.** Revista Eletrônica de Farmácia, v.8(1), p.36-59, 2011.

BARRIOS, B. **Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock.** Journal of Andrology, v. 26(4), p.539–549, 2005.

BALEY, L. B. **Folate in health and disease.** 2.Ed. Boca Raton: CRC Press/ Taylor & Francys Group, 2010.

BEDFORD, J. M. **Male reproductive System.** In: Greep, R. O.; Astwood, E. B. (Eds) Handbook of physiology. American Physiology Society: Washington, p. 303–318, 1975.

BLUNDELL, G. et al. **Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration.** Atherosclerosis, v.122(2), p.163-172, 1996.

BOEKELHEID, K.; JOHNSON, K. J.; RICHBURG, J. H. **Sertoli cell toxicants.** In: SKINNER, M.; GRISWOLD, M.; GRISWOLD, M. (Eds). Sertoli cell Biology. San Diego: Elsevier Academic Press, 1.ed., p. 345–382, 2004.

BORGES, C. S. **Efeitos do tratamento com Sibutramina sobre a qualidade espermática de ratos machos Wistar.** Dissertação apresentada ao Programa de

Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada para obtenção do título de mestre. São Paula, 2013.

BOUZID, M. A. et al. **Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update.** Sports Medicine, v.45(9), p.1245–1261, 2015.

BROSNAN, J. T. et al. **Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism.** Acta Biochimica Polonica, v.51(2), p.405-413, 2004.

BROWN, B. M. **Exploring the relationship between physical activity, beta-amyloid and tau: A narrative review.** Ageing Research Reviews, v.50, p.9-18, 2019.

CARVALHO, T. et al. **Posição oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: atividade física e saúde.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 2(4), p79-81, 1996.

CASPERSEN, C.J. et al. **Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research.** Public Health Reports, v.100(2), p.126–131, 1985.

CHEN, Z. et al. **Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinaemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition.** Human Molecular Genetics, v.10(5), p.433-443, 2001.

CLELAND, K. **The structure and fuction of the Epididymis. 1. The histology of the Rat Epididymis.** Australian Journal of Zoology, v.5(3), p.223, 1957.

CLERMONT, Y. **Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal.** Physiological Reviews, v.52(1), p.198–236, 1972.

CUASNICÚ, P. S. et al. **Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation.** In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds) The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. Springer: Boston, p.389-403, 2002.

DA ROS, V. G. et al. **Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability.** Biology of reproduction, v.70(5), p.1325–1332, 2004.

- DACHEUX, J. L. et al. **Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation.** Theriogenology, v.63(2), p. 319–341, 2005.
- DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. **New insights into epididymal function in relation to sperm maturation.** Reproduction, v.147(2), 2014.
- DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar.** 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- DE LA CALLE, M. et al. **Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v.107(2), p.125-134, 2003.
- DE ROOIJ, D.G. **Stem cells in the testis.** International Journal of Experimental Pathology, v.79(2), p.67-80, 1998.
- DEMINICE, R. et al. **Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans.** Nutrition, v.29(9), p.1127-1132, 2013.
- DEMINICE, R. et al. **The Effects of Acute Exercise and Exercise Training on Plasma Homocysteine: A Meta-Analysis.** PloS one, v.11(3), p.e0151653, 2016.
- DEMINICE, R., H. et al. **Creatine supplementation reduces increased homocysteine concentration induced by acute exercise in rats.** European Journal of Applied Physiology, v.111(11), p.2663-2670, 2011.
- DI LUIGI, L. et al. **Andrological aspects of physical exercise and sport medicine.** Endocrine, v.42(2), p.278-84, 2012.
- DIXON, J. S. et al. **Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: a review.** Microscopy Research and Technique, v. 42(6), p. 423-32, 1998.
- EBISCH, I. M. et al. **Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple.** Human Reproduction, v.21(7), p.1725-1733, 2006.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. **Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation.** Cell Metabolism, v.17(2), p.162-184, 2013.

ELIAKIM, A., NEMET D. [**Exercise and the male reproductive system**]. Harefuah, v.145(9), p.677-681, 2006.

FINKELSTEIN, J. D. **Pathways and Regulation of Homocysteine Metabolism in Mammals**. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, v.26(3), p.219–226, 2000.

FOLEY, G. L. **Overview of male reproductive pathology**. Toxicologic pathology, v.29(1), p.49–63, 2001.

FOLLAND, J. P.; WILLIAMS, A. G. **Morphological and Neurological Contributions to Increased Strength**. Sports Medicine, v.37(2), p.145-168, 2007.

GE, Y. F. et al. **Determination of plasma homocysteine in oligospermia and/or asthenospermia patients**. Zhonghua Nan Ke Xue, v.14(12), p.1112–1114, 2008.

GELECEK, N. et al. **Influences of acute and chronic aerobic exercise on the plasma homocysteine level**. Annals of nutrition and metabolismo, v.51(1), p.53-58, 2007.

GOMES, M. **Physical Activity, Exercise, and Mammalian Testis Function: Emerging Preclinical Protein Biomarker and Integrative Biology Insights**. OMICS: A Journal of Integrative Biology, v.19(9), p.499–511, 2015.

GRISWOLD, M. D. **The central role of Sertoli cells in spermatogenesis**. Seminars in: Cell & Developmental Biology, v.9(4), p.411–416, 1998.

HACKNEY, A. C. **Effects of endurance exercise on the reproductive system of men: The “exercise-hypogonadal male condition”**. Journal of Endocrinological Investigation, v.31, p.932-938, 2008.

HACKNEY, A. C. **The male reproductive system and endurance exercise**. Medicine & Science in Sports & Exercise, v.28(2), p.180-189, 1996.

HERMO, L. et al. **Secretion and Endocytosis in the Male Reproductive Tract: A Role in Sperm Maturation**. International Review of Cytology, v.154, p.105–189, 1994.

HERMO, L. et al. **Role of Epithelial Clear Cells of the Rat Epididymis in the Disposal of the Contents of Cytoplasmic Droplets Detached From Spermatozoa**. American Journal of Anatomy, v.183(2), p.107-124, 1988.

- HERMO, L.; ROBAIRE, B. **Epididymal Cell Types and Their Functions.** In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice.* Springer: Boston, p.81-102, 2002.
- HERRMANN, M. et al. **Homocysteine increases during endurance exercise.** *Clinical chemistry and laboratory medicine*, v.41(11), p.1518-1524, 2003.
- HESS, R. A.; FRANCA, L. R. **Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium.** In: CHENG, C. Y. (Eds). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.636, New York: Springer, 2009.
- HOGG, N. **The effect of cist(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine.** *Free Radical Biology & Medicine*, v.27(1-2), p.28-33, 1999.
- HOLSTEIN, A. F. et al. **Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogenous phenotype.** *Archives of Histology and Cytology*, v.59(2), p.109–125, 1996.
- HU, Y. et al. **Crystal Structure of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase from Rat Liver.** *Biochemistry*, v.38(26), p.8323–8333, 1999.
- ISNARD-BAGNIS, C. et al. **Detection of CIC-3 and CIC-5 in epididymal epithelium: immunofluorescence and RT-PCR after LCM.** *American Journal of Physiology Cell Physiology*, v.284(1), p.C220-C232, 2003.
- JAKUBOWSKI, H. **The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease.** *Journal of Physiology and Pharmacology*, v.59(9), p.155-167, 2008.
- JAMES, S. J. et al. **Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology.** *The Journal of Nutrition*, v.132(8), p.2361S-2366S, 2002.
- JAN, S. Z. et al. **Molecular control of rodent spermatogenesis.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v.1822(12), p.1838–1850, 2012.
- JENSEN, L. J. et al. **Immunolocalization of AE2 Anion Exchanger in Rat and Mouse Epididymis.** *Biology of Reproduction*, v.61(4), p.973–980, 1999.

JI, C.; KAPLOWITZ, N. **Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury.** World Journal of Gastroenterology. V.10(12), p.1699-1708, 2004.

JOHNSON, L. et al. **Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System and Potential Targets of Toxicants.** In: MCQUEEN, C. A. (eds) Comprehensive Toxicology, Elsevier, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KEMPINAS, W. G.; KLINEFELTER, G. R. **The epididymis as a target for toxicants.** In: McQueen, C.A. (Ed) Comprehensive Toxicology. Oxford: Academic Press, p.149-166, 2010.

KIM, Y. I. **Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer?** Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, v.13(4), p.511-519, 2004.

KOLASA, A. et al. **The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals.** Reproductive Biology, v.12(1), p.5–23, 2012.

KOMÁREK, V. **Synopsis of the organ anatomy.** In: KRINKE, G. J. et al. The laboratory rat – The Handbook of Experimental Rats. London: Academic Press, p. 283–322, 2000.

KÖNIG, D. et al. **Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B12.** Annals of nutrition and metabolism, v.47(3-4), p.114-118, 2003.

MAEKAWA, M.; KAMIMURA, K.; NAGANO, T. **Peritubular Myoid Cells in the Testis: Their Structure and Function.** Archives of Histology and Cytology, v.59(1), p.1-13, 1996.

MAROTO-SÁNCHEZ, B. et al. **What do we know about homocysteine and exercise? A review from the literature.** Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v.54(10), p.1561–1577, 2016.

MESCHER, A. L. **Junqueira's Basic Histology.** 14.ed. New York: McGraw-Hill Education, 2016.

- MILLER, R. J.; KILLIAN, G. J. **Morphometric analyses of the epididymis from normal and vasectomized rats.** *Journal of Andrology*, v.8(5), p.279-291, 1987.
- MORETTI, R.; CARUSO, P. **The Controversial Role of Homocysteine in Neurology: From Labs to Clinical Practice.** *International Journal of Molecular Sciences*, v.20(1), p.231, 2019.
- MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. **Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis.** *Endocrine Reviews*, v.25(5), p.747–806, 2004.
- NEUMAN, J. C. et al. **Exercise prevents hyperhomocysteinemia in a dietary folate-restricted mouse model.** *Nutrition Research*, v.33(6), p.487-493, 2013.
- O'DONNELL, L. et al. **Spermiation.** *Spermatogenesis*, v.1(1), p.14–35, 2011.
- OKURA, T. et al. **Effect of regular exercise on homocysteine concentrations: the HERITAGE Family Study.** *European Journal of Applied Physiology*, v.98(4), p 394–401, 2006.
- ORGBIN-CRIST, M. C.; DANZO, B. J.; DAVIES, J. **Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis.** In: Greep, R. O.; Astwood, E. B. (Eds) *Handbook of physiology*. American Physiology Society: Washington, p.319–338, 1975.
- PACKER, L. et al. **Free radicals and exercise: An introduction.** *Free Radical Biology and Medicine*, v.44(2), p.123–125, 2008.
- PASCHALIA, K. I. et al. **The Sertoli cell: Novel clinical potentiality.** *Hormones*, v.14(4), p.504-514, 2015.
- PASTOR-SOLER N. et al. **Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling.** *Journal of Biological Chemistry*, v.278, p. 49523-49529, 2003.
- PEDERSEN, B. K. **Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease.** *European Journal of Clinical Investigation*, v.47(8), p.600-611, 2017.
- PENNEFATHER, J. N. et al. **The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and**

- histological studies.** Journal of Autonomic Pharmacology, v. 20(4), p. 193-206, 2000.
- PETRAS, M. et al. **Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders.** Journal of Physiology and Pharmacology, v.65(1), p.15-23, 2014.
- POSTEA, O. et al. **Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine.** Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology, v.26 (3), p.508-513, 2006.
- RADAK, Z. et al. **Exercise effects on physiological function during aging.** Free Radical Biology and Medicine, 2018.
- RADAK, Z. et al. **Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise.** Free Radical Biology and Medicine, v.44(2), p.153-159, 2008.
- RATO, L. et al. **Metabolic regulation is important for spermatogenesis.** Nature Reviews Urology, v.9(6), p.330–338, 2012.
- RISBRIDGER, G. P.; TAYLOR, R. **Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bubourethral Glands.** In: NEILL, J. (Ed.). Knobil & Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier. p. 1149-1172, 2006.
- RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L. **Role of homocysteine metabolism in animal reproduction: A review.** Research in Veterinary Science, v.122, p.29-35, 2019.
- ROBAIRE, B.; HENDERSON, N. A. **Actions of 5 α -reductase inhibitors in the epididymis.** Molecular and Cellular Endocrinology, v.250(1-2), p.190-195, 2006.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. **The Epididymis.** In: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Eds) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 4^a ed. Academic Press: Cambridge, 2015.
- ROBAIRE, B.; VIGER, R. S. **Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions.** Biology of Reproduction, V.52(2), p.226–236, 1995.
- ROBERTS, K. P. **What are the components of the male reproductive-system.** Journal of Andrology, p. 1–4, 1995.

RODRIGUEZ, C. M.; KIRBY, J. L.; HINTON, B. T. **The development of the epididymis.** In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Eds) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice.* Springer: Boston, p.251-267, 2002.

ROMANO, F. et al. **The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: Possible implications in male fertility.** *Contraception*, v.72, p.294–297, 2005.

ROSADO-PEREZ. J; MENDOZA-NÚÑEZ, V. M. **Relationship Between Aerobic Capacity With Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in the Blood of Older Mexican Urban-Dwelling Population.** *Dose-Response*, 2018.

SALE, D. G. **Neural adaptation to resistance training.** *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.20(5), p.S135-145, 1988.

SELHUB, J. **Homocysteine metabolism.** *Annual Review of Nutrition*, v.19, p.217-246, 1999.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. **Distribution of Immune Cells in the Epididymis of the Aging Brown Norway Rat Is Segment-Specific and Related to the Luminal Content.** *Biology of Reproduction*, v.61(3), p.705–714, 1999.

SGRÒ, P.; DI LUIGI, L. **Sport and male sexuality.** *Journal of Endocrinological Investigation*, v.40(9), p.911-923, 2017.

SHARPE, R. **Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood.** *Reproduction*, v.125(6), p.769–784, 2003.

SHERWOOD, L. **Human physiology: from cells to systems.** 9.ed. Boston: Cengage Learning, 2016.

SILVA, A. D. S.; DA MOTA, M. P. G. **Effects of physical activity and training programs on plasma homocysteine levels: a systematic review.** *Amino acids*, v.46(8), p.1795-1804, 2014.

SKINNER, M. K.; ANWAY, M. D. **Seminiferous cord formation and germ-cell programming: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1061, p.18–32, 2005.

- SMITH, A. D.; REFSUM, H. **Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment**. Annual Review of Nutrition, v.36, p.211-239, 2016.
- SMITH, T. B. et al. **Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis**. Andrology, v.2(5), p.755–762, 2014.
- SOKOL, R. Z. **The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants**. In: SIPES, G.; MCQUEEN, C. A.; GANDOLFI, A. J. (Eds). Comprehensive toxicology. Cambridge: Cambridge University Press, p.87-98, 1997.
- STEERS, W. D. **Physiology of the vas deferens**. World Journal of Urology, v.12(5), p.281–285, 1994.
- STRECK, E. L. et al. **In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus**. Metabolic Brain Disease, v.18(2), p.147-154, 2003.
- SUN, E. L.; FLICKINGER, C. J. **Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis**. The Anatomical Record, v.196(3), p.285–293, 1980.
- TEHLIVETS, O. et al. **S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: Yeast as a model system**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, v.1832(1), p.204–215, 2013.
- TORMA, F. et al. **Exercise Increases Markers of Spermatogenesis in Rats Selectively Bred for Low Running Capacity**. PLOS ONE, v.9(12), p.e114075, 2014.
- TORTORA, G. J.; NIELSEN, M. T. **Princípios de anatomia humana**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- TURNER, T. T. **De Graaf's Thread: The Human Epididymis**. Journal of Andrology, v.29(3), p.237–250, 2008.
- VERIT, F. F. et al. **Paraoxonase-1 Activity in Subfertile Men and Relationship to Sperm Parameters**. Journal of Andrology, v.30(2), 183-189, 2009.
- VINCENT, H. K. et al. **Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults**. Obesity, v.14(11), p.1921-1930, 2006.

WALKER, W. H.; CHENG, J. **FSH and testosterone signaling in Sertoli cells.** *Reproduction*, v.130(1), p.15–28, 2005.

WEINBAUER, G. F., LUETJENS, C. M., SIMONI, M., NIESCHLAG, E. **Physiology of Testicular Function.** In: NIESCHLAG E., BEHRE H.M., NIESCHLAG S. (eds) *Andrology*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2010.

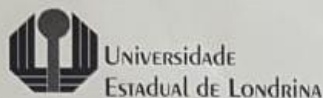
WEISS, N. **Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function.** *Current drug metabolism*, v.6(1), 27-36, 2005.

WELSH, M. et al. **Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility.** *The FASEB Journal*, v.23(12), p.4218–4230, 2009.

ZIRKIN, B. R.; CHEN, H. **Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function During Aging¹.** *Biology of Reproduction*, v.63(4), p. 977–981, 2000.

ANEXO A

Ofício Circular CEUA nº102/2017.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 102/2017

Londrina, 03 de Agosto de 2017.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o adendo ao projeto intitulado: "Efeito do exercício sobre a toxicidade hepática, reprodutiva e muscular induzida pela hiperhomocisteinemia." protocolo CEUA nº12626.2017.55 sob a responsabilidade de **Rafael Deminice**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **01/08/2017**.

O objetivo é analisar o efeito do treinamento físico sobre toxicidade hepática, reprodutiva e muscular induzida por hiperhomocisteinemia por sobrecarga de dl-Homocysteina thiolactona. Grau de invasividade=1

Vigência do Projeto	08/2017 a 08/2020
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	80
Peso/idade	~20g / ~1 mês
Sexo	Machos.
Origem	Biotério Central - Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, fígado, músculo esquelético, testículo, epidídimo, ducto deferente

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Profa. Dra Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. (a) Sr. (a)
Prof. (a) Dr. (a). Rafael Deminice
Responsável pelo projeto
Departamento de Educação Física

C/C para a Biotério Central do CCB
C/C para a Chefia do Depto. de Educação Física
C/C para a Direção de Centro do CEFE

ANEXO B

Guide for Authors

Reproductive Sciences:

<https://us.sagepub.com/en-us/sam/reproductive-sciences/journal201848#submission-guidelines>

APÊNDICE A

Roda de exercício para corrida voluntária adaptada a caixa de biotério

