



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE CAMPOS ZEFFA

**IMPACTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS NA
SAÚDE REPRODUTIVA E NO DESENVOLVIMENTO DA
PROLE DE RATOS WISTAR:
UMA PERSPECTIVA DE DIABETES MELLITUS E
PERIODONTITE**

Londrina
2024

ALINE CAMPOS ZEFFA

**IMPACTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS NA
SAÚDE REPRODUTIVA E NO DESENVOLVIMENTO DA
PROLE DE RATOS WISTAR:
UMA PERSPECTIVA DE DIABETES MELLITUS E
PERIODONTITE**

Tese de Doutorado apresentada à
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do título
de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Maria José Sparça
Salles.

Londrina
2024

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

Zeffa, Aline Campos.

Impacto de doenças inflamatórias crônicas na saúde reprodutiva e no desenvolvimento da prole de ratos Wistar: uma perspectiva de diabetes mellitus e periodontite / Aline Campos Zeffa. - Londrina, 2024.
105 f.

Orientador: Maria José Sparça Salles.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Embriologia - Tese. 2. Periodontite - Tese. 3. Diabetes Mellitus - Tese. 4. Saúde reprodutiva - Tese. I. Sparça Salles, Maria José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

ALINE CAMPOS ZEFFA

**IMPACTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS NA
SAÚDE REPRODUTIVA E NO DESENVOLVIMENTO DA
PROLE DE RATOS WISTAR:
UMA PERSPECTIVA DE DIABETES MELLITUS E
PERIODONTITE**

Tese de doutorado apresentada à
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Maria José Sparça
Salles
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Solange de Paula Ramos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gabriela Fleury Seixas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de janeiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me concedeu graça e sabedoria, por todas as oportunidades e por Seu infinito amor.

Aos meus pais, pelo carinho e apoio incondicionais que sempre me proporcionaram. Obrigada, meus amores. Amo vocês.

Ao meu amado marido, Douglas, que esteve sempre presente, pelo seu amor e suporte. Você é meu companheiro para toda a vida. Te amo.

Aos meus amados irmãos, meus melhores amigos, que me presentearam com os mais adoráveis sobrinhos, fontes de alegria diária.

À minha amada avó Izaura Vieira Primo (*in memorian*), que foi o meu maior exemplo de força. Obrigada, minha querida, por todo o amor e cuidado. Sua memória viverá eternamente em meu coração.

À minha querida Marlene Silva (*in memorian*), que sempre me incentivou e encorajou. Sei que estaria comemorando mais esta etapa, obrigada por tudo. Saudades.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria José Sparça Salles, que esteve ao meu lado ao longo desses 5 anos, me incentivando e guiando nessa caminhada.

À Prof^a Dr^a Solange de Paula Ramos, por ter me apresentado à pesquisa e ser um apoio constante desde o meu primeiro ano na faculdade até hoje. Agradeço por suas orientações e sou profundamente grata por sua amizade.

À minha amiga de laboratório, Camila Salvador Sestario, agradeço a colaboração e amizade sincera, pelas conversas construtivas e principalmente pelas não tão construtivas assim. Torço muito por você.

Ao professor, Prof^o Dr^o Avacir Casanova Andrello, agradeço por toda ajuda, suporte.

Aos professores da banca, Dra. Edna Maria Vissoci Reiche; Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, Dra. Solange de Paula Ramos e Dra. Gabriela Fleury Seixas por aceitarem o convite e contribuírem para a elaboração final deste trabalho.

Por fim, agradeço à Universidade Estadual de Londrina e a CAPES pela concessão da bolsa, que tornou possível esta jornada.

A todos, meu mais sincero agradecimento.

“É pela fé que entendemos que o Universo foi criado pela palavra de Deus e que aquilo que pode ser visto foi feito daquilo que não se vê”.

Hebreus 11:3

RESUMO

ZEFFA, Aline Campos. **Impacto de doenças inflamatórias crônicas na saúde reprodutiva e no desenvolvimento da prole de ratos Wistar: uma perspectiva de diabetes mellitus e periodontite.** 2024. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A periodontite e o diabetes mellitus são condições crônicas inflamatórias que afetam a saúde sistêmica e reprodutiva. Neste sentido, dois estudos experimentais independentes foram realizados, respectivamente, com os seguintes objetivos: (i) investigar as possíveis associações entre a doença periodontal, alterações nos órgãos sexuais masculinos, desempenho sexual e desenvolvimento intrauterino da prole; (ii) investigar os possíveis efeitos protetores do β -Cariofileno em parâmetros fisiológicos, reprodutivos e ósseos em ratos Wistar com diabetes induzida experimentalmente com aloxana. No primeiro estudo, a periodontite foi induzida em ratos Wistar. Após 14 dias de indução da lesão periodontal, os ratos foram mantidos por mais 54 dias, correspondendo a um ciclo completo da espermatogênese. Após esse período, os ratos do grupo periodontite (GP, $n = 12$) e do grupo controle (GC, $n = 12$) foram colocados para acasalar com fêmeas saudáveis (GF, $n = 48$). O acasalamento foi mantido por um período de 10 dias, que corresponde a dois ciclos estrais da fêmea, e posteriormente os machos foram submetidos à eutanásia, laparotomia, coleta de sangue para dosagem de testosterona e remoção e análise dos órgãos reprodutores. Da mesma forma, após 20 dias de prenhez, as fêmeas foram submetidas a eutanásia, laparotomia e histerectomia para avaliar o desenvolvimento intrauterino e a presença de malformações congênitas na prole. No segundo estudo, foram utilizados ratos Wistar machos ($n = 40$), divididos em quatro grupos: o primeiro grupo foi o da indução do diabetes por aloxana (GD), o segundo foi o controle de tratamento que recebeu 200 mg/kg de β -cariofileno (G β -C), o terceiro foi o da indução do diabetes por aloxana que recebeu tratamento com 200 mg/kg de β -cariofileno (GDT β -C) e o quarto grupo foi o grupo controle que recebeu água destilada (GC). Os machos foram mantidos separados das fêmeas por 54 dias, correspondentes a um ciclo completo da espermatogênese. Após o acasalamento, os machos foram submetidos à eutanásia, laparotomia, coleta de sangue para dosagem de testosterona e remoção e análise dos órgãos reprodutores. Após 20 dias de prenhez, as fêmeas foram submetidas à eutanásia, laparotomia e histerectomia para avaliar o desenvolvimento intrauterino e a presença de malformações congênitas na prole. Testes estatísticos incluíram ANOVA *one-way*, Kruskal-Wallis e o teste exato de Fisher, com um nível de significância de 5%. Como resultados no primeiro trabalho o GP apresentou redução no peso corporal, aumento no peso dos órgãos: coração e pulmões quando comparados ao GC. Em relação aos parâmetros reprodutivos, no grupo GP, foi observada diminuição na contagem das células de Sertoli (GC = $23,55 \pm 2,41$; GP = $15,57 \pm 3,13$, $P < 0,0001$) e Leydig (GC = $25,67 \pm 3,50$; GP = $19,72 \pm 5,47$, $P = 0,02$), além de uma considerável diminuição na dosagem de testosterona (GC = 681 ng/dL [422-1009]; GP = 112 ng/dL [48-200], $P = 0,0002$). No grupo GP, observaram-se alterações histológicas nos testículos como intrusão de células do epitélio germinativo para o lúmen, presença de vacúolo nos túbulos seminíferos e espaços intersticiais. Houve um aumento significativo das alterações morfológicas nas caudas dos espermatozoides

($P < 0,0001$). Os efeitos significativos da periodontite no desenvolvimento intrauterino incluíram redução no peso da placenta, do feto e do útero, aumento no número de reabsorções, além de alterações vasculares nos fetos (GP = 21%, $P < 0,0001$; $n = 268$). Quanto ao segundo trabalho os animais do grupo GD apresentaram notável perda de peso em comparação com os outros grupos. Além disso, houve evidências de danos morfológicos significativos nos tecidos reprodutivos, incluindo os testículos, epidídimos e a vesícula seminal. A análise histológica revelou uma redução acentuada no escore de Johnsen, bem como na quantidade de células de Sertoli e Leydig, sugerindo uma deterioração na função reprodutiva nesse grupo. Por outro lado, o grupo submetido ao tratamento com β -cariofileno (GDT β -C) demonstrou efeitos protetores notáveis. Houve um ganho de peso significativo, melhora na performance reprodutiva e preservação da morfologia das células germinativas. Além disso, a densidade óssea foi aumentada no grupo GDT β -C. A análise histológica dos testículos revelou uma possível melhora nos parâmetros reprodutivos, indicada pelo aumento do escore de Johnsen e da preservação das células de Sertoli e Leydig no grupo GDT β -C. Da mesma forma, os espermatozoides no grupo GDT β -C exibiram progresso na direção do desenvolvimento morfológico normal em comparação com o grupo GD. A taxa de prenhez também aumentou para 69% no grupo GDT β -C, destacando os potenciais efeitos benéficos do β -cariofileno na performance reprodutiva. Desta forma, podemos concluir que tanto a periodontite quanto o diabetes podem ter efeitos adversos na performance reprodutiva masculina e no desenvolvimento da prole. Contudo, o tratamento do diabetes com β -cariofileno mostrou potencial terapêutico, protegendo contra os efeitos negativos dos vários parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Doenças bucais; Testosterona; Inflamação; Fertilidade masculina; β -cariofileno; Aloxana.

ABSTRACT

ZEFFA, Aline Campos. **Impact of chronic inflammatory diseases on the reproductive health and development of offspring in Wistar rats: a perspective on diabetes mellitus and periodontitis.** 2024. 105 p. Thesis (Doctorate in Health Science) – Health Science, State University of Londrina, Londrina, 2024.

Periodontitis and diabetes mellitus are chronic inflammatory conditions that affect systemic and reproductive health. In this sense, two independent experimental studies were carried out, respectively, with the following objectives: (i) investigate possible associations between periodontal disease, changes in male sexual organs, sexual performance and intrauterine development of Offspring; (ii) investigate the possible protective effects of β -Caryophyllene on physiological, reproductive and bone parameters bbin Wistar rats with diabetes experimentally induced with alloxan. In the first study, periodontitis was induced in Wistar rats. After 14 days of induction of periodontal injury, the rats were maintained for another 54 days, corresponding to a complete cycle of spermatogenesis. After this period, rats from the periodontitis group (GP, n = 12) and the control group (CG, n = 12) were placed to mate with healthy females (GF, n = 48). Mating was maintained for a period of 10 days, which corresponds to two estrous cycles of the female, and subsequently the males were subjected to euthanasia, laparotomy, blood collection for testosterone measurement and removal and analysis of the reproductive organs. Likewise, after 20 days of pregnancy, the females were subjected to euthanasia, laparotomy and hysterectomy to evaluate intrauterine development and the presence of congenital malformations in the offspring. In the second study, male Wistar rats (n = 40) were used, divided into four groups: the first group was the induction of diabetes by alloxan (GD), the second was the treatment control that received 200 mg/kg of β -caryophyllene (G β -C), the third was the induction of diabetes by alloxan that received treatment with 200 mg/kg of β -caryophyllene (GDT β -C) and the fourth group was the control group that received distilled water (GC). Males were kept separate from females for 54 days, corresponding to a complete cycle of spermatogenesis. After mating, the males underwent euthanasia, laparotomy, blood collection for testosterone measurement and removal and analysis of reproductive organs. After 20 days of pregnancy, the females were subjected to euthanasia, laparotomy and hysterectomy to evaluate intrauterine development and the presence of congenital malformations in the offspring. Statistical tests included one-way ANOVA, Kruskal-Wallis and Fisher's exact test, with a significance level of 5%. As results in the first study, the GP showed a reduction in body weight and an increase in the weight of organs: heart and lungs when compared to the CG. Regarding reproductive parameters, in the GP group, a decrease in Sertoli (GC = 23.55 ± 2.41 ; GP = 15.57 ± 3.13 , P < 0.0001) and Leydig (GC = 25) cell counts was observed. $.67 \pm 3.50$; GP = 19.72 ± 5.47 , P = 0.02), in addition to a considerable decrease in testosterone dosage (GC = 681 ng/dL [422-1009]; GP = 112 ng/dL [48-200], P = 0.0002). In the GP group, histological changes were observed in the testicles, such as intrusion of cells from the germinal epithelium into the lumen, presence of vacuoles in the seminiferous tubules and interstitial spaces. There was a significant increase in morphological changes in sperm tails (P < 0.0001). The significant effects of periodontitis on intrauterine development included reduction in the weight of the placenta, fetus and uterus, increased number

of resorptions, as well as vascular changes in fetuses (GP = 21%, $P < 0.0001$; $n = 268$). As for the second study, the animals in the GD group showed notable weight loss compared to the other groups. Furthermore, there was evidence of significant morphological damage to reproductive tissues, including the testes, epididymis, and seminal vesicle. Histological analysis revealed a marked reduction in the Johnsen score, as well as in the number of Sertoli and Leydig cells, suggesting a deterioration in reproductive function in this group. On the other hand, the group subjected to treatment with β -caryophyllene (GDT β -C) demonstrated notable protective effects. There was a significant weight gain, improvement in reproductive performance and preservation of the morphology of germ cells. Furthermore, bone density was increased in the GDT β -C group. Histological analysis of the testicles revealed a possible improvement in reproductive parameters, indicated by an increase in the Johnsen score and the preservation of Sertoli and Leydig cells in the GDT β -C group. Similarly, spermatozoa in the GDT β -C group exhibited progress toward normal morphological development compared with the GD group. The pregnancy rate also increased to 69% in the GDT β -C group, highlighting the potential beneficial effects of β -caryophyllene on reproductive performance. Therefore, we can conclude that both periodontitis and diabetes can have adverse effects on male reproductive performance and offspring development. However, the treatment of diabetes with β -caryophyllene showed therapeutic potential, protecting against the negative effects of the various parameters evaluated.

Key-words: Testosterone; Inflammation; Male Fertility; β -Caryophyllene; Alloxan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos biológicos que ligam a periodontite à inflamação e doenças sistêmicas.....	21
Figura 2 – Delineamento experimental – Artigo 1.	30
Figura 3 – Delineamento experimental – Artigo 2.	36

ARTIGO 1

Figura 1 – Avaliação óssea ao redor do primeiro molar de ratos do grupo controle (GC, n = 12) e periodontite (GP, n = 12).	50
Figura 2 – Fotomicrografia de cortes transversais de testículos de ratos Wistar dos grupos controle (GC) e periodontite (GP).....	52
Figura 3 – Alterações morfológicas nos espermatozoides do grupo periodontite (GP).....	53
Figura 4 – Proporção (%) de recém-nascidos pequenos para a idade de prenhez (PIP), adequados para a idade de prenhez (AIP) e grandes para a idade de prenhez (GIP) ao término da prenhez de ratas do Grupo Controle e Periodontite.....	55
Figura 5 – Alterações vasculares encontradas em 56 filhotes de um total de 268 no grupo periodontite.	56

ARTIGO 2

Figura 1 – Comparação entre os órgãos sexuais masculinos de ratos Wistar do grupo controle (GC); grupo diabético (GD) e grupo diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C).....	77
Figura 2 – Fotomicrografia de cortes transversais de testículos de ratos Wistar dos grupos controle (GC) e diabético (GD).....	78
Figura 3 – Porcentagem de espermatozoides anormais nos grupos diabéticos (GD), β -cariofileno (G β -C); diabéticos tratados com β -cariofileno (GDT β -C) e grupo controle (GC).	80

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Efeitos da periodontite em ratos machos adultos.....	50
Tabela 2 – Efeitos da periodontite em parâmetros reprodutivos de ratos machos.....	51
Tabela 3 – Efeitos da periodontite no desenvolvimento intrauterino de descendentes de machos com periodontite e fêmeas saudáveis.....	52

ARTIGO 2

Tabela 1 – Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) e da indução de diabetes com aloxana (120 mg/kg) em ratos machos adultos	74
Tabela 2 – Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) em parâmetros reprodutivos dos ratos machos diabéticos	76
Tabela 3 – Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) nos testículos de ratos Wistar diabéticos	79
Tabela 4 – Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) na taxa de prenhez entre as fêmeas saudáveis que foram acasaladas com machos diabéticos.....	81
Tabela 5 – Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) no desenvolvimento intrauterino de descendentes de machos diabéticos e fêmeas saudáveis	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Efeitos do β -cariofileno contra complicações diabéticas.	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Periodontologia
AIP	Peso adequado para a idade de prenhez
ART1	Mono-ADP-ribosiltransferase 1
ANOVA	Análise de Variância
CA	California
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CEP	Código de endereçamento postal
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CONCEA	Concelho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTan	<i>Comprehensive Tex Archive Network</i>
DH	Dieta hiperlipídica
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GC	Grupo controle
GD	Grupo diabético
GDT β -C	Grupo diabético com β -cariofileno
GF	Grupo de Fêmea sem tratamento
GIP	Grandes para idade de prenhez
GP	Grupo Periodontite
G β -C	Grupo β -cariofileno
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-1	Interleucina-1

IL-6	Interleucina-6
IQR	Intervalo Interquartil
KV	Tensão em quilovolts
MO	Missouri
n	Número absoluto
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NJ	Nova Jersey
NOX	Forma reduzida do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina oxidase
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIP	Pequenos para idade de prenhez
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
STZ	Estreptozotocina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UE	União Europeia
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VOI	Volume de interesse
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Periodontite	19
1.1.1	Diabetes Mellitus	23
1.1.1.1	β -cariofileno e diabetes	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos Específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Artigo 1	29
3.1.1	Animais	29
3.1.2	Delineamento experimental.....	30
3.1.3	Indução da doença periodontal	30
3.1.4	Avaliação da toxicidade paterna	31
3.1.5	Identificação da prenhez	31
3.1.6	Eutanásia	31
3.1.7	Análise da espermatogênese	32
3.1.8	Análise da testosterona plasmática.....	32
3.1.9	Análise microtomográfica da periodontite induzida	32
3.1.10	Avaliação do desenvolvimento intrauterino e malformações congenitas externas, viscerais e esqueléticas	33
3.1.11	Análise estatística dos dados	34
3.2	Artigo 2	34
3.2.1	Animais	34
3.2.2	Delineamento experimental.....	36
3.2.3	Indução do diabetes mellitus	37
3.2.4	Análise da toxicidade paterna	37
3.2.5	Identificação da prenhez	37
3.2.6	Eutanásia	38
3.2.7	Análise da espermatogênese	38
3.2.8	Análise da testosterona plasmática.....	38

3.2.9	Avaliação do desenvolvimento intrauterino e malformações congênitas externas, viscerais e esqueléticas	39
3.2.10	Análise estatística dos dados	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Artigo 1 - Efeitos da doença periodontal na performance reprodutiva e na prole de ratos Wistar	42
4.2	Artigo 2 - Identificação dos possíveis efeitos protetores do β-cariofileno sobre diabetes mellitus induzido por Aloxana em ratos Wistar	66
5	CONCLUSÕES	89
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICES	98
	APÊNDICE A – Ficha controle de tratamento de ratos Wistar.....	99
	APÊNDICE B – Ficha de análise esquelética	100
	APÊNDICE C – Ficha de análise visceral	101
	ANEXOS	102
	ANEXO A – Parecer Comitê de Ética – Artigo 1	103
	ANEXO B – Parecer Comitê de Ética – Artigo 2.....	104
	ANEXO C – Parecer Comitê de Ética – Alteração do título	105

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a saúde sexual como um componente vital do bem-estar físico, mental e social. A OMS enfatiza a necessidade de ações específicas para identificar, prevenir e tratar questões de saúde sexual, reconhecendo a importância de abordar essa área de forma abrangente (1).

A infertilidade é definida como a incapacidade de um casal engravidar de forma natural após um ano de relações sexuais regulares sem proteção (2) e possui incidência global de 8-12% dos casais em idade reprodutiva (3). De forma relevante, a infertilidade de origem masculina é responsável por cerca de metade de todos os casos de infertilidade e impacta aproximadamente um em cada 20 homens na faixa etária considerada como período reprodutivo e estende-se da puberdade até os 40 anos de idade (4).

O processo inflamatório em doenças crônicas, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como o estresse oxidativo, é considerado complexo e multifatorial, que envolve a ativação de vias inflamatórias e a liberação de mediadores pró-inflamatórios que podem resultar em danos teciduais. A presença de EROs contribui para o estresse oxidativo, causando lesões celulares e alterações nas moléculas biológicas. Esses eventos estão intimamente relacionados à progressão de doenças inflamatórias crônicas (5). O processo de estresse oxidativo e a geração de EROs estão associados a alterações nos espermatozoides, afetando sua morfologia e motilidade. A presença de EROs desencadeia danos nos lipídios e proteínas dos espermatozoides, levando a disfunções celulares. O estresse oxidativo pode comprometer a integridade do DNA dos espermatozoides, resultando em um impacto negativo na fertilidade e na performance reprodutiva (6–8).

A presença de danos no DNA dos espermatozoides tem sido relacionada a uma série de desfechos clínicos desfavoráveis, como infertilidade, perda gestacional recorrente, mortalidade fetal e aumento na incidência de doenças genéticas (9). O estresse oxidativo está entre as principais causas da deterioração das células espermáticas (10), representando um dos principais contribuintes para a origem da infertilidade masculina. Esse fenômeno compromete a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (8,11,12).

Espermatozoides com alterações podem ter um impacto substancial não apenas nos resultados da concepção, mas também na saúde futura da prole. Isso pode resultar em um aumento do risco de aborto espontâneo devido à influência paterna, além de uma ampla gama de condições genéticas predominantes na descendência (13). Nesse sentido, investigar alterações fetais ocasionadas pelas condições de saúde do pai é fundamental para compreender os fatores genéticos e ambientais que afetam o desenvolvimento do feto, contribuindo para a promoção da performance reprodutiva e prevenção de complicações

nas futuras gerações.

1.1 PERIODONTITE

A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela progressiva e irreversível destruição do periodonto de suporte, incluindo ligamento periodontal e osso alveolar. É uma das principais causas de perda dentária e pode ter um impacto significativo na saúde bucal e qualidade de vida (14). Além disso, representa um fator de alto risco para o desenvolvimento ou agravante de outras doenças, como as cardiovasculares (15), diabetes (16), comprometimento cognitivo (17) e, conseqüentemente, afetando a saúde sistêmica (18). A periodontite representa um grave problema de saúde pública devido sua alta prevalência, sendo a doença inflamatória crônica não transmissível mais comum em seres humanos. De acordo com dados do *Global Burden of Disease*, estima-se que, em 2019, cerca de 1,1 bilhão de pessoas apresentavam periodontite avançada no mundo (19).

A etiologia da doença periodontal é intrinsecamente ligada à atividade dos microrganismos presentes na placa dentária que desencadeiam uma série de respostas imuno inflamatórias no tecido periodontal (14,20–22). Esse processo tem início com o acúmulo de biofilme bacteriano que desencadeiam a resposta imune inflamatória do hospedeiro. Essa resposta resulta na disbiose dentro do biofilme oral, o que leva à desregulação dos processos imunes inflamatórios (20) e, conseqüentemente, na destruição do tecido periodontal (23).

A periodontite, uma condição de origem multifatorial, é influenciada por elementos genéticos e ambientais. Pesquisas visam identificar genes e polimorfismos associados, principalmente aqueles envolvidos na produção de citocinas (24–26). Além disso, estudos epigenéticos mostram potencial para esclarecer a relação entre genética, fenótipos da doença periodontal e fatores ambientais (27). Os microrganismos periodontais, por meio de seus componentes antigênicos, enzimas, toxinas e metabólitos, têm a capacidade de invadir e danificar diretamente os tecidos periodontais, desencadeando processos celulares e moleculares que desempenham um papel fundamental na progressão da periodontite (23,28).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) desempenham um papel significativo na progressão da periodontite (11). Estas citocinas são liberadas em resposta à presença de microrganismos na placa dentária, desencadeando respostas imunológicas que podem levar a um estado inflamatório crônico no tecido periodontal. A atividade contínua dessas citocinas pode levar à degradação dos tecidos de suporte dos dentes, contribuindo para a progressão e gravidade da periodontite (12). As citocinas inflamatórias podem entrar

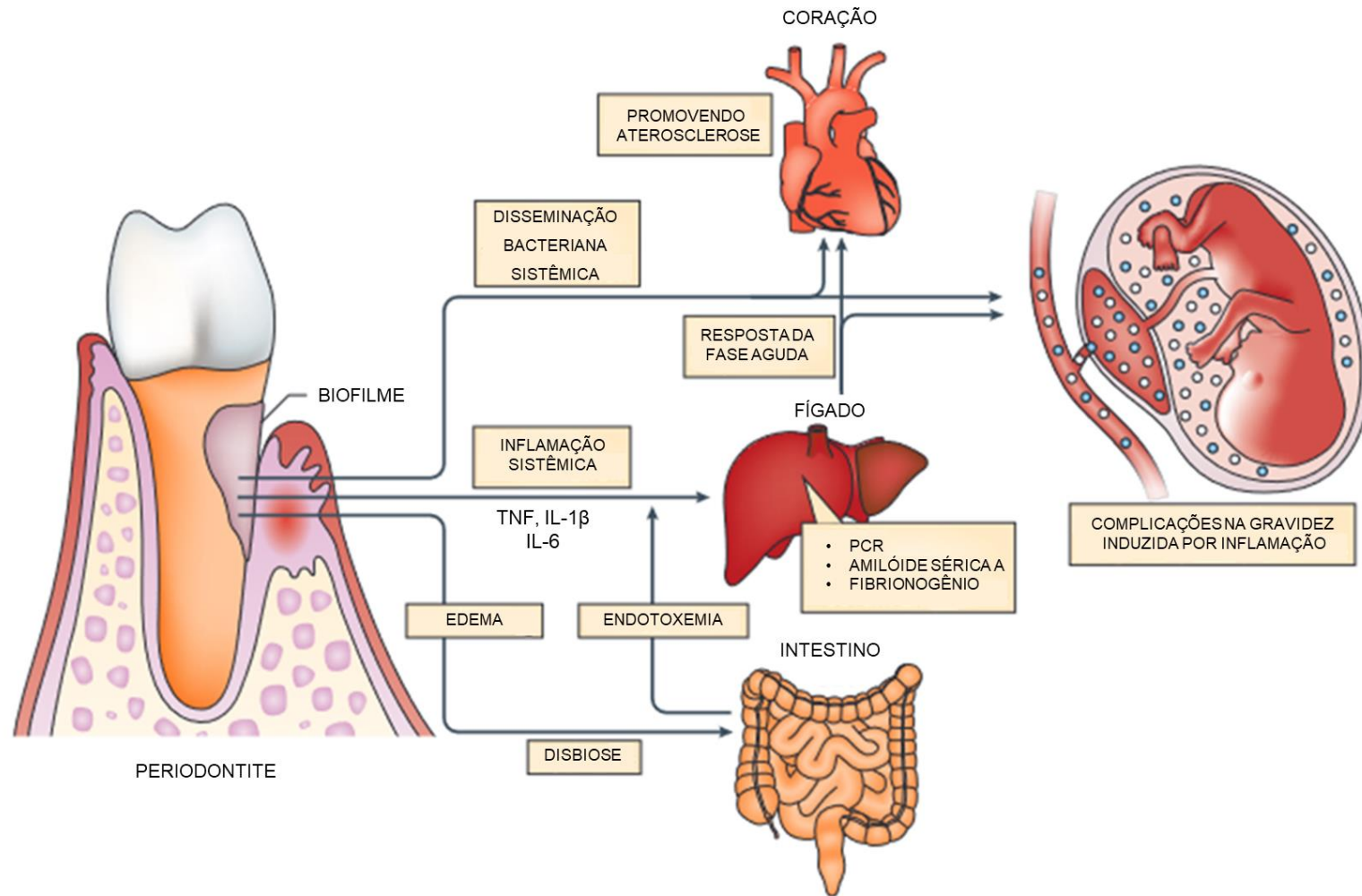
na corrente sanguínea e desencadear respostas inflamatórias sistêmicas (Figura 1) (29). Além disso, bactérias provenientes das bolsas periodontais podem atingir a circulação sanguínea, causando bacteremia. Esses eventos têm sido associados a condições como aterosclerose, aumentando o risco de doenças cardiovasculares entre outras doenças sistêmicas (22,29–32).

Em geral, há uma maior prevalência e progressão mais acentuada da doença periodontal no sexo masculino em comparação ao feminino (33). Os homens, em contraste com as mulheres, exibem uma produção elevada de citocinas inflamatórias (34). Resultados de modelos animais revelaram que os machos apresentam uma expressão distinta de citocinas, resultando em um aprimoramento da resposta estimulada pelos osteoclastos frente aos estímulos bacterianos (35).

A deterioração das células dos tecidos moles e duros periodontais, incluindo apoptose e distúrbios na diferenciação das células do tecido conjuntivo periodontal, osteoclastos e osteoblastos, são fatores fundamentais que contribuem para o desenvolvimento da doença (36,37). Desta forma, a presença de microrganismos na placa dentária desencadeia respostas inflamatórias no tecido periodontal, resultando em estresse oxidativo e dano mitocondrial, o que ocasiona uma produção insuficiente de energia para as células do tecido periodontal que, conseqüentemente, vão apresentar disfunções celulares e deterioração dos tecidos de suporte dos dentes, especialmente em pacientes com periodontite relacionada ao diabetes (38–41).

Os mediadores inflamatórios liberados durante a periodontite podem ter efeitos adversos sobre o sistema reprodutor, interferindo na função testicular e na produção de espermatozoides (22,30,32,42). Além disso, a bacteremia resultante da presença de patógenos periodontais na corrente sanguínea pode contribuir para uma resposta inflamatória sistêmica, afetando indiretamente a saúde reprodutiva (29,43,44). As disfunções no sistema reprodutor masculino, especialmente aquelas associadas à inflamação crônica, podem ter implicações significativas para a saúde reprodutiva e, por conseguinte, para a prole. Estudos têm investigado a possível relação entre alterações na espermatogênese e efeitos adversos na descendência (45,46). A inflamação sistêmica e as mudanças na qualidade do esperma podem impactar negativamente o desenvolvimento embrionário, a taxa de fertilização e a viabilidade dos embriões, potencialmente contribuindo para complicações obstétricas e comprometimento da saúde neonatal (31,47–49).

Figura 1. Mecanismos biológicos presentes na periodontite relacionados à inflamação e doenças sistêmicas.



Na periodontite, as citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente podem ingressar na circulação sistêmica, desencadeando uma resposta de fase aguda no fígado. Esta resposta é caracterizada por níveis elevados de proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e amiloide A sérica, contribuindo, por sua

vez, para o desenvolvimento de aterosclerose ou inflamação intrauterina. Adicionalmente, a ulceração gengival nas bolsas periodontais proporciona a saída e disseminação sistêmica de bactérias periodontais. Algumas dessas bactérias, como *Porphyromonas gingivalis*, foram identificadas em leucócitos circulantes e em lesões ateroscleróticas, onde podem atuar como estímulos pró-aterogênicos. Outras bactérias periodontais, como *Fusobacterium nucleatum*, foram encontradas na placenta, potencialmente causando efeitos adversos na gravidez. A ingestão constante de grandes quantidades de bactérias orais no intestino através da saliva adiciona um contexto relevante. Recentemente, foi proposto um mecanismo adicional que liga a periodontite à inflamação sistêmica: a ingestão de *P. gingivalis* pode causar alterações na microbiota intestinal, aumentando a permeabilidade epitelial intestinal e desencadeando endotoxemia, que por sua vez causa inflamação sistêmica. É importante notar que, embora esses eventos sejam representados de forma independente, não são mutuamente exclusivos e podem ocorrer simultaneamente. Os círculos azuis no compartimento fetal-placentário indicam invasão bacteriana, enquanto os círculos brancos representam a disseminação de mediadores inflamatórios. As abreviações incluem IL (interleucina) e TNF (fator de necrose tumoral). Essas complexas interações ressaltam a necessidade contínua de pesquisa para uma compreensão mais completa desses mecanismos.

Fonte: Adaptado de Hajishengallis (2015).

1.2 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença inflamatória crônica que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. A doença é caracterizada por hiperglicemia, que podem levar a complicações vasculares graves, como doenças cardiovasculares, neuropatia e retinopatia (50). A prevalência da doença tem aumentado em todo mundo, tornando-se um problema de saúde pública global. De acordo com a OMS, estima-se que mais de 422 milhões de adultos viviam com diabetes em 2014, e esse número deve mais que dobrar até 2030 (51). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Diabetes, estima que mais de 15 milhões de pessoas estavam vivendo com a doença em 2019 no país, o que representa 6,9% da população nacional (52).

As complicações vasculares do DM estão relacionadas a um estado crônico de hiperglicemia e podem afetar tanto os grandes vasos sanguíneos, caracterizando o que chamamos de macroangiopatia diabética, quanto os pequenos vasos sanguíneos, que se manifesta como microangiopatia diabética. Essas anormalidades nos vasos sanguíneos são resultado de processos como a glicação não enzimática irreversível de proteínas, mudanças no equilíbrio redox das células, aumento do estresse oxidativo, inflamação crônica, além do desenvolvimento de disfunção no revestimento interno dos vasos, conhecida como disfunção endotelial, e um estado de maior propensão à coagulação, denominado estado de hipercoagulabilidade. Esses fatores contribuem para as complicações vasculares associadas ao DM (53,54).

O aumento na produção de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão celular pode intensificar as respostas inflamatórias, resultando no agravamento das complicações vasculares associadas ao DM. Além disso, certas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, desempenham um papel significativo na promoção de um estado pró-coagulante em células endoteliais lesionadas. Isso ocorre devido à capacidade dessas citocinas de estimular a liberação e expressão de moléculas pró-coagulantes, enquanto inibem a expressão de moléculas anticoagulantes, como a trombomodulina, pelas células endoteliais (55).

A etiologia do DM é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e comportamentais. A maioria dos casos de diabetes pode ser classificada em duas categorias principais em termos de sua origem e desenvolvimento. Na primeira categoria, conhecida como diabetes tipo 1, a causa é uma deficiência total na produção de insulina. Indivíduos com maior probabilidade de desenvolver esse tipo de DM frequentemente apresentam evidências de um processo autoimune nas ilhotas pancreáticas, além de marcadores genéticos identificáveis. Na segunda categoria, mais comum, chamada de DM

tipo 2, a causa envolve uma combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta insuficiente de secreção de insulina. Nessa categoria, é possível que um nível elevado de glicose no sangue, suficiente para causar mudanças patológicas e funcionais em vários tecidos do corpo, esteja presente por um período prolongado, antes que os sintomas clínicos do DM se tornem aparentes (56).

Em pacientes com DM, a regulação normal dos processos metabólicos dentro das mitocôndrias pode ser comprometida, resultando em disfunções mitocondriais (57,58). Além de sua função na produção de energia, as mitocôndrias desempenham um papel essencial na geração EROs. Esses subprodutos químicos possuem uma vida útil muito curta e reagem rapidamente com o DNA, proteínas e lipídios, resultando no que é conhecido como estresse oxidativo. Os ácidos graxos, em particular, são altamente suscetíveis a esse tipo de dano, levando à formação de peróxidos lipídicos. Consequentemente, o acúmulo de ácidos graxos na proximidade da matriz mitocondrial, onde os processos oxidativos ocorrem, aumenta a probabilidade de peroxidação lipídica, o que, por fim, pode levar a danos nas proteínas mitocondriais e à redução da capacidade oxidativa (57,59).

O estresse oxidativo pode estar envolvido no desenvolvimento de anormalidades na função reprodutiva masculina associadas a DM. Em revisão de literatura (60), os autores abordaram uma série de estudos em humanos e modelos animais examinando os efeitos do DM na performance reprodutiva masculina. Os achados destacaram consistentemente a presença de danos nos espermatozoides de homens com DM, indicando uma correlação entre a condição metabólica e a qualidade do esperma. Os estudos em animais analisados revelaram uma série de anormalidades, incluindo alterações na morfologia espermática, comprometimento da motilidade e aumento do estresse oxidativo nas amostras de esperma de indivíduos diabéticos. A presença de diabetes em homens foi associada a um aumento significativo na porcentagem de espermatozoides com danos ao DNA nuclear (61), uma condição que tem sido reconhecida por estar correlacionada com a diminuição da fertilidade e o aumento das chances de aborto espontâneo.

A patogênese do DM inclui predominantemente disfunção das células beta, redução na quantidade ou sensibilidade da insulina, juntamente com o desencadeamento de estresse oxidativo, processos inflamatórios, disfunção mitocondrial e apoptose (62,63). A compreensão desses mecanismos patológicos é fundamental para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes, especialmente dada a crescente incidência de diabetes em todo o mundo. Compreender a interação entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais que contribuem para a manifestação do DM é fundamental para um manejo mais abrangente da doença. A pesquisa contínua e a implementação de abordagens holísticas são essenciais para lidar com os desafios que o DM apresenta em termos de saúde pública e bem-estar individual.

1.2.1.1 β -cariofileno e diabetes

O tratamento do DM é complexo e muitas vezes requer uma abordagem multifatorial. Além dos protocolos convencionais, o uso de terapias complementares tem sido explorado (63–65). O β -cariofileno, um composto presente em diversos óleos essenciais, como no óleo de copaíba, demonstrou propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, o que o torna uma possível ferramenta terapêutica no manejo do DM. Sua capacidade de modular o sistema endocanabinoide, reduzindo a inflamação e melhorando a sensibilidade à insulina, tem despertado interesse na comunidade científica como um possível agente coadjuvante no tratamento do DM, oferecendo uma abordagem promissora e complementar para melhorar o controle glicêmico e reduzir as complicações associadas à doença (66–68).

O β -cariofileno possui efeitos atenuantes sobre a neuroinflamação e a morte neuronal (69). Além disso, sua capacidade de aumentar os antioxidantes endógenos, reduzir os radicais livres e inibir a peroxidação lipídica sugere um potencial terapêutico no DM e suas complicações, agindo em múltiplas vias moleculares que desempenham papéis cruciais na cascata inflamatória e no estresse oxidativo intimamente relacionados ao DM e suas complicações (70–72).

Os estudos mencionados resumidamente no Quadro 1 (73) indicam que o β -cariofileno pode ser um potencial agente terapêutico para diabetes e suas complicações. Além disso, demonstra efeitos protetores sobre os espermatozoides, reduzindo o estresse oxidativo e preservando a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (74). Devido às suas propriedades antioxidantes, o β -cariofileno tem sido associado à redução dos danos provocados pelos radicais livres nos espermatozoides e à preservação da integridade das mitocôndrias, contribuindo para a prevenção de alterações que poderiam comprometer a performance reprodutiva (6,11).

Estudar os possíveis efeitos do β -cariofileno na proteção dos espermatozoides e do sistema reprodutor masculino de portadores de DM é de extrema importância, pois pode abrir caminho para estratégias terapêuticas inovadoras no tratamento da infertilidade masculina e para a preservação da performance reprodutiva. Compreender os mecanismos moleculares pelos quais ele exerce seus efeitos pode levar ao desenvolvimento de intervenções mais eficazes e específicas, promovendo melhorias significativas na performance reprodutiva e qualidade de vida das populações afetadas.

Quadro 1. Efeitos do β -cariofileno contra complicações diabéticas.

Modelos Experimentais	Dose, concentração e período de β-cariofileno	Complicações diabéticas	Efeitos e mecanismos do β-cariofileno	Referência
Células mesangiais humanas	6,25, 12,5 e 25 μ M por 1 hora e depois células estimuladas com alto teor de glicose por 24 horas	Nefropatia diabética	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inibiu a proliferação celular, expressão de EROs e NADPH oxidase (NOX) 2/4. ▪ Reduziu os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6. ▪ Suprimiu a fibronectina e colágeno IV. ▪ Inibiu a ativação de NF-κB e Nrf2. 	(75)
STZ 40 mg/kg, ip na semana 1 (indução), STZ 120 mg/kg na semana 3, (reforço) para camundongos fêmeas BALB/c	10 mg/kg/60 μ L, 45 dias	Dor neuropática diabética	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Redução da glicose no sangue e aumento dos níveis de insulina. ▪ Aliviou a dor da neuropatia diabética. ▪ Reduziu a substância p e citocinas pró-inflamatórias. 	(76)
Tumor induzido por células de melanoma B16F10 e metástase linfonodal em camundongos C57BL/6N com dieta rica em gordura (60 kcal%)	0, 0,15 ou 0,3% por 16 semanas com DH	Câncer associado ao diabetes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inibiu o ganho de peso, crescimento tumoral e metástase. ▪ Inibiu a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, angiogênese e linfangiogênese em tumores. ▪ Inibição de lipídios e secreção de citocinas 	(77)
Células da medula óssea derivadas de tecidos femorais de camundongo	0,1–100 μ M	Osteoporose associada ao diabetes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estimulou a mineralização osteoblástica. ▪ Inibiu a adipogênese ativando PPAR e osteoclastogênese. ▪ Inibiu TNF-α e NF-κB 	(78)
Células tumorais colorretais CT26 expostas a alto teor de glicose e células CT26 transplantadas em DM induzido por STZ (100 mg/kg) em	50 μ M por 48 h in vitro e 200 mg/kg, PO para camundongos por 10 dias	Câncer colorretal associado ao diabetes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduziu a superexpressão de ART1. ▪ Modulou a glicólise e metabolismo energético. ▪ Regulou positivamente da proteína quinase B / mTOR / c-Myc e expressão de 	(79)

camundongos Balb/c machos			enzimas glicolíticas. ▪ Suprimiu a proliferação e aumentou a apoptose de células cancerígenas.	
Polineuropatia simétrica distal em pacientes com DM	Suplemento dietético contendo β -cariofileno, mirra, ácido carnósico	Polineuropatia diabética	▪ Benéfico na neuropatia sensório-motora simétrica distal diabética dolorosa. ▪ Tolerado sem efeitos colaterais.	(80)

Fonte: Adaptado de Hashiesh et al. (2020). STZ, Estreptozotocina; DH, dieta hiperlipídica; DM, diabetes mellitus; EROs, espécies reativas de oxigênio; NADPH, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina; NOX, forma reduzida do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina oxidase; PPAR, receptor ativado por proliferador de peroxissoma; TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa; NF- κ B, fator nuclear kappa B; Nrf2, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; ART1, mono-ADP-ribosiltransferase 1; mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos); c-Myc, alvo da rapamicina em mamíferos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da periodontite e do possível efeito protetor do β -Cariofileno sobre o diabetes induzido sobre a reprodução de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os possíveis efeitos da periodontite sobre a espermatogênese de ratos Wistar.

Analisar os possíveis efeitos da periodontite induzida em ratos Wistar machos sobre o desenvolvimento intrauterino de fêmeas saudáveis.

Avaliar o efeito do β -Cariofileno nos parâmetros reprodutivos de ratos com diabetes induzida.

Analisar o possível efeito protetor do tratamento com β -Cariofileno em ratos machos diabéticos sobre a gestação e prole.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA sob a Lei nº 11.794, de 08/10/2008, e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL Brasil (Parecer n. CEUA-UEL nº 17614.2018.59 – Artigo 1 (ANEXO A) e nº 752.2019.54 - ofício nº 55/2019 e 47/2020 – Artigo 2 (ANEXO B)).

3.1 ARTIGO 1 - EFEITOS DA DOENÇA PERIODONTAL NA PERFORMANCE REPRODUTIVA E NA PROLE DE RATOS WISTAR

3.1.1 Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 24 machos e 48 fêmeas, adultos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com aproximadamente 250 g de peso corporal, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Esses animais passaram por período prévio de aclimação no biotério setorial do Departamento de Biologia Geral, da UEL. Os animais foram mantidos em grupos de 5 e durante o acasalamento em grupos de 3, em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, contendo maravalha (raspas de madeira). Durante a execução deste trabalho os animais foram mantidos em regime de luminosidade controlada, ciclo de 12 horas claro/escuro, a 22 ± 2 °C, com água e ração (Nuvilab, Nuvital, Campo Largo, Brasil) à vontade.

3.1.2 Delineamento experimental

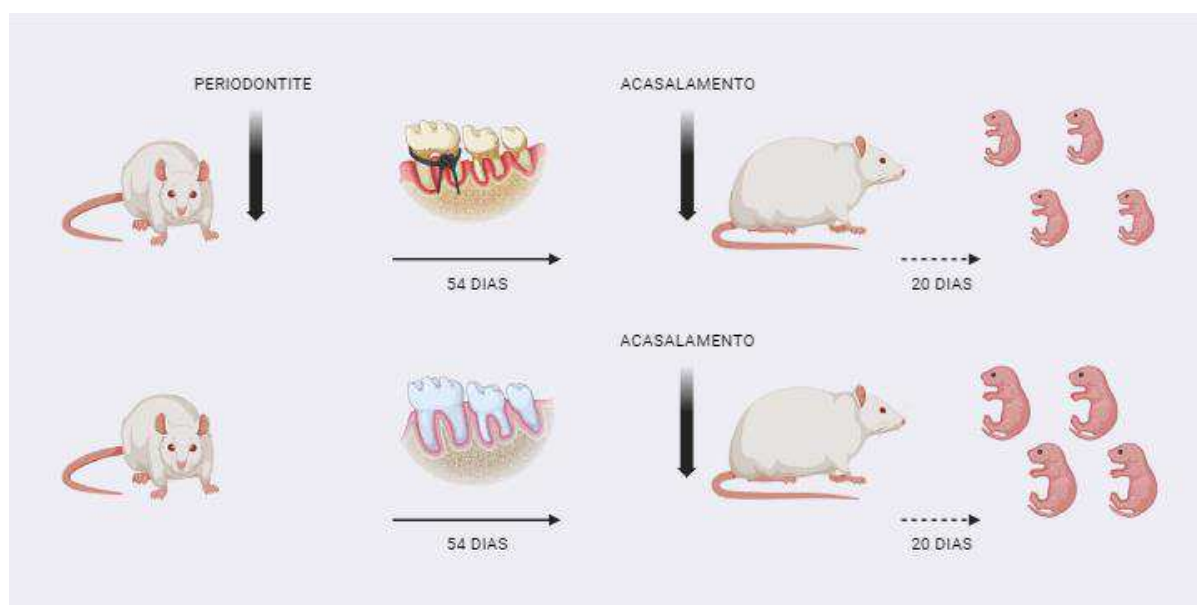
Os 24 ratos machos foram divididos igualmente em dois grupos sendo: o grupo controle (sem ligadura) e o grupo periodontite (com ligadura). Após 14 dias da indução de doença periodontal (81), os animais foram mantidos com a periodontite por 54 dias, período correspondente a um ciclo da espermatogênese em ratos (82). No dia 54, os machos foram colocados para acasalar com fêmeas que não foram submetidas a nenhum tratamento, na proporção de um macho para duas fêmeas (foram utilizadas 48 fêmeas) para a avaliação da performance reprodutiva (83) (Figura 2). Os animais continuaram com a ligadura por mais 10 dias, correspondentes a dois ciclos estrais na fêmea. Nos dias seguintes, com um intervalo de 12 horas, as fêmeas foram examinadas para a identificação de prenhez. Após o acasalamento, os machos foram submetidos a eutanásia para avaliação da espermatogênese, dosagem dos níveis de testosterona e performance reprodutiva, a fim de

investigar possíveis associações entre a doença periodontal e o sistema reprodutivo masculino.

Grupos experimentais

- Grupo Macho Controle (GC, n = 12) animais sem ligadura. Acasalados com fêmeas saudáveis (n = 24).
- Grupo Macho Periodontite (GP, n = 12) animais com ligadura para indução de doença periodontal. Acasalados com fêmeas saudáveis (n = 24).

Figura 2. Delineamento experimental – Artigo 1



Os ratos do grupo GP (n = 12) foram anestesiados e submetidos a indução de periodontite com ligadura por 14 dias e mantida por mais 54 dias que correspondem a dois ciclos da espermatogênese antes do acasalamento e pareados por peso aos ratos do grupo controle GC (n = 12) que também foram submetidos a anestesia. Os animais prenhes foram acompanhados por 20 dias e submetidas a laparotomia exploratória para análise da prole. Grupo Periodontite (GP); Grupo Controle (GC).

3.1.3 Indução da doença periodontal

A indução da periodontite foi realizada sob anestesia geral intramuscular por injeção de uma solução de 16 mg/Kg de xilazina a 2 % cloridrato de sódio (Rompum-Bayer®, São Paulo, SP, Brasil) e 40 mg/Kg de cetamina (Francotar-Virbac®, Roseira, SP, Brasil). Uma ligadura de náilon (3-0, Shalon®, Goiânia, GO, Brasil) foi posicionada em torno da região cervical do primeiro molar mandibular de cada rato e então firmemente amarrado (84). A doença periodontal é estabelecida após 14 dias do posicionamento da ligadura, determinada pela destruição do periodonto de inserção, formando bolsas infraósseas (81). Neste período,

foi oferecida uma dieta pastosa adicional (ração amolecida) ao grupo com periodontite. Os animais GC foram submetidos ao mesmo delineamento experimental do grupo tratado exceto a instalação da ligadura.

3.1.4 Avaliação da toxicidade paterna

Durante todo o período de indução e manutenção da periodontite, foi realizado um acompanhamento do peso corporal a cada três dias dos ratos machos para avaliação da toxicidade, além da observação de possíveis sinais clínicos de toxicidade, como piloereção, olhos avermelhados, diarreia, descoordenação motora e morte (APÊNDICE A). Após a eutanásia e laparotomia, o coração, pulmão, fígado e rins foram removidos e analisados externamente quanto à presença de hemorragias, áreas de necrose e coloração dos tecidos, além de serem pesados de acordo com a metodologia descrita por Stuckhardt e Poppe (1984) (85).

3.1.5 Identificação da prenhez

Após o acasalamento, as fêmeas foram examinadas para identificar a prenhez, com um intervalo de 12 horas. Foi injetado 20 µL de solução de cloreto de sódio a 9 % no canal vaginal da fêmea por meio de uma pipeta de pequeno calibre, seguida de aspiração. O material coletado foi colocado em lâminas de vidro lapidadas e, por meio de um esfregaço, foi verificado ao microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão) a presença de espermatozoides para confirmar a prenhez.

3.1.6 Eutanásia

Ao final do experimento, todos os machos foram submetidos à eutanásia por decapitação, seguida da coleta de sangue para posterior dosagem de testosterona. Esse método de eutanásia é justificado por ser compatível com a realização da dosagem de testosterona, uma vez que outros métodos, como o uso de anestésicos injetáveis ou inalatórios, podem interferir no resultado (86). Em seguida, foi realizada a avaliação clínica intrabucal e, posteriormente, a análise tomográfica da maxila. Os testículos e epidídimos também foram coletados após laparotomia.

3.1.7 Análise da espermatogênese

Para avaliar a morfologia dos espermatozoides no epidídimo, utilizou-se a metodologia descrita por Wyrobek et al. (1983) (87). Foram coletados espermatozoides da cauda do epidídimo e 400 células por animal coradas em Giemsa foram analisadas em microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão).

Os testículos retirados foram imersos em solução fixadora de Bouin.e posteriormente em álcool 70%. As amostras foram então incluídas em parafina histológica e seccionadas. Dez cortes de tecido aleatórios (7 μ m) dos testículos foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina e examinados sob um microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão), equipado com uma câmera digital (Moticam, Motic Company, Xiamen, China), em ampliações de 100 e 400X. Foram avaliados 40 túbulos seminíferos por animal em 100X de ampliação e a avaliação histológica foi classificada e pontuados conforme o escore de Johnsen (1970) (88), em uma escala de de 1 a 10, considerando os túbulos que não apresentavam epitélio seminífero com score 1 e aqueles com presença de todas as células da linhagem espermatogênica no epitélio, incluindo a célula de Sertoli, com escore 10.

Para avaliar o tecido intersticial, as células de Leydig foram contadas e avaliadas pela quantidade de células por unidade de área (mm²) em 10 imagens por animal, em uma ampliação de 400X.

3.1.8 Análise da testosterona plasmática

O plasma sanguíneo foi obtido por centrifugação a 3.000g por 15min a 4°C e armazenado a -20°C até ser analisado por imunoensaio no Laboratório de Pesquisa em imunologia Aplicada da Universidade Estadual de Londrina. A testosterona total presente no plasma foi medida via quimioluminescência (2nd Generation Testosterone. Architect System, Abbott, Wiesbaden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio e a sensibilidade mínima do ensaio foram de 4,6% e 0,15 nmol/L (4,3 ng/dL), respectivamente.

3.1.9 Análise microtomográfica da periodontite induzida

As amostras da maxila dos machos foram analisadas por microtomografia de raios-X, no LARX (Laboratório de Análise por Raio X) da Universidade Estadual de Londrina, objetivando avaliar a perda óssea ao redor do primeiro molar superior em comparação com o grupo controle. A aquisição das imagens das amostras foi realizada num microtomógrafo Skyscan modelo 1173 (Bruker, Billerica, MS, EUA). Os parâmetros usando para aquisição

das imagens foi 50 KV de tensão e 160 μ A para corrente do tubo de raios-X, com um passo angular de rotação de 0, 35°. A resolução espacial usada foi de 8 μ m. A reconstrução das imagens a partir das aquisições foi realizada no *software* NRecon (Micro Photonics, Allentown, PA, EUA), na qual foi efetuada as correções de endurecimento de feixe, artefato de anel e atenuação de ruídos. Com as imagens 2D e 3D reconstruídas, pode-se realizar as análises de perda óssea em torno do dente de interesse. Para padronizar o volume analisado, foi construída uma rotina de análise na aba *custom processes* do *software* CTan (Bruker, Billerica, MS, EUA). Após a obtenção do volume de interesse (VOI), a imagem foi binarizada utilizando o algoritmo Otsu (1979) (89) variação proposta por Liao (2001) (90) e realizada a análise 3D para obter volume de osso e espaço vazio dentro do VOI para cada amostra.

3.1.10 Avaliação do desenvolvimento intrauterino e malformações congênicas externas, viscerais e esqueléticas

O conteúdo intrauterino das fêmeas foi avaliado quanto à presença de reabsorções, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário, comprimento fetal e presença de malformações congênicas externas, sendo calculados os seguintes índices: taxa de viabilidade fetal, taxa de perda pós-implantação, taxa de reabsorção embrionária e índice placentário (91).

O útero e os ovários foram removidos e contado o número de corpos lúteos grávidicos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). A seguir os fetos foram retirados e os cornos uterinos inspecionados quanto ao número de implantações e respectivas placentas. A presença de reabsorção, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário e malformações externas também foram analisados (91).

Foram determinados a viabilidade fetal ($[\text{número de fetos vivos}/\text{número de locais de implantação}] \times 100$), após perda de implantação ($[\text{número de locais de implantação} - \text{número de fetos vivos}/\text{número de locais de implantação}] \times 100$), taxa de reabsorção embrionária ($[\text{número de reabsorções}/\text{número de locais de implantação}] \times 100$) e índice placentário (peso da placenta/peso do feto). A taxa de perda pré-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de corpos lúteos}, \text{número de implantações}) / \text{número de corpos lúteos}] \times 100$. A porcentagem de perdas pós-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de implantações}, \text{número de fetos vivos}) / \text{número de implantações}] \times 100$ (91).

Os fetos foram analisados quanto à presença de malformações congênicas externas (APÊNDICE B e C). Cerca de metade deles foram destinados à análise de malformações viscerais, sendo fixados em solução de Bodian e posteriormente examinados por meio de

cortes e microdissecção (92). Essa avaliação foi realizada em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). O restante dos fetos foi destinado à análise de malformações esqueléticas (93), sendo inicialmente fixados em acetona, eviscerados, diafanizados e corados em solução aquosa de hidróxido de potássio, alizarina e solução clareadora. Posteriormente, cada feto foi analisado em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). Foi realizada também a adequação do peso à idade de prenhes (APIP) (94).

3.1.11 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram analisados no *software GraphPad Prism 5®* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), utilizando o teste t de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para avaliar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de D'Agostino-Pearson. Para a análise de dados de frequência, foram empregados o teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado com correção de Yates. As variáveis categóricas foram apresentadas em número absoluto (n) e percentual (%), enquanto as variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQR) para dados não paramétricos. Considerou-se diferença estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

3.2 ARTIGO 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS PROTETORES DO B-CARIOFILENO SOBRE DIABETES MELLITUS INDUZIDO POR ALOXANA EM RATOS WISTAR

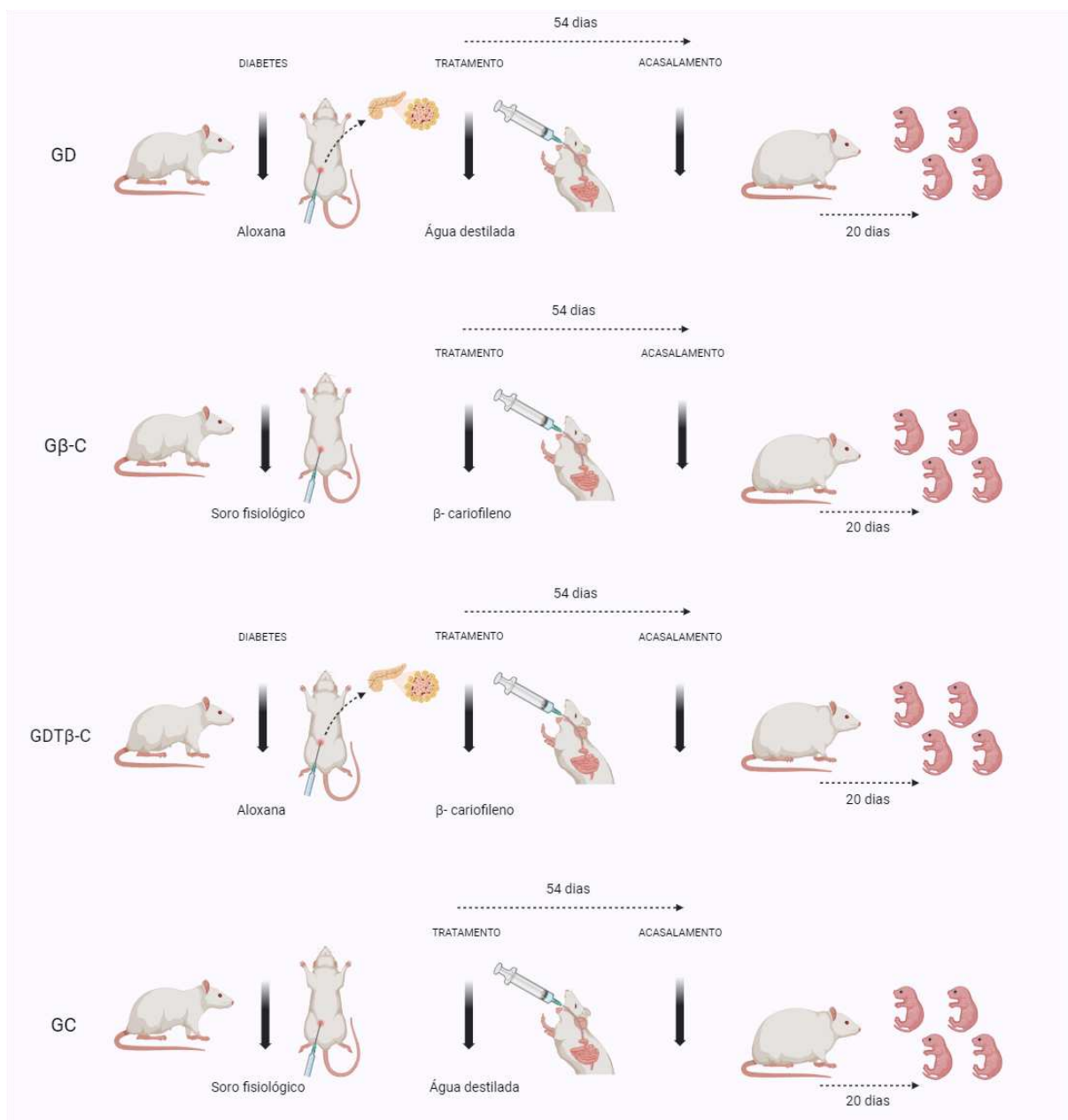
3.2.1 Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 40 ratos machos e 80 fêmeas, adultos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com aproximadamente 250 g de peso corporal, provenientes do Biotério Central do CCB-UEL. Londrina, Paraná, Brasil. Esses animais passaram por período prévio de aclimação no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Geral da UEL. Os animais foram mantidos em grupos de 5 e durante o acasalamento em grupos de 3, em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado e maravalha (raspas de madeira). Durante o estudo, os animais foram mantidos em regime de luminosidade controlada, ciclo de 12 horas claro/escuro e 22 ± 2 °C, com água e ração (Nuvilab, Nuvital, Campo Largo, Brasil) à vontade.

3.2.2 Delineamento experimental

Os 40 ratos machos foram distribuídos em quatro grupos experimentais com dez ratos machos em cada grupo (Figura 3), sendo:

1. Grupo diabético (GD): Os animais deste grupo receberam por administração via intraperitoneal, aloxana em dose única de 120 mg/kg de peso corporal. Após a confirmação do diabetes induzida, por meio da dosagem de glicemia, os animais receberam diariamente, via gavagem, água destilada, por um período de 54 dias.
2. Grupo β -cariofileno ($G\beta$ -C): Os animais deste grupo receberam diariamente, via gavagem, a dose de 200 mg/kg de β -cariofileno (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) (70), por um período de 54 dias. O volume administrado foi calculado em função do peso, sendo monitorado a cada três dias com ajuste da dose.
3. Grupo diabético tratado com β -cariofileno ($GDT\beta$ -C): Os animais receberam por administração via intraperitoneal, aloxana em dose única de 120 mg/kg de peso corporal. Após a confirmação do diabetes induzida, por meio da dosagem da glicemia, os animais receberam diariamente, via gavagem, a dose de 200 mg/kg de β -cariofileno por um período de 54 dias. O volume administrado foi calculado em função do peso, sendo monitorado a cada três dias com ajuste da dose.
4. Grupo controle (GC): Os animais deste grupo receberam diariamente, via gavagem, água destilada no mesmo volume administrado no grupo tratado por um período de 54 dias.

Figura 3. Delineamento experimental – Artigo 2

Os ratos do grupo GD ($n = 10$) foram submetidos a indução de diabetes por administração via intraperitoneal, aloxana em dose única de 120 mg/kg de peso corporal. Após a confirmação do diabetes induzida, por meio da dosagem de glicemia, os animais receberam diariamente, via gavagem, água destilada, por um período de 54 dias. Os animais do grupo Gβ-C ($n = 10$) receberam diariamente, via gavagem, a dose de 200 mg/kg de β-cariofileno, por um período de 54 dias. Os animais do grupo GDTβ-C ($n = 10$) receberam por administração via intraperitoneal, aloxana em dose única de 120 mg/kg de peso corporal. Após a confirmação do diabetes induzida, por meio da dosagem da glicemia, os animais receberam diariamente, via gavagem, a dose de 200 mg/kg de β-cariofileno por um período de 54 dias. Os animais do grupo GC ($n = 10$) receberam diariamente, via gavagem, água destilada no mesmo volume administrado no grupo tratado por um período de 54 dias. No dia 54, os machos foram colocados para acasalar com fêmeas que não foram submetidas a nenhum tratamento, na proporção de um macho para duas fêmeas. Após 20 dias as fêmeas foram submetidas a laparotomia exploratória para análise da prole.

Grupo diabético (GD); Grupo β-cariofileno (Gβ-C); Grupo diabético tratado com β-cariofileno (GDTβ-C) e Grupo controle (GC).

3.2.3 Indução do diabetes mellitus

O diabetes mellitus foi induzido por administração via intraperitoneal de aloxana (Sigma Co., Cream Ridge, NJ, EUA) em dose única de 120 mg/kg de peso corporal (95), após 12 horas de jejum. A glicose no sangue foi medida usando tiras reagentes do tipo Accu-Chek Glucometer (Roche, Basileia, Suíça). Os animais foram considerados diabéticos quando a glicemia fosse superior a 200 mg/dl (96–98).

Após a confirmação do diabetes induzida, os animais foram mantidos por 54 dias, período correspondente a um ciclo da espermatogênese em ratos (82). Nesse dia, os machos foram alocados para acasalar com fêmeas que não foram submetidas a nenhum tratamento, na proporção de um macho para duas fêmeas. Os animais continuaram sendo tratados por mais dez dias, correspondentes a dois ciclos estrais da fêmea. Nos dias seguintes, com um intervalo de 12 horas, as fêmeas foram examinadas para a identificação de prenhez. Para a avaliação da performance reprodutiva foi utilizado o protocolo de Andrade et al. (99). Após o acasalamento, os machos foram submetidos à eutanásia para avaliação da espermatogênese, dosagem dos níveis de testosterona e performance reprodutiva. Durante o estudo houve perda de um animal em ambos os grupos GD e GDT β -C devido a complicações do diabetes.

3.2.4 Análise da toxicidade paterna

Os ratos machos foram monitorados quanto ao ganho de peso a cada três dias, durante todo período experimental (64 dias). Sinais clínicos de toxicidade como piloereção, olhos avermelhados, diarreia, falta de coordenação motora e morte também foram avaliados (APÊNDICE A). Após a eutanásia e laparotomia, o coração, pulmão, fígado e rins foram removidos, pesados e analisados externamente quanto à presença de hemorragias, áreas de necrose e coloração dos tecidos, além de serem pesados de acordo com a metodologia descrita por Stuckhardt e Poppe (1984) (85).

3.2.5 Identificação da prenhez

Após o acasalamento, as fêmeas foram examinadas para identificar a prenhez com um intervalo de 12 horas. Foi injetado 20 μ L de solução de cloreto de sódio a 9% no canal vaginal por meio de pipeta de pequeno calibre, seguido de aspiração. O material coletado foi colocado em lâminas de vidro lapidadas e, por meio de um esfregaço, foi verificado ao microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão) a presença de espermatozoides para confirmar a prenhez.

3.2.6 Eutanásia

Ao final do experimento, todos os machos foram submetidos à eutanásia por decapitação, seguida da coleta de sangue para posterior dosagem de testosterona. Esse método de eutanásia é justificado por ser compatível com a realização da dosagem de testosterona, uma vez que outros métodos, como o uso de anestésicos injetáveis ou inalatórios, podem interferir no resultado (86). Os testículos e epidídimos também foram removidos após laparotomia.

3.2.7 Análise da espermatogênese

Para avaliar a morfologia dos espermatozoides no epidídimo, utilizou-se a metodologia descrita por Wyrobek et al. (1983) (87). Foram coletados espermatozoides da cauda do epidídimo e 400 células por animal coradas em giemsa foram analisadas em microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão).

Os testículos retirados foram imersos em solução fixadora de Bouin e posteriormente em álcool 70%. As amostras foram então incluídas em parafina histológica e seccionadas. Dez cortes de tecido aleatórios (7 μ m) dos testículos foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina e examinados sob um microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão), equipado com uma câmera digital (Moticam, Motic Company, Xiamen, China), em ampliações de 100 e 400X. Foram avaliados 40 túbulos seminíferos por animal em 100X de ampliação e a avaliação histológica foi classificada e pontuada conforme o escore de Johnsen (1970) (88), em uma escala de de 1 a 10, considerando os túbulos que não apresentavam epitélio seminífero com score 1 e aqueles com presença de todas as células da linhagem espermatogênica no epitélio, incluindo a célula de Sertoli, com score 10.

Para avaliar o tecido intersticial, as células de Leydig foram contadas e avaliadas pela quantidade de células por unidade de área (mm²) em 10 imagens por animal, em uma ampliação de 400X.

3.2.8 Análise da testosterona plasmática

O plasma sanguíneo foi obtido por centrifugação a 3.000g por 15min a 4°C e armazenado a -20°C até ser analisado por imunoenensaio no Laboratório de Pesquisa em imunologia Aplicada da Universidade Estadual de Londrina. A testosterona total presente no plasma foi medida via quimioluminescência (2nd Generation Testosterone. Architect System, Abbott, Wiesbaden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio e a sensibilidade mínima do ensaio foram de 4,6% e 0,15 nmol/L (4,3

ng/dL), respectivamente.

3.2.9 Avaliação do desenvolvimento intrauterino e malformações congênitas externas, viscerais e esqueléticas

O conteúdo intrauterino das fêmeas foi avaliado quanto à presença de reabsorções, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário, comprimento fetal e presença de malformações congênitas externas, sendo calculados os seguintes índices: taxa de viabilidade fetal, taxa de perda pós-implantação, taxa de reabsorção embrionária e índice placentário (91).

O útero e os ovários foram removidos e contado o número de corpos lúteos gravídicos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). A seguir os fetos foram retirados e os cornos uterinos inspecionados quanto ao número de implantações e respectivas placentas. A presença de reabsorção, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário e malformações externas também foram analisados (91).

Foram determinados a viabilidade fetal ($[\text{número de fetos vivos}/\text{número de locais de implantação}] \times 100$), após perda de implantação ($[\text{número de locais de implantação} - \text{número de fetos vivos}/\text{número de locais de implantação}] \times 100$), taxa de reabsorção embrionária ($[\text{número de reabsorções}/\text{número de locais de implantação}] \times 100$) e índice placentário (peso da placenta/peso do feto). A taxa de perda pré-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de corpos lúteos}, \text{número de implantações}) / \text{número de corpos lúteos}] \times 100$. A porcentagem de perdas pós-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de implantações}, \text{número de fetos vivos}) / \text{número de implantações}] \times 100$ (91).

Os fetos foram analisados quanto à presença de malformações congênitas externas (APÊNDICE B e C). Cerca de metade deles foram destinados à análise de malformações viscerais, sendo fixados em solução de Bodian e posteriormente examinados por meio de cortes e microdissecção (92). Essa avaliação foi realizada em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). O restante dos fetos foi destinado à análise de malformações esqueléticas (93), sendo inicialmente fixados em acetona, eviscerados, diafanizados e corados em solução aquosa de hidróxido de potássio, alizarina e solução clareadora. Posteriormente, cada feto foi analisado em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). Foi realizada também a adequação do peso à idade de prenhes (APIP) (94).

3.2.10 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram analisados no software *GraphPad Prism 5*® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Para avaliar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de D'Agostino-Pearson. A Anova *one-way* utilizado para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Os testes pós-hoc de Bonferroni e de Dunn foram utilizados para os dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Para a análise de dados de frequência, foram empregados o teste exato de Fisher. As variáveis categóricas foram apresentadas em número absoluto (n) e percentual (%), enquanto as variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQR) para dados não paramétricos. Considerou-se diferença estatisticamente significativa quando $P \leq 0,05$ para todas as análises realizadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na tese estão descritos em dois artigos que serão submetidos às revistas científicas.

4.1 EFEITOS DA DOENÇA PERIODONTAL NA PERFORMANCE REPRODUTIVA E NA PROLE DE RATOS WISTAR

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS PROTETORES DO B-CARIOFILENO SOBRE DIABETES MELLITUS INDUZIDO POR ALOXANA EM RATOS WISTAR

4.1 ARTIGO 1

Efeitos da doença periodontal na performance reprodutiva e na prole de ratos Wistar

Aline Campos Zeffa^a, Camila Salvador Sestario^a, Solange de Paula Ramos^b, Avacir Casanova Andrello^c, Andrea Name Colado Simão^d, Maria José Sparça Salles^{e*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^b Departamento de Histologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^c Departamento de Física, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^d Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^e Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Autor de correspondência:

* Maria José Sparça Salles (salmjs@gmail.com)

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral

Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380

Caixa postal: 10.011

CEP: 86057970

RESUMO

A relação entre a doença periodontal, a performance reprodutiva masculina e o desenvolvimento da prole não estão esclarecidos. Considerando que a doença periodontal promove um processo inflamatório com potencial de danificar outros tecidos, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da periodontite sobre o testículo, desempenho reprodutivo e prole de ratos machos. A periodontite foi induzida em ratos Wistar machos, por meio de ligadura nos primeiros molares. Após 14 dias de indução da lesão periodontal, os ratos foram mantidos por mais 54 dias, correspondendo a um ciclo completo da espermatogênese. Após esse período, os ratos do grupo periodontia (GP, n=12) e do grupo controle (GC, n=12) foram colocados para acasalar com fêmeas saudáveis (GF, n=48). O acasalamento foi mantido por um período de 10 dias, que corresponde a 2 ciclos estrais da fêmea, e posteriormente os machos foram submetidos a eutanásia, laparotomia, coleta de sangue para dosagem de testosterona e remoção e análise dos órgãos reprodutores. Após 20 dias de prenhez, as fêmeas foram submetidas a eutanásia, laparotomia e histerectomia para avaliar o desenvolvimento intrauterino e a presença de malformações congênitas na prole. Dados paramétricos foram analisados pelo teste t de Student e dados não paramétricos pelo teste de Mann-Whitney, com significância de 5%. Os machos com periodontite apresentaram redução no peso corporal, aumento no peso dos órgãos: coração e pulmões quando comparados ao grupo controle. Em relação aos parâmetros reprodutivos, no grupo GP, foi observada diminuição na contagem das células de Sertoli (GC = $23,55 \pm 2,41$; GP = $15,57 \pm 3,13$, $P < 0,0001$) e Leydig (GC = $25,67 \pm 3,50$; GP = $19,72 \pm 5,47$, $P = 0,02$), além de uma considerável diminuição na dosagem de testosterona (GC = 681 [422-1009]; GP = 112 [48-200], $P = 0,0002$). No grupo GP, observaram-se alterações histológicas como intrusão de células do epitélio germinativo para o lúmen, presença de vacúolo nos túbulos seminíferos e espaços intersticiais. Houve aumento significativo das alterações morfológicas nas caudas dos espermatozoides ($P < 0,0001$). Os efeitos significativos da periodontite no desenvolvimento intrauterino incluíram redução no peso da placenta, do feto e do útero, aumento no número de reabsorções, além de alterações vasculares nos fetos (GP = 21%, $P < 0,0001$; n = 268). Os dados obtidos mostraram que a periodontite promoveu efeitos adversos na performance reprodutiva masculina e no desenvolvimento da prole.

Palavras-chave: Inflamação; Saúde bucal; Estresse oxidativo; Fertilidade masculina; Malformações fetais.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal, caracterizada pela inflamação crônica das estruturas de suporte dos dentes, não se limita apenas à cavidade oral, podendo ter impactos sistêmicos que afetam outros órgãos (1,2). Os mecanismos pelos quais a doença periodontal pode comprometer órgãos distantes envolvem principalmente a disseminação de mediadores inflamatórios e patógenos bacterianos. A inflamação crônica na cavidade oral resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que podem entrar na corrente sanguínea e desencadear respostas inflamatórias sistêmicas. Além disso, bactérias provenientes das bolsas periodontais podem atingir a circulação sanguínea, causando bacteremia (1–4). Esses eventos têm sido associados a condições como aterosclerose, aumentando o risco de doenças cardiovasculares, e agravando condições inflamatórias sistêmicas, como diabetes e artrite reumatoide (4–6)

Embora a relação entre periodontite e o aparelho reprodutor masculino seja um campo de pesquisa em desenvolvimento, existem evidências sugerindo uma possível associação entre a doença periodontal e disfunções no sistema reprodutivo masculino (7–10). Os mediadores inflamatórios liberados durante a periodontite podem exercer efeitos negativos sobre o sistema reprodutor, interferindo na função testicular e na produção de espermatozoides (1,2,6,9). Além disso, a bacteremia induzida pela presença de patógenos periodontais na corrente sanguínea pode contribuir para a resposta inflamatória sistêmica, impactando indiretamente a saúde reprodutiva (4,8,11).

As disfunções no sistema reprodutor masculino, especialmente aquelas associadas à inflamação crônica, podem ter implicações para a saúde reprodutiva e conseqüentemente na prole. Estudos têm explorado a possível relação entre alterações na espermatogênese e efeitos adversos na descendência (12,13). A inflamação sistêmica e as mudanças na qualidade do esperma podem afetar negativamente o desenvolvimento embrionário, a taxa de fertilização e a viabilidade dos embriões, potencialmente contribuindo para complicações obstétricas e saúde neonatal comprometida (5,14–16). Além disso, há evidências sugerindo que a exposição a fatores inflamatórios durante a produção de espermatozoides pode influenciar a expressão gênica em células germinativas masculinas, impactando a saúde a longo prazo da prole (12,13,16). Embora mais pesquisas sejam necessárias para uma compreensão abrangente desses mecanismos e seus efeitos na prole, a interação entre a saúde reprodutiva masculina e os desfechos na descendência é uma área de crescente interesse científico.

Considerando a importância da doença periodontal como problema de saúde pública e as possíveis implicações sistêmicas que ela pode acarretar, é essencial investigar e

compreender suas implicações em diferentes aspectos da saúde, incluindo os parâmetros reprodutivos masculino, bem como o desenvolvimento da prole. Esse estudo se propõe a contribuir nesse sentido, buscando esclarecer as possíveis associações entre a doença periodontal, alterações nos órgãos sexuais masculinos, desempenho sexual e saúde da prole.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 24 machos e 48 fêmeas, adultos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com aproximadamente 250 g de peso corporal, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Esses animais passaram por período prévio de aclimação no biotério setorial do Departamento de Biologia Geral, da UEL. Os animais foram mantidos em grupos de 5 e durante o acasalamento em grupos de 3, em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, contendo maravalha (raspas de madeira). Durante a execução deste trabalho os animais foram mantidos em regime de luminosidade controlada, ciclo de 12 horas claro/escuro, a 22 ± 2 °C, com água e ração (Nuvilab, Nuvital, Campo Largo, Brasil) à vontade.

Delineamento experimental

Os 24 ratos machos foram divididos igualmente em dois grupos sendo: o grupo controle (sem ligadura) e o grupo periodontite (com ligadura). Após 14 dias da indução de doença periodontal (17), os animais foram mantidos com a periodontite por 54 dias, período correspondente a um ciclo da espermatogênese em ratos (18). No dia 54, os machos foram colocados para acasalar com fêmeas que não foram submetidas a nenhum tratamento, na proporção de um macho para duas fêmeas (foram utilizadas 48 fêmeas) para a avaliação da performance reprodutiva (19). Os animais continuaram com a ligadura por mais 10 dias, correspondentes a dois ciclos estrais na fêmea. Nos dias seguintes, com um intervalo de 12 horas, as fêmeas foram examinadas para a identificação de prenhez. Após o acasalamento, os machos foram submetidos a eutanásia para avaliação da espermatogênese, dosagem dos níveis de testosterona e performance reprodutiva, a fim de investigar possíveis associações entre a doença periodontal e o sistema reprodutivo masculino.

Grupos experimentais

- Grupo Macho Controle (GC, n = 12) animais sem ligadura. Acasalados com fêmeas saudáveis (n = 24).
- Grupo Macho Periodontite (GP, n = 12) animais com ligadura para indução de doença periodontal. Acasalados com fêmeas saudáveis (n = 24).

Indução da doença periodontal

A indução da periodontite foi realizada sob anestesia geral intramuscular por injeção de uma solução de 16 mg/Kg de xilazina a 2 % cloridrato de sódio (Rompum-Bayer®, São Paulo, SP, Brasil) e 40 mg/Kg de cetamina (Francotar-Virbac®, Roseira, SP, Brasil). Uma ligadura de náilon (3-0, Shalon®, Goiânia, GO, Brasil) foi posicionada em torno da região cervical do primeiro molar mandibular de cada rato e então firmemente amarrado (20). A doença periodontal é estabelecida após 14 dias do posicionamento da ligadura, determinada pela destruição do periodonto de inserção, formando bolsas infraósseas (17). Neste período, foi oferecida uma dieta pastosa adicional (ração amolecida em água) ao grupo com periodontite. Os animais GC foram submetidos ao mesmo delineamento experimental do grupo tratado exceto a instalação da ligadura.

Avaliação da toxicidade paterna

Durante todo o período de indução e manutenção da periodontite, foi realizado um acompanhamento do peso corporal a cada três dias dos ratos machos para avaliação da toxicidade, além da observação de possíveis sinais clínicos de toxicidade, como piloereção, olhos avermelhados, diarreia, descoordenação motora e morte (APÊNDICE A). Após a eutanásia e laparotomia, o coração, pulmão, fígado e rins foram removidos e analisados externamente quanto à presença de hemorragias, áreas de necrose e coloração dos tecidos, além de serem pesados de acordo com a metodologia descrita por Stuckhardt e Poppe (1984) (21).

Identificação da prenhez

Após o acasalamento, as fêmeas foram examinadas para identificar a prenhez, com um intervalo de 12 horas. Foi injetado 20 µL de solução de cloreto de sódio a 9 % no canal vaginal da fêmea por meio de uma pipeta de pequeno calibre, seguida de aspiração. O material coletado foi colocado em lâminas de vidro lapidadas e, por meio de um esfregaço,

foi verificado ao microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão) a presença de espermatozoides para confirmar a prenhez.

Eutanásia

Ao final do experimento, todos os machos foram submetidos à eutanásia por decapitação, seguida da coleta de sangue para posterior dosagem de testosterona. Esse método de eutanásia é justificado por ser compatível com a realização da dosagem de testosterona, uma vez que outros métodos, como o uso de anestésicos injetáveis ou inalatórios, podem interferir no resultado (22). Em seguida, foi realizada a avaliação clínica intrabucal e, posteriormente, a análise tomográfica da maxila. Os testículos e epidídimos também foram coletados após laparotomia.

Análise da espermatogênese

Para avaliar a morfologia dos espermatozoides no epidídimo, utilizou-se a metodologia descrita por Wyrobek et al. (1983) (23). Foram coletados espermatozoides da cauda do epidídimo e 400 células por animal coradas em giemsa foram analisadas em microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão).

Os testículos retirados foram imersos em solução fixadora de Bouin e posteriormente em álcool 70%. As amostras foram então incluídas em parafina histológica e seccionadas. Dez cortes de tecido aleatórios (7 μ m) dos testículos foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina e examinados sob um microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão), equipado com uma câmera digital (Moticam, Motic Company, Xiamen, China), em ampliações de 100 e 400X. Foram avaliados 40 túbulos seminíferos por animal em 100X de ampliação e a avaliação histológica foi classificada e pontuada conforme o escore de Johnsen (1970) (24), em uma escala de 1 a 10, considerando os túbulos que não apresentavam epitélio seminífero com score 1 e aqueles com presença de todas as células da linhagem espermatogênica no epitélio, incluindo a célula de Sertoli, com score 10.

Para avaliar o tecido intersticial, as células de Leydig foram contadas e avaliadas pela quantidade de células por unidade de área (mm^2) em 10 imagens por animal, em uma ampliação de 400X.

Análise da testosterona plasmática

O plasma sanguíneo foi obtido por centrifugação a 3.000g por 15min a 4°C e armazenado a -20°C até ser analisado por imunoenensaio no Laboratório de Pesquisa em

imunologia Aplicada da Universidade Estadual de Londrina. A testosterona total presente no plasma foi medida via quimioluminescência (2nd Generation Testosterone. Architect System, Abbott, Wiesbaden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio e a sensibilidade mínima do ensaio foram de 4,6% e 0,15 nmol/L (4,3 ng/dL), respectivamente.

Análise microtomográfica da periodontite induzida

As amostras da maxila dos machos foram analisadas por microtomografia de raios-X, no LARX (Laboratório de Análise por Raio X) da Universidade Estadual de Londrina, objetivando avaliar a perda óssea ao redor do primeiro molar superior em comparação com o grupo controle. A aquisição das imagens das amostras foi realizada num microtomógrafo Skyscan modelo 1173 (Bruker, Billerica, MS, EUA). Os parâmetros usando para aquisição das imagens foi 50 KV de tensão e 160 μ A para corrente do tudo de raios-X, com um passo angular de rotação de 0, 35°. A resolução espacial usada foi de 8 μ m. A reconstrução das imagens a partir das aquisições foi realizada no *software* NRecon (Micro Photonics, Allentown, PA, EUA), na qual foi efetuada as correções de endurecimento de feixe, artefato de anel e atenuação de ruídos. Com as imagens 2D e 3D reconstruídas, pode-se realizar as análises de perda óssea em torno do dente de interesse. Para padronizar o volume analisado, foi construída uma rotina de análise na aba *custom processes* do *software* CTan (Bruker, Billerica, MS, EUA). Após a obtenção do volume de interesse (VOI), a imagem foi binarizada utilizando o algoritmo Otsu (1979) (25) variação proposta por Liao (2001) (26) e realizada a análise 3D para obter volume de osso e espaço vazio dentro do VOI para cada amostra.

Avaliação do desenvolvimento intrauterino e malformações congênitas externas, viscerais e esqueléticas

O conteúdo intrauterino das fêmeas foi avaliado quanto à presença de reabsorções, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário, comprimento fetal e presença de malformações congênitas externas, sendo calculados os seguintes índices: taxa de viabilidade fetal, taxa de perda pós-implantação, taxa de reabsorção embrionária e índice placentário (27).

O útero e os ovários foram removidos e contado o número de corpos lúteos gravídicos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). A seguir os fetos foram retirados e os cornos uterinos inspecionados quanto ao número de implantações e respectivas placentas. A presença de reabsorção, número de

fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário e malformações externas também foram analisados (27).

Foram determinados a viabilidade fetal ($[\text{número de fetos vivos/número de locais de implantação}] \times 100$), após perda de implantação ($[\text{número de locais de implantação} - \text{número de fetos vivos/número de locais de implantação}] \times 100$), taxa de reabsorção embrionária ($[\text{número de reabsorções /número de locais de implantação}] \times 100$) e índice placentário (peso da placenta/peso do feto). A taxa de perda pré-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de corpos lúteos, número de implantações}) / \text{número de corpos lúteos}] \times 100$. A porcentagem de perdas pós-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de implantações, número de fetos vivos}) / \text{número de implantações}] \times 100$ (27).

Os fetos foram analisados quanto à presença de malformações congênitas externas (APÊNDICE B e C). Cerca de metade deles foram destinados à análise de malformações viscerais, sendo fixados em solução de Bodian e posteriormente examinados por meio de cortes e microdissecção (28). Essa avaliação foi realizada em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). O restante dos fetos foi destinado à análise de malformações esqueléticas (29), sendo inicialmente fixados em acetona, eviscerados, diafanizados e corados em solução aquosa de hidróxido de potássio, alizarina e solução clareadora. Posteriormente, cada feto foi analisado em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). Foi realizada também a adequação do peso à idade de prenhes (APIP) (30).

Análise estatística dos dados

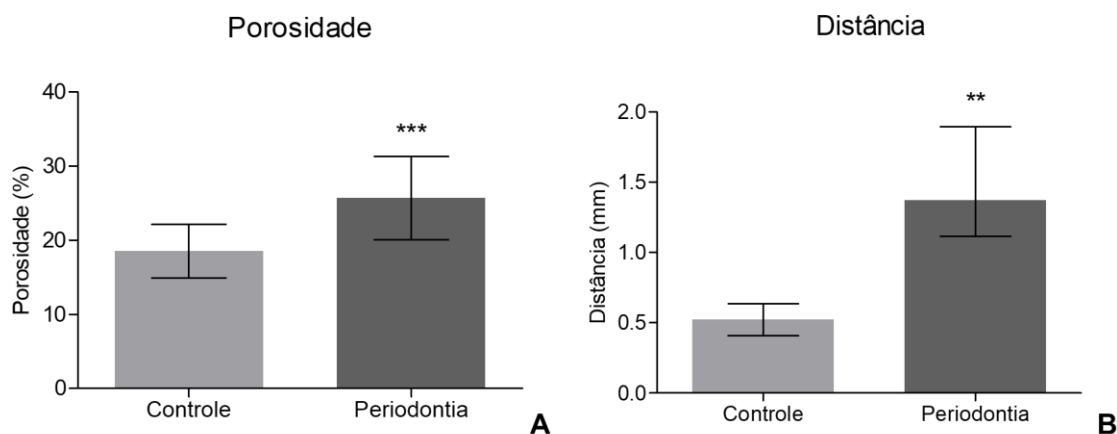
Os dados obtidos foram analisados no *software GraphPad Prism 5®* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), utilizando o teste t de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para avaliar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de D'Agostino-Pearson. Para a análise de dados de frequência, foram empregados o teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado com correção de Yates. As variáveis categóricas foram apresentadas em número absoluto (n) e percentual (%), enquanto as variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQR) para dados não paramétricos. Considerou-se diferença estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

A análise microtomográfica revelou uma maior porcentagem de porosidade ao redor do primeiro molar no GP ($26 \pm 6 \%$), em comparação ao GC ($19 \pm 4 \%$) (Figura 5A). Além

disso, no GP, foi observada uma distância significativamente maior entre a junção amelocementária e o osso alveolar (1,37 [1,12-1,90] mm), em comparação com o GC (0,53 [0,41-0,64] mm), o que é característico de reabsorção óssea na periodontite (Figura 1B).

Figura 1. Avaliação óssea ao redor do primeiro molar de ratos do grupo controle (GC, n = 12) e periodontite (GP, n = 12).



(A) Porosidade ao redor do primeiro molar. ***P 0,0004 Teste t de Student.

(B) Distância entre a junção amelocementária e o osso alveolar. **P 0,002 Teste de Mann-Whitney.

Foram observadas diminuição de peso corporal final e do ganho de peso, além de aumento de peso dos órgãos: coração e pulmões nos animais com periodontite (GP) em comparação ao grupo controle (GC) (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos da periodontite em ratos machos adultos.

Parâmetro	GC (n = 12)	GP (n = 12)	P-valor
Peso (g) ^a	362 ± 33	301 ± 26	<0,0001
Ganho de peso (g) ^a	108 ± 29	69 ± 14	0,0005
Peso do coração (g) ^a	1,19 ± 0,13	1,30 ± 0,11	0,02
Peso dos pulmões (g) ^b	1,75 [1,70-2,05]	2,03 [1,86-2,27]	0,02
Peso do fígado (g) ^a	12,64 ± 1,25	11,95 ± 1,75	0,28
Peso dos rins (g) ^a	2,56 ± 0,18	2,42 ± 0,26	0,16

^aDados paramétricos estão expressos em médias e desvio padrão, e foram analisados pelo teste t de Student.

^bDados não paramétricos estão expressos em medianas e quartis, e foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

Grupo controle (GC) e grupo periodontite (GP).

Em relação aos parâmetros reprodutivos, não foram observadas alterações no peso e medidas dos órgãos sexuais. No entanto, no GP, foi observada diminuição na contagem das células de Sertoli e Leydig, além de uma considerável diminuição na dosagem de testosterona em comparação ao grupo GC (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da periodontite em parâmetros reprodutivos de ratos machos.

Parâmetro Reprodutivo	GC (n = 12)	GP (n = 12)	P-valor
Peso do epidídimo direito (g) ^a	0,69 ± 0,09	0,68 ± 0,07	0,6
Peso do epidídimo esquerdo (g) ^a	0,67 ± 0,08	0,70 ± 0,09	0,4
Peso do testículo direito (g) ^a	1,46 ± 0,16	1,49 ± 0,23	0,8
Peso do testículo esquerdo (g) ^a	1,49 ± 0,13	1,50 ± 0,23	0,8
Peso da vesícula seminal cheia (g) ^a	1,33 ± 0,29	1,51 ± 0,39	0,2
Peso da vesícula seminal vazia (g) ^a	0,96 ± 0,30	1,02 ± 0,30	0,6
Medida do testículo direito (mm) ^a	2,00 ± 0,07	2,03 ± 0,05	0,2
Medida do testículo esquerdo (mm) ^a	2,01 ± 0,07	2,03 ± 0,05	0,5
Escore de Johnsen ^a	9,78 ± 0,18	9,54 ± 0,53	0,2
Células de Sertoli (célula/mm ²) ^a	23,55 ± 2,41	15,57 ± 3,13	<0,0001
Células de Leydig (célula/mm ²) ^a	25,67 ± 3,50	19,72 ± 5,47	0,02
Dosagem de testosterona (ng/dL) ^b	681 [422-1009]	112 [48-200]	0,0002

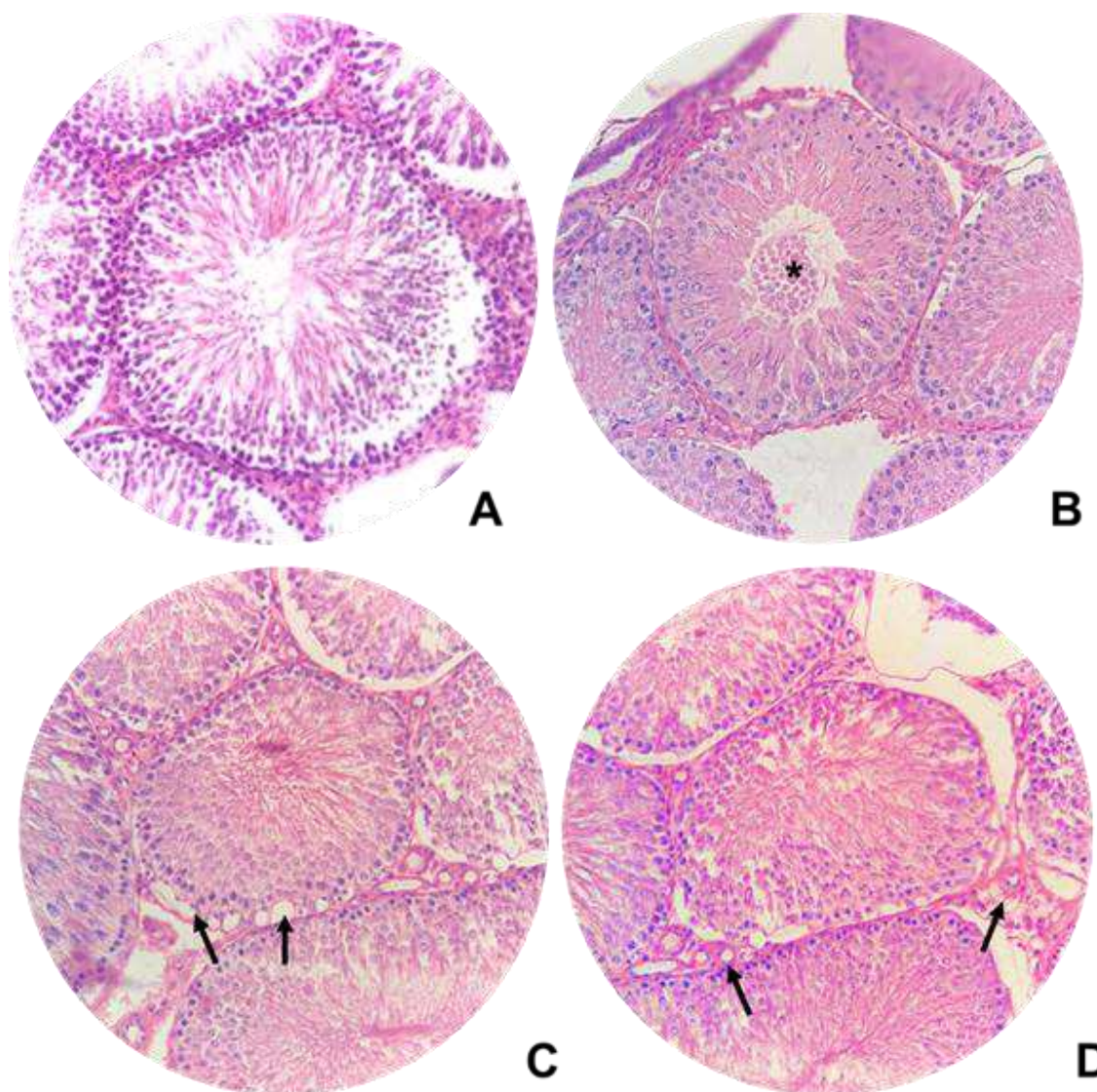
^aDados paramétricos estão expressos em médias e desvio padrão, e foram analisados pelo teste t de Student.

^bDados não paramétricos estão expressos em medianas e quartis, e foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

Grupo controle (GC) e grupo periodontite (GP).

Na análise histológica dos testículos do GP, foram observadas intrusão de células do epitélio germinativo para o lúmen, presença de vacúolo nos túbulos seminíferos e nos espaços intersticial. A presença de vacúolo são alterações compatíveis com degeneração hidrópica, que consiste em acúmulo intracelular de água que ocorre pela incapacidade da célula de manter o equilíbrio iônico e a homeostasia de fluidos (Figura 2).

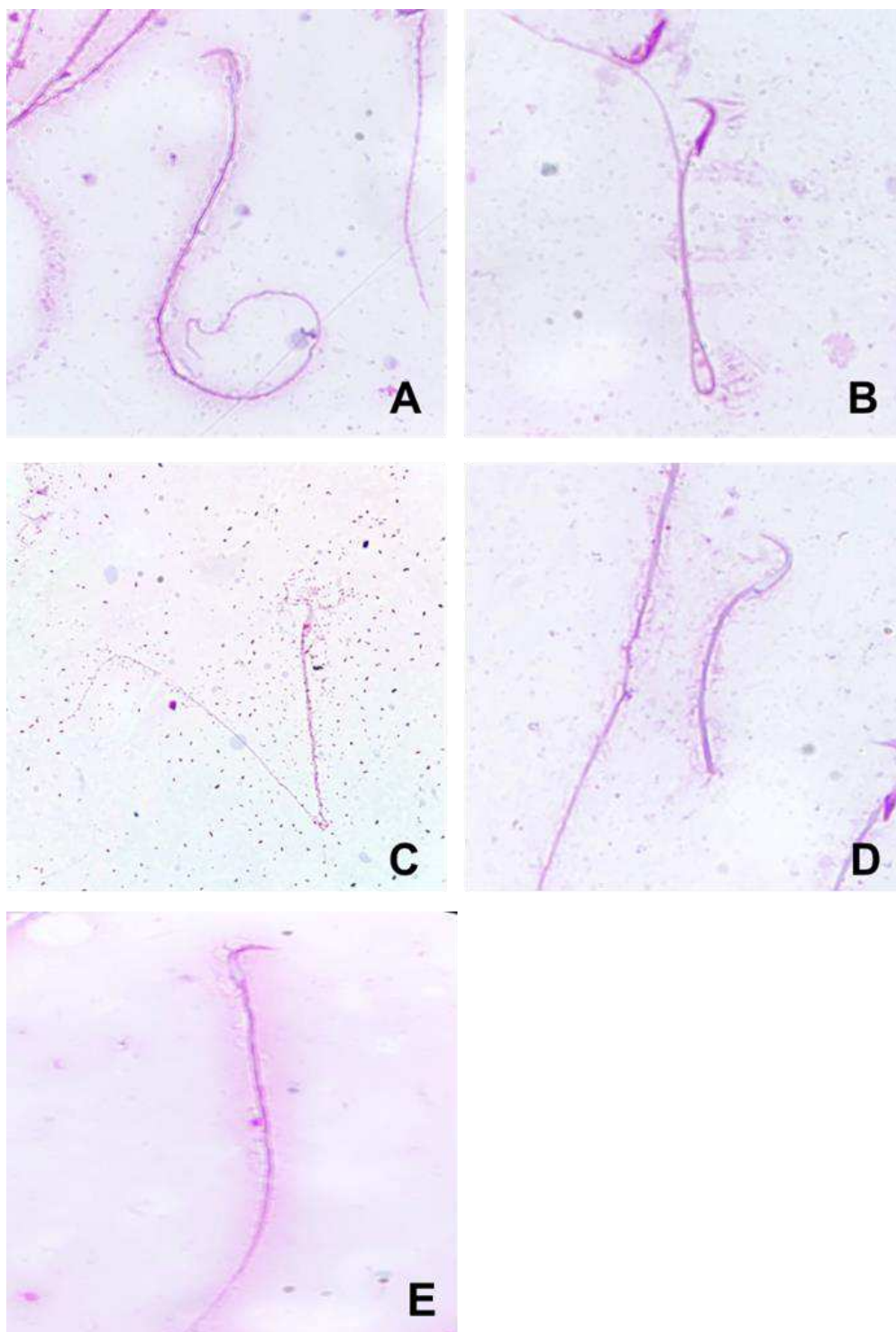
Figura 2. Fotomicrografia de cortes transversais de testículos de ratos Wistar dos grupos controle (GC) e periodontite (GP).



(A) GC sem alterações; (B) GP indicando intrusão de células do epitélio germinativo para o lúmen (*); (C) GP com presença de vacúolos nos túbulos seminíferos (setas) e (D) GP, observar espaços intersticiais vacuolizados (setas). Hematoxilina-eosina, médio aumento.

Durante a avaliação da morfologia dos espermatozoides, constatou-se uma maior porcentagem de alterações na morfologia da cauda, tais como enrolada, dobrada, em forma de vírgula e curta, nos espermatozoides pertencentes ao GP (33%), em comparação com o GC (11%) (Figura 3). O teste Qui-quadrado com correção de Yats apresentou resultado significativo com $P < 0,0001$.

Figura 3. Alterações morfológicas nos espermatozoides do grupo periodontite (GP).



As alterações incluíram cauda enrolada (A), cauda dobrada (B), cauda em formato de vírgula (C) e cauda curta (D). Espermatozoide sem alterações (E). Coloração de Giemsa, 400X.

Foram observadas reabsorções, diminuição no peso da placenta, medida e peso dos fetos, peso do útero, taxa de viabilidade fetal, aumento da perda pós-implantacional e da taxa de reabsorções no GP que foram acasalados com fêmeas saudáveis em comparação

com o GC (Tabela 3). Além disso, no grupo periodontite, um macho realizou o acasalamento com apenas uma das duas fêmeas.

Tabela 3. Efeitos da periodontite no desenvolvimento intrauterino de descendentes de machos com periodontite e fêmeas saudáveis.

Parâmetro das Fêmeas	GC (n = 24)	GP (n = 23)	P-valor
Peso final (g) ^b	330 [310-350]	315 [304-348]	0,2
Ganho de peso (g) ^a	95 ± 12	90 ± 19	0,4
Número de reabsorções (contagem por animal) ^b	0	1 [0.25-1]	0,001
Sítios de implantação (contagem) ^b	12 [11-13]	13 [11-13]	0,8
Peso da placenta (g) ^b	0,56 [0,50-0,63]	0,52 [0,47-0,64]	0,02
Medida dos fetos (cm) ^b	3,80 [3,70-4,00]	3,20 [3,10-3,40]	<0,0001
Peso dos fetos (g) ^b	5,03 [3,83-5,50]	3,60 [3,30-3,97]	<0,0001
Peso do útero (g) ^a	77,55 ± 10,57	66,14 ± 12,76	0,003
Taxa de viabilidade fetal (%) ^b	100 [100-100]	100 [92-100]	0,003
Perda pós implantacional (%) ^b	0	0 [0-8]	0,003
Taxa de reabsorções (%) ^b	0	0 [0-8]	0,003

^aDados paramétricos estão expressos em médias e desvio padrão, e foram analisados pelo teste t de Student.

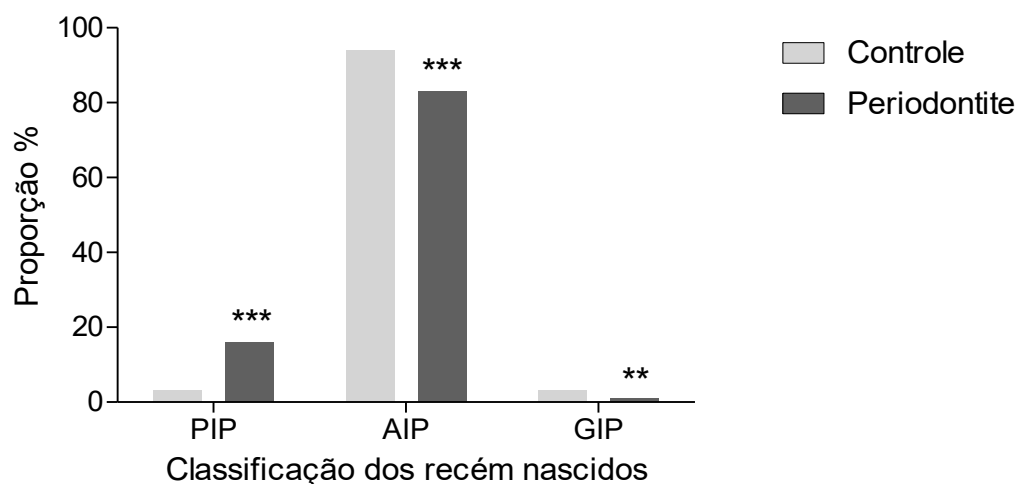
^bDados não paramétricos estão expressos em medianas e quartis, e foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

Grupo controle (GC), grupo periodontite (GP) e grupo de fêmea sem tratamento (GF).

Taxa de reabsorções ([número de reabsorções /número de locais de implantação] X 100).

O peso fetal em relação à idade gestacional de fetos do GC (n = 287) e do GP (n = 268), demonstrando que 16% (43 fetos) dos fetos do GP apresentavam baixo peso para a idade de prenhez (PIP), enquanto 83% (222 fetos) apresentavam peso adequado para a idade de prenhez (AIP) e apenas 0,8% (2 fetos) estavam grandes para a idade de prenhez (GIP) (Figura 4).

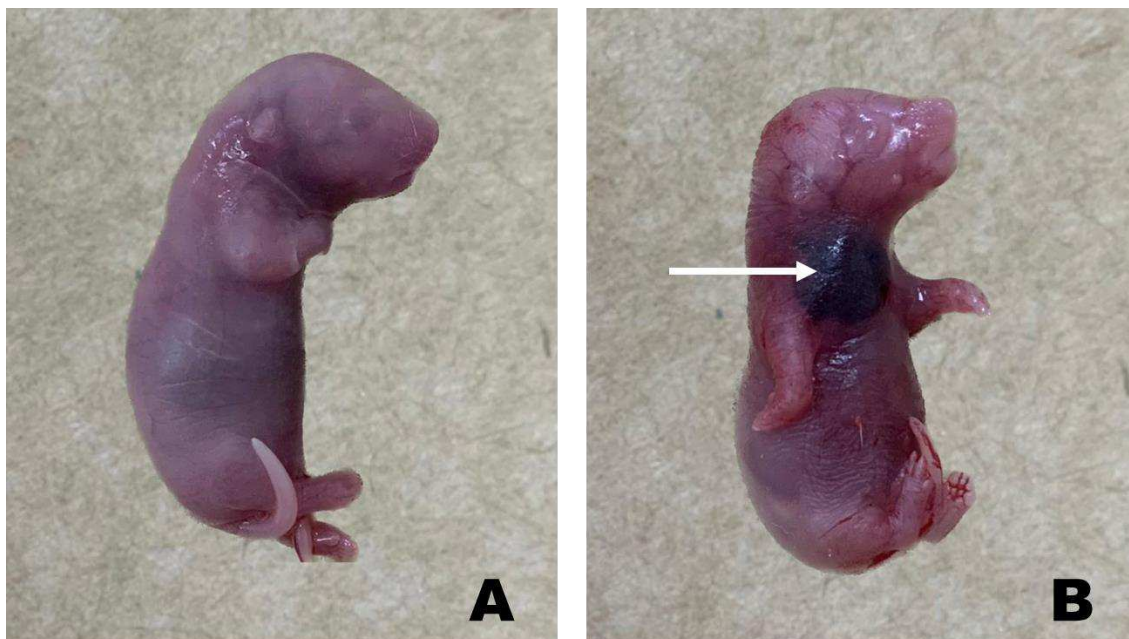
Figura 4. Proporção (%) de recém-nascidos pequenos para a idade de prenhez (PIP), adequados para a idade de prenhez (AIP) e grandes para a idade de prenhez (GIP) ao término da prenhez de ratos do Grupo Controle e Periodontite.



P = 0,002 *P < 0,0001 teste Qui-quadrado.

Alterações vasculares foram identificadas em 21% (P < 0.0001; n = 268) dos filhotes do GP (Figura 5), enquanto nenhuma alteração foi observada no GC (n = 287). Não foram identificadas outras alterações viscerais ou esqueléticas nos grupos avaliados.

Figura 5. Alterações vasculares encontradas em 56 filhotes de um total de 268 no grupo periodontite.



(A) Grupo controle sem alterações.
(B) Grupo periodontite com alteração vascular (seta).

DISCUSSÃO

A relação entre a saúde periodontal e geral do organismo tem sido amplamente estudada (31–33). Estudos (10,34) têm sugerido uma possível associação entre a doença periodontal e a performance reprodutiva masculina. Descobertas em estudos com humanos relataram correlação positiva entre alterações nos espermatozoides e pacientes com doença periodontal (9,11,35). A partir dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a doença periodontal apresentou efeito adverso sobre os parâmetros reprodutivos masculinos, resultando em alterações morfológicas da cauda dos espermatozoides e, conseqüentemente, comprometendo a fertilidade masculina.

A possível explicação para associação entre doença periodontal e performance reprodutiva masculina pode ser a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) durante a inflamação e destruição do periodonto (36,37). Essas citocinas podem afetar diretamente os testículos e hormônios sexuais, como a testosterona, resultando em alterações nos parâmetros reprodutivos masculinos (10,34,38). O estudo de Reborcet et al. (39) revela uma relação essencial entre a quantidade de células de Sertoli, células de Leydig, células germinativas e testosterona, a qual desempenha um papel importante no desenvolvimento e na preservação dos testículos em sua fase adulta. Embora alguns estudos tenham relacionado

uma maior perda óssea periodontal no estágio inicial da doença em homens a níveis consideravelmente mais elevados de testosterona (10,40,41), este estudo específico identificou uma notável redução nos níveis de testosterona. Essa diminuição pode ser atribuída possivelmente à redução no número de células de Leydig.

As células de Leydig e Sertoli são importantes componentes dos testículos por serem responsáveis pela produção e regulação da testosterona, um hormônio esteroide essencial para o desenvolvimento e funcionamento adequado do sistema reprodutor masculino. As células de Leydig são responsáveis pela produção de testosterona nos testículos, enquanto as células de Sertoli fornecem suporte estrutural e nutricional para a espermatogênese e auxiliam no controle da concentração hormonal, incluindo a testosterona no ambiente seminífero. (39,42–45). Estudos destacam alterações importantes na qualidade do sêmen de homens com doença periodontal, como diminuição da quantidade dos espermatozoides (oligospermia) e alterações de motilidade (9,10,46,47). No presente estudo, foram observadas alterações morfológicas nas caudas dos espermatozoides, o que pode resultar em uma redução na motilidade.

Práger et al (8) sugerem duas possíveis explicações para a diminuição na qualidade do sêmen em homens com periodontite. A primeira delas é a bacteremia, que pode ser causada por infecção local proveniente de problemas periodontais. A segunda hipótese destaca os altos níveis de citocinas plasmáticas relacionadas a reações inflamatórias periodontais. Por sua vez, Klinger et al. (11) propõem a hipótese de que a presença de IL-6 no plasma seminal é a causa das alterações no sêmen e, conseqüentemente, da infertilidade. Essa citocina é encontrada em níveis significativamente mais elevados em homens inférteis do que em homens férteis. Embora a inflamação crônica possa ter efeitos sistêmicos, não foram encontrados na literatura consultada estudos que demonstrem uma relação direta entre a doença periodontal e as células de Sertoli ou de Leydig.

Durante a doença periodontal, o processo inflamatório ativa as células do sistema imunológico, como neutrófilos, macrófagos e células epiteliais. Essas células produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) como parte da resposta de defesa do organismo (48,49). Quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante do organismo, ocorre estresse oxidativo no tecido periodontal. O aumento das EROs desempenha um papel fundamental na destruição do tecido periodontal durante a doença, sendo que, à medida que a doença progride, observa-se um aumento significativo do estresse oxidativo (48,50,51). O estresse oxidativo resultante da inflamação crônica pode levar à disfunção endotelial, afetando a circulação sanguínea e prejudicando a oxigenação adequada dos tecidos, incluindo os tecidos reprodutivos (52–54). Portanto, sugere-se que a inflamação associada à periodontite possa afetar a circulação sanguínea nos testículos, resultando em danos nos tecidos e, conseqüentemente, na degeneração hidrópica

observada no presente estudo.

Neste estudo, observamos alterações no peso corporal, coração e pulmão de machos do grupo periodontite. Estudos anteriores sobre a doença periodontal, também relataram alterações na estrutura e função do coração e pulmão provenientes dos danos causados pelas citocinas inflamatórias liberadas durante a progressão da doença (55–58). As citocinas inflamatórias podem causar mudanças na estrutura e função do coração, incluindo hipertrofia ventricular esquerda e disfunção diastólica (56–58). Além disso, também são capazes de desenvolver alterações na microcirculação e função pulmonar, como redução da capacidade de difusão de oxigênio, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e respiratórias (31,33).

Pesquisas (15,16,59) sugerem que a inflamação crônica decorrente da doença periodontal em homens pode levar a alterações epigenéticas em seu DNA, que têm a capacidade de serem transmitidas para a prole. Mesmo com as mães saudáveis, o presente estudo revela alterações vasculares em fetos do grupo com periodontite. Alterações epigenéticas nos pais podem acarretar em uma maior predisposição à ocorrência de doenças cardiovasculares na prole e, conseqüentemente, resultar em danos aos vasos sanguíneos, bem como progredir para aterosclerose e outras doenças cardiovasculares graves (59,60). Embora o presente estudo não tenha investigado as alterações epigenéticas, ficou claro que investigações futuras nessa área podem proporcionar uma compreensão mais profunda das suas implicações associadas à periodontite e seu impacto na saúde da prole.

O peso fetal foi avaliado em relação à idade gestacional, revelando de maneira significativa um índice mais elevado de baixo peso entre os fetos do grupo com doença periodontal. A doença periodontal tem sido associada a vários desfechos adversos na gravidez, como fetos de menor peso (61,62), parto prematuro (14,63–65), recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (63) e aborto espontâneo (66).

Acredita-se que a insuficiência placentária desempenhe um papel importante na restrição do crescimento fetal, uma vez que a placenta é a única fonte de oxigênio e nutrientes para o feto (67–70). Diversas pesquisas (71–75) destacaram uma forte correlação entre o peso da placenta e o peso fetal, evidenciando ainda mais a importância do papel desempenhado pela placenta no desenvolvimento do feto. É importante salientar que neste estudos as fêmeas eram saudáveis, deste modo, a alteração no peso placentário foi provavelmente devido a periodontite paterna que promoveu alguma alteração no gameta masculino. Conseqüentemente, interferiu no metabolismo e crescimento fetal. Com base nos resultados obtidos para os parâmetros das fêmeas, pode-se inferir que a indução de doença periodontal em ratos machos promoveu alterações durante o desenvolvimento da prole de fêmeas saudáveis, como evidenciado pelo aumento no número de reabsorções,

redução do peso da placenta, feto e útero, bem como pela diminuição da taxa de viabilidade fetal e aumento da perda pós-implantacional.

O estudo realizado por Soubry et al. (76), destaca a relevância da saúde paterna na programação epigenética fetal. A pesquisa revelou uma associação entre a obesidade paterna e a hipometilação do gene *IGF2* em recém-nascidos, indicando o potencial impacto das condições de saúde do pai no desenvolvimento fetal. A metilação do DNA é um processo epigenético que pode influenciar a expressão gênica, afetando como os genes são ativados ou desativados. A hipometilação do gene *IGF2* tem sido associada a alterações no crescimento fetal e ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos. Ao considerar os efeitos da periodontite paterna, uma doença inflamatória crônica, é plausível sugerir que a inflamação sistêmica resultante pode influenciar o ambiente intrauterino de maneira semelhante, afetando negativamente o crescimento e o desenvolvimento fetal. Portanto, compreender a influência das condições de saúde paterna, como a periodontite, no contexto da performance reprodutiva e no desenvolvimento fetal é fundamental para uma abordagem abrangente da saúde durante a gestação.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que há uma possível relação entre a doença periodontal e a performance reprodutiva masculina, incluindo alterações morfológicas do espermatozoide e sua provável contribuição na infertilidade masculina. Além disso, os resultados sugerem que a inflamação crônica proveniente da doença periodontal pode ocasionar alterações nos machos e, desta forma, impactar no desenvolvimento da prole de fêmeas saudáveis, destacando a importância de considerar os efeitos sistêmicos da saúde bucal na performance reprodutiva e na geração futura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, para desenvolvimento do estudo por meio da concessão de bolsa de estudo para A.C.Z. (N. 88882.448606/2019-01) e C.S.S. (N.88882.448607/2019-01).

Declaração de interesses: Não há.

REFERÊNCIAS

1. Hajishengallis G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: Evidence, mechanisms, and implications. *Periodontology 2000*. junho de 2022;89(1):9–18.
2. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21(7):426–40.
3. Chapple IL, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018;89:S74–84.
4. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. janeiro de 2015;15(1):30–44.
5. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2013;62(1):59–94.
6. Tonetti MS, D’Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of Periodontitis and Endothelial Function. *New England Journal of Medicine*. 1º de março de 2007;356(9):911–20.
7. Cheraghi Z, Doosti-Irani A. Chronic periodontitis and the risk of erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis: methodological issues. *Int J Impot Res*. novembro de 2017;29(6):262–262.
8. Práger N, Pásztor N, Várnagy Á, Kozinszky Z, Baráth Z, Gorzó I, et al. Idiopathic male infertility related to periodontal and caries status. *J Clin Periodontol*. setembro de 2017;44(9):872–80.
9. Tao D, Zhu J, Xie C, Kuang Y, Chai W, Lo ECM, et al. Relationship between periodontal disease and male infertility: A case–control study. *Oral Dis*. abril de 2021;27(3):624–31.
10. Lecaplain B, Badran Z, Soueidan A, Prud’homme T, Gaudin A. Periodontitis, erectile dysfunction, reproductive hormones, and semen quality: A systematic review. *Andrology*. maio de 2021;9(3):769–80.
11. Klinger A, Hain B, Yaffe H, Schonberger O. Periodontal status of males attending an in vitro fertilization clinic: Periodontal status and male fertility. *Journal of Clinical Periodontology*. junho de 2011;38(6):542–6.
12. Azenabor A, Ekun AO, Akinloye O. Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. *Journal of Reproduction & Infertility*. setembro de 2015;16(3):123.
13. McPherson NO, Fullston T, Aitken RJ, Lane M. Paternal Obesity, Interventions, and Mechanistic Pathways to Impaired Health in Offspring. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2 de outubro de 2014;64(3–4):231–8.
14. Bobetsis YA, Barros SP, Offenbacher S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. *The Journal of the American Dental Association*. 2006;137:S7–13.
15. Bobetsis YA, Barros SP, Lin DM, Weidman JR, Dolinoy DC, Jirtle RL, et al. Bacterial Infection Promotes DNA Hypermethylation. *J Dent Res*. 1º de fevereiro de 2007;86(2):169–74.

16. Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preisser JS, Offenbacher S. Alteration of PTGS2 Promoter Methylation in Chronic Periodontitis. *J Dent Res.* 1º de fevereiro de 2010;89(2):133–7.
17. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *Journal of Periodontal Research.* 1982;17(3):263–74.
18. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews.* janeiro de 1972;52(1):198–236.
19. Andrade, Antenor, Pinto, Sergio Correia, Oliveira, Rosilene Santos de. *Animais de laboratório: criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006. 388.
<https://doi.org/10.7476/9788575413869>.
20. Kim H, Kim C, Kook KE, Yanti, Choi S, Kang W, et al. Inhibitory Effects of Standardized *Boesenbergia pandurata* Extract and Its Active Compound Panduratin A on Lipopolysaccharide-Induced Periodontal Inflammation and Alveolar Bone Loss in Rats. *Journal of Medicinal Food.* outubro de 2018;21(10):961–70.
21. Stuckhardt JL, Poppe SM. Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis.* 1984;4(2):181–8.
22. Gil AG, Silvan G, Illera M, Illera JC. The effects of anesthesia on the clinical chemistry of New Zealand White rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2004;43(3):25–9.
23. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kapp Jr RW, Letz G, et al. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1983;115(1):1–72.
24. Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics.* 1970;1(1):2–25.
25. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics.* 1979;9(1):62–6.
26. Liao PS, Chen TS, Chung PC. A fast algorithm for multilevel thresholding. *J Inf Sci Eng.* 2001;17(5):713–27.
27. Moraes-Souza RQ, Soares TS, Carmo NOL, Damasceno DC, Campos KE, Volpato GT. Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology.* 6 de março de 2017;199:328–33.
28. Barrow MV, Taylor WJ. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J Morphol.* março de 1969;127(3):291–305.
29. Costa GDA, Galvão TC, Bacchi AD, Moreira EG, Salles MJS. Investigation of possible teratogenic effects in the offspring of mice exposed to methylphenidate during pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online.* fevereiro de 2016;32(2):170–7.
30. Alderman BW, Zhao H, Holt VL, Watts DH, Beresford SAA. Maternal Physical Activity in Pregnancy and Infant Size for Gestational Age. *Annals of Epidemiology.* novembro de 1998;8(8):513–9.

31. Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías A, Vera-Pineda R, Flores-Ramírez R. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart, Lung and Circulation*. novembro de 2018;27(11):1327–34.
32. Păunică I, Giurgiu M, Dumitriu AS, Păunică S, Pantea Stoian AM, Martu MA, et al. The Bidirectional Relationship between Periodontal Disease and Diabetes Mellitus—A Review. *Diagnostics*. 11 de fevereiro de 2023;13(4):681.
33. Altamura S, Del Pinto R, Pietropaoli D, Ferri C. Oral health as a modifiable risk factor for cardiovascular diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*. março de 2023;S1050173823000300.
34. Bizzarro S, Loos BG. The link between periodontitis and erectile dysfunction: a review. *Br Dent J*. outubro de 2019;227(7):599–603.
35. Pourabbas R, Farajzadeh S, Babaloo A, Pazhohan A, Sadighi M, Hajebrahimi S, et al. The association between oral inflammatory load and semen and sperm functional analysis: A cross-sectional study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2023;17(3):188–95.
36. Assinger A, Laky M, Schabbauer G, Hirschl AM, Buchberger E, Binder BR, et al. Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. abril de 2011;9(4):799–809.
37. Loos BG. Systemic Markers of Inflammation in Periodontitis. *Journal of Periodontology*. novembro de 2005;76(11-s):2106–15.
38. Hasturk H, Kantarci A. Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontol 2000*. outubro de 2015;69(1):255–73.
39. Rebourcet D, Darbey A, Monteiro A, Soffientini U, Tsai YT, Handel I, et al. Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis. *Endocrinology*. 1º de setembro de 2017;158(9):2955–69.
40. Singh BP, Makker A, Tripathi A, Singh MM, Gupta V. Association of testosterone and bone mineral density with tooth loss in men with chronic periodontitis. *J Oral Sci*. 2011;53(3):333–9.
41. Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations Between Sex Hormone Levels and Periodontitis in Men: Results From NHANES III. *Journal of Periodontology*. outubro de 2015;86(10):1116–25.
42. Rebourcet D, O’Shaughnessy PJ, Pitetti JL, Monteiro A, O’Hara L, Milne L, et al. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development*. 15 de maio de 2014;141(10):2139–49.
43. Kolettis PN, Purcell ML, Parker W, Poston T, Nangia AK. Medical Testosterone: An Iatrogenic Cause of Male Infertility and a Growing Problem. *Urology*. maio de 2015;85(5):1068–73.
44. Clavijo RI, Hsiao W. Update on male reproductive endocrinology. *Transl Androl Urol*. julho de 2018;7(S3):S367–72.
45. Garza S, Papadopoulos V. Testosterone recovery therapy targeting dysfunctional Leydig cells. *Andrology*. 10 de outubro de 2022;andr.13304.

46. Nwhator SO, Umezudike KA, Ayanbadejo PO, Opeodu OI, Olamijulo JA, Sorsa T. Another Reason for Impeccable Oral Hygiene: Oral Hygiene-Sperm Count Link. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. junho de 2014;15(3):352–8.
47. Chidambar C, Shankar S, Agarwal R, Bhushan K, Gururaj S. Evaluation of periodontal status among men undergoing infertility treatment. *J Hum Reprod Sci*. 2019;12(2):130.
48. Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, Serrano F, Puig-Silla M, Dasí F. Oxidative Stress Parameters in Saliva and Its Association with Periodontal Disease and Types of Bacteria. *Disease Markers*. 2015;2015:1–7.
49. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive Oxygen Species and Human Inflammatory Periodontal Diseases. *Biochemistry (Moscow)*. junho de 2005;70(6):619–28.
50. Waddington R, Moseley R, Embery G. Periodontal Disease Mechanisms: Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Diseases*. 28 de junho de 2008;6(3):138–51.
51. Borges Jr. I, Moreira EAM, Filho DW, De Oliveira TB, Da Silva MBS, Fröde TS. Proinflammatory and Oxidative Stress Markers in Patients with Periodontal Disease. *Mediators of Inflammation*. 2007;2007:1–5.
52. Tonetti MS, Van Dyke TE, on behalf of working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Periodontology*. abril de 2013;84(4-s):S24–9.
53. Zhang X, Saaddine JB, Chou CF, Cotch MF, Cheng YJ, Geiss LS, et al. Prevalence of Diabetic Retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA*. 11 de agosto de 2010;304(6):649.
54. Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, et al. Periodontal Disease and Atherosclerotic Vascular Disease: Does the Evidence Support an Independent Association?: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 22 de maio de 2012;125(20):2520–44.
55. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 10 de novembro de 2018;392(10159):1789–858.
56. Gomes-Filho IS, Passos JS, Seixas Da Cruz S. Respiratory disease and the role of oral bacteria. *Journal of Oral Microbiology*. janeiro de 2010;2(1):5811.
57. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations Between Periodontal Disease and Risk for Nosocomial Bacterial Pneumonia and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Systematic Review. *Annals of Periodontology*. dezembro de 2003;8(1):54–69.
58. Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. Relationship Between Electrocardiographic Abnormalities and Periodontal Disease: The Hisayama Study. *Journal of Periodontology*. junho de 2004;75(6):791–7.
59. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease: *Risk factors for periodontal diseases*. *Periodontology* 2000. junho de 2013;62(1):59–94.

60. Soubry A. Epigenetics as a Driver of Developmental Origins of Health and Disease: Did We Forget the Fathers? *BioEssays*. janeiro de 2018;40(1):1700113.
61. Collins JG, Smith MA, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. *Infect Immun*. outubro de 1994;62(10):4652–5.
62. Collins JG, Windley HW, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun*. outubro de 1994;62(10):4356–61.
63. Mannem S, Chava VK. The relationship between maternal periodontitis and preterm low birth weight: A case-control study. *Contemporary clinical dentistry*. 2011;2(2):88.
64. Tucker R. Periodontitis and pregnancy. *Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. janeiro de 2006;126(1):24–7.
65. Offenbacher S, Beck JD, Jared HL, Mauriello SM, Mendoza LC, Couper DJ, et al. Effects of Periodontal Therapy on Rate of Preterm Delivery A Randomized Controlled Trial. *Obstetrics and gynecology*. setembro de 2009;114(3):551.
66. Moore S, Randhawa M, Ide M. A case-control study to investigate an association between adverse pregnancy outcome and periodontal disease. *J Clinic Periodontology*. janeiro de 2005;32(1):1–5.
67. Naeye RL. Do placental weights have clinical significance? *Human pathology*. 1987;18(4):387–91.
68. Coan PM, Fowden AL, Constancia M, Ferguson-Smith AC, Burton GJ, Sibley CP. Disproportional effects of *Igf2* knockout on placental morphology and diffusional exchange characteristics in the mouse. *The Journal of Physiology*. 15 de outubro de 2008;586(20):5023–32.
69. Fowden AL, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, Constancia M, Burton GJ. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *The Journal of Physiology*. 15 de julho de 2009;587(14):3459–72.
70. Sandovici I, Hoelle K, Angiolini E, Constância M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. *Reproductive BioMedicine Online*. julho de 2012;25(1):68–89.
71. Wilson ME, Ford SP. Comparative aspects of placental efficiency. *Reproduction Supplement* (58). 1999;223–32.
72. Williams LA, Evans SF, Newnham JP. Prospective cohort study of factors influencing the relative weights of the placenta and the newborn infant. *Bmj*. 1997;314(7098):1864.
73. Molteni RA. Placental growth and fetal/placental weight (F/P) ratios throughout gestation—their relationship to patterns of fetal growth. Em: *Seminars in Perinatology* [Internet]. 1984 [citado 22 de outubro de 2023]. p. 94–100. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/6374904>
74. Bonds DR, Gabbe SG, Kumar S, Taylor T. Fetal weight/placental weight ratio and perinatal outcome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1984;149(2):195–200.

75. Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. outubro de 2015;213(4):S6.e1-S6.e4.
76. Soubry A, Schildkraut JM, Murtha A, Wang F, Huang Z, Bernal A, et al. Paternal obesity is associated with IGF2hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Medicine*. 6 de fevereiro de 2013;11(1):29.

4.2 ARTIGO 2

Identificação dos possíveis efeitos protetores do β - cariofileno sobre diabetes mellitus induzido por aloxana em ratos Wistar

Aline Campos Zeffa^a, Camila Salvador Sestario^a, Andrea Name Colado Simão^b, Maria José Sparça Salles^{c*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^b Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^c Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Autor de correspondência:

* Maria José Sparça Salles (salmjs@gmail.com)

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral

Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380

Caixa postal: 10.011

CEP: 86057970

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do β -cariofileno em parâmetros fisiológicos, reprodutivos e ósseos em ratos Wistar com diabetes mellitus induzido experimentalmente com aloxana. **Métodos:** ratos Wistar ($n = 40$), divididos em quatro grupos: o primeiro grupo foi o da indução do diabetes por aloxana (GD), o segundo foi o controle de tratamento que recebeu 200 mg/kg de β -cariofileno ($G\beta$ -C), o terceiro foi o da indução do diabetes por aloxana que recebeu tratamento com 200 mg/kg de β -cariofileno ($GDT\beta$ -C) e o quarto grupo foi o grupo controle que recebeu água destilada (GC). Os machos foram mantidos separados das fêmeas por 54 dias, correspondentes a um ciclo completo da espermatogênese. Após o acasalamento, foram realizadas análises nos machos e avaliações intrauterinas e de malformações congênitas nas proles das fêmeas. Testes estatísticos incluíram ANOVA *one-way*, Kruskal-Wallis e o teste exato de Fisher, com um nível de significância de 5%. **Resultados:** Os animais do grupo GD apresentaram notável perda de peso em comparação com os outros grupos ($P < 0,05$). Além disso, ocorreram danos morfológicos significativos nos tecidos reprodutivos, incluindo os testículos, epidídimos e a vesícula seminal. A análise histológica revelou uma redução acentuada no escore de Johnsen, bem como na quantidade de células de Sertoli e Leydig, sugerindo uma deterioração na função reprodutiva nesse grupo. Por outro lado, o grupo submetido ao tratamento com β -cariofileno ($GDT\beta$ -C) demonstrou efeitos protetores, com ganho de peso significativo, melhora na performance reprodutiva e preservação da morfologia das células germinativas. Além disso, a densidade óssea foi aumentada no grupo $GDT\beta$ -C. A análise histológica revelou uma possível melhora nos parâmetros reprodutivos, indicada pelo aumento do escore de Johnsen e da preservação das células de Sertoli e Leydig no grupo $GDT\beta$ -C. Da mesma forma, os espermatozoides no grupo $GDT\beta$ -C exibiram uma melhora notável na morfologia em comparação com o grupo GD. A taxa de prenhez também aumentou para 69% no grupo $GDT\beta$ -C, destacando os potenciais efeitos benéficos do β -cariofileno na performance reprodutiva. **Conclusão:** O diabetes teve um impacto negativo no desempenho reprodutivo de ratos machos; no entanto, observou-se que o tratamento com β -cariofileno demonstrou um efeito protetor em diversos parâmetros.

Palavras-chave: Inflamação; malformações fetais; Infertilidade masculina; espermatogênese; Complicações do Diabetes.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico crônico consequente de alterações genéticas e deficiência na produção ou resistência à insulina, podendo ocasionar uma condição de hiperglicemia, no qual os níveis de glicose no sangue ficam elevados (1,2). Além de possíveis alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios, íons e minerais, a hiperglicemia aumenta o estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre os antioxidantes e os radicais livres pelo efeito do aumento de oxidantes circulantes, o que contribui para as complicações do diabetes (3,4).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, cerca de 537 milhões de pessoas estavam vivendo com a doença em 2021 e projeções indicam uma prevalência de 643 milhões até 2030, e 783 milhões de diabéticos até 2045 (5). Estudos vem indicando aumento progressivo de diabetes em crianças e jovens em idade reprodutiva (6,7). Este aumento é preocupante, uma vez que o diabetes pode afetar as funções reprodutivas desses jovens, visto que a prevalência de pacientes diabéticos com infertilidade foi significativamente maior do que em pacientes não diabéticos (8).

Com o aumento da prevalência do diabetes mellitus e suas altas taxas de morbidade e mortalidade, tornou-se alvo de estudos visando identificar novos tratamentos para redução dos danos causados por essa doença. Os fitoterápicos são amplamente utilizados no desenvolvimento de novos fármacos, pois desempenham um papel importante na prevenção e tratamento de diversas doenças (9,10). Diferentes espécies de plantas são citadas na literatura como auxiliadoras no tratamento do diabetes, na qual, aproximadamente 1200 espécies vegetais apresentam potencial atividade antidiabética. Todavia, menos da metade dessas espécies já teve seu efeito benéfico cientificamente comprovado (11).

O óleo de copaíba tem como principal constituinte o β -cariofileno, extraída de plantas do gênero *Copaifera*, proveniente da Amazônia e comercializada mundialmente (12). O óleo de copaíba é capaz de exercer diversos efeitos benéficos farmacológicos, como propriedades antidiabéticas, hepatoprotetoras e neuroprotetoras descritos em modelos experimentais (13,14). Seus resultados foram comparados com os efeitos da glibenclamida em um estudo experimental com ratos diabéticos, na qual os autores observaram que a administração de β -cariofileno causou uma diminuição significativa nos níveis de insulina, revertendo significativamente as citocinas pró inflamatórias a níveis quase normais e, consequentemente, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo e inflamatório (15). Outro estudo sugeriu que não há efeitos tóxicos no desempenho reprodutivos dos ratos saudáveis e no desenvolvimento da prole (16).

Embora diversos benefícios do β -cariofileno, inclusive no sistema reprodutor masculino (17,18), já tenham sido relatados, na literatura consultada não foram encontrados estudos que abordem sua influência no sistema reprodutor e na fertilidade masculina associados ao diabetes. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi induzir diabetes em ratos machos e investigar possíveis efeitos protetores do β -cariofileno no desempenho reprodutivo desses animais, bem como examinar seus possíveis efeitos na prole.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 40 ratos machos e 80 fêmeas, adultos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com aproximadamente 250 g de peso corporal, provenientes do Biotério Central do CCB-UEL. Londrina, Paraná, Brasil. Esses animais passaram por período prévio de aclimação no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Geral da UEL. Os animais foram mantidos em grupos de 5 e durante o acasalamento em grupos de 3, em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado e maravalha (raspas de madeira). Durante o estudo, os animais foram mantidos em regime de luminosidade controlada, ciclo de 12 horas claro/escuro e 22 ± 2 °C, com água e ração (Nuvilab, Nuvital, Campo Largo, Brasil) à vontade.

Delineamento experimental

Os 40 ratos machos foram distribuídos em quatro grupos experimentais com dez ratos machos em cada grupo, sendo:

1. Grupo diabético (GD): Os animais deste grupo receberam por administração via intraperitoneal, aloxana em dose única de 120 mg/kg de peso corporal. Após a confirmação do diabetes induzida, por meio da dosagem de glicemia, os animais receberam diariamente, via gavagem, água destilada, por um período de 54 dias.
2. Grupo β -cariofileno ($G\beta$ -C): Os animais deste grupo receberam diariamente, via gavagem, a dose de 200 mg/kg de β -cariofileno (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) (15), por um período de 54 dias. O volume administrado foi calculado em função do peso, sendo monitorado a cada três dias com ajuste da dose.
3. Grupo diabético tratado com β -cariofileno ($GDT\beta$ -C): Os animais receberam por

administração via intraperitoneal, aloxana em dose única de 120 mg/kg de peso corporal. Após a confirmação do diabetes induzida, por meio da dosagem da glicemia, os animais receberam diariamente, via gavagem, a dose de 200 mg/kg de β -cariofileno por um período de 54 dias. O volume administrado foi calculado em função do peso, sendo monitorado a cada três dias com ajuste da dose.

4. Grupo controle (GC): Os animais deste grupo receberam diariamente, via gavagem, água destilada no mesmo volume administrado no grupo tratado por um período de 54 dias.

Indução do diabetes

O diabetes foi induzido por administração via intraperitoneal de aloxana (Sigma Co., Cream Ridge, NJ, EUA) em dose única de 120 mg/kg de peso corporal (19), após 12 horas de jejum. A glicose no sangue foi medida usando tiras reagentes do tipo Accu-Chek Glucometer (Roche, Basileia, Suíça). Os animais foram considerados diabéticos quando a glicemia fosse superior a 200 mg/dl (20–22).

Após a confirmação do diabetes induzida, os animais foram mantidos por 54 dias, período correspondente a um ciclo da espermatogênese em ratos (23). Nesse dia, os machos foram alocados para acasalar com fêmeas que não foram submetidas a nenhum tratamento, na proporção de um macho para duas fêmeas. Os animais continuaram sendo tratados por mais dez dias, correspondentes a dois ciclos estrais da fêmea. Nos dias seguintes, com um intervalo de 12 horas, as fêmeas foram examinadas para a identificação de prenhez. Para a avaliação da performance reprodutiva foi utilizado o protocolo de Andrade et al. (24). Após o acasalamento, os machos foram submetidos à eutanásia para avaliação da espermatogênese, dosagem dos níveis de testosterona e performance reprodutiva. Durante o estudo houve perda de um animal em ambos os grupos GD e GDT β -C devido a complicações do diabetes.

Análise da toxicidade paterna

Os ratos machos foram monitorados quanto ao ganho de peso a cada três dias, durante todo período experimental (64 dias). Sinais clínicos de toxicidade como piloereção, olhos avermelhados, diarreia, falta de coordenação motora e morte também foram avaliados (APÊNDICE A). Após a eutanásia e laparotomia, o coração, pulmão, fígado e rins foram removidos, pesados e analisados externamente quanto à presença de hemorragias, áreas de necrose e coloração dos tecidos, além de serem pesados de acordo com a metodologia descrita por Stuckhardt e Poppe (1984) (25).

Identificação da prenhez

Após o acasalamento, as fêmeas foram examinadas para identificar a prenhez com um intervalo de 12 horas. Foi injetado 20 µL de solução de cloreto de sódio a 9% no canal vaginal por meio de pipeta de pequeno calibre, seguido de aspiração. O material coletado foi colocado em lâminas de vidro lapidadas e, por meio de um esfregaço, foi verificado ao microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão) a presença de espermatozoides para confirmar a prenhez.

Eutanásia

Ao final do experimento, todos os machos foram submetidos à eutanásia por decapitação, seguida da coleta de sangue para posterior dosagem de testosterona. Esse método de eutanásia é justificado por ser compatível com a realização da dosagem de testosterona, uma vez que outros métodos, como o uso de anestésicos injetáveis ou inalatórios, podem interferir no resultado (26). Os testículos e epidídimos também foram removidos após laparotomia.

Análise da espermatogênese

Para avaliar a morfologia dos espermatozoides no epidídimo, utilizou-se a metodologia descrita por Wyrobek et al. (1983) (27). Foram coletados espermatozoides da cauda do epidídimo e 400 células por animal coradas em Giemsa foram analisadas em microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão).

Os testículos retirados foram imersos em solução fixadora de Bouin e posteriormente em álcool 70%. As amostras foram então incluídas em parafina histológica e seccionadas. Dez cortes de tecido aleatórios (7 µm) dos testículos foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina e examinados sob um microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão), equipado com uma câmera digital (Moticam, Motic Company, Xiamen, China), em ampliações de 100 e 400X. Foram avaliados 40 túbulos seminíferos por animal em 100X de ampliação e a avaliação histológica foi classificada e pontuada conforme o escore de Johnsen (1970) (28), em uma escala de 1 a 10, considerando os túbulos que não apresentavam epitélio seminífero com score 1 e aqueles com presença de todas as células da linhagem espermatogênica no epitélio, incluindo a célula de Sertoli, com score 10.

Para avaliar o tecido intersticial, as células de Leydig foram contadas e avaliadas pela quantidade de células por unidade de área (mm²) em 10 imagens por animal, em uma ampliação de 400X.

Análise da testosterona plasmática

O plasma sanguíneo foi obtido por centrifugação a 3.000g por 15min a 4°C e armazenado a -20°C até ser analisado por imunoenensaio no Laboratório de Pesquisa em imunologia Aplicada da Universidade Estadual de Londrina. A testosterona total presente no plasma foi medida via quimioluminescência (2nd Generation Testosterone. Architect System, Abbott, Wiesbaden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. O coeficiente de variação intraensaio e a sensibilidade mínima do ensaio foram de 4,6% e 0,15 nmol/L (4,3 ng/dL), respectivamente.

Avaliação do desenvolvimento intrauterino e malformações congênitas externas, viscerais e esqueléticas

O conteúdo intrauterino das fêmeas foi avaliado quanto à presença de reabsorções, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário, comprimento fetal e presença de malformações congênitas externas, sendo calculados os seguintes índices: taxa de viabilidade fetal, taxa de perda pós-implantação, taxa de reabsorção embrionária e índice placentário (29).

O útero e os ovários foram removidos e contado o número de corpos lúteos gravídicos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). A seguir os fetos foram retirados e os cornos uterinos inspecionados quanto ao número de implantações e respectivas placentas. A presença de reabsorção, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário e malformações externas também foram analisados (29).

Foram determinados a viabilidade fetal ($[\text{número de fetos vivos/número de locais de implantação}] \times 100$), após perda de implantação ($[\text{número de locais de implantação} - \text{número de fetos vivos/número de locais de implantação}] \times 100$), taxa de reabsorção embrionária ($[\text{número de reabsorções /número de locais de implantação}] \times 100$) e índice placentário (peso da placenta/peso do feto). A taxa de perda pré-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de corpos lúteos, número de implantações}) / \text{número de corpos lúteos}] \times 100$. A porcentagem de perdas pós-implantação foi calculada pela fórmula $[(\text{número de implantações, número de fetos vivos}) / \text{número de implantações}] \times 100$ (29).

Os fetos foram analisados quanto à presença de malformações congênitas externas (APÊNDICE B e C). Cerca de metade deles foram destinados à análise de malformações viscerais, sendo fixados em solução de Bodian e posteriormente examinados por meio de cortes e microdissecção (30). Essa avaliação foi realizada em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). O restante dos fetos foi destinado à análise de

malformações esqueléticas (31), sendo inicialmente fixados em acetona, eviscerados, diafanizados e corados em solução aquosa de hidróxido de potássio, alizarina e solução clareadora. Posteriormente, cada feto foi analisado em microscópio estereoscópico (Motic SMZ 140, Motic Co, Xiamen, China). Foi realizada também a adequação do peso à idade de prenhes (APIP) (32).

Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram analisados no software *GraphPad Prism 5*® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Para avaliar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de D'Agostino-Pearson. A Anova *one-way* utilizado para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Os testes pós-hoc de Bonferroni e de Dunn foram utilizados para os dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Para a análise de dados de frequência, foram empregados o teste exato de Fisher. As variáveis categóricas foram apresentadas em número absoluto (n) e percentual (%), enquanto as variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQR) para dados não paramétricos. Considerou-se diferença estatisticamente significativa quando $P \leq 0,05$ para todas as análises realizadas.

RESULTADOS

Foram observadas alterações no peso corporal final, ganho de peso, peso do coração e dosagem de glicemia nos ratos dos grupos GD e GDT β -C em relação aos grupos G β -C e GC, conforme apresentado na Tabela 1. Em relação ao peso corporal, os grupos GD e GDT β -C apresentaram baixo peso em relação ao grupo controle; todavia, ocorreu melhora no grupo GDT β -C que recebeu o tratamento com β -cariofileno. Quanto ao ganho de peso, no grupo GD todos os animais apresentaram perda de peso, enquanto no grupo GDT β -C alguns animais apresentaram ganho de peso. Além disso, três ratos do grupo GD ficaram cegos.

Tabela 1. Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) e da indução de diabetes com aloxana (120 mg/kg) em ratos machos adultos.

Parâmetro	GD (n = 9)	Gβ-C (n = 10)	GDTβ-C (n = 9)	GC (n = 10)	P-valor
Peso (g) ^a	197 \pm 21 C	351 \pm 18 A	292 \pm 47 B	361 \pm 36 A	< 0,0001
Ganho de peso (g) ^a	-73 \pm 27 B	104 \pm 24 A	35 \pm 35 AB	105 \pm 31 A	< 0,0001
Peso do coração (g) ^a	0,98 \pm 0,18 B	1,19 \pm 0,16 A	0,98 \pm 0,07 B	1,19 \pm 0,14 A	0,002
Peso dos pulmões (g) ^a	1,78 \pm 0,26	2,18 \pm 0,50	1,94 \pm 0,39	1,86 \pm 0,33	0,2
Peso do fígado (g) ^b	9,56 [7,49-10,59] B	11,18 [10,61-12,16] AB	9,97 [8,62-11,70] B	12,94 [11,40-13,73] A	0,003
Peso dos rins (g) ^b	2,75 [2,62-2,99]	2,44 [2,23-2,83]	2,47 [2,34-2,73]	2,55 [2,41-2,75]	0,1
Glicemia (mg/dL) ^b	515 [458-583] B	52 [49-87] A	454 [234-501] B	52 [50-90] A	< 0,0001

^aDados paramétricos estão expressos em médias e desvio padrão, e foram analisados pelo teste ANOVA *one-way*.

^bDados não paramétricos estão expressos em medianas e quartis, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Letras iguais na horizontal não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn ou Bonferroni.

Grupo diabético (GD); Grupo β -cariofileno (G β -C); Grupo diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C) e Grupo controle (GC).

Em relação aos parâmetros reprodutivos, foram observadas alterações no peso e medidas de todos os órgãos sexuais internos analisados (epididimo, testículo e vesícula seminal) no grupo GD e possível efeito protetor do β -cariofileno, uma vez que seus resultados foram semelhantes aos observados nos grupos G β -C e GC (Tabela 2, Figura 1).

Tabela 2. Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) em parâmetros reprodutivos dos ratos machos diabéticos.

Parâmetro Reprodutivo	GD (n = 9)	Gβ-C (n = 10)	GDTβ-C (n = 9)	GC (n = 10)	P-valor
Peso do epidídimo direito (g) ^a	0,37 \pm 0,18 B	0,71 \pm 0,10 A	0,60 \pm 0,16 A	0,70 \pm 0,10 A	< 0,0001
Peso do epidídimo esquerdo (g) ^b	0,45 [0,19-0,53] B	0,64 [0,61-0,75] A	0,61 [0,44-0,73] A	0,67 [0,60-0,76] A	0,001
Peso do testículo direito (g) ^b	0,71 [0,41-1,40] B	1,42 [1,37-2,59] A	1,33 [1,21-1,48] AB	1,46 [1,33-1,60] A	0,03
Peso do testículo esquerdo (g) ^b	1,12 [0,43-1,31] B	1,45 [1,36-1,59] A	1,31 [1,21-1,46] A	1,55 [1,36-1,60] A	0,002
Peso da vesícula seminal cheia (g) ^a	0,44 \pm 0,34 B	1,45 \pm 0,23 A	0,68 \pm 0,33 B	1,25 \pm 0,24 A	< 0,0001
Peso da vesícula seminal vazia (g) ^a	0,36 \pm 0,28 B	0,98 \pm 0,21 A	0,49 \pm 0,18 B	0,89 \pm 0,18 A	< 0,0001
Medida do testículo direito (mm) ^b	1,30 [0,85-1,80] B	2,00 [2,00-2,00] A	1,80 [1,70-2,00] AB	2,00 [1,98-2,00] A	< 0,0001
Medida do testículo esquerdo (mm) ^b	1,10 [0,90-1,60] B	2,00 [1,95-2,05] A	1,90 [1,73-1,90] AB	2,00 [2,00-2,03] A	< 0,0001

^aDados paramétricos estão expressos em médias e desvio padrão, e foram analisados pelo teste ANOVA *one-way*.

^bDados não paramétricos estão expressos em medianas e quartis, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Letras iguais na horizontal não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn ou Bonferroni.

Grupo diabético (GD); Grupo β -cariofileno (G β -C); Grupo diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C) e Grupo controle (GC).

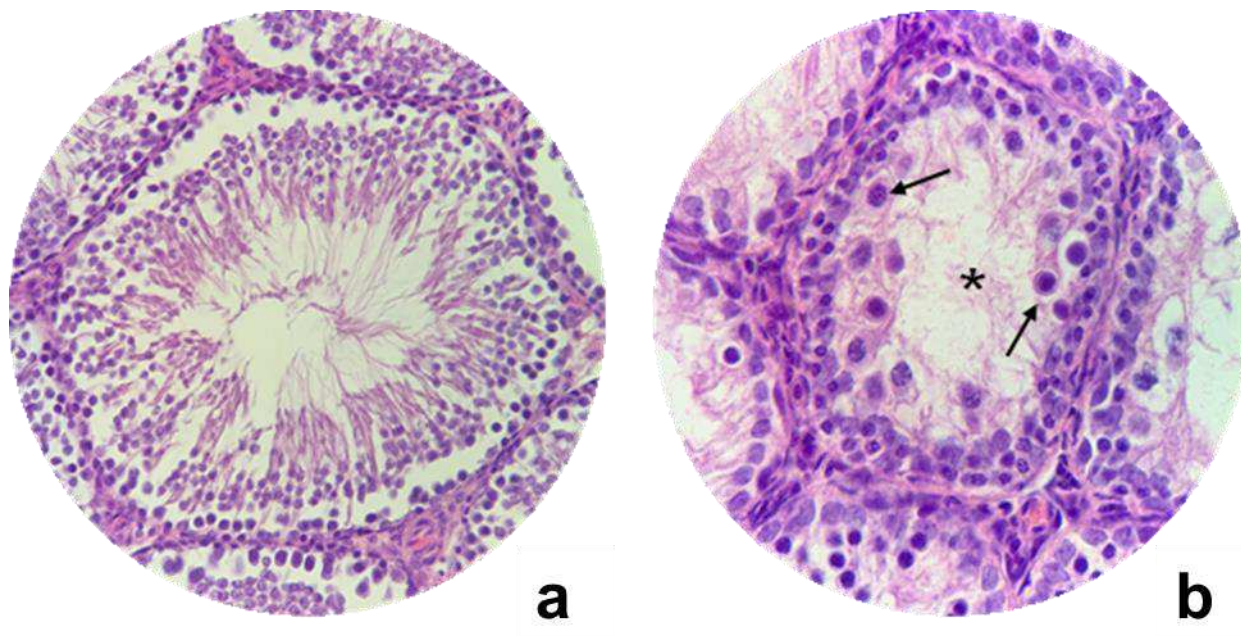
Figura 1. Comparação entre os órgãos sexuais masculinos de ratos Wistar do grupo controle (GC); grupo diabético (GD) e grupo diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C).



Os órgãos epidídimo, testículo e vesícula seminal estão representados, respectivamente, na vertical de cima para baixo.

Na análise histológica dos testículos do grupo GD, foram observadas alterações celulares, bem como uma extensa destruição dos túbulos seminíferos e espaços intersticiais quando comparado ao grupo GC, indicando os danos celulares e teciduais do diabetes em testículos (Figura 2).

Figura 2. Fotomicrografia de cortes transversais de testículos de ratos Wistar dos grupos controle (GC) e diabético (GD).



Grupo GC (a) com túbulo seminífero normal e Grupo GD (b) indicando alterações no lúmen (*) e nas células germinativas (setas). Hematoxilina-eosina, em médio aumento.

Não foram observados efeitos adversos no grupo G β -C quando comparado ao grupo GC, uma vez que não houve diferenças significativas desses grupos em relação aos parâmetros avaliados (Tabela 3). Entretanto, foram observadas alterações no escore de Johnsen, bem como contagem de células de Sertoli e Leydig no grupo GD, uma vez que houve diminuição desses parâmetros quando comparado ao grupo GC. Por outro lado, houve diferença significativa do grupo GDT β -C em relação aos grupos GD e GC para os parâmetros escore de Johnsen e células de Sertoli, indicando que o tratamento de diabetes utilizando β -cariofileno apresentou efeito protetor nesses parâmetros reprodutivos. Em relação às células de Leydig, o GDT β -C não apresentou diferença significativa quando comparado ao GC; todavia, houve diferença significativa para entre os grupos o GDT β -C e GD, visto que houve aumento na contagem dessas células. Para dosagem de testosterona, o grupo GD apresentou redução significativa desse parâmetro em comparação aos grupos G β -C, GDT β -C e GC que, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) nos testículos de ratos Wistar diabéticos.

Parâmetros	GD (n = 9)	Gβ-C (n = 10)	GDTβ-C (n = 9)	GC (n = 10)	P-valor
Escore de Johnsen ^b	7,50 [4,70-8,37] C	10,00 [10,00-10,00] A	9,27 [9,05-9,65] BC	9,80 [9,70-10,00] AB	< 0,0001
Células de Sertoli (unidade/mm ²) ^b	15,28 [10,27-17,54] B	23,70 [21,51-24,93] A	19,4 [16,61-21,16] AB	23,55 [22,21-26,60] A	< 0,0001
Células de Leydig (unidade/mm ²) ^a	17,89 \pm 3,88 B	27,07 \pm 5,67 A	24,36 \pm 2,89 A	24,92 \pm 3,88 A	0,002
Dosagem de testosterona (ng/dL) ^a	112 \pm 112 B	539 \pm 369 A	347 \pm 288 A	626 \pm 298 A	0,01

^aDados paramétricos estão expressos em médias e desvio padrão, e foram analisados pelo teste ANOVA *one-way*.

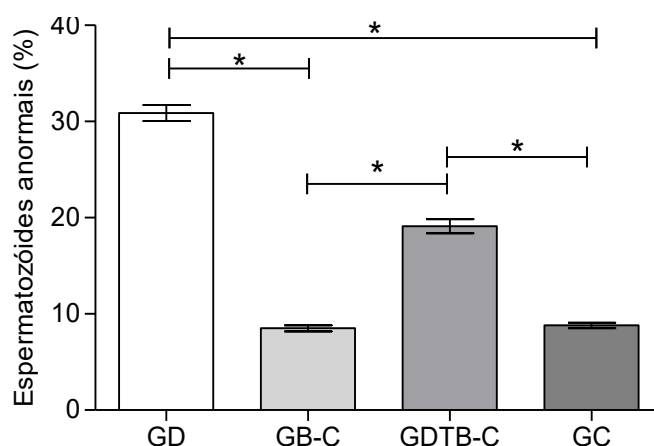
^bDados não paramétricos estão expressos em medianas e quartis, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Letras iguais na horizontal não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn ou Bonferroni.

Grupo diabético (GD); Grupo β -cariofileno (G β -C); Grupo diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C) e Grupo controle (GC).

O diabetes aumentou significativamente as alterações morfológicas dos espermatozoides, uma vez que se constatou maior porcentagem de alterações na morfologia da cauda (enrolada, dobrada, em forma de vírgula e curta) nos espermatozoides pertencentes ao grupo GD (31%) e GDT β -C (19%) em comparação com os grupos GC (9%) e G β -C (9%) (Figura 3). Durante a análise de espermatozoides, nenhum espermatozoide foi identificado em dois dos ratos pertencentes ao grupo GD.

Figura 3. Porcentagem de espermatozoides anormais nos grupos diabético (GD), β -cariofileno (G β -C); diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C) e controle (GC).



* Indicam diferenças significativas ($P < 0,001$) pelo teste de Kruskal-Wallis com pos teste de Dunn. GD (n = 9); G β -C (n = 10); GDT β -C (n = 9) e GC (n = 10).

Apenas 45% das fêmeas do grupo GD acasalaram, enquanto no grupo GDT β -C essa frequência aumentou para 69% (Tabela 4). Não foram identificadas alterações viscerais ou esqueléticas nos fetos em nenhum dos grupos avaliados. Além disso, o grupo GD apresentou alterações significativas em relação às medidas e ao peso dos fetos quando comparado aos demais grupos (Tabela 5). As reabsorções ocorreram apenas nos grupos diabéticos (GD e GDT β -C).

Tabela 4. Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) na taxa de prenhez entre as fêmeas saudáveis que foram acasaladas com os machos diabéticos.

Grupo	Taxa de prenhez (%)
Grupo diabético (GD) (n = 18)	45 *
Grupo β -cariofileno (G β -C) (n = 20)	100
Grupo diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C) (n = 18)	69 *
Grupo controle (GC) (n = 20)	100

* indica diferença significativa em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Fisher em relação aos grupos G β -C e GDT β -C.

Tabela 5. Efeitos do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) no desenvolvimento intrauterino de descendentes de machos diabéticos e fêmeas saudáveis.

Parâmetro das Fêmeas	GD (n = 8)	G β -C (n = 20)	GDT β -C (n = 12)	GC (n = 20)	P-valor
Peso final (g) ^a	346 ± 15	346 ± 24	347 ± 15	336 ± 26	0,53
Ganho de peso (g) ^a	95 ± 8	105 ± 10	96 ± 14	95 ± 13	0,09
Reabsorções (contagem por animal) ^b	0 [0-1]	0	0 [0-0,3]	0	0,04
Sítios de implantação (contagem) ^b	13 [12-14]	12 [10-12]	11 [8-13]	12 [11-13]	0,05
Peso da placenta (g) ^b	0,55 [0,52-0,62] A	0,54 [0,49-0,62] A	0,60 [0,53-0,70] B	0,58 [0,50-0,64] AB	< 0,0001
Medida dos fetos (cm) ^b	3,60 [3,10-3,80] C	3,80 [3,60-4,00] A	3,70 [3,60-3,80] B	3,90 [3,70-4,00] A	< 0,0001
Peso dos fetos (g) ^b	3,78 [3,52-5,10] B	5,03 [4,29-5,28] A	5,06 [4,07-5,54] A	5,13 [4,08-5,64] A	< 0,0001
Peso do útero (g) ^b	73,28 [73,13-85,00]	73,87 [65,36-84,11]	73,04 [45,90-75,19]	81,91 [71,14-85,14]	0,24
Taxa de viabilidade fetal (%) ^b	100 [100-100]	100 [100-100]	100 [100-100]	100 [100-100]	0,14

^aDados paramétricos estão expressos em médias e desvio padrão, e foram analisados pelo teste ANOVA one-way.

^bDados não paramétricos estão expressos em medianas e quartis, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Letras iguais na horizontal não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn ou Bonferroni.

Grupo diabético (GD); Grupo β -cariofileno (G β -C); Grupo diabético tratado com β -cariofileno (GDT β -C) e Grupo controle (GC).

DISCUSSÃO

No presente estudo, foram observadas alterações relevantes nos parâmetros reprodutivos de ratos diabéticos em comparação aos grupos não diabéticos e diabéticos tratados com β -cariofileno, sugerindo possíveis efeitos protetores desse fitoterápico nas complicações decorrentes do diabetes mellitus. Estudos demonstraram que o β -cariofileno tem capacidade de reduzir a glicemia em camundongos diabéticos, bem como atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias (15,33). Além disso, o tratamento com β -cariofileno mostrou uma notável redução nos níveis de glicose, melhorando o estado antioxidante e reduzindo as citocinas inflamatórias em ratos diabéticos, ao mesmo tempo que aumentou os níveis de insulina (15,34). Dessa forma, os resultados do presente estudo corroboram com esses achados, evidenciando o potencial terapêutico do β -cariofileno no manejo do diabetes mellitus e de suas complicações relacionadas à performance reprodutiva masculina.

Além das alterações visíveis e significativas nos órgãos sexuais internos, foram observadas uma considerável diminuição da capacidade reprodutiva dos ratos machos com diabetes mellitus, uma vez que os machos do grupo GD acasalaram apenas com 45% das fêmeas saudáveis. Esses resultados podem ser correlacionados com a influência do diabetes na saúde sexual e reprodutiva, pois a doença é reconhecida por ser um fator de risco para o desenvolvimento de disfunção erétil em homens e pode afetar negativamente a fertilidade em mulheres (35). Além disso, estudos anteriores destacaram que o diabetes está associado a uma maior incidência de disfunção erétil em pacientes diabéticos mais jovens em comparação com a população não diabética (36–40).

As alterações nos órgãos reprodutores masculinos observadas no presente estudo, incluindo mudanças na estrutura testicular, redução na produção e qualidade de espermatozoides também foram observadas em outros estudos e estão associadas, principalmente, à hiperglicemia em decorrência do diabetes (41,42). Durante a hiperglicemia, ocorre o aumento de citocinas pró-inflamatórias nos testículos. Essa condição possui o potencial de resultar em inflamação crônica que, por sua vez, aumenta a liberação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (43,44). Um estudo realizado em ratos revelou que o diabetes mellitus pode ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento dos testículos e na motilidade dos espermatozoides, devido ao estresse oxidativo e, consequentemente, ocasionando aumento da taxa de infertilidade masculina (20). Essa associação direta entre a condição diabética e a infertilidade em machos é reforçada pelos dados deste estudo em ratos, uma vez que observamos alterações significativas nos órgãos sexuais masculinos do grupo GD, além de alterações nas caudas dos espermatozoides, o que poderia resultar em redução de motilidade.

As células de Leydig são componentes importantes dos testículos, uma vez que são responsáveis, pela produção e regulação da testosterona, sendo essenciais no desenvolvimento e funcionamento adequado do sistema reprodutor masculino (45–47). Além disso, as células de Sertoli apresentam grande importância na espermatogênese, pois produzem substâncias que promovem a sobrevivência das células germinativas e criam um ambiente essencial para uma espermatogênese adequada (48). No presente estudo, foram relatadas reduções nas células de Leydig e Sertoli no grupo GD em comparação ao grupo GC, indicando que os efeitos negativos do diabetes mellitus afetaram a capacidade dessas células no fornecimento de nutrientes e regulação das células germinativas, comprometendo a espermatogênese e ocasionado aumento do número de espermatozoides com caudas anormais, bem como na ausência de espermatozoides nos animais mais comprometidos pelo diabetes.

No presente estudo, o tratamento com β -cariofileno demonstrou ter efeito protetor, uma vez que resultou em melhorias significativas nos parâmetros físicos e reprodutivos em relação aos ratos diabéticos não tratados, incluindo o aumento no número de células de Leydig, nível de testosterona e peso de testículos e epidídimo. Esses resultados tiveram um impacto positivo na taxa de prenhez das fêmeas saudáveis, visto que aquelas que se acasalaram com machos com diabetes e tratados com β -cariofileno apresentaram índices de prenhez superiores quando comparadas com as fêmeas que foram acasaladas com machos do grupo diabéticos, mas sem tratamento com β -cariofileno. Um estudo realizado em camundongos intoxicados com cádmio reforçam os resultados deste estudo, uma vez que o tratamento utilizando β -cariofileno também evidenciou o potencial efeito protetor desse composto no sistema reprodutor masculino por meio da sua capacidade de proteção contra agentes oxidantes (17).

No presente estudo, foram relatadas perdas acentuadas de peso nos ratos diabéticos sem tratamento com β -cariofileno. Em geral, a relação entre perda de peso e diabetes é complexa, uma vez que esse parâmetro pode variar de acordo com o tipo de diabetes e fatores individuais. Em certos casos de diabetes tipo 1, a falta de produção de insulina resulta em uma incapacidade das células de absorver glicose, levando à quebra de gorduras e proteínas como fonte alternativa de energia, resultando em perda de peso. No diabetes tipo 2, a resistência à insulina pode contribuir para o ganho de peso devido ao aumento da fome e consumo excessivo de alimentos. No entanto, em alguns indivíduos com diabetes tipo 2, a descompensação glicêmica pode levar à perda de energia, fadiga e perda de peso (49).

Embora a maioria das pesquisas sobre o impacto do diabetes na prole se concentre nas condições maternas, há evidências crescentes que sugerem que o diabetes mellitus

paterno também pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da prole. Alguns estudos evidenciaram que o diabetes paterno pode estar associada às alterações epigenéticas no esperma, afetando a expressão gênica e contribuindo para a suscetibilidade de descendentes à distúrbios metabólicos (50,51). Neste estudo, a prole proveniente de fêmeas saudáveis acasaladas com machos do grupo GD apresentou alterações significativas quanto às medidas e peso dos fetos quando comparado aos outros grupos, indicando influência da condição diabética paterna na sua descendência. Além disso, as reabsorções ocorreram apenas nos grupos diabéticos (GD e GDT β -C).

CONCLUSÃO

O presente estudo evidencia as implicações do diabetes mellitus no sistema reprodutor masculino. O tratamento de β -cariofileno mostrou-se promissor como um agente protetor, melhorando os parâmetros físicos e reprodutivos masculinos. Essas descobertas enfatizam a importância de controlar o diabetes mellitus e explorar terapias potenciais para minimizar seus impactos na performance reprodutiva. No entanto, a relevância clínica desses achados deve ser considerada em conjunto com outros conhecimentos e considerações médicas para uma avaliação completa das implicações do diabetes mellitus.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, para desenvolvimento do estudo por meio da concessão de bolsa de estudo para A.C.Z. (N. 88882.448606/2019-01) e C.S.S. (N.88882.448607/2019-01).

Declaração de interesses: Não há.

REFERÊNCIAS

1. Niwas Jangir R, Chand Jain G. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Current diabetes reviews*. 2014;10(3):147–57.
2. Vlad I, Popa AR. Epidemiology of Diabetes Mellitus: A Current Review. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*. 1º de dezembro de 2012;19(4):433–40.
3. Costantino S, Paneni F, Battista R, Castello L, Capretti G, Chiandotto S, et al. Impact of Glycemic Variability on Chromatin Remodeling, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Patients With Type 2 Diabetes and With Target HbA1c Levels. *Diabetes*. 1º de setembro de 2017;66(9):2472–82.
4. Roshankhah SH, Salahshoor MR, Aryanfar S, Jalili F, Sohrabil M, Jalili C. Effects of curcumin on sperm parameters abnormalities induced by morphine in rat. *Journal of Medical and Biomedical Sciences*. 2017;6(2):1–10.
5. Federation ID. *The IDF Diabetes Atlas 10th Edition*. 2021;
6. Bahmanzadeh M, Vahidinia A, Mehdinejadi S, Shokri S, Alizadeh Z. Dietary supplementation with astaxanthin may ameliorate sperm parameters and DNA integrity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Exp Reprod Med*. 2016;43(2):90.
7. Kettner LO, Matthiesen NB, Ramlau-Hansen CH, Kesmodel US, Bay B, Henriksen TB. Fertility treatment and childhood type 1 diabetes mellitus: a nationwide cohort study of 565,116 live births. *Fertility and Sterility*. 2016;106(7):1751–6.
8. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *Journal of andrology*. 2012;33(2):145–53.
9. Carvalho HO, Santos IVFD, Rocha CFD, Barros ASA, Faria E Souza BS, Ferreira IM, et al. Effect of the treatment of *Copaifera duckei* oleoresin (copaiba) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. novembro de 2018;28(6):724–31.
10. Megraj KVK, Raju K, Balaraman R, Meenakshisundaram K. Biological activities of some Indian medicinal plants. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2011;1(1):12–44.
11. Chang CLT, Lin Y, Bartolome AP, Chen YC, Chiu SC, Yang WC. Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1–33.
12. Desmarchelier C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? *Phytotherapy Research*. 2010;24(6):791–9.
13. Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Pereira Leite DF, et al. β -Caryophyllene Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through CB2 Receptor Activation and PPAR γ Pathway. *The American Journal of Pathology*. março de 2011;178(3):1153–66.
14. Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, et al. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *Br J Nutr*. 14 de fevereiro de 2013;109(3):394–401.

15. Basha RH, Sankaranarayanan C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*. fevereiro de 2016;245:50–8.
16. Gonçalves ES, Silva JR, Gomes CL, Nery MB, Navarro DM, Santos GK, et al. Effects of the oral treatment with *Copaifera multijuga* oil on reproductive performance of male Wistar rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2014;24:355–62.
17. Espinosa-Ahedo BA, Madrigal-Bujaidar E, Sánchez-Gutiérrez M, Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, Madrigal-Santillán EO, et al. Potential protective effect of beta-caryophyllene against cadmium chloride-induced damage to the male reproductive system in mouse. *Reproductive Toxicology*. 1º de junho de 2022;110:19–30.
18. Adefegha SA, Oboh G, Olopade EO. β -caryophyllene improves sexual performance via modulation of crucial enzymes relevant to erectile dysfunction in rats. *Toxicol Res*. 1º de abril de 2021;37(2):249–60.
19. Hamzah RU, Lawal AR, Madaki FM, Erukainure OL. Methanolic extract of *Celosia argentea* var. *crista* leaves modulates glucose homeostasis and abates oxidative hepatic injury in diabetic rats. *Comp Clin Pathol*. julho de 2018;27(4):1065–71.
20. Aguirre-Arias MV, Velarde V, Moreno RD. Effects of ascorbic acid on spermatogenesis and sperm parameters in diabetic rats. *Cell Tissue Res*. novembro de 2017;370(2):305–17.
21. Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Santi AP, Cuoghi OA, Salazar M. Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2012;23:467–73.
22. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reproductive Toxicology*. junho de 2007;23(4):578–87.
23. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*. janeiro de 1972;52(1):198–236.
24. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RSD, organizadores. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [Internet]. Editora FIOCRUZ; 2006 [citado 17 de julho de 2023]. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwtj>
25. Stuckhardt JL, Poppe SM. Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1984;4(2):181–8.
26. Gil AG, Silvan G, Illera M, Illera JC. The effects of anesthesia on the clinical chemistry of New Zealand White rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2004;43(3):25–9.
27. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kapp Jr RW, Letz G, et al. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1983;115(1):1–72.

28. Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*. 1970;1(1):2–25.
29. Moraes-Souza RQ, Soares TS, Carmo NOL, Damasceno DC, Campos KE, Volpato GT. Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology*. 6 de março de 2017;199:328–33.
30. Barrow MV, Taylor WJ. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J Morphol*. março de 1969;127(3):291–305.
31. Costa GDA, Galvão TC, Bacchi AD, Moreira EG, Salles MJS. Investigation of possible teratogenic effects in the offspring of mice exposed to methylphenidate during pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online*. fevereiro de 2016;32(2):170–7.
32. Alderman BW, Zhao H, Holt VL, Watts DH, Beresford SAA. Maternal Physical Activity in Pregnancy and Infant Size for Gestational Age. *Annals of Epidemiology*. novembro de 1998;8(8):513–9.
33. Aguilar-Ávila DS, Flores-Soto ME, Tapia-Vázquez C, Pastor-Zarandona OA, López-Roa RI, Viveros-Paredes JM. β -Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Attenuates Neuropathic Pain and Depressive-Like Behavior in Experimental Diabetic Mice. *Journal of Medicinal Food*. maio de 2019;22(5):460–8.
34. Li H, Wang D, Chen Y, Yang M. β -Caryophyllene inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix accumulation in mesangial cells. *International Immunopharmacology*. julho de 2020;84:106556.
35. Laumann EO, Nicolosi A, Glasser DB, Paik A, Gingell C, Moreira E, et al. Sexual problems among women and men aged 40–80 y: prevalence and correlates identified in the Global Study of Sexual Attitudes and Behaviors. *Int J Impot Res*. 1º de janeiro de 2005;17(1):39–57.
36. Laumann EO, Paik A, Rosen RC. Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *Jama*. 1999;281(6):537–44.
37. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *The Journal of urology*. 1994;151(1):54–61.
38. Lewis RW, Fugl-Meyer KS, Corona G, Hayes RD, Laumann EO, Moreira Jr ED, et al. Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. *The journal of sexual medicine*. 2010;7(4_Part_2):1598–607.
39. Yamasaki H, Ogawa K, Sasaki H, Nakao T, Wakasaki H, Matsumoto E, et al. Prevalence and risk factors of erectile dysfunction in Japanese men with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. dezembro de 2004;66:S173–7.
40. De Berardis G, Franciosi M, Belfiglio M, Di Nardo B, Greenfield S, Kaplan SH, et al. Erectile Dysfunction and Quality of Life in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 1º de fevereiro de 2002;25(2):284–91.

41. Elangovan A, Durairaj S, Subramanian A, Ramakrishnan S, Lakshmanan DK, Ravichandran G, et al. *Momordica cymbalaria* improves reproductive parameters in alloxan-induced male diabetic rats. *3 Biotech*. fevereiro de 2021;11(2):76.
42. Akinola OB, Dosumu OO, Sanusi SA, Ajayi TF, Olajide TH. PPAR- γ agonist pioglitazone improves semen quality and testicular histomorphometrics with partial reversal of hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic rats. *Middle East Fertility Society Journal*. dezembro de 2015;20(4):271–9.
43. Jalili C, Kamani M, Roshankhah S, Sadeghi H, Salahshoor MR. Effect of *Falcaria vulgaris* extracts on sperm parameters in diabetic rats. *Andrologia*. 2018;50(10):e13130.
44. Jalili C, Salahshoor MR, Naderi T. The effect of hydroalcoholic extract of *P. crispum* on sperm parameters, testis tissue and serum nitric oxide levels in mice. *Advanced biomedical research*. 2015;4.
45. Garza S, Papadopoulos V. Testosterone recovery therapy targeting dysfunctional Leydig cells. *Andrology*. 10 de outubro de 2022;andr.13304.
46. Rebourcet D, O’Shaughnessy PJ, Pitetti JL, Monteiro A, O’Hara L, Milne L, et al. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development*. 15 de maio de 2014;141(10):2139–49.
47. Rebourcet D, Darbey A, Monteiro A, Soffientini U, Tsai YT, Handel I, et al. Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis. *Endocrinology*. 1º de setembro de 2017;158(9):2955–69.
48. Griswold MD. Interactions Between Germ Cells and Sertoli Cells in the Testis. *Biology of Reproduction*. 1º de fevereiro de 1995;52(2):211–6.
49. Hebert SL, Nair KS. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clinical Nutrition*. fevereiro de 2010;29(1):13–7.
50. Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*. dezembro de 2015;17(6):948.
51. Jazayeri M, Alizadeh A, Gilani MAS, Eftekhari-Yazdi P, Sharafi M, Shahverdi A. Underestimated Aspects in Male Infertility: Epigenetics is A New Approach in Men with Obesity or Diabetes: A Review. *International Journal of Fertility & Sterility*. setembro de 2022;16(3):132.

5 CONCLUSÕES

As alterações morfológicas nos espermatozoides observadas em ratos com periodontite induzida indicam implicações significativas na contagem e funcionalidade das células reprodutivas, ressaltando a importância da saúde bucal na performance reprodutiva masculina.

A periodontite induzida afetou o desenvolvimento intrauterino e a saúde da prole, destacando implicações além da saúde bucal e reprodutiva masculina.

O diabetes mellitus teve efeitos adversos no desempenho reprodutivo em ratos machos, mas a administração de β -cariofileno mostrou potencial para atenuar alguns desses efeitos prejudiciais, sugerindo benefícios terapêuticos na gestão da performance reprodutiva em indivíduos com diabetes.

O β -cariofileno pode desempenhar um papel importante na preservação da saúde óssea em ratos com diabetes, indicando seu potencial como agente terapêutico promissor na gestão da saúde óssea comprometida devido à diabetes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo destacam os efeitos negativos da periodontite na performance reprodutiva masculina e no desenvolvimento intrauterino. A redução na contagem de células reprodutivas, nos níveis hormonais e as malformações congênitas na prole indicam a necessidade de uma abordagem preventiva e terapêutica abrangente para combater os efeitos adversos da periodontite na performance reprodutiva masculina e na prole. Revelou a necessidade de uma abordagem abrangente para o manejo do diabetes, a fim de reduzir os efeitos adversos na performance reprodutiva masculina e no desenvolvimento da prole. Além disso, a identificação do β -cariofileno como um possível agente protetor sugere seu potencial como uma opção terapêutica promissora. Essas descobertas ressaltam a importância de estratégias de controle do diabetes que considerem não apenas os efeitos metabólicos, mas também os efeitos na reprodução masculina e na saúde da prole.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Defining Sexual Health: Report of a Technical Consultation on Sexual Health, 28-31 January 2002, Geneva [Internet]. World Health Organization; 2006. Disponível em: <https://www.cesas.lu/perch/resources/whodefiningsexualhealth.pdf>
2. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Male. Cambridge University Press; 2000. 106 p.
3. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update*. 2015;21(4):411–26.
4. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *The Journal of urology*. 2002;167(5):2138–44.
5. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44–84.
6. Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(1):32–58.
7. Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia*. dezembro de 2018;50(11):e13126.
8. Mannucci A, Argento FR, Fini E, Coccia ME, Taddei N, Becatti M, et al. The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. *Frontiers in Molecular Biosciences* [Internet]. 2022 [citado 31 de outubro de 2023];8. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.799294>
9. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J of Andrology*. fevereiro de 2009;32(1):46–56.
10. Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive biomedicine online*. 2003;7(1):65–70.
11. Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*. 2014;32(1):1–17.
12. Venkatesh S, Shamsi MB, Deka D, Saxena V, Kumar R, Dada R. Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *The Indian journal of medical research*. 2011;134(3):396.
13. Aitken R, Smith T, Jobling M, Baker M, De Iuliis G. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014;16(1):31.
14. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-

- Implant Diseases and Conditions: Classification and case definitions for periodontitis. *J Periodontol.* junho de 2018;89:S173–82.
15. Stewart R, West M. Increasing evidence for an association between periodontitis and cardiovascular disease. Vol. 133, *Circulation.* Am Heart Assoc; 2016.
 16. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nature Reviews Endocrinology.* 2011;7(12):738–48.
 17. Sung CE, Huang RY, Cheng WC, Kao TW, Chen WL. Association between periodontitis and cognitive impairment: Analysis of national health and nutrition examination survey (NHANES) III. *Journal of Clinical Periodontology.* 2019;46(8):790–8.
 18. Jiang W, Wang Y, Cao Z, Chen Y, Si C, Sun X, et al. The role of mitochondrial dysfunction in periodontitis: From mechanisms to therapeutic strategy. *Journal of Periodontal Research.* outubro de 2023;58(5):853–63.
 19. Chen MX, Zhong YJ, Dong QQ, Wong HM, Wen YF. Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990–2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Journal of clinical periodontology.* 2021;48(9):1165–88.
 20. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000.* 2015;69(1):7–17.
 21. Herrera D, Sanz M, Shapira L, Brotons C, Chapple I, Frese T, et al. Association between periodontal diseases and cardiovascular diseases, diabetes and respiratory diseases: Consensus report of the Joint Workshop by the European Federation of Periodontology (EFP) and the European arm of the World Organization of Family Doctors (WONCA Europe). *Journal of Clinical Periodontology.* junho de 2023;50(6):819–41.
 22. Hajishengallis G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: Evidence, mechanisms, and implications. *Periodontology 2000.* junho de 2022;89(1):9–18.
 23. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology.* 2021;21(7):426–40.
 24. Laine ML, Jepsen S, Loos BG. Progress in the Identification of Genetic Factors in Periodontitis. *Curr Oral Health Rep.* 1º de dezembro de 2014;1(4):272–8.
 25. Dosseva-Panova V, Mlachkova A, Popova C. Gene polymorphisms in periodontitis. Overview. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 3 de setembro de 2015;29(5):834–9.
 26. Taba Jr M, Souza SLS de, Mariguela VC. Periodontal disease: a genetic perspective. *Braz oral res.* 2012;26:32–8.
 27. Suzuki S, Yamada S. Epigenetics in susceptibility, progression, and diagnosis of periodontitis. *Japanese Dental Science Review.* 1º de novembro de 2022;58:183–92.
 28. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 766944. 2021.

29. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* janeiro de 2015;15(1):30–44.
30. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology.* 2021;21(7):426–40.
31. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000.* 2013;62(1):59–94.
32. Tonetti MS, D’Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of Periodontitis and Endothelial Function. *New England Journal of Medicine.* 1º de março de 2007;356(9):911–20.
33. Shiao HJ. Periodontal Disease in Women and Men. *Curr Oral Health Rep.* 1º de dezembro de 2018;5(4):250–4.
34. Horst R ter, Jaeger M, Smeekens SP, Oosting M, Swertz MA, Li Y, et al. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell.* 3 de novembro de 2016;167(4):1111-1124.e13.
35. Valerio MS, Basilakos DS, Kirkpatrick JE, Chavez M, Hathaway-Schrader J, Herbert BA, et al. Sex-based differential regulation of bacterial-induced bone resorption. *J of Periodontal Research.* junho de 2017;52(3):377–87.
36. Song B, Zhou T, Yang WL, Liu J, Shao LQ. Programmed cell death in periodontitis: recent advances and future perspectives. *Oral diseases.* 2017;23(5):609–19.
37. Tsukasaki M. RANKL and osteoimmunology in periodontitis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* 2021;39:82–90.
38. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *Journal of immunology research.* 2015;2015.
39. Gruber R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. *Journal of Clinical Periodontology.* 2019;46:52–69.
40. Govindaraj P, Khan NA, Gopalakrishna P, Chandra RV, Vanniarajan A, Reddy AA, et al. Mitochondrial dysfunction and genetic heterogeneity in chronic periodontitis. *Mitochondrion.* 2011;11(3):504–12.
41. Sun X, Mao Y, Dai P, Li X, Gu W, Wang H, et al. Mitochondrial dysfunction is involved in the aggravation of periodontitis by diabetes. *Journal of Clinical Periodontology.* 2017;44(5):463–71.
42. Tao D, Zhu J, Xie C, Kuang Y, Chai W, Lo ECM, et al. Relationship between periodontal disease and male infertility: A case–control study. *Oral Dis.* abril de 2021;27(3):624–31.
43. Práger N, Pásztor N, Várnagy Á, Kozinszky Z, Baráth Z, Gorzó I, et al. Idiopathic male infertility related to periodontal and caries status. *J Clin Periodontol.* setembro de 2017;44(9):872–80.
44. Klinger A, Hain B, Yaffe H, Schonberger O. Periodontal status of males attending an in vitro fertilization clinic: Periodontal status and male fertility. *Journal of Clinical Periodontology.* junho de 2011;38(6):542–6.

45. Azenabor A, Ekun AO, Akinloye O. Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. *Journal of Reproduction & Infertility*. setembro de 2015;16(3):123.
46. McPherson NO, Fullston T, Aitken RJ, Lane M. Paternal Obesity, Interventions, and Mechanistic Pathways to Impaired Health in Offspring. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2 de outubro de 2014;64(3-4):231-8.
47. Bobetsis YA, Barros SP, Offenbacher S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. *The Journal of the American Dental Association*. 2006;137:S7-13.
48. Bobetsis YA, Barros SP, Lin DM, Weidman JR, Dolinoy DC, Jirtle RL, et al. Bacterial Infection Promotes DNA Hypermethylation. *J Dent Res*. 1º de fevereiro de 2007;86(2):169-74.
49. Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preisser JS, Offenbacher S. Alteration of PTGS2 Promoter Methylation in Chronic Periodontitis. *J Dent Res*. 1º de fevereiro de 2010;89(2):133-7.
50. Domingueti CP, Dusse LMS, Carvalho M das G, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of Diabetes and its Complications*. 1º de maio de 2016;30(4):738-45.
51. Roglic G. Global report on diabetes. World Health Organization; 2016.
52. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1º de novembro de 2019;157:107843.
53. Goldberg RB. Cytokine and Cytokine-Like Inflammation Markers, Endothelial Dysfunction, and Imbalanced Coagulation in Development of Diabetes and Its Complications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1º de setembro de 2009;94(9):3171-82.
54. Wautier JL, Guillausseau PJ. Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vasc Med*. 1º de maio de 1998;3(2):131-7.
55. Margetic S. Inflammation and hemostasis. *Biochemia Medica*. 15 de fevereiro de 2012;22(1):49-62.
56. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1º de janeiro de 2011;34(Supplement_1):S62-9.
57. Schrauwen P, Hesselink MKC. Oxidative Capacity, Lipotoxicity, and Mitochondrial Damage in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 1º de junho de 2004;53(6):1412-7.
58. Jenkins AJ, Carroll LM, Huang MLH, Wen-Loh Y, Mangani A, O'Neal DN, et al. Mitochondrial DNA copy number in adults with and without Type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1º de setembro de 2023;203:110877.
59. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*. 1º de janeiro de 1999;31(4):261-72.
60. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *Journal of andrology*. 2012;33(2):145-53.

61. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction*. 1º de julho de 2007;22(7):1871–7.
62. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*. 1º de fevereiro de 2016;92(1084):63–9.
63. Kahn SE, Cooper ME, Prato SD. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*. 22 de março de 2014;383(9922):1068–83.
64. Thrasher J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Available Therapies. *The American Journal of Medicine*. 1º de junho de 2017;130(6, Supplement):S4–17.
65. Wu L, Gunton JE. The Changing Landscape of Pharmacotherapy for Diabetes Mellitus: A Review of Cardiovascular Outcomes. *International Journal of Molecular Sciences*. janeiro de 2019;20(23):5853.
66. Sharma C, M. Al Kaabi J, M. Nurulain S, N. Goyal S, Amjad Kamal M, Ojha S. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. *Current Pharmaceutical Design*. 1º de junho de 2016;22(21):3237–64.
67. Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. julho de 2008;105(26):9099–104.
68. Horváth B, Mukhopadhyay P, Haskó G, Pacher P. The Endocannabinoid System and Plant-Derived Cannabinoids in Diabetes and Diabetic Complications. *The American Journal of Pathology*. 1º de fevereiro de 2012;180(2):432–42.
69. Yang M, Lv Y, Tian X, Lou J, An R, Zhang Q, et al. Neuroprotective Effect of β -Caryophyllene on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of Necroptotic Neuronal Death and Inflammation: In Vivo and in Vitro. *Frontiers in Neuroscience* [Internet]. 2017 [citado 31 de outubro de 2023];11. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00583>
70. Basha RH, Sankaranarayanan C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*. fevereiro de 2016;245:50–8.
71. Youssef DA, El-Fayoumi HM, Mahmoud MF. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1º de fevereiro de 2019;110:145–54.
72. Youssef DA, El-Fayoumi HM, Mahmoud MF. Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR- γ receptors. *Chemico-Biological Interactions*. 5 de janeiro de 2019;297:16–24.
73. Hashiesh HM, Meeran MFN, Sharma C, Sadek B, Kaabi JA, Ojha SK. Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Cannabinoid in Diabetes and Associated Complications. *Nutrients*. outubro de 2020;12(10):2963.
74. Espinosa-Ahedo BA, Madrigal-Bujaidar E, Sánchez-Gutiérrez M, Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, Madrigal-Santillán EO, et al. Potential protective effect of beta-caryophyllene against

- cadmium chloride-induced damage to the male reproductive system in mouse. *Reproductive Toxicology*. 1º de junho de 2022;110:19–30.
75. Li H, Wang D, Chen Y, Yang M. β -Caryophyllene inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix accumulation in mesangial cells. *International Immunopharmacology*. julho de 2020;84:106556.
 76. Aguilar-Ávila DS, Flores-Soto ME, Tapia-Vázquez C, Pastor-Zarandona OA, López-Roa RI, Viveros-Paredes JM. β -Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Attenuates Neuropathic Pain and Depressive-Like Behavior in Experimental Diabetic Mice. *Journal of Medicinal Food*. maio de 2019;22(5):460–8.
 77. Jung JI, Kim EJ, Kwon GT, Jung YJ, Park T, Kim Y, et al. β -Caryophyllene potently inhibits solid tumor growth and lymph node metastasis of B16F10 melanoma cells in high-fat diet–induced obese C57BL/6N mice. *Carcinogenesis*. 1º de setembro de 2015;36(9):1028–39.
 78. Yamaguchi M, Levy RM. β -Caryophyllene promotes osteoblastic mineralization, and suppresses osteoclastogenesis and adipogenesis in mouse bone marrow cultures in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 1º de dezembro de 2016;12(6):3602–6.
 79. Zhou L, Zhan ML, Tang Y, Xiao M, Li M, Li QS, et al. Effects of β -caryophyllene on arginine ADP-ribosyltransferase 1-mediated regulation of glycolysis in colorectal cancer under high-glucose conditions. *International Journal of Oncology*. 1º de outubro de 2018;53(4):1613–24.
 80. Semprini R, Martorana A, Ragonese M, Motta C. Observational clinical and nerve conduction study on effects of a nutraceutical combination on painful diabetic distal symmetric sensory-motor neuropathy in patients with diabetes type 1 and type 2. *Minerva Med [Internet]*. outubro de 2018 [citado 31 de outubro de 2023];109(5). Disponível em: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R10Y2018N05A0358>
 81. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *Journal of Periodontal Research*. 1982;17(3):263–74.
 82. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*. janeiro de 1972;52(1):198–236.
 83. Andrade, Antenor, Pinto, Sergio Correia, Oliveira, Rosilene Santos de. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006. 388. <https://doi.org/10.7476/9788575413869>.
 84. Kim H, Kim C, Kook KE, Yanti, Choi S, Kang W, et al. Inhibitory Effects of Standardized *Boesenbergia pandurata* Extract and Its Active Compound Panduratin A on Lipopolysaccharide-Induced Periodontal Inflammation and Alveolar Bone Loss in Rats. *Journal of Medicinal Food*. outubro de 2018;21(10):961–70.
 85. Stuckhardt JL, Poppe SM. Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1984;4(2):181–8.
 86. Gil AG, Silvan G, Illera M, Illera JC. The effects of anesthesia on the clinical chemistry of New Zealand White rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2004;43(3):25–9.

87. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kapp Jr RW, Letz G, et al. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1983;115(1):1–72.
88. Johnsen SG. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*. 1970;1(1):2–25.
89. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*. 1979;9(1):62–6.
90. Liao PS, Chen TS, Chung PC. A fast algorithm for multilevel thresholding. *J Inf Sci Eng*. 2001;17(5):713–27.
91. Moraes-Souza RQ, Soares TS, Carmo NOL, Damasceno DC, Campos KE, Volpato GT. Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology*. 6 de março de 2017;199:328–33.
92. Barrow MV, Taylor WJ. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J Morphol*. março de 1969;127(3):291–305.
93. Costa GDA, Galvão TC, Bacchi AD, Moreira EG, Salles MJS. Investigation of possible teratogenic effects in the offspring of mice exposed to methylphenidate during pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online*. fevereiro de 2016;32(2):170–7.
94. Alderman BW, Zhao H, Holt VL, Watts DH, Beresford SAA. Maternal Physical Activity in Pregnancy and Infant Size for Gestational Age. *Annals of Epidemiology*. novembro de 1998;8(8):513–9.
95. Hamzah RU, Lawal AR, Madaki FM, Erukainure OL. Methanolic extract of *Celosia argentea* var. *crista* leaves modulates glucose homeostasis and abates oxidative hepatic injury in diabetic rats. *Comp Clin Pathol*. julho de 2018;27(4):1065–71.
96. Aguirre-Arias MV, Velarde V, Moreno RD. Effects of ascorbic acid on spermatogenesis and sperm parameters in diabetic rats. *Cell Tissue Res*. novembro de 2017;370(2):305–17.
97. Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Santi AP, Cuoghi OA, Salazar M. Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2012;23:467–73.
98. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reproductive Toxicology*. junho de 2007;23(4):578–87.
99. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RSD, organizadores. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [Internet]. Editora FIOCRUZ; 2006 [citado 17 de julho de 2023]. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwtj>

APÊNDICES

APÊNDICE A
Ficha controle de tratamento de ratos Wistar

Projeto _____

Grupo: **Macho:**

Data da eutanásia

Data de colocar para acasalar:

Peso inicial (Dia 1):

Início do tratamento:

Dose fixa:

Tratamento:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	*	37	38	39	40	41	42	43	44	45	**

Peso final (Dia 36 ou 46):

	Fêmeas do machos					
	Fêmea 1			Fêmea 2		
	Peso Placenta	Peso Fetos	Medida fetos	Peso Placenta	Peso Fetos	Medida fetos
1-				1-		
2-				2-		
3-				3-		
4-				4-		
5-				5-		
6-				6-		
7-				7-		
8-				8-		
9-				9-		
10-				10-		
11-				11-		
12-				12-		
13-				13-		
14-				14-		
15-				15-		
16-				16-		
17-				17-		
18-				18-		
19-				19-		
20-				20-		

Peso Órgão (g)
Coração:
Pulmões:
Fígado:
Rins:
Vesícula cheia:
Vesícula vazia:
Epidídimo esquerdo
Epidídimo direito
Testículo esquerdo:
Testículo direito

Medida órgãos (mm)
Testículo direito:
Testículo esquerdo:

Observações:

APÊNDICE C
Ficha de análise visceral

ANÁLISE VISCERAL

Projeto:	
Grupo:	Fêmea:
Data da eutanásia: ___/___/___	Data da análise: ___/___/___
Número de fetos:	

CORTES	
1~4: Cabeça	5: Pescoço
6: Pescoço	7: Abdômen

		FETO 1	FETO 2	FETO 3	FETO 4	FETO 5	FETO 6	FETO 7	FETO 8	FETO 9	FETO 10
1	Palato										
	Ouvido interno										
	Medula										
	Traquéia										
2	Cavidade nasal										
	Septo nasal										
	Palato										
3	Bulbo olfatório										
	Retina										
	Palato										
	Córnea										
4	Hemisfério cerebral										
	Ventrículos cerebrais										
	3º Ventrículo cerebral										
	Diencefalo										
5	Glândula salivar										
	Tireóide										
	Medula espinhal										
	Esôfago										
6	Traquéia										
	Coração										
	Pulmões										
	Timo										
7	Traquéia										
	Diafragma										
	Bexiga										
	Rins										
	Pelve renal										
	Medula renal										
	Ureteres										
Útero											
Testículo											
Epidídimo											

OBSERVAÇÕES:

NÚMERO DE FETOS FEMININOS	NÚMERO DE FETOS MASCULINOS

ANEXOS

ANEXO A
Parecer Comitê de Ética – Artigo 1



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 182/2018

Londrina, 26 de outubro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: “Análise do efeito toxicológico da Doença Periodontal sobre as glândulas salivares de ratos machos e fêmeas prenhes e avaliação das possíveis alterações na fertilidade masculina e teratogênese na prole” protocolo CEUA n° 17614.2018.59 sob a responsabilidade de Maria José Sparça Salles, 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 n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em 26/10/2018.

O objetivo do estudo é avaliar as possíveis alterações causadas pela doença periodontal induzida em molares de ratos machos e fêmeas prenhes sobre as glândulas salivares, a performance reprodutiva masculina e as malformações congênitas na prole. Grau de invasividade: GI 2

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/06/2019 a 30/06/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato (Wistar)
N° de animais	210
Peso/ Idade	Adulto (250g)
Sexo	70 Machos e 140 Fêmeas
Origem	Biotério Central do CCB/UEL
Amostras a serem coletadas	Fetos, placentas, órgãos das fêmeas e machos: coração, pulmão, fígado, rins, glândulas salivares, testículos, epidídimos e coleta de sangue.

Cumpra 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 necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Prof. Dr. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Maria José Sparça Salles
Responsável pelo projeto
Departamento de Biologia Geral

C/C para a Chefia do Depto de Biologia Geral/CCB
C/C para a Direção de Centro do CCB

ANEXO B
Parecer Comitê de Ética – Artigo 2



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 55/2019

Londrina, 16 de abril de 2019.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: **“Identificação dos possíveis efeitos protetores do óleo de copaíba sobre diabetes mellitus induzido por aloxana em ratos machos”** protocolo CEUA n° 752.2019.54 sob a responsabilidade de **Maria José Sparça Salles**, 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 n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **17 /04/2019**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os possíveis benefícios do tratamento de ratos machos diabéticos com óleo de copaíba, na concentração de 250 mg/Kg, sobre as glândulas salivares, efeito protetor no tecido da cavidade oral, performance reprodutiva e as malformações congênitas na prole. Grau de Invasividade: 2.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/06/2019 a 30/06/2022
Espécie/ linhagem/ raça	<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)
N° de animais	264 (88 machos e 176 fêmeas)
Peso/ Idade	Adulto
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central do CCB/UEL
Amostras a serem coletadas	Coração, pulmão, fígado, rins , testículos, epididimo, glândulas salivares e mandíbulas.

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 necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Profª. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Profª Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr (a). Maria José Sparça Salles
Responsável pelo projeto

Departamento de Biologia Geral/CCB
C/C para a Chefia do Depto. de Biologia Geral
C/C para a Direção de Centro do CCB
C/C para o Biotério Central do CCB

ANEXO C
Parecer Comitê de Ética – Alteração do título



Universidade
 Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 47/2020

Londrina, 06 de maio de 2020.

Prezado(a) professor(a),

Em resposta ao pedido de alteração de título referente ao processo 752.2019.54 "Identificação dos possíveis efeitos protetores do Óleo de Copaíba sobre Diabetes Mellitus induzido por Aloxana em Ratos machos" sob responsabilidade de Maria José Sparça Salles e previamente aprovado pela CEUA-UEL, certificamos que o mesmo teve parecer favorável em reunião realizada em 05/05/2020.

O atual título do projeto é: "Identificação dos possíveis efeitos protetores do Beta-Cariofileno sobre Diabetes Mellitus induzido por Aloxana em Ratos machos". A alteração se deve à impossibilidade de compra do óleo de copaíba, o qual tem como principal constituinte o β -cariofileno, extraído de plantas do gênero *Copaifera*, proveniente da Amazônia e comercializada mundialmente. Não haverá necessidade de utilização de mais animais ou modificação das metodologias experimentais.

Cumpra 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 necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Maria Fernanda R. Graciano
 Profª Draª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

**Profª Drª Maria Fernanda
 Rodrigues Graciano**
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais
 Universidade Estadual de Londrina
 ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a) Maria José Sparça Salles
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Biologia Geral /CCB
 Centro de Ciências Biológicas/CCB