



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SIMONE FORCATO FERREIRA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À METFORMINA
NOS ASPECTOS REPRODUTIVOS DA PROLE MASCULINA
DE RATAS**

Londrina
2017

SIMONE FORCATO FERREIRA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À METFORMINA NOS
ASPECTOS REPRODUTIVOS DA PROLE MASCULINA DE
RATAS**

Dissertação apresentada para ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Cristina Ceccatto Gerardin.

Londrina
2017

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

Ferreira, Simone Forcato.

Efeitos da exposição materna à Metformina nos aspectos reprodutivos da prole masculina de ratas / Simone Forcato Ferreira. - Londrina, 2017.
59 f. : il.

Orientador: Daniela Cristina Ceccatto Gerardin.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes Gestacional - Tese. 2. Exposição materna à Metformina. - Tese. 3. Parâmetros reprodutivos. - Tese. I. Gerardin, Daniela Cristina Ceccatto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

SIMONE FORCATO FERREIRA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À METFORMINA NOS
ASPECTOS REPRODUTIVOS DA PROLE MASCULINA DE RATAS**

Dissertação apresentada para ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto
Gerardin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss Universidade
Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dr. Ernane Torres Uchôa Universidade
Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 03 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida. Por ter me presenteado com a melhor família que eu poderia ter. Por todos os dons e bênçãos recebidas. Por ter me moldado a ser quem sou e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que tornaram possível a obtenção desse tão sonhado e aguardado título.

Aos meus pais, Arcilio e Sebastiana, pelo incentivo, pelo apoio financeiro, pelo amparo emocional, pelo amor incondicional, pela presença constante em todos os momentos da minha vida e pela ajuda na criação e educação do meu filho, sem o qual não teria sido possível concretizar mais essa etapa da minha vida.

Ao meu esposo Marcos pela compreensão pelos meus momentos de ausência, e pelo incentivo que me impulsionou a concretizar essa obra.

Ao meu filho Bruno Henrique, razão pelo qual eu tenho buscado incessantemente me tornar uma pessoa melhor.

À minha irmã, Claudía, pela preocupação que tem comigo e pela presença constante e marcante em minha vida.

À minha orientadora, Profa. Daniela, pela oportunidade, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos que me ajudaram na construção de um conhecimento imensurável que adquiri ao longo do mestrado. E acima de tudo, obrigada por me ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

À professora Graziela C., pela extrema importância na construção de todas as etapas desse trabalho, pelo apoio e colaboração diante de todas as vezes em que precisei de seu auxílio.

A todos os professores do Programa Multicêntrico de Pós graduação em Ciências Fisiológicas, pelo conhecimento compartilhado e por toda contribuição ao longo do curso.

À Daniela, colega de jornada, peça chave no desenvolvimento desse trabalho, que além de uma excelente companheira de trabalho e estudos, tornou-se uma querida amiga.

À Camila, pela contribuição para o desenvolvimento desse trabalho e por tornar mais alegre as tarefas do biotério com sua simpatia, carisma e bom humor.

Aos colegas de laboratório (Bruno, Nathália, Karine, Maria Luiza, Lorena, Mariana, Milene, Marina), pelo trabalho em equipe, pelos finais de semana e feriados compartilhados, por tornarem o trabalho e a rotina mais leve, pelas contribuições fundamentais para a conclusão deste trabalho e acima de tudo pela amizade. Agradeço em especial o Bruno e a

Nathália, por todo os ensinamentos, pelas contribuições fundamentais para a execução desse trabalho, e acima de tudo pela paciência e companheirismo.

À professora Rosângela F. Garcia, por compartilhar seus conhecimentos, pelo carinho e por me dar a oportunidade de desenvolver meu primeiro trabalho experimental ampliando meus horizontes.

À Prof. Claudia Nogata, pela incentivo, por ter confiado a mim as aulas de monitoria durante a graduação, mas acima de tudo por ter feito eu me apaixonar pela fisiologia.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que não foram aqui citadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

A todos os animais utilizados para o desenvolvimento desse trabalho.

“E de repente, num dia qualquer, acordamos e percebemos que já podemos lidar com aquilo que julgávamos maior que nós mesmos. Não foram os abismos que diminuíram, mas nós que crescemos”. Fabíola Simões

FERREIRA, Simone Forcato. **Efeitos da exposição materna à Metformina nos aspectos reprodutivos da prole masculina de ratas.** 2017. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017

RESUMO

Metformina (MET) é prescrita no manejo terapêutico do diabetes *mellitus* tipo 2 e diabetes gestacional. Embora a MET atravesse a placenta sendo detectada no cordão umbilical em concentrações terapêuticas iguais à materna, seu uso tem sido considerado seguro durante a gestação. No entanto, foi demonstrado que a exposição materna à MET aumenta as concentrações de globulinas ligadoras de hormônios sexuais em neonatos, o que influencia os efeitos biológicos dos andrógenos e estrógenos, resultando em fatores de risco para baixa contagem espermática e desenvolvimento de câncer testicular na idade adulta. Mediante a isso, esse estudo investigou se exposição materna à MET interfere nos parâmetros reprodutivos da prole masculina. Ratas Wistar foram tratadas com MET 293mg/kg/dia, por gavagem, do dia gestacional (DG) 0 ao DG 21 (METG) ou do DG0 ao dia lactacional (DL) 21 (METGL). Os grupos controles receberam água por gavagem pelo mesmo período (CTRG e CTRGL). O comportamento sexual da prole masculina foi afetado em ambos os grupos. No grupo METGL foi observado um aumento no comprimento total dos túbulos seminíferos nos animais com 21 dias e uma diminuição na contagem espermática nos testículos dos animais adultos. Esses resultados sugerem que a exposição à MET durante o início do desenvolvimento induziu alterações em alguns parâmetros reprodutivos da prole masculina na infância e na vida adulta, sendo mais frequente no grupo que foi exposto durante a gestação e lactação. No entanto, mais estudos são necessários para investigar os mecanismos relacionados a essas alterações.

Palavras-chaves: Antidiabético. Comportamento sexual. Contagem espermática. Exposição materna.

FERREIRA, Simone Forcato. **Effects of maternal exposure to Metformin on the reproductive aspects of male offspring of rats.** 2017. 59 p. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Metformin (MET) is prescribed in the therapeutic management of type 2 diabetes *mellitus* and gestational diabetes. Although MET crosses the placenta and has been detected in the umbilical cord at the same concentrations as in the maternal venous, it is considered a safe drug throughout gestation. However, it was shown that maternal exposure to MET increases sex hormone binding globulin levels in newborn, which could influence the biological effects of androgens and estradiol, and result in risk factors for low sperm counts and development of testicular cancer in adulthood. Therefore, this study evaluated if maternal exposure to MET could interfere with reproductive parameters of male offspring. Wistar female rats were treated with metformin 293mg/kg/day, by gavage from gestational day (GD) 0 to the GD 21 (METG) or GD 0 until lactation day (LD) 21 (METGL). Controls groups received water by gavage at the same periods (CTRG and CTRGL). Sexual behavior of male offspring was affected in both treated groups. In METGL group was observed an increase in total length of seminiferous tubules in animals on PND 21 and a decrease in the sperm count in testis of adult male rats. No statistical difference was observed in the others reproductive parameters evaluated. These results suggest that the early developmental exposure to MET induced alterations in some reproductive parameters in puppies and adulthood male offspring, being more frequent in METGL group that was exposed during gestation and lactation. More studies are required to investigate the mechanism related to these alterations.

Keywords: Antidiabetic drug. Sexual behavior. Sperm count. Maternal exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental da prole masculina.....	17
Figura 2. Ovários e útero de rata com pontos de implantação no dia lactacional 21 (A). Ovários (B) e corpos lúteos (C)	20
Figura 3. Representação esquemática da vista superior da arena do teste de motivação sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea e do macho, respectivamente.....	23
Figura 4. Câmara de Neubauer utilizada para contagem espermática. À esquerda, foto do modelo utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior, através do microscópio de uma das câmaras do aparelho	27
Figura 5. Ganho de peso corporal das mães tratadas com MET e controle durante a gestação (A) e lactação (B).....	31
Figura 6. Consumo de ração durante os períodos gestacional e lactacional das mães tratadas durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B)	32
Figura 7. Comportamento materno do DL 1 ao DL 10 das mães tratadas durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B)	34
Figura 8. Ganho de peso corporal da prole masculina do nascimento até o desmame. Animais expostos durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B).....	36
Figura 9. Esquema gráfico que resume as consequências da exposição materna à Metformina nos parâmetros reprodutivos da prole masculina. MET: Metformina; DPN: dia pós natal.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Teste de fertilidade das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	35
Tabela 2.	Peso corporal, peso testicular e concentração plasmática de testosterona de ratos no DPN 21 dos diferentes grupos experimentais	37
Tabela 3.	Parâmetros histomorfométricos do parênquima testicular de ratos no DPN 21 dos diferentes grupos experimentais.....	38
Tabela 4.	Descolamento prepucial de ratos dos diferentes grupos experimentais	38
Tabela 5.	Peso corporal, peso úmido dos testículos e próstata e concentração plasmática de testosterona de ratos no DPN 50 dos diferentes grupos experimentais.....	39
Tabela 6.	Parâmetros histomorfométricos do parênquima testicular da prole masculina no DPN 50 dos diferentes grupos experimentais	40
Tabela 7.	Comportamento copulatório dos animais com DPN 90 dos diferentes grupos experimentais	41
Tabela 8.	Motivação sexual dos animais dos diferentes grupos experimentais	41
Tabela 9.	Peso corporal, peso úmido dos órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona dos animais no DPN 110 dos diferentes grupos experimentais	42
Tabela 10.	Contagem espermática dos animais adultos dos diferentes grupos experimentais.....	43
Tabela 11.	Morfologia, motilidade, viabilidade e concentração espermática dos animais no DPN 110 dos diferentes grupos experimentais	44
Tabela 12.	Parâmetros histomorfométricos do parênquima testicular de ratos no DPN 110 dos diferentes grupos experimentais.....	44

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
2.	Objetivos	16
3.	Material e métodos	17
3.1.	<i>Delineamento experimental</i>	17
3.2.	<i>Animais e tratamento</i>	18
3.3.	Avaliação da toxicidade materna.	19
3.3.1.	<i>Avaliação do comportamento materno</i>	20
3.3.2.	<i>Análise da fertilidade</i>	20
3.4.	Avaliação da toxicidade reprodutiva na prole masculina	21
3.4.1.	<i>Ganho de peso corporal</i>	21
3.4.2.	<i>Distância anogenital</i>	21
3.4.3.	<i>Determinação de instalação da puberdade</i>	22
3.5.	Avaliação do comportamento sexual	22
3.5.1	<i>Avaliação do comportamento copulatório</i>	22
3.5.2.	<i>Teste de Motivação sexual</i>	23
3.6.	Concentração plasmática de testosterona	24
3.7.	Retirada dos órgãos reprodutivos	24
3.8.	Parâmetros espermáticos	24
3.8.1.	<i>Viabilidade espermática</i>	24
3.8.2.	<i>Motilidade espermática</i>	25
3.8.3.	<i>Concentração espermática</i>	25
3.8.4.	<i>Morfologia espermática</i>	25
3.8.5.	<i>Contagem espermática</i>	26
3.9.	Parâmetros histomorfométricos do testículo	27
3.10.	Análise estatística	28
4.	Resultados	30
4.1.	<i>Toxicidade geral materna</i>	30
4.1.1.	<i>Ganho de peso corporal</i>	30
4.1.2.	<i>Avaliação do comportamento materno</i>	33

4.1.3.	<i>Análise de fertilidade</i>	35
4.2.	<i>Parâmetros analisados na prole masculina</i>	35
4.2.1.	<i>Peso corporal ao nascer</i>	35
4.2.2.	<i>Ganho de peso corporal</i>	36
4.2.3	<i>Distância anogenital</i>	36
4.2.4.	<i>Peso corporal, peso testicular e concentração plasmática de testosterona no DPN 21</i>	37
4.2.5.	<i>Parâmetros histomorfométricos do testículo no DPN 21</i>	37
4.2.6.	<i>Determinação de instalação da puberdade</i>	38
4.2.7.	<i>Peso corporal, peso testicular e da próstata e concentração plasmática de testosterona no DPN 50</i>	39
4.2.8.	<i>Parâmetros histomorfométricos do testículo no DPN 50</i>	39
4.2.9.	<i>Comportamento sexual</i>	40
4.2.9.1.	<i>Comportamento copulatório</i>	40
4.2.9.2.	<i>Motivação sexual</i>	41
4.2.10.	<i>Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona no DPN 110</i>	42
4.2.11.	<i>Parâmetros espermáticos</i>	42
4.2.12.	<i>Parâmetros histomorfométricos do testículo no DPN 110</i>	44
5.	Discussão	45
6.	Conclusão	49
	Referências	50
	Apêndice A - Resumo gráfico das alterações reprodutivas induzidas na prole masculina pela exposição materna à MET.....	58
	Anexo A - Aprovação da Comissão de ética no uso de animais	59

1. Introdução

A Metformina (MET) é uma dimetilbiguanida recomendada como primeira linha no tratamento de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 pela Associação Americana de Diabetes (VIOLLET *et al.* 2012; RHEE *et al.* 2010). Também tem sido utilizado como alternativa terapêutica no tratamento da resistência insulínica, síndrome do ovário policístico e diabetes gestacional (GLUECK *et al.*, 2008; VIOLLET *et al.*, 2012).

Diabetes gestacional é a principal desordem metabólica desenvolvida na gravidez, que de acordo com a American Diabetes Association (ADA, 2015) é definida como "diabetes diagnosticada no segundo e terceiro trimestres da gravidez" com prevalência estimada em até 28% (JIWANI *et al.* 2012). Apesar da insulino-terapia ser o tratamento padrão para o diabetes gestacional, a Sociedade Brasileira de Diabetes (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009) e *Federação Internacional de Diabetes* (International Diabetes Federation. Global Guideline on Pregnancy and Diabetes. 2009) recomendam o uso da MET para o tratamento da diabetes gestacional, por apresentar eficácia terapêutica semelhante à insulina (LANGER *et al.*, 2000; ROWAN *et al.*, 2008; BARRET *et al.*, 2013), além disso, tem sido uma alternativa mais aceitável, pela facilidade na auto administração e por não resultar em hipoglicemia ou em ganho indesejado de peso (ROWAN *et al.*, 2008). Dessa forma, torna-se cada vez mais comum o uso da MET durante todo o período gestacional e lactacional, tanto por mulheres que desenvolvem diabetes gestacional, quanto em mulheres diagnosticadas com diabetes tipo 2 antes do período gestacional (GLUECK *et al.*, 2008, JOHNSON *et al.*, 2011; MORIN-PAPUNEN *et al.*, 2012).

O principal efeito farmacológico da MET é a redução da gliconeogênese hepática. No entanto, a MET também melhora o perfil glicêmico, por estimular a entrada de glicose no fígado e melhorar a sensibilidade a insulina nos tecidos periféricos (DUNN e PETERS, 1995), uma vez que, induz a translocação de transportadores GLUT 4 para a membrana celular (LEE, *et al.*, 2012). Melhora o perfil lipídico por reduzir as concentrações plasmáticas de triglicérides e ácidos graxos livres (DUNN e PETERS, 1995), além disso, também tem sido utilizada no controle do ganho de peso corporal (INZUCCHI *et al.*, 2012; ADA, 2011), devido ao seu efeito anoréxico (KIM *et al.*, 2016). Em hepatócitos e no músculo, a MET é transportada para dentro das células por transportadores de cátions orgânicos (OCT) e pode inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e/ou ativar o sensor de energia da proteína quinase ativada por

monofosfato de adenosina (AMPK) (RENA *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2001; VANDER HEIDEN, 2011). No entanto, diferentes estudos têm demonstrado que a MET pode atuar independentemente de AMPK (RATTAN *et al.*, 2011; KALENDER *et al.*, 2010), uma vez que, esse fármaco também surtiu efeito sobre a redução da glicemia em camundongos nocaute para AMPK (FORETZ *et al.*, 2010).

Apesar da MET atravessar a membrana placentária (KOVO *et al.*, 2008) e já ter sido detectada no cordão umbilical em concentrações iguais às do sangue materno (CHARLES *et al.*, 2006), podendo, portanto influenciar diretamente o metabolismo fetal (BARRET *et al.*, 2013), a MET é considerada segura inclusive no primeiro trimestre de gestação (GILBERT *et al.*, 2006) por não induzir teratogênese (GLUECK *et al.*, 2002; BOLTON *et al.*, 2009; GUTZIN *et al.*, 2003; BALANI *et al.*, 2009).

Embora, em humanos, o tratamento com MET não esteja associado com malformação fetal (GUTZIN *et al.*, 2003), a exposição intrauterina à MET eleva a concentração de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) em neonatos (CARLSEN e VANKY, 2010). Essa glicoproteína plasmática liga-se a andrógenos diminuindo a concentração biodisponível modulando assim seus efeitos biológicos (CARLSEN e VANKY, 2010). A atividade hormonal que se inicia no período perinatal promove no cérebro, em desenvolvimento, a capacidade de responsividade aos perfis hormonais adultos, e estes permeiam a fisiologia reprodutiva e do comportamento. Uma vez que, durante o período crítico de desenvolvimento, além da formação, crescimento e diferenciação do sistema reprodutivo, também ocorre a diferenciação sexual hipotalâmica (LENZ e MCCARTHY, 2010). Na prole masculina a diferenciação sexual hipotalâmica está compreendida entre o DG 17/18 (WEISZ e WARD, 1975) até o DPN 10 (JACOBSON e GORSKI, 1981) e tem início com um aumento na concentração plasmática de testosterona de origem testicular (BEACH, 1975). Para a diferenciação sexual hipotalâmica ocorrer satisfatoriamente, é necessário que a testosterona testicular seja convertida no cérebro pela enzima aromatase em estradiol, uma vez que, é o estradiol que atua nos processos de masculinização e defeminização do hipotálamo masculino (NAFTOLIN *et al.*, 1975). O processo de masculinização torna o macho capaz de apresentar comportamento sexual típico de machos quando adulto, que em roedores consiste em ereção, monta, intromissão e ejaculação (MACLUSKY e NAFTOLIN, 1981), enquanto que a defeminização consiste no processo pelo qual a prole masculina passa por alterações neuronais responsáveis por deixarem de apresentar

comportamento sexual típico de fêmeas na idade adulta, que em roedores consistem em comportamento de lordose (LENZ e McCARTHY, 2010). A masculinização fetal pode ser alterada por uma produção anormal de andrógeno ocasionada por diversos fatores, resultando em desordens de diferenciação sexual ou inversão do fenótipo sexual. Essas desordens podem ocasionar diminuição na contagem espermática e também desenvolvimento de câncer testicular na vida adulta (SKAKKEBAEK *et al.*, 2001). Corroborando desta forma, com a hipótese da origem desenvolvimentista da saúde e doença (DOHaD), em que doenças desenvolvidas durante a vida adulta podem estar relacionadas à dependência ao ambiente intrauterino adverso como a exposição materna à drogas (WADHWA *et al.*, 2009). Esta exposição pode mudar permanentemente a estrutura, função e o metabolismo de órgãos e tecidos aumentando o risco de desenvolvimento de doenças tardias (HO *et al.*, 2016).

Além disso, em roedores a exposição materna à MET induz alterações reprodutivas como a diminuição do tamanho testicular associado à redução nas populações de células de Leydig e Sertoli (TARTARIN *et al.*, 2012). Em ratos, esse fármaco diminuiu a concentração de estrógeno circulante pela redução da aromatase no pulmão (DEAN *et al.*, 2016). Em humanos a exposição à MET reduz a expressão e atividade da aromatase em cultura de células da musculatura lisa da artéria pulmonar (DEAN *et al.*, 2016), em células do estroma endometriótico (ZHOU *et al.* 2015) e em células da granulosa (RICE *et al.* 2009). A exposição à MET também induz diminuições: na produção de testosterona em células testiculares fetais de humanos e de ratos (TARTARIN *et al.*, 2012), na produção de esteróides, como estradiol e progesterona em cultura de células da granulosa de bovinos (TOSCA *et al.*, 2007) e de ratas (TOSCA *et al.*, 2006), e na produção de andrógenos, estradiol e progesterona em cultura de células tecais humanas (ATTIA *et al.*, 2001; TOSCA *et al.*, 2007). Além disso, inibe a expressão do hormônio folículo estimulante (FSH) e de receptores de FSH (FSHR) em células da granulosa (RICE *et al.*, 2013; MANSFIELD *et al.*, 2003).

Uma vez que, as evidências disponíveis ainda são inadequadas para estabelecer a segurança de fetos expostos à MET e à luz do amplo uso deste fármaco durante a gravidez e lactação, evidencia-se a necessidade de estudos adicionais que caracterizem as possíveis alterações reprodutivas na prole exposta à MET durante as fases iniciais do desenvolvimento.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Avaliar se a exposição materna à MET, durante a gestação e lactação, pode resultar em alterações sobre a função reprodutiva na prole masculina de ratos.

2.2. Objetivos específicos

Investigar se exposição à MET durante as fases iniciais do desenvolvimento pode alterar na prole masculina de ratos:

- Filhotes (dia pós natal - DPN 21): Peso corporal, peso dos testículos, concentração plasmática de testosterona e histomorfometria do testículo;
- Púberes (DPN 50): Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos (testículos e próstata), concentração plasmática de testosterona e histomorfometria do testículo;
- Adultos (DPN 110): Instalação da puberdade (descolamento de prepúcio), comportamento sexual (copulatório e motivação sexual), peso corporal, concentração plasmática de testosterona, peso dos órgãos reprodutivos (ducto deferente, testículos, epidídimos, próstata e vesículas seminais), parâmetros espermáticos (viabilidade, motilidade, concentração, morfologia e contagem) e histomorfometria do testículo.

3. Material e métodos

3.1. Delineamento experimental

O diagrama abaixo (Figura 1) resume o delineamento experimental empregado nesse trabalho.

Figura 1: Delineamento experimental da prole masculina

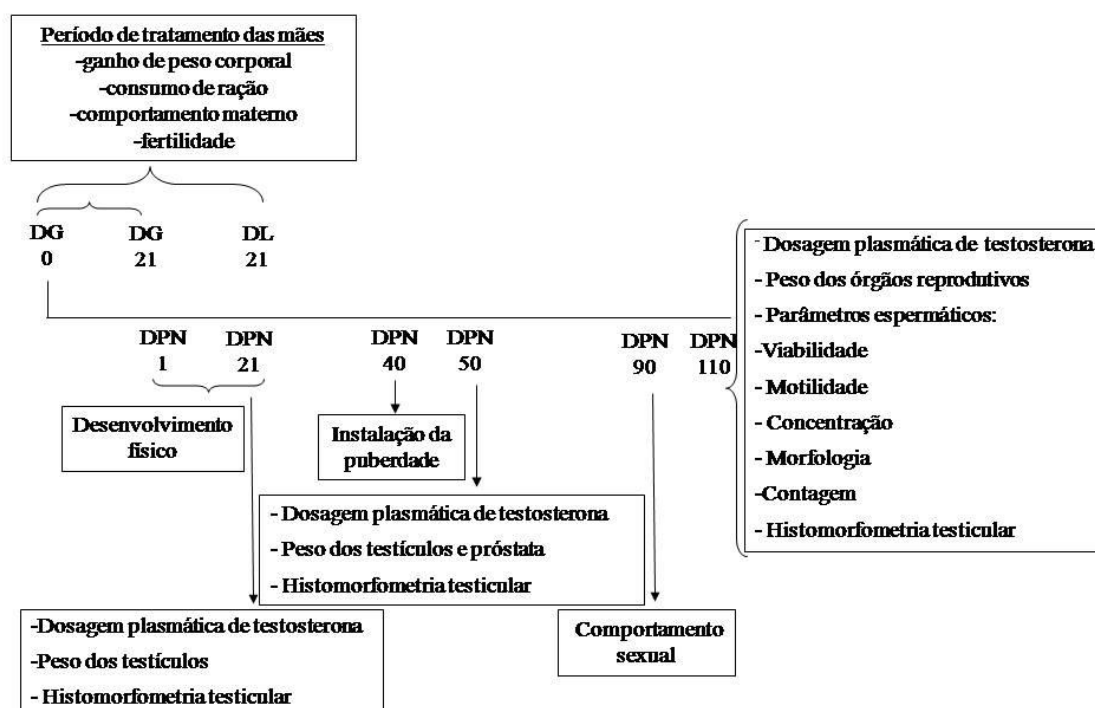


Figura 1. Delineamento experimental da prole masculina. DG: dia gestacional; DL: dia lactacional; DPN: dia pós-natal.

3.2. Animais e tratamento

Foram utilizados ratos Wistar com 75 dias de idade, machos e fêmeas, provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), transferidos para o Biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas do CCB, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração (Nuvilab®, Colombo, PR) à vontade.

Para o acasalamento, ao final da tarde, em cada gaiola foi colocado um macho para cada duas fêmeas. Na manhã do dia seguinte, o macho foi retirado da gaiola das fêmeas e foram coletadas células da mucosa vaginal através de hastes flexíveis de algodão embebido em salina e posterior foi feito um esfregaço. A prenhez foi considerada positiva quando observado, ao microscópio óptico, a presença de células características da fase estro e espermatozoides nas lâminas do esfregaço, esse dia foi considerado como dia gestacional (DG) 0. As fêmeas prenhes (n=10-11/grupo) foram alocadas em gaiolas individuais e distribuídas para compor os seguintes grupos experimentais e obtenção dos filhotes:

Grupo controle gestacional (CTRG): ratas tratadas com água, por gavagem, do DG 0 até o dia DG 21 (nascimento da prole).

Grupo metformina gestacional (METG): ratas tratadas com MET (293 mg/Kg/dia), por gavagem do DG 0 até dia DG 21.

Grupo controle gestacional lactacional (CTRGL): ratas tratadas com água, por gavagem do DG 0 até o dia lactacional (DL) 21 (dia do desmame da ninhada).

Grupo metformina gestacional lactacional: ratas tratadas com MET (293 mg/Kg/dia), por gavagem do DG 0 até o dia DL 21.

Os períodos de exposição à MET justificam-se pela necessidade de mimetizar o período de tratamento em mulheres com diabetes gestacional, ou seja, durante a gestação, podendo se estender no período lactacional.

Os comprimidos de MET (Glifage®-MERCK) foram triturados e dissolvidos em água e o tratamento foi realizado uma vez ao dia, como descrito anteriormente, obedecendo sempre à mesma rotina quanto aos horários de administração (10:00-11:00). Foi realizado o acompanhamento do peso corporal a cada três dias para ajuste do volume de administração, bem como para avaliação de toxicidade do fármaco.

A dose de MET recomendada para gestantes é de 500 mg/dia (diretrizes e EYAL *et al.*, 2010) o que equivale a 7,14 mg/kg/dia. Realizando ajuste dosimétrico utilizando a escala BW^{3/4} (EPA, 2006) e considerando o peso de um humano de 70 kg e o de um roedor com 250 g, obtemos o valor de 29,26 mg/kg/dia. No entanto, considerando que os animais são mais resistentes, a escolha da dose foi de 293 mg/kg/dia, uma vez que adotou-se o fator 10 (variação intraespécie) e considerou-se a proximidade com outro estudo na literatura (300 mg/kg/dia) (TARTARIN *et al.*, 2012).

O dia do nascimento dos filhotes foi denominado DPN 0. No DPN 1 os filhotes foram contados, pesados, e o sexo foi determinado. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas para 10 animais, para se evitar que filhotes pertencentes a ninhadas maiores recebessem menor quantidade de MET que filhotes de ninhadas menores. Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. O desmame dos filhotes ocorreu no DPN 21. Para a avaliação de cada parâmetro, foi utilizado somente um filhote macho de cada ninhada evitando assim o efeito ninhada (homogeneidade genética ou variabilidade materna). Portanto, a ninhada foi a unidade experimental. Os demais filhotes foram utilizados em outros estudos.

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA 6996.2015.02).

3.3. Avaliação de toxicidade materna

Os animais foram monitorados diariamente quanto ao bem-estar geral, e quanto a sinais gerais de toxicidade como lacrimação, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores. O ganho de peso corporal e o consumo de ração foram registrados nos DG 0, 7, 14 e 21e nos DL 1, 4, 7, 14 e 21.

Além disso, o ganho real de peso corporal durante a gestação foi estimado subtraindo o peso no DL 1 (primeiro dia após o parto) do peso do DG 0 (dia do diagnóstico de prenhez), Assim como o ganho de peso durante a lactação foi estimado subtraindo o peso no DL 21 (último dia lactacional) do peso do DL 1. Excluindo portanto a influência do tamanho da ninhada do ganho de peso das mães.

3.3.1. Avaliação do Comportamento Materno

Para verificar se o tratamento com MET poderia alterar o cuidado com a prole foi avaliado o comportamento materno, que foi conduzido do DPN 1 ao DPN 10, seguindo metodologia descrita em Champagne *et al.* (2003) e adaptado por Reis *et al.* (2014). Foram realizadas 4 sessões de observação diária, que ocorreram em horários regulares, sendo 3 períodos durante a fase de luz (10:00, 13:00 e 16:00) e um período durante a fase de escuro (19:00). As observações iniciou-se no tempo zero, e as observações posteriores foram realizadas a cada 3 minutos, resultando em 25 observações (72 min.) por período e totalizando 100 observações da mãe por dia, o que equivale a 100% das observações. Em uma tabela foram pontuados os seguintes comportamentos: mãe fora do ninho, construção do ninho, limpeza dos filhotes, amamentação e recuperação dos filhotes. Somaram-se as observações totais por dia e cada parâmetro foi revertido em porcentagem de observação.

3.3.2. Análise de fertilidade

Após o desmame dos filhotes no DL 21, as fêmeas foram decapitadas e colocadas em decúbito dorsal e, em seguida, foi feita uma incisão longitudinal na parede abdominal para visualização dos cornos uterinos. Após a retirada dos cornos uterinos, foram determinados os números de implantações uterinas (Figura 2A). Adicionalmente, os ovários foram isolados (Figura 2B) e os corpos lúteos separados e contados (Figura 2C) (n=10-11/grupo).



Figura 2. Ovários e útero de rata com pontos de implantação no dia lactacional 21 (A). Ovários (B) e corpos lúteos (C).

A partir da contagem das implantações e dos corpos lúteos foram determinados os seguintes parâmetros:

- Taxa de implantação = $[(n^\circ \text{ de implantações} / n^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100]$.
- Taxa de perda pré-implantação = $[(n^\circ \text{ de corpos lúteos} - n^\circ \text{ de implantações} / n^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100]$.
- Taxa de perda pós-implantação = $[(n^\circ \text{ de corpos lúteos} - n^\circ \text{ de fetos vivos}) / n^\circ \text{ de implantações}) \times 100]$.
- Taxa de Viabilidade Fetal = $[(n^\circ \text{ de filhotes vivos} / n^\circ \text{ de pontos de implantação}) \times 100]$.

3.4. Avaliação da toxicidade reprodutiva na prole masculina

3.4.1. Ganho de peso corporal

Foi realizado o acompanhamento do peso corporal da prole masculina nos DPN 1, 4, 7, 14 e 21 e semanalmente até o dia da eutanásia, durante o tratamento das mães foram observados também na prole os sinais gerais de toxicidade descritos anteriormente (item 3.3).

3.4.2. Distância anogenital

Nos DPN 1 e 21 foi determinado a distância anogenital (DAG, distância do anus ao tubérculo genital) média da ninhada dos descendentes. A DAG foi normalizada através da sua divisão pela raiz cúbica do peso corporal (GALLAVAN *et al.*, 1999).

Além disso, no DPN 21, um animal de cada ninhada (n=10/grupo) foi submetido à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado para determinação da concentração plasmática de testosterona conforme metodologia descrita no item 3.6. “Concentração plasmática de testosterona”. Após a coleta de sangue os animais foram colocados em decúbito dorsal e, em seguida, submetidos a laparotomia para visualização dos testículos, que foram removidos, dissecados e pesados empregando-se balança analítica. O testículo direito foi armazenado em Bouin e submetido à análise histológica conforme metodologia descrita no item 3.9. “Parâmetros histomorfométricos do testículo”.

3.4.3. *Determinação de instalação da puberdade*

A partir do DPN 40, os animais foram examinados diariamente até se verificar a completa separação prepucial, considerado com um indicador do início da maturidade sexual, ocasião em que os animais foram novamente pesados e tiveram a DAG medida (n=09-11/grupo).

No DPN 50, um animal de cada ninhada (n=08-11/grupo) foi submetido à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado para determinação da concentração plasmática de testosterona conforme metodologia descrita no item 3.6. “Concentração plasmática de testosterona”. Após a coleta de sangue os animais foram colocados em decúbito dorsal e, em seguida, submetidos a laparotomia para visualização dos órgãos reprodutores (testículos e próstata), que foram removidos, dissecados e pesados empregando-se balança analítica. Após, o testículo direito foi armazenado em Bouin e foi submetido à análise histológica conforme metodologia descrita no item 3.9. “Parâmetros histomorfométricos do testículo”.

3.5. Avaliação do comportamento sexual

3.5.1. Avaliação do comportamento copulatório

Quinze dias antes das análises comportamentais (DPN 75), os animais (n=09-11/grupo) foram transferidos para o biotério com ciclo de luz claro/escuro de 12x12 horas invertido, que possui controle de luminosidade, ruído e temperatura, para a perfeita adaptação das funções fisiológicas. Os testes comportamentais foram filmados e analisados por um experimentador localizado fora do biotério de ciclo de luz invertida. Os testes foram realizados sempre 4h após o início da fase escura e foram capturados por câmera conectada a um monitor em sala adjacente. A partir do DPN 90, cada macho foi inicialmente colocado na gaiola de observação (caixa transparente) e após 10 min. de aclimatação na gaiola, uma fêmea em estro natural foi introduzida na mesma caixa. Durante 30 min., as latências e frequências para intromissão e ejaculação foram observadas como descrito em Gerardin *et al.* (2006). Caso o macho não apresentasse comportamento dentro de 10 min., a avaliação era interrompida e repetida no dia seguinte. Machos que falharam na segunda avaliação foram considerados sexualmente inativos.

3.5.2. Teste de Motivação sexual

Após análise do comportamento copulatório, os machos foram submetidos ao teste de motivação sexual. Neste teste, foi utilizada uma arena retangular de 50 x 50 x 100 cm (altura x largura x comprimento) apresentando duas aberturas que se comunicavam com duas arenas menores, ambas com 25 cm². As arenas pequenas são diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal é fechada com uma tela de arame (Figura 3). Para o teste, foi colocada uma fêmea em estro natural (zona de incentivo da fêmea) em uma das arenas pequenas, e na outra, um macho sexualmente ativo (zona de incentivo do macho). O piso da arena principal possuía duas áreas delimitadas com 25 cm² (zonas) na frente de cada abertura das arenas menores. Estas áreas foram chamadas de zona de incentivo da fêmea e zona de incentivo do macho. O macho experimental foi posicionado no centro da arena principal e observado durante 20 min. O número de visitas e o tempo total gasto visitando cada zona de incentivo foram registrados, e calculado o escore de preferência ($[\text{tempo de permanência na zona de fêmea} / \text{tempo total gasto em ambas as zonas de incentivo}] \times 100$) (AGMO, 2003).

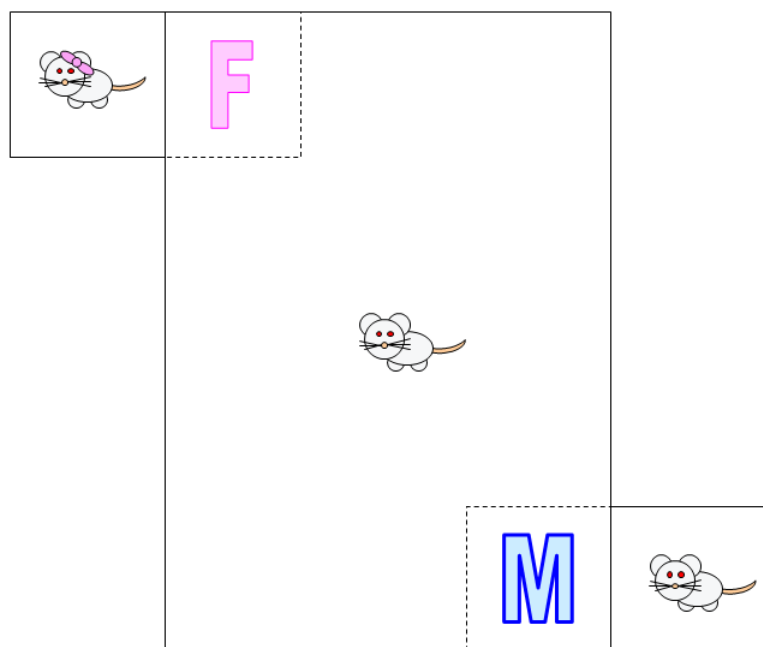


Figura 3. Representação esquemática da vista superior da arena do teste de motivação sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea e do macho, respectivamente.

3.6. Concentração plasmática de testosterona

Imediatamente após a decapitação, amostras de sangue dos animais no DPN 21, DPN 50 e DPN 110 foram coletadas em tubos de ensaio heparinizados, sempre no mesmo horário. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 4°C) e o plasma congelado a -20°C para posterior análise. A concentração plasmática de testosterona foi obtida por imunoensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT[®] 2nd Generation Testosterone), o qual o coeficiente de variação intra-ensaio e sensibilidade foram 4,6% e 0,15nmol/L respectivamente.

3.7. Retirada dos órgãos reprodutivos

Para reposição dos estoques espermáticos, a retirada dos órgãos reprodutivos aconteceu no DPN 110, 20 dias após o teste de comportamento sexual; Para isso, um animal de cada ninhada (n=09-11/grupo) foi pesado e submetido à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado para determinação da concentração plasmática de testosterona conforme metodologia descrita no item 3.6. “Concentração plasmática de testosterona”. Após a coleta de sangue os animais foram colocados em decúbito dorsal e, em seguida, submetidos a laparotomia para visualização dos órgão reprodutores. O ducto deferente direito foi imediatamente removido e utilizado para análise da viabilidade (3.8.1), motilidade (3.8.2) e concentração espermática (3.8.3). O ducto deferente esquerdo foi retirado para posterior análise da morfologia dos espermatozoides (3.8.4). Além disso, os órgãos da reprodução (testículos, epidídimos, vesículas seminais e próstata ventral) foram removidos e dissecados. Após secagem em papel de filtro, foram determinados os respectivos pesos úmidos, empregando-se balança analítica. O testículo e o epidídimo esquerdo foram congelados para posterior contagem espermática (3.8.5) o testículo direito foi preparado para análise dos parâmetros histomorfométricos do testículo (3.9).

3.8. Parâmetros espermáticos

3.8.1. Viabilidade espermática

Para análise da viabilidade espermática foi realizada a técnica de coloração com eosina-nigrosina (BJORND AHL, SODERLUND e KVIST, 2003), em que 50 µl de meio GV HEPES (Ingamed, Brasil) com espermatozoides foram misturados com

eosina-nigrosina e diretamente examinados, foram avaliados 100 espermatozoides por animal e classificados em viáveis e não viáveis.

3.8.2. Motilidade espermática

A análise da motilidade espermática foi realizada de acordo com Perobelli *et al.* (2010) e Favareto *et al.* (2011). Os espermatozoides foram obtidos do ducto deferente direito e diluídos em 1ml de meio GV HEPES (Ingamed, Brasil) pré-aquecido a 34°C. Uma alíquota de 10µl foi colocada em câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) e analisados em fase de contraste do microscópio óptico (100X) (OSM-223287, Olympus). Foram avaliados 100 espermatozoides por animal e classificados em móveis e imóveis (PEROBELLI *et al.*, 2010).

3.8.3. Concentração espermática

Após a análise do padrão de motilidade, verificou-se a concentração espermática estimada em milhões por mililitro. Utilizou-se uma câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) com microscopia de fase, com um aumento de 100X, com o auxílio de contador de células. A câmara de Makler possui uma profundidade de 0,01 mm e uma marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1 mm²) cada um com 0,1 mm x 0,1 mm. O volume compreendido na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula é de 0,001 mm³. Foram contados os espermatozóides presentes em 10 quadrados (marcação da própria câmara) escolhidos aleatoriamente, em quatro campos diferentes, e realizada a média (PIFFER *et al.*, 2009).

3.8.4. Morfologia espermática

A avaliação da morfologia dos espermatozoides foi realizada de acordo com Fernandes *et al.* (2007). O ducto deferente esquerdo dos animais (n=09-11/grupo) foi seccionado nas extremidades anterior e posterior e lavado internamente com o auxílio de agulha e seringa contendo 1,0 ml de formol-salina (10%). O conteúdo foi colhido em um tubo e mantido sob refrigeração para posterior análise. Para análise, o conteúdo foi depositado em lâmina histológica, coberto com lamínula e após 90 min. de secagem foram analisados 200 espermatozoides por animal em fase de contraste do microscópio (400x). Anormalidades morfológicas foram classificadas em duas categorias gerais:

anormalidades de cabeça (sem curvatura característica ou forma isolada, ou seja, sem cauda anexada) e anormalidades de cauda (quebrada ou isolada, isto é, sem cabeça anexada).

3.8.5. Contagem espermática

O testículo esquerdo decapsulado e o epidídimo esquerdo (n=09-11/grupo), dos diferentes grupos experimentais, foram removidos e estocados a -20° C para posterior determinação da concentração de células germinativas.

Número de espermátides maduras no testículo e cálculo da produção diária de espermatozoides: Para a realização da contagem das espermátides no testículo, procedeu-se o descongelamento dos testículos dos ratos dos diferentes grupos experimentais seguido de homogeneização do material, segundo método descrito por Robb *et al.* (1978) e adaptado por Fernandes *et al.* (2007). Após o descongelamento do testículo decapsulado, o parênquima testicular pesado foi colocado em um tubo de ensaio com tampa, onde foram adicionados 5ml de solução contendo NaCl (0,9%), Triton-X (0,05%) e Thimerosal (0,01%). Em seguida, este tubo foi tampado e pesado novamente para cálculo da primeira diluição. A amostra foi homogeneizada com a utilização de um homogeneizador em velocidade máxima por 2 minutos. Após nova diluição na proporção 1:10 na solução de Triton-X (100 μ l do homogeneizado + 900 μ l de solução), uma alíquota foi transferida por meio de uma pipeta Pasteur para a câmara de Neubauer (Figura 4), onde as espermátides resistentes à homogeneização foram contadas (2 câmaras por animal, 5 campos por câmara). Para calcular a produção espermática diária, o número de espermátides no testículo foi dividido por 6,1, que é o n° de dias em que essas espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio seminífero. Para facilitar a visualização, os dados obtidos (número de espermátides) são apresentados em 10^6 (em milhões) por testículo e em número de espermátides X 10^6 por grama (g) de testículo.

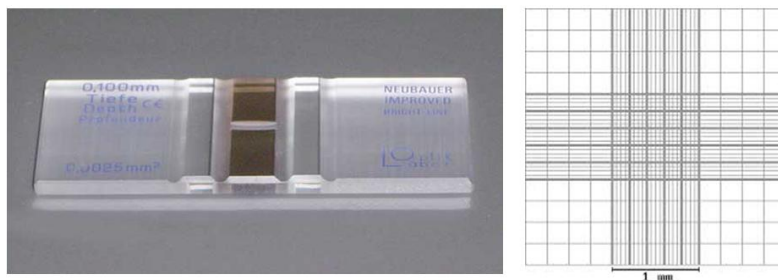


Figura 4. Câmara de Neubauer utilizada para contagem espermática. À esquerda, foto do modelo utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior, através do microscópio de uma das câmaras do aparelho.

Número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo: Os epidídimos esquerdos foram inicialmente divididos nas unidades: cabeça/corpo e cauda. As porções epididimárias foram separadas logo após a coleta e congeladas a -20° C até a homogeneização e contagem dos espermatozoides de acordo com o mesmo procedimento descrito para o item anterior com a diferença que, antes da homogeneização, as peças foram cortadas em pequenos pedaços com tesoura bem afiada. Este material foi diluído em 1ml da mistura contendo Triton- X para cada 100mg de cauda e 1ml dessa mistura para cada 200mg de cabeça/corpo. O tecido epididimário foi então homogeneizado, diluído 20 vezes e contado em câmaras de Neubauer. O tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo foi calculado dividindo-se o número de espermatozoides na cabeça/corpo ou cauda do epidídimo, pelo valor obtido na produção diária de espermatozoides de cada animal (ROBB *et al.*, 1978). Para facilitar a visualização, o número de espermatozoides no epidídimo é apresentado em $\times 10^6$ espermatozoides por órgão e em $\times 10^6$ espermatozoides por grama de órgão.

3.9. Parâmetros histomorfométricos do testículo

O testículo direito foi dissecado, pesado e fixado em solução de Bouin por 24 horas e depois foi estocado em etanol 70%. Posteriormente foi cortado em fragmentos de tecido, desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. Foram feitos cortes com $7\mu\text{m}$ de espessura, corados com hematoxilina e eosina.

A composição dos dados volumétricos do parênquima testicular foi obtida usando contagem de pontos utilizado uma grade de 100 pontos na ocular em aumento final de 100x. Um total de 10 campos escolhidos aleatoriamente (1000 pontos) foram pontuados para cada animal. O volume de cada componente do parênquima testicular,

expresso em μl , foi estimado a partir do conhecimento do porcentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. Para obter uma medição mais precisa do volume do parênquima testicular, subtraiu-se do peso bruto do testículo pelo peso da túnica albugínea (~6,5%). O peso do testículo foi considerado igual ao seu volume, uma vez que, a densidade do testículo é quase 1,0 (~1,03–,04) (FRANÇA e GODINHO, 2003).

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido pela mensuração ao acaso de 15 secções transversais de túbulo seminífero por animal escolhidos de forma aleatória com perfis redondos ou arredondados. As medições foram realizadas a partir de imagens obtidas com uma câmera (Moticam 5, Motic) acoplada ao microscópio óptico, utilizando o software Images Plus 2.0 (Motic), com aumento final de 100x. O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS), expresso em metros (10^6) por testículo foi calculada a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos e da medição do diâmetro tubular obtido para cada animal, de acordo com a seguinte fórmula: $CTTS = VTS / \pi R^2$, em que VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI, 1974).

3.10. Análise estatística

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov/ Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) para cada variável. Para os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram conduzidas análises paramétricas e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram transformadas a fim de atingir os critérios para a análise paramétrica, os dados que ainda não apresentaram normalidade e homogeneidade foram submetidos aos testes não-paramétricos, apresentados como mediana (1º e 3º quartil). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

-ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA): ingestão de ração materna, comportamento materno e ganho de peso corporal dos filhotes.

-*Test-t* de Student: ganho de peso corporal das fêmeas, teste de fertilidade das fêmeas, número de filhotes por ninhada, peso corporal ao nascer dos filhotes, DAG, dia do descolamento do prepúcio, comportamento sexual copulatório, teste de motivação sexual, peso corporal final no DPN 21 e DPN 110, concentração plasmática de testosterona no DPN 50 e DPN 110, peso de órgãos reprodutivos, viabilidade, concentração, morfologia e contagem espermática e parâmetros histomorfométricos do testículo.

-*Mann-Whitney*: concentração plasmática de testosterona no DPN 21, peso corporal final no DPN 50, e motilidade espermática.

-Teste de Fisher: comportamento sexual copulatório.

O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo software SPSS (IBM, SPSS statistics 19) e software Prism 6 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA).

4. Resultados

4.1. Toxicidade geral materna

4.1.1. Ganho de peso corporal

A variação do ganho de peso corporal materno durante a gestação (DL1-DG0) e durante a lactação (DL21-DL1) e ingestão alimentar materna estão presentes nas figuras 5 e 6 respectivamente. Como indicado por test-*t* de Student durante a gestação houve diminuição no ganho de peso corporal das mães de ambos os grupos tratados com MET (CTRG: $33,21 \pm 2,84$, $n = 10$, METG: $23,93 \pm 3,00^*$, $n = 11$) [$t(19)=2,23$; $p=0,038$] e (CTRGL: $34,04 \pm 3,50$, $n = 10$, METGL: $23,86 \pm 3,20^*$, $n = 10$) [$t(18)=2,15$; $p=0,046$] com relação ao seu grupo controle. No entanto, durante o período lactacional não foi observada diferença estatística no ganho de peso das ratas.

Ganho de peso corporal das mães tratadas com MET e controle durante a gestação (A) e lactação (B).

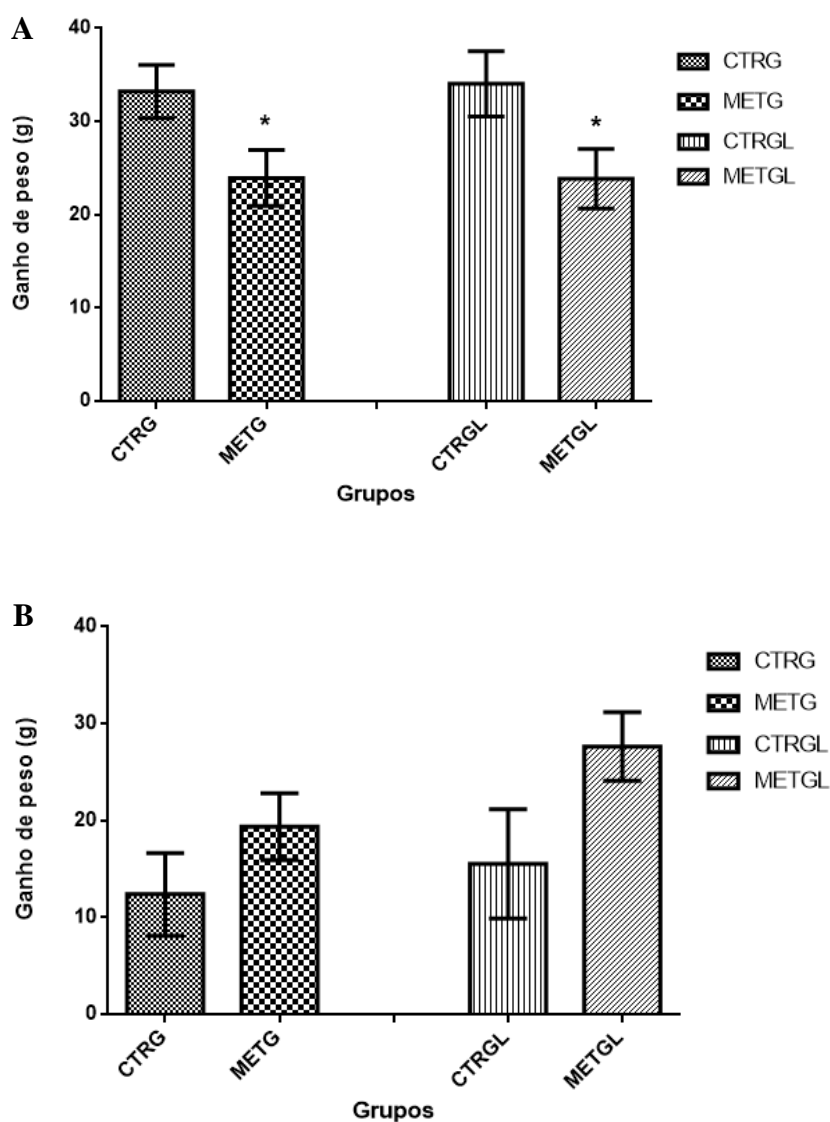


Figura 5. Ganho de peso corporal materno na gestação (A) (DL1-DG0) e lactação (B) (DL21-DL1). Dados apresentados como média \pm EPM $n=10-11$ /grupo $*p<0,05$ (test-*t* de Student). Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRGL e CTRG). CTRG: grupo controle gestacional tratado com água do dia gestacional (DG) 0 ao DG21; METG: grupo MET gestacional tratado com MET 293 mg/kg/dia DG0 ao DG21; CTRGL: grupo controle gestacional lactacional tratado com água do DG0 ao dia lactacional (DL) 21; METGL: grupo MET gestacional lactacional tratado com 293 mg/kg/dia do DG0 ao DL21.

Como indicada por RMANOVA não houve diferença estatística com relação a ingestão alimentar durante os períodos gestacional e lactacional das mães tratadas com MET com relação a seu grupo controle. Além disso, durante o período de exposição à MET não foram observados os sinais gerais de toxicidade como lacrimação, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores nas ratas.

Consumo de ração durante os períodos gestacional e lactacional das mães tratadas durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B).

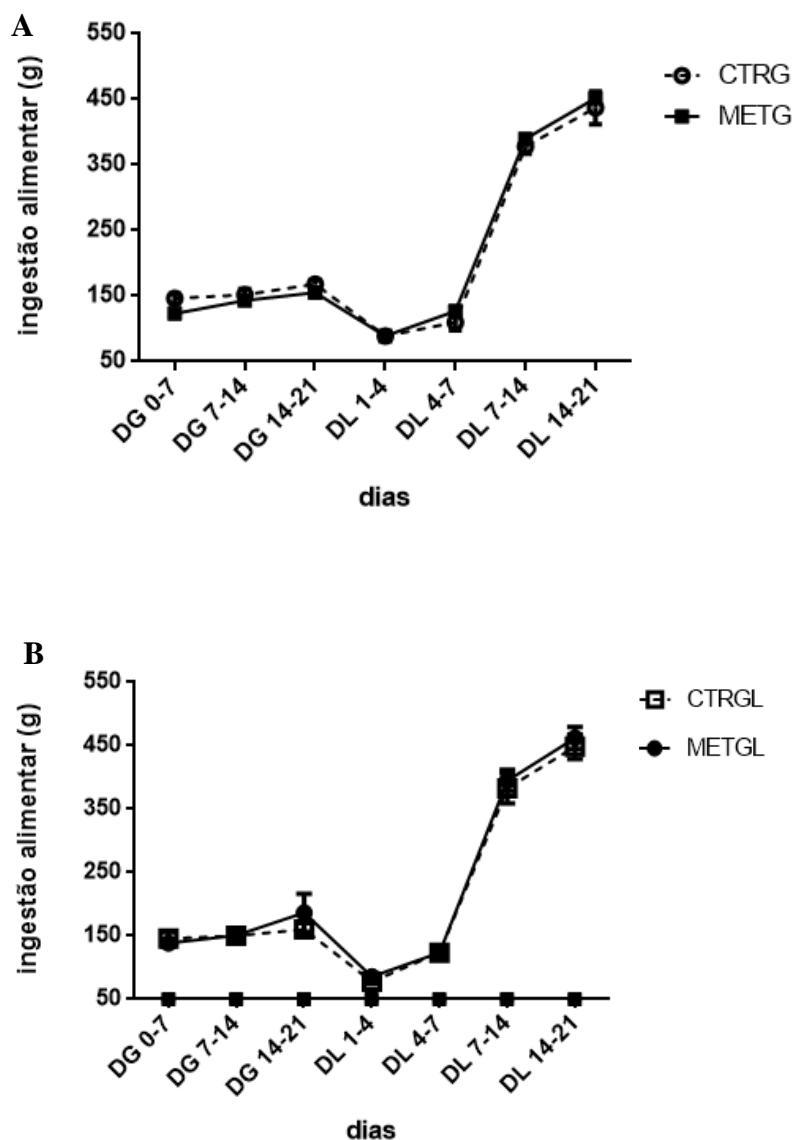


Figura 6. Consumo de ração durante o período gestacional e lactacional das mães tratadas durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B). Dados apresentados como média \pm EPM n=10-11/grupo (RMANOVA, $p>0,05$). Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRGL). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional; DG: dia gestacional; DL: dia lactacional.

4.1.2. Avaliação do Comportamento Materno

Os parâmetros do comportamento materno foram analisados por RMANOVA tendo dia de lactação, horário e grupo experimental como variáveis entre sujeitos. Como esperado os diversos parâmetros do comportamento materno que foram analisados (amamentação, tempo fora do ninho, tempo gasto na limpeza dos filhotes, construção do ninho e recuperação dos filhotes) sofreram mudanças de acordo com o dia da lactação, (DL1-10) bem como, com o horário de observação (10:00, 13:00, 16:00 e 19:00). No entanto, o tratamento com MET não induziu alteração significativa nestes parâmetros com relação ao seu respectivo grupo controle.

Como não houve diferença significativa entre os grupos tratados com MET e seu grupo controle, e com o objetivo de facilitar a visualização desse dado, as observações foram somadas entre os 4 horários (10:00, 13:00, 16:00 e 19:00) e dias de avaliação (DL1-10) e estão apresentados na figura 7.

Comportamento materno do DL 1 ao DL 10 das mães tratadas durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B).

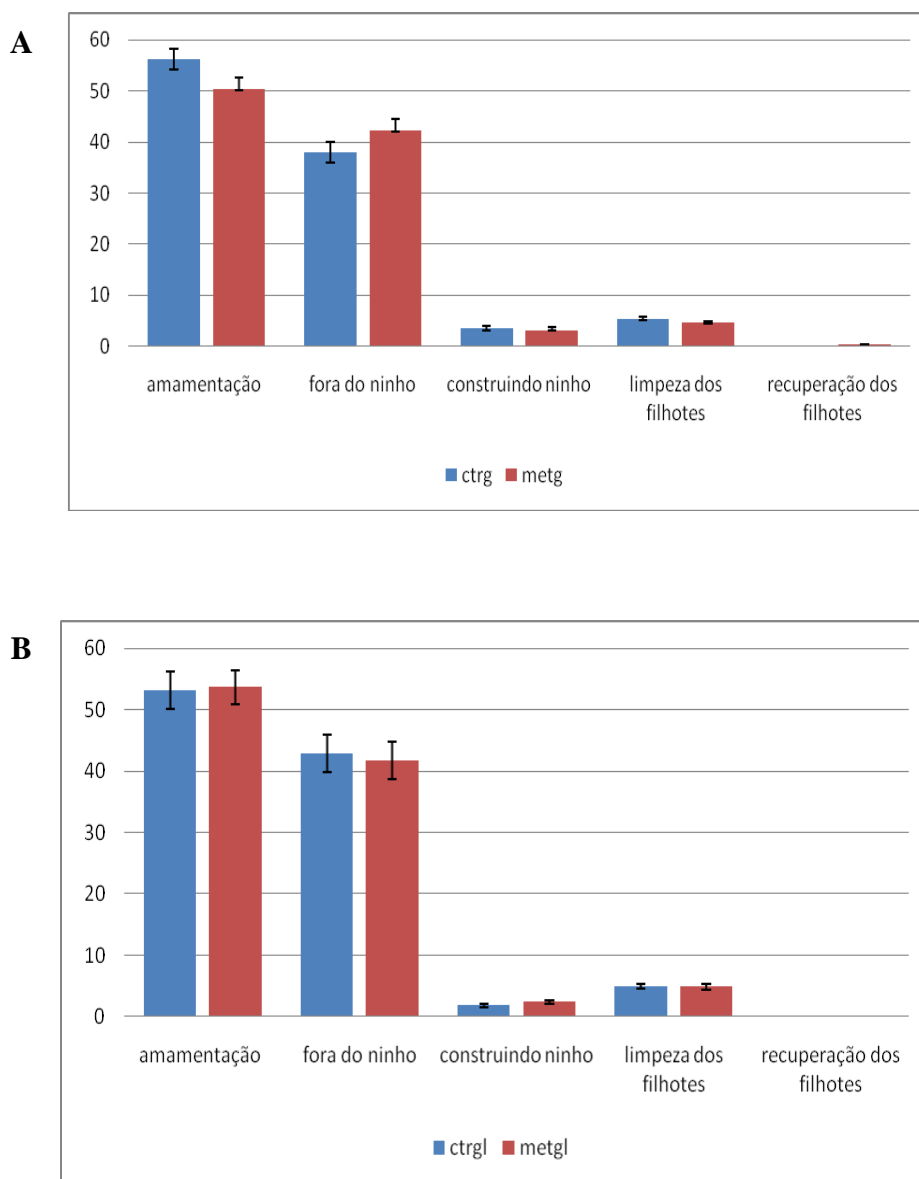


Figura 7. Porcentagem de observações pontuadas durante o comportamento materno do DL 1 ao 10 (n=10-11/grupo) das mães tratadas durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B). Valores estão expressos em porcentagem, $p > 0,05$, RMANOVA. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRGL e CTRG). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.1.3. Análise de fertilidade

Como indicado pelo teste-*t* de Student, houve redução significativa no número de filhotes por ninhada tanto das ratas tratadas durante a gestação (CTRG: $12,50 \pm 0,34$, $n = 10$, METG: $10,91 \pm 0,46^*$, $n = 11$) [$t(19) = 2,75$; $p = 0,013$], quanto nas ratas tratadas durante a gestação e lactação (CTRGL: $12,70 \pm 0,62$, $n = 10$, METGL: $10,90 \pm 0,57^*$, $n = 10$) [$t(18) = 2,15$; $p = 0,045$].

No entanto, o teste-*t* de Student não indicou alterações significativas nos parâmetros da análise de fertilidade como as taxas de: implantação, perda pré-implantação, perda pós-implantação e viabilidade fetal entre os grupos experimentais (tabela 1).

Tabela 1. Teste de fertilidade das ratas dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [10]	METG [11]	CTRGL [10]	METGL [10]
Taxa de implantação	$95,44 \pm 2,31$	$93,23 \pm 1,47$	$94,90 \pm 2,43$	$92,10 \pm 2,48$
Taxa de perda pré-implantação	$4,56 \pm 2,31$	$6,77 \pm 1,47$	$5,10 \pm 2,43$	$7,90 \pm 2,48$
Taxa de perda pós-implantação	$4,51 \pm 2,22$	$10,73 \pm 2,80$	$9,16 \pm 4,11$	$9,88 \pm 1,94$
Taxa de viabilidade fetal	$95,49 \pm 2,22$	$89,27 \pm 2,80$	$90,84 \pm 4,11$	$90,12 \pm 1,94$

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média \pm EPM, $p > 0,05$ $n=10-11$ /grupo, teste-*t* de Student. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2. Parâmetros analisados na prole masculina

4.2.1. Peso corporal ao nascer

Como indicado pelo teste-*t* de Student, não houve efeito da exposição à MET no peso corporal médio da ninhada (g) ao nascer do grupo exposto durante a gestação (CTRG: $6,11 \pm 0,14$, $n = 10$, METG: $6,38 \pm 0,16$, $n = 11$) [$t(19) = 1,26$; $p = 0,23$] ou no grupo exposto durante a gestação e lactação (CTRGL: $6,15 \pm 0,17$, $n = 10$, METGL: $6,44 \pm 0,20$, $n = 10$) [$t(18) = 1,12$; $p = 0,28$] com relação ao seu grupo controle. Além disso, durante o período de exposição à MET não foram observados nos filhotes os sinais gerais de toxicidade como lacrimação, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores.

4.2.2. Ganho de peso corporal

Como indicado pela RMANOVA o tratamento das mães com MET não influenciou o ganho de peso dos filhotes machos durante o período lactacional (DPN 1 ao DPN 21).

Ganho de peso corporal da prole masculina do nascimento até o desmame.
Animais expostos durante a gestação (A) e durante a gestação e lactação (B).

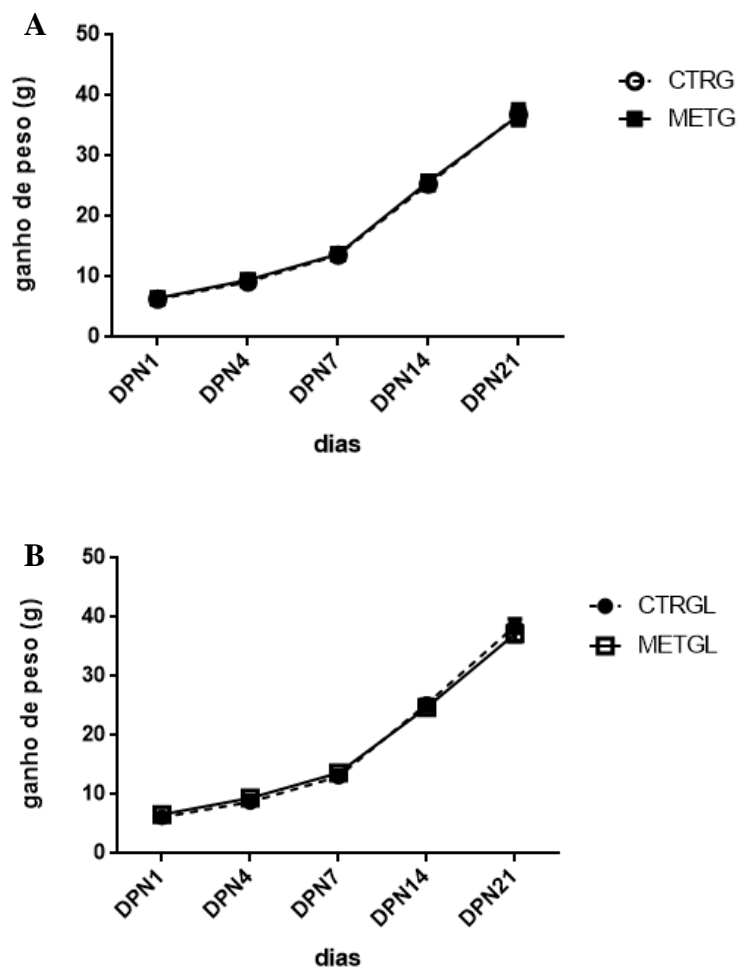


Figura 8. Ganho de peso corporal médio da prole masculina durante o período lactacional (do DPN 1 até DPN 21). Animais expostos à MET durante gestação (A) e durante a gestação e lactação (B). Valores expressos em média \pm EPM, $p > 0,05$ $n = 10-11$ /grupo (RMANOVA). Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRGL e CTRGL). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional; DPN: dia pós natal.

4.2.3. Distância anogenital

O test-*t* de Student mostrou que o tratamento das mães com MET não induziu alteração na DAG ($\text{mm/g}^{1/3}$) média da ninhada masculina exposta durante a gestação no

DPN 1 (G) (CTRG: $1,60 \pm 0,31$, $n = 10$; METG: $1,65 \pm 0,26$, $n = 11$) [$t(19)=1,27$; $p=0,22$] e expostos durante gestação e lactação (GL) (CTRGL: $1,69 \pm 0,38$, $n = 10$; METGL: $1,67 \pm 0,38$, $n = 10$) [$t(18)=0,42$; $p=0,68$]. Assim como, também não afetou a DAG no DPN 21 (G) (CTRG: $3,03 \pm 0,77$, $n = 10$; METG: $3,12 \pm 0,78$, $n = 11$) [$t(19)=0,79$; $p=0,44$] e (GL) (CTRGL: $3,05 \pm 0,76$, $n = 10$; METGL: $2,95 \pm 0,10$, $n = 10$) [$t(18)=0,76$; $p=0,45$].

4.2.4. *Peso corporal, peso testicular e concentração plasmática de testosterona no DPN 21*

Como indicado pelo test-*t* de Student, a exposição à MET durante o desenvolvimento não induziu alterações no peso corporal, assim como não promoveu alterações no peso úmido dos testículos dos animais no DPN 21 (tabela 2) em relação ao seu respectivo grupo controle. Também não foi encontrada diferença estatística na concentração plasmática de testosterona dos animais expostos à MET durante a gestação (*Mann-Whitney*), ou durante a gestação e lactação (test-*t* de Student).

Tabela 2. Peso corporal, peso testicular e concentração plasmática de testosterona de ratos no DPN 21 dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG[10]	METG [10]	CTRGL [10]	METGL [10]
Peso corporal (g)	$36,27 \pm 1,47$	$39,00 \pm 1,29$	$36,68 \pm 1,49$	$35,39 \pm 1,24$
Testículos (g)	$0,15 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
Concentração plasmática de testosterona (ng/dl)	$13,42 (7,05-73,83)$ [8]	$26,55 (15,50-56,59)$ [9]	$35,21 \pm 10,09$ [8]	$17,06 \pm 4,16$ [8]

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média \pm EPM (test-*t* de Student), e mediana (1º e 3º quartil) na concentração plasmática de testosterona (*Mann-Whitney*) $p > 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2.5. *Parâmetros histomorfométricos do testículo no DPN 21*

Os volumes dos componentes do parênquima testicular da prole masculina no DPN 21 estão apresentados na tabela 3. O teste-*t* de Student indicou um aumento significativo no comprimento total dos túbulos seminíferos dos animais do grupo METGL [$t(11)=2,62$; $p=0,024$] em relação ao seu grupo controle. Não foi observada diferença estatística nos demais parâmetros histomorfométricos como os volumes:

testicular, do tecido intersticial, dos túbulos seminíferos ou no diâmetro dos túbulos seminíferos entre os animais dos diferentes grupos experimentais no DPN 21 ($p > 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros histomorfométricos do parênquima testicular de ratos no DPN 21 dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [7]	METG [7]	CTRGL [6]	METGL [7]
Volume testicular (μl)	71,29 \pm 3,91	78,54 \pm 3,78	66,13 \pm 7,02	75,19 \pm 4,65
Volume do tecido intersticial (μl)	30,24 \pm 2,60	32,96 \pm 2,61	29,03 \pm 4,42	27,84 \pm 2,77
Volume dos túbulos seminíferos (μl)	41,04 \pm 1,76	45,58 \pm 1,96	37,11 \pm 3,64	47,36 \pm 3,54
Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm)	85,62 \pm 2,78	90,00 \pm 3,14	91,09 \pm 1,65	86,27 \pm 3,05
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	7,25 \pm 0,54	7,33 \pm 0,64	5,72 \pm 0,55	8,19 \pm 0,73*

Valores expressos em média \pm EPM (test-*t* de Student), * $p < 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2.6. Determinação de instalação da puberdade

O tratamento das mães com MET não induziu alteração no dia do descolamento do prepúcio, assim como, também não foram observadas diferenças significativas no peso corporal ou na DAG relativa no dia em que ocorreu o total descolamento do prepúcio dos animais dos grupos expostos à MET com relação ao seu respectivo grupo controle (tabela 4).

Tabela 4. Descolamento prepucial de ratos dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [9]	METG [11]	CTRGL [10]	METGL [10]
Peso corporal(g) no dia em que ocorreu a separação prepucial	185,17 \pm 4,14	185,32 \pm 4,60	192,66 \pm 7,45	197,45 \pm 6,77
DPN em que ocorreu a separação prepucial	47,33 \pm 0,99	45,00 \pm 0,79	47,09 \pm 1,22	47,30 \pm 1,00
DAG relativa no dia em que ocorreu a separação prepucial	4,18 \pm 0,11	4,17 \pm 0,11	4,18 \pm 0,11	4,09 \pm 0,11

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média \pm EPM (test-*t* de Student), $p > 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional. DPN: dia pós-natal; DAG: distância anogenital.

4.2.7. Peso corporal, peso testicular e da próstata e concentração plasmática de testosterona no DPN 50

Os dados do peso corporal, do peso úmido dos testículos e da próstata e a concentração plasmática de testosterona dos animais que foram submetidos à eutanásia no DPN 50 estão representados na tabela 5. A exposição à MET não induziu alterações significativas nesses parâmetros.

Tabela 5. Peso corporal, peso úmido dos testículos e próstata e concentração plasmática de testosterona de ratos no DPN 50 dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG[9]	METG [11]	CTRGL [10]	METGL [10]
Peso corporal (g)	207,98 ± 6,80	220,91 ± 8,39	213,7 (153,3-234,4)	205,2 (197,4-216,5)
Testículos (g)	2,06± 0,09	2,16 ± 0,09	1,87 ± 0,17	2,12 ± 0,05
Próstata (g)	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ±0,01	0,11 ± 0,01
Concentração plasmática de testosterona (ng/dl)	323,06 ± 81,91 [8]	187,37 ± 41,08 [8]	130,93 ± 34,16 [7]	219,11 ± 39,69 [7]

Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student), e mediana (1° - 3° quartil) no peso corporal final (*Mann-Whitney*) $p > 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2.8. Parâmetros histomorfométricos do testículo no DPN 50

Os volumes dos componentes do parênquima testicular da prole masculina dos animais no DPN 50 estão apresentados na tabela 6. O teste-*t* de Student não indicou diferença estatística nos parâmetros histomorfométricos do parênquima testicular como os volumes: testicular, do tecido intersticial e dos túbulos seminíferos, assim como no diâmetro dos túbulos seminíferos e comprimento total dos túbulos seminíferos desses animais ($p > 0,05$).

Tabela 6. Parâmetros histomorfométricos do parênquima testicular da prole masculina no DPN 50 dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [7]	METG [7]	CTRGL [7]	METGL [8]
Volume testicular (ml)	1,01 ± 0,04	1,00 ± 0,06	0,84 ± 0,11	0,98 ± 0,02
Volume do tecido intersticial (ml)	0,36 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,32 ± 0,02
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	0,64 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,57 ± 0,08	0,63 ± 0,04
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	220,58 ± 6,72	235,19 ± 7,45	216,55 ± 9,69	221,95 ± 7,17
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	17,06 ± 1,03	16,60 ± 1,19	14,95 ± 1,92	16,36 ± 1,24

Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student), $p > 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional

4.2.9. Comportamento sexual

4.2.9.1. Comportamento copulatório

Os resultados da avaliação do comportamento copulatório estão representados na tabela 7. Como indicado pelo test-*t* de Student nos ratos do grupo METG houve redução significativa na latência em segundos para a primeira intromissão [$t(18)=2,10$; $p=0,05$] e aumento no número de intromissões até a primeira ejaculação [$t(18)=2,21$; $p=0,04$]. No entanto, nos ratos do grupo METGL o test-*t* de Student revelou aumento significativo na latência para a primeira ejaculação [$t(17)=2,15$; $p=0,046$] e na latência para a primeira intromissão pós-ejaculatória [$t(17)=2,14$; $p=0,047$]. Dois machos do grupo CTRGL foram considerados sexualmente inativos. Não houve diferença significativa na porcentagem de animais que não apresentaram comportamento copulatório em nenhum dos períodos de avaliação (teste de Fisher, $p > 0,05$). Não foi observada diferença estatística nos outros parâmetros de comportamento sexual (tabela 7).

Tabela 7. Comportamento copulatório dos animais com DPN 90 dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Latência para 1ª intromissão (s)	Nº de intromissões até 1ª ejaculação	Latência para 1ª ejaculação (s)	Latência para 1ª intromissão pós-ejaculação (s)	Nº de intromissões pós-ejaculação	Nº de ejaculações
CTRG [9]	237,00 ± 72,52	16,33 ± 1,93	815,67 ± 108,07	1108,67 ± 115,24	21,22 ± 1,04	2,44 ± 0,24
METG [11]	89,00 ± 24,16*	24,73 ± 3,04*	925,18 ± 97,00	1084,36 ± 133,52	19,27 ± 2,52	1,82 ± 0,23
CTRGL [9]	81,56 ± 29,53	27,44 ± 5,47	514,56 ± 152,66	730,44 ± 204,29	13,89 ± 4,17	1,67 ± 0,44
METGL [10]	218,20 ± 67,83	22,80 ± 3,48	890,00 ± 92,63*	1199,80 ± 98,04*	18,80 ± 2,40	2,20 ± 0,29

Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student), **p*<0,05 Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). Número entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2.9.2. *Motivação sexual*

Como indicado pelo test-*t* de Student não foi observada diferença estatística nos parâmetros analisados no teste de motivação sexual (tempo gasto na zona do macho e na zona da fêmea, número de visitas na zona do macho e na zona da fêmea e escore de preferência) de ratos expostos à MET durante o desenvolvimento em relação ao seu respectivo grupo controle (tabela 8).

Tabela 8. Motivação sexual dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [9]	METG [11]	CTRGL [11]	METGL [10]
Tempo na zona do macho (s)	209,56 ± 30,58	250,55 ± 28,30	285,64 ± 30,89	287,00 ± 21,06
Tempo na zona da fêmea (s)	692,33 ± 54,84	691,45 ± 48,59	642,55 ± 42,74	655,50 ± 41,01
Nº de visitas na zona do macho	17,44 ± 1,48	17,27 ± 2,27	18,45 ± 0,58	19,30 ± 0,91
Nº de visitas na zona da fêmea	22,22 ± 1,82	19,36 ± 1,56	22,45 ± 1,10	20,80 ± 1,00
Escore de preferência	76,14 ± 3,61	72,64 ± 3,66	68,82 ± 3,56	69,10 ± 2,63

Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student), *p*>0,05. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2.10. Peso corporal, peso de órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona no DPN 110

O peso corporal, o peso úmido dos órgãos reprodutivos e a concentração plasmática de testosterona de ratos no DPN 110 estão representados na tabela 9. A exposição à MET não induziu alterações significativas nesses parâmetros (test-*t* de Student, $p > 0,05$).

Tabela 9. Peso corporal, peso úmido dos órgãos reprodutivos e concentração plasmática de testosterona dos animais no DPN 110 dos diferentes grupos experimentais.

	CTRG [9]	METG [11]	CTRGL [11]	METGL [10]
Peso corporal (g)	429,40 ± 10,07	438,62 ± 10,69	415,72 ± 10,51	420,04 ± 15,46
Testículos (g)	3,04 ± 0,09	3,13 ± 0,05	3,09 ± 0,06	3,09 ± 0,05
Ducto deferente (mg)	132,77 ± 37,60	170,36 ± 71,09	191,51 ± 91,01	102,05 ± 2,89
Epidídimo(direito) (g)	0,57 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,57 ± 0,01
Próstata (g)	0,43 ± 0,04	0,46 ± 0,03	0,44 ± 0,05	0,48 ± 0,03
Vesículas seminais (g)	1,42 ± 0,10	1,37 ± 0,06	1,47 ± 0,10	1,48 ± 0,11
Concentração plasmática de testosterona (ng/dl)	359,00 ± 61,58 [8]	343,57 ± 62,87 [7]	392,99 ± 63,13 [8]	323,27 ± 60,33 [7]

Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student), $p > 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2.11. Parâmetros espermáticos

Os parâmetros de contagem espermática estão representados na tabela 10. A exposição à MET induziu no testículo do grupo METGL, diminuição significativa no número de espermátides (10^6) [$t(19)=2,09$; $p=0,05$], no número de espermátides por grama de órgão ($10^6/g$) [$t(19)=2,83$; $p=0,01$], assim como, na produção espermática diária testicular [$t(19)=2,09$; $p=0,05$]. Não foram observadas diferenças estatísticas nos outros parâmetros de contagem espermática no grupo METGL. Nos ratos expostos à MET apenas durante a gestação (METG), não foi observada diferença estatística em nenhum dos parâmetros de contagem espermática (teste-*t* de Student, $p > 0,05$).

Tabela 10. Contagem espermática dos animais adultos dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [9]	METG [11]	CTRGL [11]	METGL [10]
Nº de espermátides (10 ⁶ /testículo)	125,72 ± 13,08	124,70 ± 15,17	139,47 ± 10,92	113,04 ± 5,56*
Nº de espermátides (10 ⁶ /g/testículo)	97,07 ± 9,97	96,60 ± 11,74	106,99 ± 7,10	84,68 ± 2,63*
Produção diária espermática	20,61 ± 2,14	20,44 ± 2,49	22,86 ± 1,79	18,53 ± 0,91*
Nº de espermatozoides x 10 ⁶ / cabeça + corpo do epidídimo	128,34 ± 11,50	145,86 ± 19,31	134,15 ± 11,77	112,96 ± 6,27
Nº de espermatozoides x10 ⁶ /g/cabeça+ corpo do epidídimo	411,72 ± 36,64	517,74 ± 95,12	440,99 ± 30,73	372,83 ± 16,34
Nº de espermatozoides x 10 ⁶ /cauda do epidídimo	175,81 ± 15,34	185,19 ± 23,68	207,48 ± 14,35	175,01 ± 7,21
Nº de espermatozoides x 10 ⁶ /g/cauda do epidídimo	722,44 ± 50,01	736,86 ± 91,21	846,35 ± 55,93	731,12 ± 40,39
Tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo do epidídimo (dias)	6,79 ± 1,08	7,64 ± 1,08	5,91 ± 0,30	6,17 ± 0,39
Tempo de trânsito espermático na cauda (dias)	9,39 ± 1,53	10,84 ± 1,82	9,68 ± 1,10	9,74 ± 0,80

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student), *p<0,05. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

Os dados dos demais parâmetros espermáticos (morfologia, viabilidade, motilidade e concentração) dos animais adultos estão representados na tabela 11. A exposição à MET não induziu alterações significativas nesses parâmetros.

Tabela 11. Morfologia, motilidade, viabilidade e concentração espermática dos animais no DPN 110 dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [9]	METG [11]	CTRGL [11]	METGL [10]
Anormalidades de cabeça (%)	17,70 ± 1,37	13,77 ± 1,84	13,36 ± 1,66	15,29 ± 1,64
Anormalidades de cauda (%)	2,90 ± 0,70	3,50 ± 0,70	2,81 ± 0,58	2,76 ± 0,71
Espermatozoides móveis (%)	72,56 ± 4,72	64,64 ± 6,07	70,21 (51,00-81,00)	71,50 (62,75-82,50)
Espermatozoides viáveis (%)	68,00 ± 5,25	58,97 ± 6,28	57,89 ± 7,45	63,60 ± 4,14
Concentração espermática (%)	26,08 ± 5,54	20,77 ± 4,10	20,43 ± 2,62	21,70 ± 3,85

Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student) e mediana (1° - 3° quartil) na motilidade espermática (*Mann-Whitney*) $p > 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

4.2.12. Parâmetros histomorfométricos do testículo no DPN 110

Os parâmetros histomorfométricos do testículo da prole masculina dos animais que foram submetidos à eutanásia no DPN 110 estão apresentados na tabela 12. O teste-*t* de Student não indicou diferença estatística entre os animais expostos à MET com relação ao seu respectivo grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 12. Parâmetros histomorfométricos do parênquima testicular de ratos no DPN 110 dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	CTRG [8]	METG [10]	CTRGL [9]	METGL [10]
Volume testicular (ml)	1,41 ± 0,04	1,45 ± 0,03	1,43 ± 0,03	1,43 ± 0,02
Volume do tecido intersticial (ml)	5,50 ± 0,44	5,51 ± 0,36	5,62 ± 0,31	5,21 ± 0,27
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	8,62 ± 0,41	8,96 ± 0,38	8,63 ± 0,43	9,14 ± 0,24
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	263,67 ± 5,29	266,48 ± 5,66	261,83 ± 8,37	276,27 ± 6,25
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	158,17 ± 7,11	162,76 ± 9,93	162,45 ± 9,54	154,19 ± 6,91

Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student), $p > 0,05$. Grupos tratados com MET (METG e METGL) comparado com seu respectivo grupo controle (CTRG e CTRGL). Números entre colchetes indicam o número de animais/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: MET gestacional; CTRGL: controle gestacional lactacional; METGL: MET gestacional lactacional.

5. Discussão

O presente estudo investigou os efeitos da exposição materna à MET durante a gestação e lactação no desenvolvimento reprodutivo da prole masculina. Houve redução no ganho de peso corporal durante a gestação em ambos os grupos METG e METGL. A MET tem sido comumente utilizada em pacientes obesos com diabetes não apenas para o controle glicêmico, mas também para o controle do peso corporal (KIM *et al.*, 2016). Como já descrito na literatura o efeito anorexígeno da MET resulta de mecanismos multifatoriais que atuam no hipotálamo (MALIN e KASHYAP, 2014). Sabe-se que a MET pode atravessar a barreira hematoencefálica, uma vez que, ratos diabéticos apresentaram concentrações elevadas da droga no fluido cerebrospinal, podendo afetar diretamente o comportamento alimentar (LV *et al.*, 2012).

Entretanto a ingesta alimentar nesse período não foi alterada, bem como o ganho de peso corporal e a ingesta alimentar durante a lactação. Isso pode ser explicado pelo aumento da demanda energética durante os períodos gestacional e lactacional (FLINT *et al.*, 2005). Apesar de o número de filhotes ter sido significativamente menor por ninhada, em ambos os grupos expostos à MET (METG e METGL), a exposição à MET não teve efeito no peso da ninhada ao nascer, assim como no ganho de peso corporal da prole durante a lactação. Isso sugere que o tratamento com MET, nessa dose, não causou toxicidade nas mães ou em seus filhotes. Além disso, não foi observado nenhum dos sinais característicos de toxicidade como: lacrimação, piloereção, padrão respiratório anormal e tremores nas mães ou na prole, assim como, não houve alterações significativas nos parâmetros de fertilidade e do comportamento materno analisados nas mães.

Os dados obtidos mostraram que a DAG (considerado um marcador de ação androgênica fetal) medida no DPN 1 e 21 não foi afetada pela exposição à MET, assim como, não alterou o dia em que ocorreu a total separação prepucial (indicador de maturidade sexual). Estes resultados sugerem que a concentração plasmática de testosterona nesses momentos não foi afetada drasticamente pela exposição à MET, uma vez que, tanto a DAG quanto a instalação da puberdade são andrógenos dependentes (CLARK *et al.*, 1990).

No grupo METGL foi verificado um aumento no comprimento total dos túbulos seminíferos dos animais no DPN 21, em relação ao seu grupo controle. Em mamíferos o

desenvolvimento do sistema reprodutor se inicia durante a gestação, período em que inicialmente ocorre a migração das células germinativas e estas promovem a morfogênese das gônadas, das estruturas do trato reprodutivo e da genitália externa. Os tecidos reprodutores em crescimento são influenciados por diferentes tipos de moléculas como fatores de crescimento, fatores transcricionais, e hormônios esteróides (HO *et al.*, 2016). No trabalho de Tartarin *et al.* (2012) foi demonstrado que a exposição materna à MET levou a diminuição: no volume testicular no DG 16.5 e no DPN 1e no diâmetro dos túbulos seminíferos no DPN 1, no entanto, o comprimento total dos túbulos seminíferos não foi investigado. No presente estudo, a exposição materna à MET, durante toda a gestação e lactação, não alterou o diâmetro dos túbulos seminíferos, assim como o peso testicular. Baseando-se nos resultados obtidos, sugere-se que a MET possa ter comprometido a concentração de FSH, uma vez que, este fármaco é capaz de inibir a expressão (RICE *et al.*, 2013) e a atividade do FSH em células da granulosa (RICE *et al.*, 2013; MANSFIELD *et al.*, 2003), sabe-se que o FSH possui um efeito específico no crescimento longitudinal dos túbulos seminíferos em ratos pré-púberes (LEIDL *et al.*, 1976). Uma vez que, ratos tratados com FSH do DPN 1-16 apresentaram um aumento no comprimento longitudinal dos túbulos seminíferos sem apresentar alterações no diâmetro ou concentração de andrógenos, corroborando com nossos resultados (LEIDL *et al.*, 1976). Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar ou excluir essa hipótese, como a dosagem plasmática de FSH. No entanto, não foi possível realizar essa investigação no DPN 21, uma vez que o objetivo principal era avaliar a concentração plasmática de testosterona e o baixo volume plasmático não permitiu uma segunda investigação hormonal.

A exposição à MET não alterou as concentrações de testosterona da prole no DPN 21. Dado da literatura mostra que a exposição materna à MET até o DG 16.5 reduz a concentração plasmática de testosterona na prole no DG 16.5, no entanto, sem alteração no DPN 1 (TARTARIN *et al.* 2012). Embora no presente estudo não observamos diferença estatística, houve redução na concentração plasmática de testosterona nos animais expostos à MET durante toda a gestação e lactação, diferentemente dos animais expostos somente durante a gestação. Desta forma, os resultados do presente estudo, somados aos da literatura (TARTARIN *et al.* 2012), sugerem que a redução plasmática de testosterona induzida pela MET não tenha efeito

em longo prazo, visto que, em nosso trabalho, esse resultado não foi observado durante a puberdade e vida adulta.

No presente estudo, a MET levou a alterações no comportamento sexual de ambos os grupos expostos, observados pela significativa redução na latência para a primeira intromissão e pelo aumento no número de intromissões até a primeira ejaculação nos animais METG. No entanto, nos animais METGL houve aumento significativo na latência para a primeira ejaculação e na latência para a primeira intromissão pós ejaculatória. Durante o período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica se forma uma ampla janela de suscetibilidade à perturbação por fatores ambientais (HO *et al.*, 2016). De modo que, os resultados obtidos sugerem que as alterações no comportamento sexual possam ser devido ao comprometimento na diferenciação sexual hipotalâmica, que pode ter ocorrido por dois mecanismos: a primeira hipótese é devido ao aumento nas SHBG. De fato, Carlsen e Vanky (2010), observaram aumento nas concentrações de SHBG em neonatos expostos à MET durante a gestação. O aumento das SHBG pode resultar em baixos índices de androgênios livres impedindo que a concentração adequada de testosterona entre no sistema nervoso central, não promovendo, portanto uma adequada diferenciação sexual hipotalâmica. A segunda hipótese sugere que a MET possa atuar como inibidor da aromatase, pois dados da literatura mostram que em ratos, esse fármaco diminuiu a concentração de estrógeno circulante pela diminuição da concentração dessa enzima no pulmão (DEAN *et al.*, 2016). Já em humanos a MET diminui a expressão e atividade da aromatase em células da musculatura lisa da artéria pulmonar (DEAN *et al.*, 2016), em células do estroma endometriótico (ZHOU *et al.* 2015) e em células da granulosa (RICE *et al.* 2009). Sabe-se que a atividade anormal da aromatase em neonatos bloqueia o efeito masculinizante dos andrógenos (BAKKER *et al.*, 1993a; BAKKER *et al.*, 2002) e pode prejudicar aspectos múltiplos do comportamento copulatório como a latência para a intromissão e ejaculação (BAKKER *et al.*, 2004).

Como já demonstrado, a concentração plasmática de testosterona dos animais do grupo METGL no DPN 21 (idade em que ainda estavam sendo expostos à MET através da lactação), apesar de não significativa foi menor do que nos animais do seu grupo controle. Sabe-se que em ratos, durante o período perinatal, a manutenção de concentrações plasmáticas de testosterona adequada na prole masculina é fundamentalmente importante para um desenvolvimento reprodutivo satisfatório, que

inclui as diferenças fisiológicas, comportamentais e neuroanatômicas entre os sexos (GOY e MAC EWEN, 1980). Vale ressaltar que o padrão secretório de testosterona testicular fetal normal atingem picos que incluem aumentos substancialmente abruptos (CORBIER *et al.*, 1983; ROFFI *et al.*, 1987). O primeiro pico na concentração de testosterona fetal ocorre no DG 18, sendo este necessário para a expressão posterior e manutenção do comportamento sexual masculino (HERNÁNDEZ-ARTEAGA *et al.*, 2016). Entre 0 e 2 horas após o nascimento a concentração plasmática de testosterona aumenta cerca de 400% (CORBIER *et al.*, 1992), podendo ficar bem próximo ou até mesmo exceder o encontrado em machos adultos (MOTELICA-HEINO, 1988; CORBIER *et al.*, 1992). Após esse período, a atividade secretora dos testículos diminui, de modo que, nas próximas 4 horas subsequentes a sua concentração é apenas ligeiramente superior ao da prole feminina (CORBIER *et al.*, 1992). Dessa forma sugere-se que a MET tenha induzido flutuações na concentração de testosterona plasmática capazes de alterar ou interferir na amplitude dos picos de testosterona necessários para um desenvolvimento reprodutivo normal dentro dos padrões da espécie. No entanto, oscilações hormonais não são possíveis de serem detectadas em uma amostra única de sangue. Essa hipótese baseia-se no fato de que apesar do tempo de exposição à MET ter sido diferente, ambos os grupos expostos apresentaram alterações no comportamento sexual, sem que houvesse o comprometimento de parâmetros reprodutivos andrógenos dependentes. Além disso, as demais alterações foram observadas apenas nos animais do grupo METGL, cuja exposição à MET abrangeu todo o período de diferenciação sexual hipotalâmica. No entanto, mais estudos são necessários para verificar essas alterações, como por exemplo, a dosagem plasmática de SHBG e investigação da expressão e atividade da aromatase no SNC.

Apesar da exposição à MET não ter alterado o peso corporal ou o peso dos órgãos reprodutivos da prole masculina, no testículo houve diminuição no número de espermátides, no número de espermátides por grama de testículo, e na produção espermática diária do grupo METGL. Sugere-se que o comprometimento na contagem espermática testicular possa estar relacionado à possível alteração na concentração plasmática de FSH, uma vez que, dados na literatura mostram que a MET é capaz de induzir a diminuição da secreção de hormônio luteinizante (LH) e FSH em cultura de células hipofisárias de ratos pela redução do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (TOSCA *et al.*, 2011) e sabe-se que em ratos recém-nascidos, a concentração adequada de FSH desempenha um papel importante na produção espermática

(FRANÇA *et al.*, 2000). Isso acontece, porque de acordo com França *et al.*(2000), a proliferação das células de Sertoli ocorre de maneira restrita ao período perinatal, visto que, em ratos essa proliferação cessa completamente no DPN 20 e estas suportam um número limitado de células germinativas primordiais, de modo que, o número de células de Sertoli estabelecido no período perinatal determina o número de espermatozoides produzidos em animais sexualmente maduros. Vale ressaltar que, os principais picos na secreção de FSH ocorrem entre os dias DG 17.5-21.5, DPN 1-5 e DPN 35 e que o pico na expressão de FSHR ocorre no DPN 15 (WALKER e CHENG, 2005) e portanto, apenas os animais do grupo METGL estavam sendo expostos à MET durante dois dos principais períodos secretórios do FSH e durante a expressão máxima de FSHR, ao contrário dos animais do grupo METG que estavam sendo expostos apenas no primeiro pico de FSH. No entanto, mais estudos são necessários para investigar essa relação.

Sabe-se ainda, que a exposição intrauterina à MET diminui as populações de células de Leydig e Sertoli no DG 16.5 e DPN 1 (TARTARIN *et al.*, 2012), no entanto, no presente estudo, não foi realizada a contagem diferenciada dessas células, sugerindo a necessidade efetiva dessa investigação, uma vez que, a ausência de dados na literatura restringe a discussão.

6. Conclusão

O presente estudo revelou que a exposição à MET durante períodos críticos de desenvolvimento, como a gestação e a lactação, teve um impacto nos parâmetros reprodutivos da prole masculina durante a infância e vida adulta. Como observado por um aumento do comprimento total dos túbulos seminíferos dos animais do grupo METGL no DPN 21, e por uma diminuição na contagem espermática nos animais adultos do grupo METGL e nas alterações no comportamento sexual em ambos os grupos expostos à MET. Esses resultados sugerem que as alterações reprodutivas induzidas pela MET estão relacionadas com o tempo de exposição. Considerando que os animais do grupo METGL, cuja exposição abrangeu todo o período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica apresentaram mais alterações reprodutivas do que os animais do grupo METG. Uma vez que o tratamento das mulheres durante a gestação e lactação com MET é cada vez mais comum e que a baixa contagem espermática que representa fator de risco para a infertilidade masculina tem aumentado ao longo dos anos, são necessários mais estudos para investigar por quais mecanismos a MET causa essas alterações.

Referências

- ADA, Standards of medical care in diabetes—2011, *Diabetes Care* 34 (Suppl. 1), S11–S61, 2011.
- ADA, Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 38 (Suppl. 1), S8–S16, 2015.
- AGMO A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. *Behav Neurosci*, v. 117, p.55-68, 2003.
- ATTAL, J.; COUROT, M. Development testiculaire et etablissement de la spermatogenese chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. v. 3, n. 3, p. 219–41, 1963.
- ATTIA, G.R., RAINEY, W.E., CARR, B.R. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril*, v.76, p.517– 524, 2001.
- BAKKER, J.; BRAND, T.; van OPHEMERT, J.; SLOB, A.K. Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav. Neurosci.*, v.107, p. 480–487, 1993a.
- BAKKER, J.; HONDA, S.; HARADA, N. & BALTHAZART, J. The aromatase knockout mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of socio sexual behaviors in adulthood. *J. Neurosci.*, v. 22, p. 9104–9112, 2002.
- BAKKER, J.; HONDA, S.; HARADA, N.; BALTHAZART, J. Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Horm. Behav.*, v. 46, p.1–10, 2004.
- BALANI, J.; HYER, S.L.; RODIN, D.A. et al. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes with metformin or insulin: a case-control study. *Diabet Med*.v. 26, p.798-802, 2009.
- BARRET, H.L.; GATFORD, K. L.; HOUDA, C.M. *et al.* Maternal and neonatal circulating markers of metabolic and cardiovascular risk in the metformin in gestational diabetes (MiG) trial. *Diabetes Care*.v.36, n.3, p.529-536, 2013.
- BEACH, F. A. Hormonal modification of sexually dimorphic behavior. *Psychoneuroendocrinology*, v. 1, p.3, 1975.
- BJORND AHL, L.; SODERLUND, L.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin–nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum. Reprod.* v. 18, p. 813–816, 2003.

- BOLTON, S.; CLEARY, B.; WALSH, J.; et al. Continuation of metformin in the first trimester of women with polycystic ovarian syndrome is not associated with increased perinatal morbidity. *Eur J Pediatr.* v.168, p. 203-206, 2009.
- CARLSEN, S.M.; VANKY, E. Metformin influence on hormone levels at birth, in PCOS mothers and their newborns. *Hum Reprod.* v.25, p.786 –790, 2010.
- CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A. MEANEY; M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav.* v. 79: p. 359–371, 2003.
- CHARLES, B.; NORRIS, R.; XIAO, X.; HAGUE, W. Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy. *Ther Drug Monit.* v. 28, p.67 – 72, 2006.
- CLARK, R.L. *et al.* External genitalia abnormalities in male rats exposed *in utero* to finasterida, a 5 α reductase inhibitor. *Teratology.* v.42, p. 91-100, 1990.
- CORBIER, P., EDWARDS, D. A., ROFFI, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique.* v.100, p. 127-131, 1992.
- CORBIER, P., ROFFI, J. e RHODA, J. Female sexual behavior in male rats: effect of hour of castration at birth. *Physiol. Behav.* v.30, p.613-616, 1983.
- DEAN, A.; NILSEN, M.; LOUGHLIN, L.; SALT, I. P.; MACLEN, M.C.; M;R. Metformin Reverses Development of Pulmonary Hypertension via Aromatase Inhibition. *Hypertension.* v.68, p. 446-454, 2016.
- DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens wahrend der postnatalen entwicklug. *Monaths Veterinary Medicine.* v. 29, p. 650–2, 1974.
- DUNN, C.J.; PETERS, D.H. Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs.* v.49, n. 5, p. 721-749, 1995.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Harmonization in Interspecies Extrapolation : Use of BW 3 / 4 as Default Method in Derivation of the Oral RfD, 2006.
- EYAL, S.; EASTERLING, T.R.; CARR, D.; UMANS, J.G.; MIODOVNIK, M.; HANKINS, G.D.; CLARK, S.M.; RISLER, L.; WANG, J.; KELLY, E.J.; SHEN, D.D.; HEBERT, M.F. Pharmacokinetics of metformin during pregnancy. *Drug Metab Dispos.* v.38(5), p.833-40, 2010.
- FAVARETO, A.P.; FERNANDEZ, C.D.; da SILVA, D.A.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; KEMPINAS, W.G. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in

adult rats treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* v.109, p. 85–96, 2011.

FERNANDES, G. S.; ARENA, A. C.; FERNANDEZ, C. D.; MERCADANTE, A.; BARBISAN, L. F. et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol*, v. 23, p. 106–12, 2007.

FLINT, D. J.; TRAVERS, M. T.; BARBER, M. C.; BINART, N.; KELLY, P. A. Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* v. 288, n.6, p. E1179–E1187, 2005.

FORETZ, M.; HEBRARD, S.; LECLERC, J. et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*, v.120, n.7, p.2355–2369, 2010.

FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*, v. 68, p. 1554–1561, 2003.

FRANÇA, R.L.; SILVA, J.V.A., CIARINI-GARCIA, H., GARCIA, S.K., DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction.* v.63, p.1629–1636, 2000.

GALLAVAN, Jr. R.H.; HOLSON, J.F.; STUMP, D.G.; KNAPP, J.F.; REYNOLDS, V.L. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol.* V.13, p.383-390, 1999.

GERARDIN, D.C.C.; BERNARD, M. M.; MOREIRA, E.G.; PEREIRA, O.C.M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v.83, n.4, p. 618-623, 2006.

GILBERT, C.; VALOIS, M.; KOREN, G. Pregnancy outcome after first-trimester exposure to metformin: a meta-analysis. *Fertil Steril*, v.86, n.3, p.658-63, 2006.

GLUECK, C.J.; PRANIKOFF, J. AREGAWI, D; WANG, P. Prevention of gestational diabetes by metformin plus diet in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, v.89, n.3, p.625–634, 2008.

GLUECK, C.J.; WANG, P.; GOLDENBERG, N. et al. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum Reprod.* v.17, p.2858-2864, 2002.

- GOY, R. W. e Mc EWEN, B. S. in *Sexual Differentiation of the brain*. MIT Press, 1980.
- GUTZIN, S.J.; KOZER, E.; MAGEE, L.A. et al. The safety of oralhypoglycemic agents in the first trimester of pregnancy: a meta-analysis. *Can J Clin Pharmacol*. v.10, p. 179-183, 2003.
- HERNÁNDEZ-ARTEAGA, E., HERNÁNDEZ-GONZALEZ, M. RENTERÍA, M.L., ALMANZA-SEPÚLVEDA, M.L., GUEVARA, M.A., SILVA, M.A. JAIME, H.B. Prenatal stress alters the developmental pattern of behavioral indices of sexual maturation and copulation in male rats. *Physiol Behav*. v. 163, p. 251-257, 2016.
- HO, S.M.; CHEONG, A.; ADGENT, M.A.; VEEVERS, J.; SUEN, A.A.; TAM, N.N. et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reprod Toxicol*. 2016.
- INZUCCHI, S.E.; BERGENSTAL, R.M.; BUSE, J.B.; DIAMANT, M.; FERRANNINI, E.; NAUCK, M. et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD), *Diabetologia*. v. 55 p. 1577–1596, 2012.
- JACOBSON, C.D.; GORSKI, R.A. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *J.Comp.Neurol.*, v. 196, p. 519-529, 1981.
- JIWANI, A.; MARSEILLE, E.; LOHSE, N.; DAMM, P.; HOD, M.; KAHN, J. G. Gestational diabetes mellitus: results from a survey of country prevalence and practices. *J Matern Fetal Neonatal Med*. v. 25, p. 600–610, 2012.
- JOHNSON, N. Metformin is a reasonable first-line treatment option for non-obese women with infertility related to anovulatory polycystic ovary syndrome – a meta-analysis of randomised trials. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, v.51, n.2, p.125–129, 2011.
- KALENDER, A.; SELVARAJ, A.; KIM, S.Y. *et al*. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*. v.11, p. 390-401, 2010.
- KIM, H.J.; JIN, B.Y.; SHIN, K.H.; CHOI, S.H.; KIM, D.H. The effect of metformin on neuronal activity in the appetite-regulating brain regions of mice fed a high-fat diet during an anorectic period. *Physiology & Behavior*. n. 154, p. 184-190, 2016.
- KOVO, M.; HAROUTIUNIAN, S.; FELDMAN, N.; HOFFMAN, A.; GLEZERMAN, M. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. v.136, p.29 – 33, 2008.

- LANGER, O.; CONWAY, D.L.; BERKUS, M.D.; XENAKIS, E.M.; GONZALES, O. A. comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med.*v.343, n.16, p.1134-1138, 2000.
- LEE, J. O.; LEE, S.K.; KIM, J.H.; KIM, N.; YOU, G.Y.; MOON, J.W.; KIM, S.J.; PARK, S. H.; KIM, H.S. Metformin Regulates Glucose Transporter 4 (GLUT4) Translocation through AMP-activated Protein Kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP Signaling in 3T3-L1 Preadipocyte Cells*. *JBC* v. 287, n. 53, p. 44121–44129, 2012.
- LEIDL, W., BENTLEY, M.I., GASS, G.H. Longitudinal growth of the seminiferous tubules in LH and FSH treated rats. *Andrologia*, v.8, n.2, p. 131-136, 1976.
- LENZ, K.M.; McCARTHY, M. Organized for sex - steroids hormones and the developing hypothalamus. *European Journal of Neuroscience.*, v. 32, p. 2096-2104, 2010.
- LV, W.S.; WEN, J.P.; LI, L.; SUN, R.X.; WANG, J.; XIAN, Y.X. *et al.* The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats, *Brain Res.* v.1444, p. 11–19, 2012.
- MACLUSKY, N.J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, v.211, p.1294-1303, 1981.
- MALIN, S. K.; KASHYAP, S. R. Effects of metformin on weight loss. *Current Opinion In Endocrinology & Diabetes and Obesity.* v. 21, n. 5, p.323-329, 2014.
- MANSFIELD, R. GALEA, R. BRINCAT, M. HOLE, D. MASON, H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*, v. 79, n.4, p.956–962, 2003.
- MORIN-PAPUNEN, L.; RANTALA, A.S.; UNKILA-KALLIO, L. *et al.* Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo controlled randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 97, n.5, p.1492–1500, 2012.
- MOTELICA-HEINO, I., CASTANLER, M., CORBIER, P., EDWARDS, D. A. e ROFFI, J. J. Testosterone levels in plasma and testes of neonatal mice. *Steroid Biochem.* v.31, n.3, p. 283-286, 1988.
- NAFTOLIN, F.; RYAN, K.J.; DAVIES, I.J.; REEDY, V.V.; FLORES, F.; PETRO, Z. *et al.*, 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog. Hormone Res.Chemosphere.* n.31, p. 295-319, 1975.

PEROBELLI, J.E.; MARTINEZ, M.F.; FRANCHI, C.A.S.; FERNANDEZ, C.D.; CAMARGO, J.L.; KEMPINAS, W.G. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A*. v. 73, p. 991–1002, 2010.

PIFFER, R.C.; GARCIA, P. C.; GERARDIN, D.C.C.; KEMPINAS, W.G.; PEREIRA, O.C.M. Semen parameters, fertility, and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. *Reproduction, fertility and development*, v. 21, p.634-639, 2009.

RATTAN, R.; GIRI, S.; HARTMANN, L.C.; SHRIDHAR, V. Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner. *J Cell Mol Med*. v.15, p.166 – 178, 2011.

REIS, A.R.; de AZEVEDO, M. S.; de SOUZA, M. A.; LUTZ, M. L.; ALVES, M. B. et al. Neonatal handling alters the structure of maternal behavior and affects mother-pup bonding. *Behav Brain Res*, v. 265, p. 216-228, 2014.

RENA, G.; PEARSON, E.R.; SAKAMOTO, K. Molecular action and pharmacogenetics of metformin: current understanding of an old drug. *Diabetes Management*, v. 2, p. 439–452, 2012.

RHEE, M.; HERRICK, K.; ZIEMER, D *et al*. Many Americans have prediabetes and should be considered for metformin therapy. *Diabetes Care*. v. 33, p. 49-54, 2010.

RICE, S., ELIA, A., JAWAD, Z., PELLATT, L., MASON, H.D. Metformin inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action in human granulosa cells: relevance to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. v. 98, n.9, p. 1491-1500, 2013.

RICE, S.; PELLAT, L.; RAMANATHAN, K.; WHITEHEAD, S. A.; MASON, H. M. Metformin inhibits aromatase via an ERK (extracellular signal-regulated kinase) - mediated pathway. *Endocrinology*. v. 150, n.10, p. 4794-4801, 2009

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil*, v. 54, p. 103–107, 1978.

ROFF, J., CHAMI, F., CORBIER, P. e EDWARDS, D. A. Testicular hormones during the first few hours after birth augment the tendency of adult male rats to mount receptive females. *Physiol. Behav*. v.39, p.625-628, 1987.

ROWAN, J.A., HAGUE, W.M., GAO, W., BATTIN, M.R., MOORE, M.P. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N Engl J Med*. v.358, p.2003-2015, 2008.

SKAKKEBAEK, N.E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K.M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* v.16, p.972–978, 2001.

TARTARIN, P.; MOISON, D. *et al.* Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Human Reproduction*, v. 27, n. 11, p. 3304–3314, 2012.

TOSCA, L.; FROMENT, P.; RAME, C. *et al.* Metformin decreases GnRH- and activin induced gonadotropin secretion in rat pituitary cells: potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA). *Biol Reprod.* v.84, n.2, p.351-362, 2011.

TOSCA, L.; CHABROLLE, C.; UZBEKOVA, S.; DUPONT, J. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod.* v.76, p.368–378, 2007.

TOSCA, L.; SOLNAIS, P.; FERRE, P.; FOUFELLE, F.; DUPONT, J. Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol Reprod.* v.75, p.342–351, 2006.

VANDER HEIDEN, M.G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* v.9, p.671–684, 2011.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; SANZ GARCIA, N.; LECLERC, J.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F.; Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, v. 122, n.6, p.253-270, 2012.

ZHOU, Y.; XU, J.N.; ZENG, C. LI, X.; ZHOU, Y.F.; QI, Y.; XUE, Q Metformin Suppresses Prostaglandin E2-Induced Cytochrome P450 Aromatase Gene Expression and Activity via Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase in Human Endometriotic Stromal Cells. *Reproductive Sciences*, v. 22, n. 9 p.1162-1170, 2015.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, v.108, n.8, p.1167–1174, 2001.

WADHWA, P. *et al.* Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Seminars IN Reproductive Medicine.* v. 27, n. 5, p.358-368, 2009.

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

WEISZ, J., WARD, I.L. Plasma testosterone and progesterone litters of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*, v.106, n.1, p. 306-316, 1980.

Apêndice A- Resumo gráfico das alterações reprodutivas induzidas na prole masculina pela exposição materna à MET.

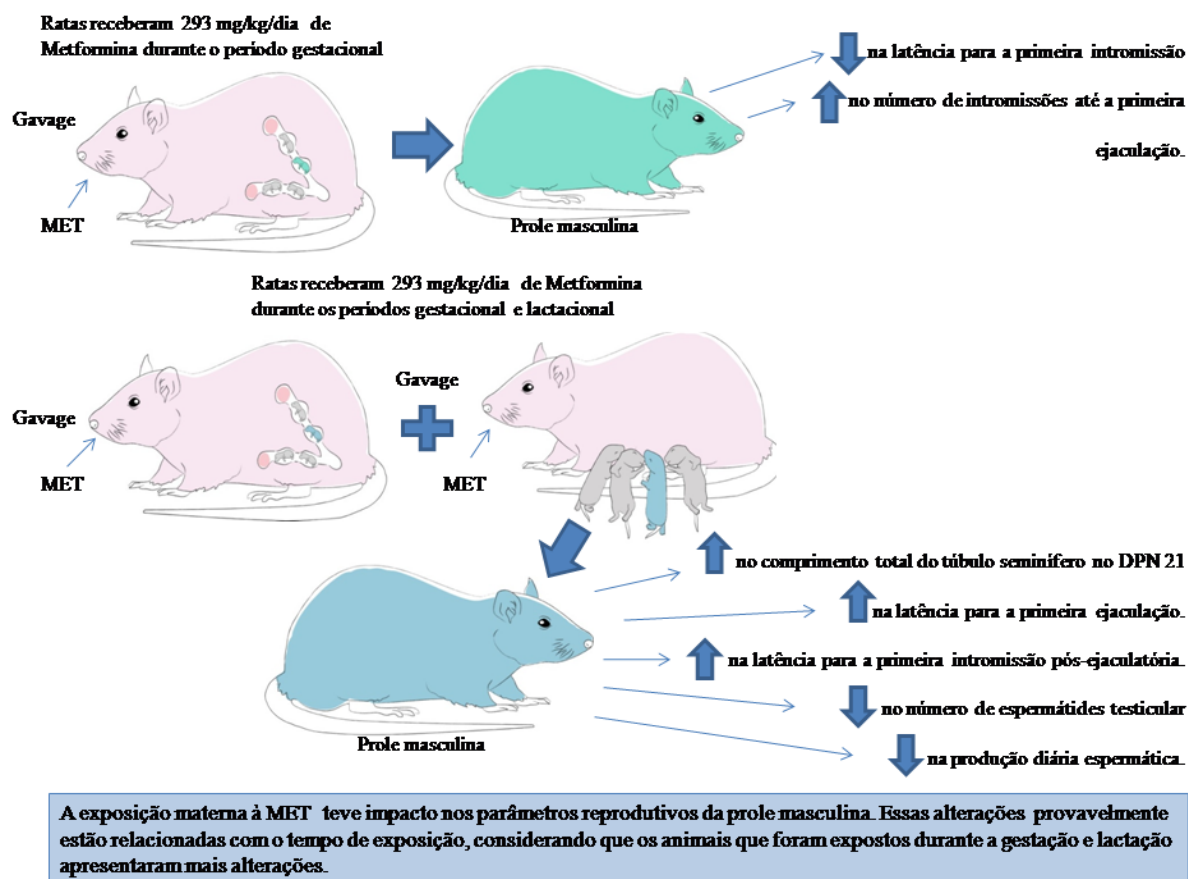


Figura 9: Esquema gráfico que resume as consequências da exposição materna à Metformina nos parâmetros reprodutivos da prole masculina. MET: Metformina; DPN: dia pós natal.

Anexo A- Aprovação da Comissão de ética no uso de animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 138/2015

Londrina, 03 de Julho de 2015.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**Influência da exposição materna à metformina sobre parâmetros reprodutivos, metabólicos e cardiovasculares na prole de ratos**”, registrado sob o processo CEUA nº6996.2015.02, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 100 ratos Wistar (40 machos e 60 fêmeas), com 75 dias de idade e provenientes do Biotério Central da UEL, e a partir do cruzamento de parte destes, espera-se obter aproximadamente 400 filhotes. O projeto tem como objetivo avaliar em ratos e ratas expostos à metformina durante a gestação e a amamentação os parâmetros reprodutivos e comportamentais, o fenótipo metabólico, a pressão arterial e frequência cardíaca, responsividade da aorta e a produção de espécies reativas de oxigênio na aorta. Para tanto, será colocado um macho e duas fêmeas em cada gaiola para o acasalamento e a prenhe será determinada quando observados espermatozoides e a fase estro a partir da realização do esfregaço vaginal. A partir da determinação da prenhe, as ratas serão alocadas em gaiolas individuais e divididas em grupos experimentais para tratamento com metformina e água em doses e tempos variáveis de acordo com o grupo experimental. As proles também serão divididas em grupos de acordo com o tratamento que suas respectivas gerações parentais receberam para avaliação da toxicidade materna, toxicidade reprodutiva na prole feminina e masculina e parâmetros metabólicos e cardiovasculares. Os animais serão eutanasiados com tiopental (40 mg/kg, i.p.) e será realizada taracotomia para remoção do sangue por punção cardíaca e das porções torácica e abdominal da aorta, que serão separadas, dissecadas e seccionadas em dois anéis transversais. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 36 meses.

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 necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Ap. Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo

Coordenadora do Projeto
Departamento de Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.