

DIANE COSTA ARAUJO

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES DE
CAMUNDONGOS ADULTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Araujo, Diane Costa, 1991-
A663a Ação da melatonina sobre parâmetros testiculares de
2019 camundongos adultos / Diane Costa Araujo. – Viçosa, MG,
2019.

ix, 38 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Testículos. 2. Melatonina. 3. Antioxidante.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
II. Título.


CDD 22. ed. 573.655

DIANE COSTA ARAUJO

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES DE
CAMUNDONGOS ADULTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2019.



Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo
(Coorientadora)



Viviane Gorete Silveira Moura



Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela vida e pela oportunidade de estar realizando este sonho.

Aos meus pais, Manoel e Lucinéia, que sempre me incentivaram e aconselharam. Essa vitória também é de vocês! Aos meus irmãos, Aline, Bruno e Ronan, pelo companheirismo e ajuda nos momentos necessários e meu sobrinho Arthur, motivo de muita alegria em nossas vidas.

Às meninas do Sérgio, Amanda, Ana Luiza, Beth, Grasi, Jana, Fernanda e Vivi. Obrigada pelo apoio e companheirismo durante esse tempo. Obrigada também pela ajuda durante todas as etapas do experimento, nada disso seria possível sem a ajuda de vocês. Muito obrigada!

Ao meu orientador Sérgio, obrigada pela orientação e ensinamentos ao longo desse tempo. Obrigada também pelo cafezinho e pelas conversas e conselhos valiosos.

À Fabiana e Fernanda que aceitaram serem minhas coorientadoras. Obrigada por todo aprendizado e contribuição.

À minha orientadora da graduação Kyvia, obrigada por todo ensinamento, pelo apoio e torcida.

Aos colegas do Laboratório 333, obrigada por todo companheirismo e disponibilidade.

Aos professores do Departamento de Biologia Animal e Biologia Geral por disponibilizarem seus laboratórios, equipamentos e reagentes. A realização deste trabalho não seria possível sem essas parcerias.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições na correção deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Biologia Animal e do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal.

Aos animais utilizados no experimento, fundamentais para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. Introdução Geral	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1 Glândula Pineal e a Produção de Melatonina	2
2.2 Organização testicular	5
2.3 Estresse Oxidativo.....	6
3. Objetivos	8
3.1. Objetivo Geral	8
3.2 Objetivos Específicos.....	8
4. Referências	9
Artigo I.....	13
Ação da melatonina sobre parâmetros testiculares de camundongos adultos.....	13
Introdução	13
Material e métodos	14
Animais	14
Tratamento	14
Coleta de amostras, biometria corporal e dos órgãos.....	14
Processamento do material histológico	15
Histopatologia testicular.....	15
Morfometria e estereologia testicular.....	16
Morfometria tubular	16
Morfometria intertubular	17
Avaliação do estresse oxidativo	18
Análise das enzimas antioxidantes	18
Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA).....	18
Oxido nítrico (ON)	19
Proteína total.....	19
Análises estatísticas.....	19
Resultados	19
Biometria Corporal e Testicular	19
Histopatologia	20

Histomorfometria Tubular	20
Histomorfometria Intertubular	20
Estresse Oxidativo.....	20
Discussão	28
Conclusões	33
Referências	34

RESUMO

ARAÚJO, Diane Costa. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Ação da melatonina sobre parâmetros reprodutivos e testiculares de camundongos adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadoras: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo e Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

A melatonina (MLT) é um hormônio bastante utilizado para o tratamento de distúrbios relacionados ao sono. Este hormônio é naturalmente produzido pelo organismo, na glândula pineal, e sua síntese ocorre exclusivamente durante a noite sendo inibida pela luz. A forma rítmica com que a MLT é sintetizada e secretada fornece informações importantes para o organismo sobre a hora do dia e época do ano, sendo importantes para a regulação do sono, temperatura corporal e para as alterações sazonais reprodutivas. A MLT distribui-se por todo o organismo, atuando via receptores membranares ou nucleares ou por meio da ligação a proteínas intracelulares. Atua no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, na síntese e secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e dos hormônios gonadotróficos adenohipofisários. Além disso, a MLT secretada pela glândula pineal, ao atingir a circulação, é absorvida pelos testículos, modulando diretamente a atividade testicular. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos da melatonina administrada em dois períodos diferentes sobre os parâmetros testiculares. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos experimentais (n=7 animais/grupo). A MLT foi administrada em dois períodos diferentes, de manhã (06:30) e à tarde (17:30). A distribuição dos grupos foi a seguinte: controle recebeu água destilada; os grupos MM-3, MM-5 e MM-10 receberam 3, 5 e 10 mg/Kg de MLT de manhã; os grupos MT-3, MT-5 e MT-10 receberam as mesmas doses à tarde, ambos por via oral, durante 42 dias. No 43º dia os animais foram eutanasiados. Animais tratados com 3 e 5 mg/Kg de MLT de manhã apresentaram aumento na proporção de túnica própria. Alterações histopatológicas significativas não foram observadas. Animais que receberam 5mg/Kg de melatonina no período da manhã apresentaram aumento na proporção e no volume de tecido conjuntivo, enquanto que os animais tratados com a mesma dose no período da tarde apresentaram aumento no volume de vasos sanguíneos. Os demais parâmetros intertubulares e da célula de Leydig não alteraram. Aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) foi observado nos grupos MM-5, MM-10, MT-3 e MT-10. Entretanto, a atividade da catalase (CAT) e glutational-S-transferase (GST) não diferiu nos grupos quando comparados ao controle. A concentração de óxido nítrico

(NO) não alterou, enquanto a concentração de malondialdeído (MDA) diminuiu no grupo MM-5 quando comparado ao controle. Esses resultados indicam que a MLT promoveu alterações testiculares no túbulo e intertúbulo, porém sem comprometer a espermatogênese e esteroidogênese. A MLT apresentou atividade antioxidante estimulando a atividade da superóxido dismutase e da glutatona-S-transferase e reduziu a formação do malondialdeído, indicando que houve diminuição da formação de lipídios peroxidados.

ABSTRACT

ARAÚJO, Diane Costa. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Action of melatonin on reproductive and testicular parameters of male adult mice.** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-advisers: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo and Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

Melatonin (MLT) is a hormone widely used in the treatment of sleep-related disorders. The body, in the pineal gland, naturally produces this hormone, its synthesis occurs exclusively at night and it is inhibited by light. The rhythmic form with which MLT is synthesized and secreted provides important information for the organism about the time of the day and time of year, essential for the regulation of sleep, body temperature and reproductive seasonal changes. MLT distributed throughout the body and exerts its effects via membrane or nuclear receptors or by binding to intracellular proteins. MLT can act on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, in the synthesis and secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and adenohipophyseal gonadotropin hormones. In addition, MLT secreted by the pineal gland, reaches the circulation, and is taken up by the testis, directly modulating testicular activity. Thus, this study aimed to evaluate possible interferences of MLT administered in two different periods on reproductive parameters. The animals were randomly separated into seven experimental groups (n = seven animals / group). MLT was administered in two different periods, in the morning (06:30 a. m.) and in the afternoon (07:30 p. m.). The distribution of the groups was as follows: control received distilled water; the MM-3, MM-5 and MM-10 groups received 3, 5 and 10 mg / kg of MLT in the morning; groups MT-3, MT-5 and MT-10 received the same doses in the afternoon, both via oral for 42 days. After 42 days, the animals were euthanized. Animals treated with 3 and 5 mg / kg of MLT exhibited increased volumetric density of tunica propria. Significant histopathological alterations were not observed. Animals that received 5 mg / kg of MLT in the morning exhibited an increased in volumetric density and volume of connective tissue, while the animals treated with the same dose in the afternoon showed increased volume of blood vessels. The intertubular and Leydig cell parameters did not change. Superoxide dismutase (SOD) activity increased in the groups MM-5, MM-10, MT-3 and MT-10. However, catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) activity did not differ in the groups when compared to the control. The concentration of nitric oxide (NO) did not change, whereas the concentration of malondialdehyde (MDA) decreased in the MM-5 group when

compared to the control. These results indicate that MLT promoted tubular and intertubular alterations, but without compromising spermatogenesis and steroidogenesis. MLT showed antioxidant activity stimulating superoxide dismutase and glutathione S-transferase activity and reduced malondialdehyde formation, indicating that there was a decrease in peroxidated lipid formation.

1. Introdução Geral

Os distúrbios do sono atualmente atingem cerca de um terço da população mundial sendo, portanto, caracterizados como um problema de saúde pública (Auld et al., 2017). Assim, atualmente, a melatonina (MLT) ou N-acetil-5-metoxitriptamina tem sido utilizada para o tratamento de distúrbios relacionados ao sono como, insônia (Auld et al. 2017; Li et al., 2019), o efeito *jet lag* e problemas advindos de trabalho por turnos (Brown et al., 2009; Reid & Abbott, 2015).

A MLT é uma molécula distribuída por todo o organismo, atuando via receptores ligados à proteína G (MT1 e MT2) expressos em diversos locais do sistema nervoso central e em tecidos periféricos, como a retina e o trato gastrointestinal (Hardeland et al., 2010; Anwar et al., 2015). Ambos os receptores estão envolvidos na sinalização intracelular promovendo a inibição da formação do adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e da atividade da proteína quinase A (Carpentieri et al., 2012). Devido a sua natureza anfipática, a MLT pode atravessar com facilidade as membranas celulares podendo atuar dentro da célula por meio da ligação a receptores nucleares órfãos da superfamília RZR/ROR (Singh & Jadhav, 2014). Ela pode ainda se ligar a proteínas intracelulares como a calmodulina (Carpentieri et al., 2012; Frungieri et al., 2017), calreticulina e tubulina, envolvidas na regulação do citoesqueleto (Pevet et al., 2017).

A MLT é um hormônio sintetizado exclusivamente durante a noite, principalmente pela glândula pineal, sendo sua produção controlada pelo relógio circadiano localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ). Assim, sua síntese é inibida pela exposição à luz, e como consequência, a concentração de MLT circulante é alta durante a noite e baixa durante o dia (Houdek et al., 2016). Em mamíferos a informação fótica é recebida pelas células ganglionares, localizadas na retina, transmitida por via neural para a pineal, modulando o ritmo de secreção da MLT (Frungieri et al., 2017). Uma das principais funções desse ritmo de secreção da MLT é transmitir informações sobre a duração do período escuro diário para os sistemas circadiano e circannual fornecendo, dessa forma, informações sobre a hora do dia e a época do ano ao organismo (Reiter, 1993). Portanto, tais informações são importantes para a regulação do sono, da temperatura corporal e também para alterações sazonais reprodutivas (Anwar et al., 2015).

A reprodução é uma função complexa comandada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG). O hipotálamo é responsável pela secreção de hormônio liberador de

gonadotrofina (GnRH), que estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise (Yu et al., 2018). O LH liga-se à célula de Leydig estimulando a produção de testosterona, enquanto o FSH liga-se à célula de Sertoli, estimulando a sua atividade e o seguimento normal da espermatogênese na gônada masculina (Frungieri et al., 2017). Estudos relatam que a melatonina apresenta efeito antigonadotrófico, inibindo o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Reiter, 1980; Ng & Lo, 1988).

Além da inibição do eixo HHG, estudos demonstram que a MLT age diretamente sobre as células somáticas através de seus receptores, inibindo a síntese de testosterona pela célula de Leydig (Ng & Lo, 1988; Frungieri et al., 2017). Nas células de Sertoli, a MLT pode influenciar a proliferação celular e o metabolismo energético e, conseqüentemente, pode regular a esteroidogênese. (Yu et al., 2018; Deng et al., 2018). Sabe-se que a MLT reduz a expressão de mRNA em células liberadoras de GnRH que expressam receptores para a melatonina (MT1 e MT2) (Roy et al., 2001). Além disso, é capaz de promover alterações ultraestruturais na célula de Leydig de camundongos suíços, inibindo assim a produção de esteroides (Redins et al., 2002). Redução do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio, após a administração de MLT, foi descrita por Mehraein & Negahdar (2011), em camundongos idosos.

Os efeitos da MLT em animais sazonais são bastante estudados, várias pesquisas demonstram os efeitos inibitórios da MLT sobre os testículos (Reiter et al., 1976; Tarmakin et al., 1976; Turek et al., 1976; Stetson et al., 1986). Seu mecanismo de ação nesses animais ocorre sobre o eixo hipotálamo-hipófise e também sobre as células somáticas (Ng & Lo, 1988; Frungieri et al., 2017). Alguns estudos têm avaliado o efeito da melatonina sobre o testículo de animais não sazonais, como ratos e camundongos (Ng & Ooi, 1990; Redins et al., 2002). Entretanto, a avaliação morfológica e estereológica dos componentes dos túbulos e do intertúbulo, e de estresse oxidativo em camundongos administrados com MLT em períodos diferentes, foi pouco explorada. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da MLT, sobre os parâmetros testiculares, com ênfase na espermatogênese e esteroidogênese.

2. Revisão de Literatura

2.1 Glândula Pineal e a Produção de Melatonina

A Melatonina (MLT) é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, embora seja sintetizada em outros locais como a retina, o trato gastrointestinal e o

testículo (Tjimes et al., 1996; Radogna et al., 2010; Sing & Jadhav, 2014). Esta molécula é derivada do aminoácido triptofano e recebeu esse nome devido a sua capacidade de clarear a pele de sapos, causando a agregação de melanina em torno do núcleo dos melanócitos (Lerner et al., 1958; Lerner et al., 1960).

A síntese da MLT na células parenquimatosas da pineal é controlada pelo ciclo claro-escuro por meio da ativação neural do hipotálamo anterior através dos axônios das células ganglionares da retina que percorrem os nervos ópticos formando o trato retino-hipotalâmico (Reiter, 1991; Carpentieri et al., 2012). O núcleo supraquiasmático é conectado à glândula pineal através de núcleos paraventriculares e dos neurônios pré-ganglionares simpáticos. A noradrenalina liberada pelas fibras simpáticas pós-ganglionares na membrana dos pinealócitos estimula seus adrenoreceptores, levando à formação de cAMP, bem como outros mensageiros secundários, que estimulam a expressão e atividade da N-acetiltransferase (AANAT), enzima responsável pela conversão de serotonina em N-acetilserotonina (NAS) (Sing & Jadhav, 2014). Com a ajuda adicional de hidroxindol-O-metil transferase (HIOMT), também conhecida como acetil-serotonina-N-metiltransferase (ASMT), a NAS é convertida em melatonina (Figura 1) (Reiter, 1991;).

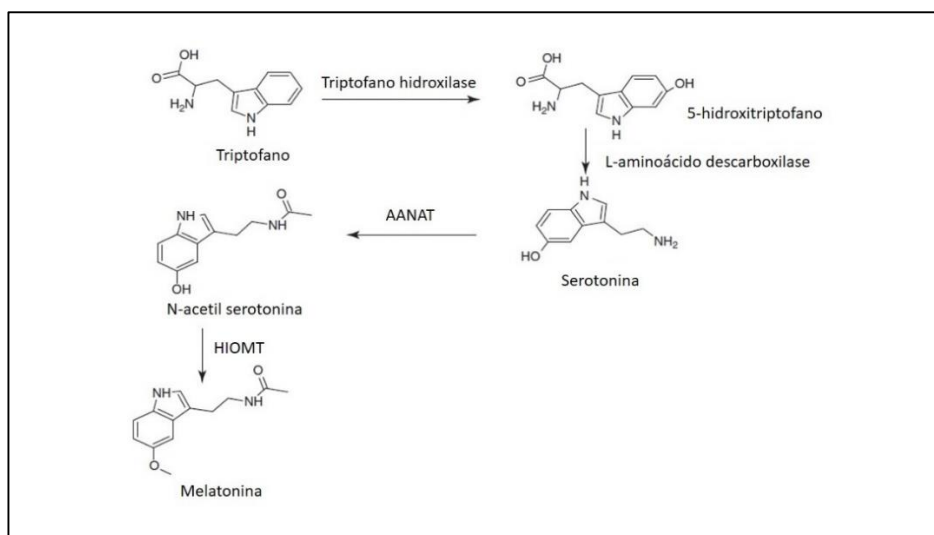


Figura 1. Biossíntese de melatonina a partir do triptofano. O triptofano é convertido via hidroxilação em 5-hidroxi triptofano, o qual é posteriormente convertido em serotonina utilizando a enzima aromática L-aminoácido descarboxilase. A serotonina é ainda acetilada pelas enzimas aralquilamina N-acetil transferase (AANAT) ou serotonina N acetil transferase (SNAT). Finalmente, com a ajuda de hidroxí-indol-O-metil transferase (HIOMT) ou acetil-serotonina-N-metiltransferase (ASMT), ocorre a biossíntese da melatonina.

A forma como a MLT é sintetizada foi um dos primeiros ritmos biológicos caracterizados como um ritmo circadiano (Pevet et al., 2017). Em todos os vertebrados, de hábitos noturnos ou diurnos, a produção da melatonina é exclusivamente noturna, sendo sua síntese e secreção dependentes unicamente do período escuro (Reiter, 1993). Dessa forma a MLT apresenta uma variação circadiana e sazonal que modifica de acordo com a duração do fotoperíodo e fornece informações temporais ao organismo, permitindo a adaptação das funções fisiológicas às variações do ciclo claro-escuro (Arendt, 1998). Uma vez sintetizada pela glândula pineal, a MLT é secretada na corrente sanguínea. Por ser uma molécula lipofílica, a MLT rapidamente atinge outros fluidos corporais como o líquido cefalorraquiano, o sêmen e a saliva (Reiter, 1991). A concentração de MLT no sangue é reflexo da sua síntese pela pineal, de forma que durante a noite ela é elevada, enquanto durante o dia é encontrada em baixas concentrações (Carpentieri et al., 2012).

O metabolismo da MLT circulante ocorre no fígado, onde é hidroxilada e excretada como um conjugado sulfatado que será encaminhado aos rins e eliminado na forma de 6-sulfatoximelatonina (Reiter, 1991; Sing & Jadhav, 2014). No sistema nervoso central a MLT é degradada via clivagem oxidativa do anel pirrólico dando origem a N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). A AFMK é posteriormente convertida em 5-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK). Tanto AFMK quanto o AMK, interagem com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio apresentando, portanto, atividade antioxidante (Carpentieri et al., 2012; Singh & Jadhav, 2014).

A ação da MLT em órgãos e células-alvo pode se dar por meio da receptores melatoninérgicos de membrana, que podem ser do tipo MT1 ou MT2. Porém, por ser uma molécula anfipática, a MLT é capaz de atravessar a membrana plasmática, atuando diretamente sobre os diferentes alvos celulares no citosol (Carpentieri et al., 2012). Sendo esse efeito direto relacionado ao seu papel antioxidante (Aitken & Roman, 2008). Visto que a MLT é um hormônio distribuído por todo o organismo, ela apresenta uma variedade de funções, que incluem o controle do ritmo circadiano (Pevet et al. 2017) e sazonalidade (Claustrat & Leston, 2015). Estudos demonstram também a sua atividade antioxidante (Reiter et al., 2003; Reiter et al., 2016). Uygur et al. (2013) relataram que a melatonina apresentou efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido pelo arsênio no testículo de ratos.

2.2 Organização testicular

O testículo é a gônada masculina, responsável pela síntese de andrógenos, que atuam na manutenção da função reprodutiva e das características sexuais secundárias masculinas (Russell & França, 1995), assim como pela produção dos espermatozoides, que são importantes para a preservação da espécie (Lara et al., 2017). O testículo de mamíferos é recoberto por uma cápsula fibrosa, denominada albugínea, que é composta principalmente por colágeno com alguns elementos fibroblásticos (Lara et al., 2017). A parte funcional do testículo, denominada parênquima, é dividida em dois compartimentos: o tubular e o intertubular, sendo o primeiro composto por túbulos seminíferos onde estão localizadas as células da linhagem germinativa e as células de Sertoli, e o segundo que contém as células de Leydig, responsáveis pela secreção de testosterona, além de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, macrófagos, bem como fibroblastos e fibras do tecido conjuntivo (Li & Zhou, 2015).

Os túbulos seminíferos são constituídos por três tipos principais de células: células mioides ou peritubulares, células de Sertoli e células germinativas (Smith & Walker, 2014). As células mioides circundam a parede externa do túbulo, e apresentam capacidade de contração auxiliando na expulsão dos espermatozoides contidos no lúmen do túbulo. As células de Sertoli fornecem os fatores necessários para a proliferação e diferenciação das células germinativas. Juntas, as células de Sertoli e as células mioides, formam a membrana basal que serve de suporte estrutural para as células germinativas basais e para a própria célula de Sertoli. O citoplasma da célula de Sertoli se projeta desde a porção basal até o lúmen, envolvendo as células germinativas em desenvolvimento (Russell et al., 1990; Russell & França, 1995). Por meio de junções celulares especializadas, junções de oclusão, formadas entre células de Sertoli adjacentes, ocorre a divisão do epitélio seminífero em dois ambientes: o basal e o adluminal (Russell et al., 1990). No ambiente basal se encontram espermatogônias e espermatócitos em preleptóteno. O ambiente adluminal constitui um local isolado do sistema imune, garantindo o desenvolvimento do processo espermatogênico. Além disso, as células de Sertoli também realizam a nutrição das células germinativas presentes nesse ambiente (Russell & Peterson, 1985).

No compartimento intertubular as células de Leydig são responsáveis pela síntese de testosterona em resposta à estimulação do LH (Lara et al. 2017). A testosterona tem ação parácrina difundindo-se dos espaços linfáticos para os túbulos seminíferos, e endócrina quando é lançada para os vasos sanguíneos do compartimento intertubular. Os

efeitos da testosterona são mediados por receptores de andrógenos que estão presentes nas células de Sertoli, no entanto estes não se encontram nas células da linhagem germinativa. Dessa forma, elevadas concentrações de testosterona são necessárias para o processo espermatogênico (Smith & Walker, 2014), que é dividido em três fases: a proliferativa, na qual as células germinativas sofrem sucessivas divisões mitóticas; a meiótica, onde o material genético é recombinado; e a de diferenciação (ou espermiogênese), na qual as espermatídes se transformam em espermatozoides (Russell et al., 1990).

O desenvolvimento testicular e a produção dos espermatozoides são controlados, em grande parte, por uma complexa rede de processos de sinalização que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Yu et al., 2018). As células de Sertoli e as células de Leydig são alvos de hormônios liberados pela hipófise. Assim, o LH liga-se às células de Leydig estimulando a produção de andrógenos, e o FSH age nas células de Sertoli, estimulando sua atividade secretora e por consequência a progressão da espermatogênese (Frungieri et al., 2017).

Além das funções estabelecidas pelos hormônios produzidos e secretados pelo hipotálamo e pela hipófise, várias evidências sugerem que a glândula pineal também seja importante para o desenvolvimento testicular, por meio da secreção da MLT (Li & Zhou, 2015). Visto que este hormônio atua na síntese e secreção do GnRH e dos hormônios gonadotróficos adenohipofisários. Além disso, a MLT secretada pela glândula pineal ao atingir a circulação é absorvida pelos testículos, modulando diretamente a atividade testicular (Frungieri et al., 2017).

2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no equilíbrio entre a ocorrência de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação, por meio do sistema de defesa antioxidante (Betteridge, 2000; Piscochi & Pop, 2015). Os radicais livres são moléculas químicas que apresentam elétrons não pareados, tornando-os altamente reativos, sendo os exemplos mais comuns o radical hidroxila (OH^\cdot) e o ânion superóxido (O_2^\cdot) (Betteridge, 2000). Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não seja um radical livre, por não apresentar elétron desemparelhado, ele é um metabólito extremamente deletério, que participa da reação que produz OH^\cdot (Ferreira & Matsubara, 1997).

Os radicais livres em concentrações moderadas são importantes para processos fisiológicos, estando envolvidos no processo de sinalização celular (Schieber & Chandel, 2014). Entretanto, quando em excesso podem causar estresse oxidativo, que está relacionado ao surgimento de patologias, podendo causar danos ao DNA, lipídios e proteínas (Ahmad & Maqbool, 2017). Alguns radicais livres, como as EROs, são gerados como subprodutos do metabolismo que ocorre na cadeia transportadora de elétrons presente nas mitocôndrias, por meio do citocromo P450 ou como subprodutos da NADPH oxidase, localizado em diversos tipos celulares (Mittal et al., 2014).

No organismo há um eficiente sistema de defesa antioxidante composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione-S-transferase (GST) e por moléculas não enzimáticas, como as vitaminas C e E (Golli-Bennour & Bacha, 2011). A SOD é responsável pela conversão do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é convertido em água (H_2O) e oxigênio (O_2) pela CAT (Aitken & Roman, 2008). Sendo a ação de ambas caracterizada como parte da primeira linha de defesa antioxidante (Sharma et al., 2004). Os radicais livres que escapam da primeira linha de defesa podem desencadear uma cadeia autocatalítica de peroxidação lipídica. Assim, nesse momento entra em ação a segunda linha de defesa antioxidante pela atuação, por exemplo, da GST, sendo esta enzima, importante na defesa contra a peroxidação lipídica (Sharma et al., 2004).

Segundo Reiter et al., (2003) a MLT pode atuar por meio de vários mecanismos para reduzir o estresse oxidativo: (a) eliminação direta de radicais livres; (b) estimulação indireta da atividade de enzimas antioxidantes; (c) aumento da eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial (diminuindo assim a geração de radicais livres) e (d) aumentando a eficiência de outros antioxidantes, como as vitaminas C e E. Assim, o mecanismo de ação da MLT na eliminação de radicais livres, como EROs e ERNs, se dá pela doação de seus elétrons para estes radicais e, além disso, os metabólitos gerados nesse processo também apresentam capacidade de eliminação de radicais livres semelhante à da MLT (Reiter et al., 2016).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração de melatonina, em dois períodos diferentes (manhã e tarde), sobre os testículos de camundongos adultos, por meio de análises biométricas, histopatológicas, histomorfométricas e de estresse oxidativo.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a biometria corporal e testicular
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES) e Leydigossomático (ILS);
- Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos, diâmetro luminal e a altura do epitélio seminífero;
- Obter a proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e intertubulares;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos e o comprimento total de túbulo por grama de testículo;
- Mensurar o diâmetro, volume nuclear e citoplasmático da célula da Leydig, e o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Realizar avaliação histopatológica do testículo;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, e glutathione S-transferase;
- Mensurar a concentração de malondialdeído e de óxido nítrico nos testículos.

4. Referências

- Ahmad, S.; Maqbool, A. Free radical injury and oxidative stress: a review. *Global Journal For Research Analysis*, 6 (9), 50 – 51, 2017.
- Aitken, R. J.; Roman, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1), 15 – 24, 2008.
- Anwar, M. J.; Muhammad, B. Y.; Bader, A. A.; Abulghani, M.; Mahmood D.; Haider, M. An insight into the scientific background and future perspectives for the potential uses of melatonin. *Egyptian Journal of Basic and Applied Science*, 2, 139 – 152, 2015.
- Arendt, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 3, 13 – 22, 1998.
- Auld, F.; Maschauer, E. L.; Morrison, I.; Skene, D. J.; Riha, R. L. Evidence for the efficacy of melatonin in the treatment of primary adult sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*, 34, 10-22, 2017.
- Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49 (2), 3 – 8, 2000.
- Brown, G. M.; Pandi-Perumal, S. R.; Trakht, I.; Cardinali, D. P. Melatonin and its relevance to *jet lag*. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7, 69 – 81, 2009.
- Carperntieri, A.; Barboza, G. D.; Areco, V.; López, M. P.; Talamoni, N. T. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*, 65, 437-444, 2012.
- Claustrat, B.; Leston, J. B. Melatonin: physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 65, 77 – 84, 2015.
- Deng, S.; Wang, Z.; Jin, C.; Kang, X.; Batool, A.; Zhang, Y.; Li, X.; Wang, X.; Chen, S.; Chang, C.; Cheng, C. Y.; Lian, Z. Liu, Y. Melatonin promotes sheep Leydig cell testosterone secretion in a co-culture with Sertoli cells. *Theriogenology*, 106, 170 – 177, 2018.
- Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43 (1), 61 – 68, 1997.
- Frungieri, M. B.; Calandra, R. S.; Rossi, S. P. Local actions of melatonin in somatic cells of the testis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-17, 2017.
- Golli-Bennour, E. E.; Bacha, H. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology*, 287, 1 – 7, 2011.

Hardeland, R.; Cardinali, D. P.; Srinivasan, V.; Spende, D. W.; Brown, G. M.; Pandi-Perumal, S. R.D. Melatonin – a pleiotropic, orchestrating molecule. *Progress in Neurobiology*, 93, 350-384, 2010.

Houdek, P.; Nováková, M.; Polidarová, L.; Sládek, M.; Sumová, A. Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Hormones and Behavior*, 83, 1-5, 2016.

Lara, N. L. M.; Costa, G. M. J.; Avelar, G. F.; Lacerda, S. M. S. N.; Hess, R. A.; Franca, L. R. Testis physiology : overview and histology. *Encyclopedia of Reproduction*, 1, 105 – 116, 2017.

Lerner, A. B.; Case, J. D.; Takahashi, Y.; Lee, T. H.; Mori, W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 80 (10), 2587, 1958.

Lerner, A. B.; Case, J. D.; Takahashi, Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *The Journal of Biological Chemistry*, 235 (7), 1960.

Li, X.; Zhou, X. Melatonin and male reproduction. *Clinica Chimica Acta*, 446, 175 – 180, 2015.

Li, T.; Jiang, S.; Han, M.; Yang, Z.; Lv, J.; Deng, C.; Reiter, R. J.; Yang, Y. Exogenous melatonin as a treatment for sleep disorders: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 52, 22 – 28, 2019.

Mehraein, F.; Negahdar, F. Morphometric evaluation of seminiferous tubules in aged mice testes after melatonin administration. *Cell Journal*, 13(1), 1-4, 2011.

Mittal, M.; Siddiqui, M. R.; Tran, K.; Reddy, S. P.; Malik, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20 (7), 1126 – 1167, 2014.

Ng, T. B.; Lo, L. L. H. Inhibitory actions of pineal indoles on steroidogenesis in isolated rat Leydig cells. *Journal of Pineal Research*, 5, 229 – 243, 1988.

Ng, T. B.; Ooi, V. E. C. Effect of pineal indoles on testicular histology of mice. *Archives of Andrology*, 25, 137 – 145, 1990.

Pevet, P.; Klosen, P.; Felder-Schittbuhl, M. P. P. The hormone melatonin: animal studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31, 547-559, 2017.

Pisochi, A. M.; Pop, A. The role of antioxidant in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55 – 74, 2015.

Radogna, F.; Diederich, M.; Ghibelli, L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1844 – 1852, 2010.

Redins, C. A.; Redins, G. M.; Novaes, J. C. The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Brazilian Journal of Biology*, v. 63 (3), 517 – 523, 2002.

Reid, K. J.; Abbott, S. M. Jet lag and shift work disorder. *Sleep Medicine Clinics*, 10 (4), 523 – 535, 2015.

Reiter, R. J.; Blask, D. E.; Johnson, L. Y.; Rudden, P. K.; Vaughan, M. K.; Waring, P. J. Melatonin inhibition of reproduction in the male hamster : its dependency on time of day of administration and on an intact and sympathetically innervated pineal gland. *Neuroendocrinology*, 22, 107 – 116, 1976.

Reiter, R. J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Reviews*, 1 (2), 109 - 131, 1980.

Reiter, R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 79, 153-158, 1991.

Reiter, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49 (8), 654–664, 1993.

Reiter, R. J.; Mayo, J. C.; Tan, D.; Sainz, R. M.; Alatorre-Jimenez, M.; Qin, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*, 61 (3), 253-278, 2016.

Reiter, R. J.; Tan, D.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Leon, J.; Czarnocki, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50 (4), 1129 – 1146, 2003.

Roy, D.; Angelini, N. L.; Fujieda, H.; Brown, G. M; Belsham, D. D. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1–7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology*, 142 (11), 4711-4720, 2001.

Russell, L. D.; Peterson, R. N. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International Review of Cytology*, 94, 177 – 211, 1985.

Russell, L. D.; Ettl, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Bolesta: Cache River Press*, 1 – 40, 1990.

Russell, L. D.; França, L. R. Building a testis. *Tissue and Cell*, 27 (2), 129 – 147, 1995.

Schieber, M.; Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24 (10), 453 – 462, 2014.

Sharma, R.; Yang, Y.; Sharma, A.; Awasthi, S.; Awasthi, Y. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6 (2), 289 – 300, 2004.

Singh, M.; Jadhav, H. R. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discovery Today*, 19(9), 1410 – 1418, 2014.

Smith, L. B.; Walker, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2 – 13, 2014.

Stetson, M. H.; Sarafidis, E.; Rollag, M. D. Sensitivity of adult male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*) to melatonin injections throughout the day: effects in the reproductive system and the pineal. *Biology of Reproduction*, 35, 618 – 623, 1986.

Tarmakin, L.; Westrom, W. K.; Hamill, A. I.; Goldman, B. D. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology*, 99 (6), 1534 – 1541, 1976.

Tjimes, M.; Pedraza, R.; Valladares, L. Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. *Steroids*, 61, 65 – 68, 1996.

Turek, F. W.; Desjardins, C.; Menaker, M. Differential effects of melatonin on the testis of photoperiodic and nonphotoperiodic rodents. *Biology of Reproduction*, 15, 94-97, 1976.

Uygur, R.; Aktas, C.; Caglar, V.; Uygur, E.; Erdogan, H.; Ozen, O. A. Protective effects of melatonin against arsenic-induced apoptosis and oxidative stress in rat testes. *Toxicology and Industrial Health*, 32(5), 848 – 859, 2016.

Yu, K.; Deng, S.; Sun, T.; Li, Y.; Liu, Y. Melatonin regulates the synthesis of steroid hormones on male reproduction: A Review. *Molecules*, 23 (447), 1 – 7, 2018.

Ação da melatonina sobre parâmetros testiculares de camundongos adultos

Introdução

A melatonina (MLT) ou N-acetil-5-metoxitriptamina é um hormônio que, embora seja sintetizado em outros órgãos, como o testículo (Tjimes et al., 1996), tem como local principal de síntese a glândula pineal (Radogna et al., 2010; Sing & Jadhav, 2014). A MLT tem sido amplamente utilizada para o tratamento de distúrbios relacionados ao sono (Brown et al., 2009; Reid e Abbott, 2015; Auld et al., 2017; Li et al., 2019) devido às suas propriedades soporíferas e cronobióticas (Cajochen et al., 2003).

A MLT é amplamente distribuída pelo organismo devido à sua natureza anfipática. Uma vez sintetizada pela pineal ela rapidamente se difunde, atingindo a corrente sanguínea e outros fluidos corporais bem como outros tecidos periféricos (Reiter, 1991). Sua síntese ocorre exclusivamente durante a noite, sendo inibida pela luz e controlada pelo relógio circadiano localizado no núcleo supraquiasmático (SNQ). Assim, a MLT apresenta uma variedade de funções que incluem o controle dos ritmos circadianos (Pevet et al., 2017), sazonalidade (Claustrat & Leston, 2015) e atividade antioxidante (Reiter et al., 2016).

A reprodução é uma função altamente complexa, regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada por meio da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH), estes irão atuar sobre as células de Leydig e de Sertoli, respectivamente (Revel, et al., 2009; Yu et al., 2018). Em animais sazonais o fotoperíodo (duração do dia), através das mudanças na secreção de MLT, é um fator que influencia na reprodução, podendo inibir a atividade testicular (Frungieri et al., 2017). Assim, os efeitos da MLT em animais sazonais, como o hamster, são amplamente estudados (Reiter et al., 1976; Tamarkin et al., 1976; Stetson & Tay, 1983). Nesses animais os efeitos inibitórios da melatonina na gônada masculina dependem da hora em que é administrada (Reiter, 1976). Em animais sazonais e não sazonais, além do horário da administração da MLT, a idade também parece ser um fator que influencia seus efeitos nos testículos (Lang et al., 1984).

Estudos têm avaliado o efeito da MLT sobre o testículo de animais não sazonais, como ratos e camundongos. Lang et al., (1984) relataram redução do peso de testículos,

vesícula seminal e nos níveis plasmáticos de testosterona, LH e FSH de ratos que foram tratados com MLT em horários diferentes. Redução no volume nuclear da célula de Leydig acompanhada pela redução de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias, em camundongos que receberam MLT, foram observados por Redins et al. (2002). Entretanto, a avaliação morfométrica e estereológica dos componentes dos túbulos seminíferos e do intertúbulo e de estresse oxidativo de camundongos submetidos à MLT em períodos diferentes, foi pouco explorada. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da administração da MLT em períodos diferentes, sobre os parâmetros testiculares, com ênfase na espermatogênese e esteroidogênese.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados 49 camundongos machos Balb/c com 120 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral, sob condições-padrão de dieta (água e ração *ad libitum*), de luminosidade (12h/12h de luz/escuro) e de temperatura (20-22°C).

Tratamento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos experimentais (n=7 animais/grupo), pesados e colocados em gaiolas individuais de prolipropileno. O tratamento foi administrado em dois períodos diferentes, de manhã e à tarde. A distribuição dos grupos foi a seguinte: Controle recebeu água destilada; MM-3, MM-5 e MM-10 que receberam 3, 5 e 10 mg/Kg de MLT de manhã; MT-3, MT-5 e MT-10 que receberam as mesmas doses à tarde, todos por via oral, durante 42 dias. Os tratamentos do período da manhã foram administrados às 06:30 e os tratamentos do período da tarde às 17:30. Todo o procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV (protocolo 08/2019).

Coleta de amostras, biometria corporal e dos órgãos

Ao final do período de 42 dias os animais foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte) e eutanasiados. Os animais foram sedados e anestesiados com tiopental sódico 30mg/Kg intraperitoneal. A anestesia foi aprofundada seguida da coleta do sangue por meio de punção cardíaca levando os animais a morte por exsanguinação.

O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos e congelados a -20°C, para análises séricas.

Em seguida, foi realizada incisão escrotal para a retirada dos testículos. De cada animal o testículo direito foi congelado (-80°C) para realização das análises de estresse oxidativo, enquanto que o esquerdo foi fixado em solução Karnovsky para processamento histológico.

Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada do testículo fixado e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular, foi calculado o índice gonadossomático (IGS), a partir da equação: $IGS (\%) = PG / PC \times 100$, onde PG= Peso total das gônadas e PC= Peso corporal. O índice parenquimossomático (IPS), foi obtido a partir da equação: $IPS (\%) = PPT / PC \times 100$, onde PPT= Peso do parênquima dos dois testículos e PC= Peso corporal (Amann, 1970).

Processamento do material histológico

Fragmentos testiculares fixados em Karnovsky, destinados ao estudo em microscopia de luz, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens dos testículos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa Image J®.

Histopatologia testicular

Para a avaliação histopatológica do testículo foram contados 200 túbulos por animal e classificados em três categorias: patologias leves (vacúolos na base, vacúolos no ápice e vacúolos na base e no ápice), moderada (desprendimento de epitélio e túbulos apenas com células basais) e graves (túbulos apenas com células de Sertoli e túbulos desprovidos de células de Sertoli ou células germinativas), adaptado do índice de Johnsen (1970). Os resultados foram expressos em percentuais.

Morfometria e estereologia testicular

Morfometria tubular

A proporção volumétrica dos elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 5320 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100X, realizando-se a contagem de 20 campos aleatoriamente distribuídos, nas preparações. Foram contados pontos coincidentes sobre a túnica própria, epitélio seminífero e lúmen (compartimento tubular) e pontos no compartimento intertubular. A proporção volumétrica desses componentes foi obtida utilizando-se a seguinte equação: Proporção volumétrica (%) = (NT / NTT) x 100, onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT= Número de pontos totais contados.

Para cálculo dos volumes de túbulo seminífero e intertúbulo, bem como dos elementos que os compõem, foi utilizada a equação: Volume= % do elemento x PPT /100, onde PPT= Peso do parênquima de 2 testículos. Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Johnson et al., 1981), considerou-se a massa do testículo igual ao seu volume.

O índice tubulossomático (ITS) foi calculado a partir da fórmula $ITS (\%) = VT/PC \times 100$ (VT = Volume de túbulo seminífero e PC = Peso corporal) (Amann, 1970). O índice epiteliossomático (IES) foi obtido pela seguinte fórmula: $IES = VE/PC \times 100$ (VE = Volume de epitélio seminífero e PC = Peso corporal).

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir da mensuração de 20 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Uma vez que o diâmetro tubular permanece constante em camundongos machos adultos, em todo o ciclo do epitélio seminífero, não é necessário considerar a fase do epitélio dentro do ciclo (França e Russell, 1998). Estas secções também foram usadas para medir a altura do epitélio seminífero, a partir da túnica própria até o lúmen tubular, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal. Para determinar o diâmetro do lúmen subtraiu-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero (Mouro et al., 2017).

A área de túbulo seminífero foi calculada pela seguinte fórmula: $AT = \pi \cdot (RT^2)$, em que AT = área de túbulo seminífero, RT = raio tubular, enquanto que a área de lúmen calculada pela fórmula: $AL = \pi \cdot (RL^2)$, onde AL = área de lúmen, RL = raio luminal. A área de epitélio foi obtida subtraindo-se da área do túbulo seminífero a área do lúmen. Os

resultados de área foram expressos em milímetro quadrado (μm^2). A relação túbulo epitélio foi determinada dividindo-se a área tubular pela área de epitélio.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos nos dois testículos (CTS/t), foi estimado a partir do conhecimento prévio do volume ocupado por estas estruturas dentro do parênquima, bem como a partir do diâmetro tubular médio: $VT/\pi r^2$ (VTS = volume do túbulo seminífero; πr^2 = área do túbulo seminífero; r = diâmetro/2) (Attal e Courot, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

Morfometria intertubular

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, realizando-se a contagem de campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Pontos coincidentes sobre os componentes intertubulares foram registados para núcleo e citoplasma da célula de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo, obtendo-se as proporções volumétricas entre estes por meio da equação: $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\%IT \times \%PVI) / 100$, onde %IT= Proporção volumétrica de intertúbulo no testículo e %PVI= Proporção volumétrica do componente no intertúbulo.

Baseado nos volumes de células de Leydig e nos pesos corporais foi calculado o índice Leydigossomático a partir da equação: $ILS = (VCL / PC) \times 100$, onde VCL= Volume de células de Leydig nos dois testículos e PC= Peso corporal.

O diâmetro nuclear médio, em μm , das células de Leydig foi medido em aumento de 400x, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram mais esféricos e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. Foram calculados os volumes nuclear ($VNL = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear) e citoplasmático ($VCL = \% \text{ citoplasma} \times VNL / \% \text{ núcleo}$) e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig (VL), somando-se VNL e VCL, sendo os valores expressos em μm^3 .

O volume que a célula de Leydig ocupa nos dois testículos (VLT), em μL , foi calculado a partir da fórmula: $VLT = (\%Ley \times PPT) / 100$, onde %Ley= Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e PPT= Peso do parênquima de 2 testículos. O volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (VL/gT), em

μL , foi calculado a partir da fórmula: $\text{VL/gT} = \text{VLT} / \text{PT}$, onde VLT = Volume que a célula de Leydig ocupa por testículo, e PT = peso de 2 testículos.

De posse do volume individual da célula de Leydig e do volume total ocupado por estas células no testículo, foram calculados o número de células de Leydig por testículo (NL) e por grama de testículo (NLg/T), por meio da seguinte equação: $\text{NL} = \text{VLT} / \text{VL}$, onde: VLT = Volume de Leydig por testículo e VL = Volume de uma célula de Leydig. $\text{NLg/T} = \text{NL} / \text{PT}$, onde PT = Peso de 2 testículos.

Avaliação do estresse oxidativo

O testículo foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7.4 - 0,1M), na proporção de 100 mg de órgão para 1000 μL , centrifugado a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante utilizado nas análises da determinação da atividade de enzimas antioxidantes, concentração de óxido nítrico, malondialdeído e proteína total.

Análise das enzimas antioxidantes

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm baseado na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- em H_2O_2 e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000). Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por Dieterich et al. (2000), medindo a cinética da decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 60s, em espectrofotômetro a 240 nm.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida por leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Habig et al., 1974) e calculada a partir da taxa de formação do conjugado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

Determinação do produto de estresse oxidativo – Malondialdeído (MDA)

Ao homogenato foi adicionada solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e ácido clorídrico 0,25 M), sendo posteriormente aquecido em água fervente por 40 minutos a 90°C, resfriado, adicionado álcool butílico (600mL), agitado em vortex e centrifugado a 6000 rpm. A fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ($\lambda = 532\text{nm}$). A concentração de MDA

foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína (Buege & Aust, 1978).

Oxido nítrico (ON)

O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H_3PO_4 . Desta forma, 50 μL do sobrenadante das amostras foram adicionados em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida o teor de ON foi determinado em leitor de microplacas ($\lambda=540$ nm). A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μM (Ricart-Jané et al., 2002; Droge, 2002).

Proteína total

A proteína total dos sobrenadantes de SOD, CAT e MDA foi mensurada, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão (Lowry et al., 1951).

Análises estatísticas

Os parâmetros foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o software STATISTICA, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão

Resultados

Biometria Corporal e Testicular

Os dados biométricos, corporal e testicular estão representados na Tabela 1. Não foram observadas variações significativas entre os grupos controle, tratados com MLT, quanto ao peso corporal, peso testicular, peso da albugínea, peso do parênquima assim como para o IGS e IPS.

Histopatologia

Não foram observadas alterações significativas quanto as patologias avaliadas nos grupos tratados com melatonina de manhã e à noite (Figura 1A). Algumas das patologias encontradas, como vacúolos, desprendimento do epitélio seminífero e túbulos desprovidos de células, são observadas na Figura 1B.

Histomorfometria Tubular

Os parâmetros de proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e ITS e IES se encontram na Tabela 2. Houve aumento na proporção de túnica própria no grupo MM-3 quando comparado ao controle. O grupo MM-5 também apresentou aumento na proporção de túnica própria que refletiu no aumento do volume de túnica própria nesse grupo em relação ao controle. Não houve alterações nos demais parâmetros de proporção e volume dos componentes tubulares e nos índices ITS e IES.

Os tratamentos com MLT, em diferentes horas do dia, não provocaram alterações nos diâmetros tubulares, altura de epitélio, assim como nas suas respectivas aéreas, no CTS/t e na RTE (Tabela 3).

Histomorfometria Intertubular

Com relação aos parâmetros histomorfométricos intertubulares, o grupo MM-10 apresentou aumento na proporção e no volume de tecido conjuntivo em relação ao grupo controle. A proporção de vaso sanguíneo aumentou no grupo MT- 5 quando comparado ao grupo controle e em relação aos grupos MM-5, MT-3 e MT-10. O volume de vaso sanguíneo aumentou no grupo MT-5 em comparação ao controle. Os demais parâmetros não apresentaram alteração (Tabela 4).

Os tratamentos com MLT em diferentes períodos, manhã e noite, não alteraram os parâmetros estereológicos das células de Leydig (Tabela 5).

Estresse Oxidativo

Os dados de estresse oxidativo são apresentados na Figura 2. A atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentou nos grupos MM-5, MM-10, MT-3 e MT-10 quando comparados ao grupo controle. Não foram observadas alterações significativas na atividade da catalase (CAT), observou-se aumento na atividade da glutathione-S-transferase (GST) nos grupos MM-5 e MM-10 em relação ao grupo MT-5. Houve redução na concentração de malondialdeído (MDA) no grupo MM-5 em relação ao grupo controle. O óxido nítrico (ON) não apresentou variação significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 1. Parâmetros biométricos, corporais e testiculares de camundongos Balb/c tratados com melatonina de manhã ou à tarde

Parâmetros	Controle	MM-3	MM-5	MM-10	MT-3	MT-5	MT-10
PC (g)	40,21±3,16	35,91±5,88	39,70±2,95	41,99±1,89	41,21±2,98	35,89±3,48	41,89 ±2,16
PT (g)	0,23±0,04	0,21±0,03	0,23±0,03	0,26±0,03	0,23±0,03	0,24±0,04	0,21±0,01
PA (g)	0,03±0,01	0,02±0,00	0,03±0,01	0,03±0,01	0,02±0,00	0,03±0,01	0,03±0,01
PP (g)	0,20±0,03	0,19±0,03	0,20±0,03	0,22±0,02	0,20±0,03	0,21±0,04	0,19±0,02
IGS (%)	0,57±0,05	0,59±0,09	0,59±0,10	0,61±0,04	0,55±0,09	0,67±0,08	0,52±0,03
IPS (%)	0,50±0,08	0,53±0,08	0,51±0,10	0,53±0,04	0,49±0,07	0,59±0,07	0,46±0,04

Controle (água destilada); MM-3 – Melatonina-Manhã 3mg/kg; MM-5 – Melatonina-Manhã 5mg/kg; MM-10 – Melatonina-Manhã 10mg/kg; MT-3 – Melatonina-Tarde – 3mg/kg; MT-5 – Melatonina-Tarde 5mg/kg; MT-10 – Melatonina-Tarde 10mg/kg; PC – Peso corporal; PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea; PP – Peso do parênquima testicular; IGS – Índice gonadossomático; IPS – Índice parenquimossomático. Dados expressos como média±DP (p> 0,05)

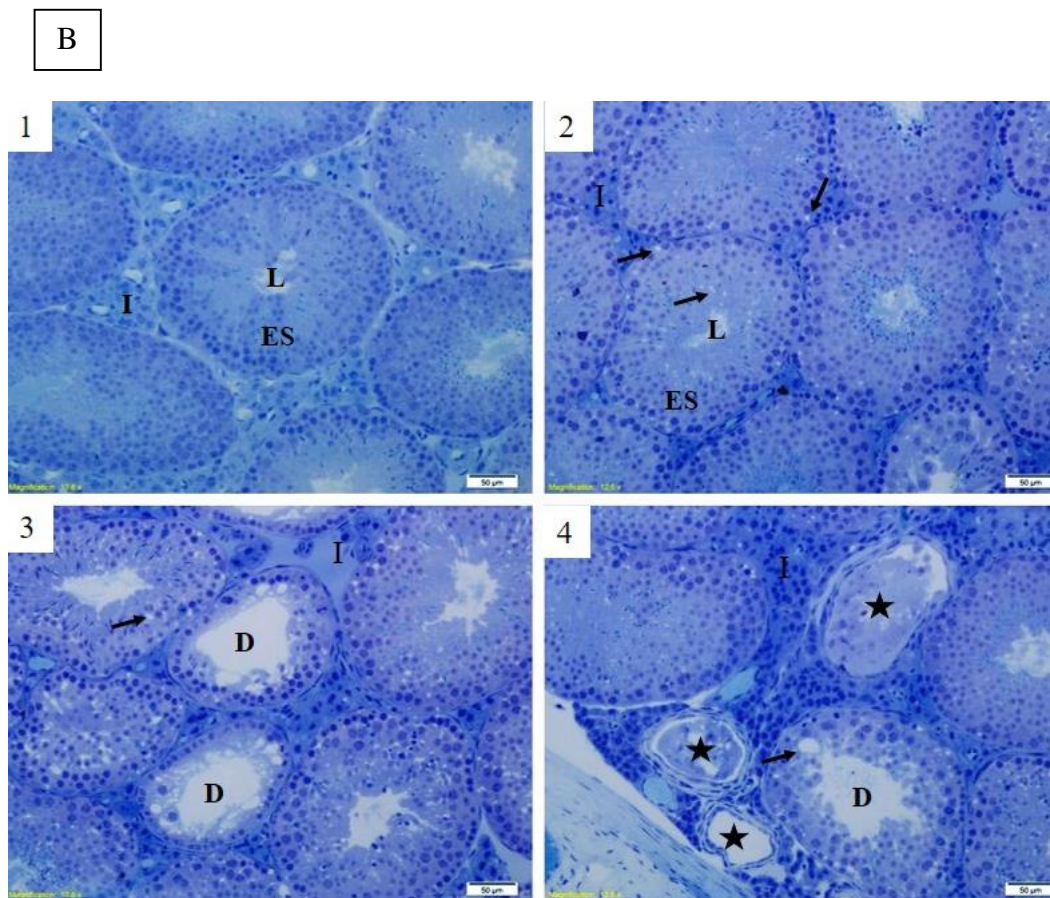
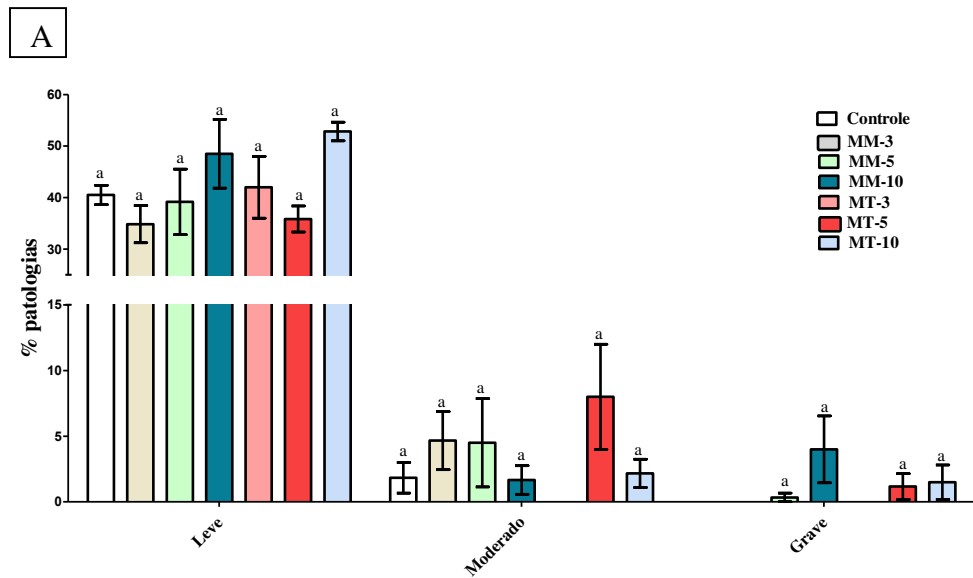


Figura 1: A- Proporção dos túbulos com patologias nos testículos de camundongos Balb/c tratados com melatonina de manhã ou à noite. Dados expressos como média \pm DP ($p > 0,05$). B – Secções histológicas dos testículos do grupo controle (B1), túbulos de animais tratados com patologias leves (B2), patologias moderadas (B3) e patologias graves (B4). ES – Epitélio seminífero, L – Lúmen, I - Intertúbulo, Seta –vacúolos; D= Desprendimento de epitélio; Estrela = Túbulo seminífero com ausência de células germinativas e/ou Sertoli. Azul de Toluidina. Barras = 50 μ m.

Tabela 2. Proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático, de camundongos Balb/c tratados com melatonina de manhã ou à tarde.

Parâmetros	Controle	MM-3	MM-5	MM-10	MT-3	MT-5	MT-10
TS (%)	92,68±1,17	92,80±0,90	92,04±2,68	90,79±1,89	92,39±,56	90,75±1,07	91,63±1,46
ES (%)	85,54±1,16	83,85±1,18	83,10±2,64	84,13±2,10	85,83±0,92	84,93±1,06	84,39±2,23
TP (%)	2,65±0,32 ^a	4,27±1,27 ^b	4,88±0,32 ^b	2,92±0,48 ^a	2,97±0,36 ^a	2,65±0,15 ^a	2,51±0,37 ^a
L (%)	4,19±0,54	4,68±0,59	4,06±0,74	3,74±0,63	3,59±0,92	3,16±0,73	4,73±1,37
VT (mL)	0,19±0,03	0,17±0,03	0,18±0,03	0,20±0,02	0,19±0,03	0,19±0,03	0,18±0,01
VE (mL)	0,17±0,03	0,16±0,02	0,17±0,03	0,19±0,02	0,17±0,02	0,18±0,03	0,16±0,01
VTP (mL)	0,005±0,001 ^a	0,008±0,003 ^{ab}	0,010±0,003 ^b	0,007±0,001 ^a	0,006±0,001 ^a	0,006±0,001 ^a	0,005±0,001 ^a
VL (mL)	0,008±0,001	0,009±0,002	0,008±0,002	0,008±0,002	0,007±0,002	0,006±0,001	0,009±0,003
ITS (%)	0,46±0,00	0,49±0,07	0,47±0,10	0,48±0,04	0,45±0,07	0,53±0,07	0,42±0,04
IES (%)	0,43±0,07	0,44±0,07	0,42±0,08	0,45±0,03	0,42±0,07	0,50±0,07	0,39±0,04

Controle (água destilada); MM-3 – Melatonina-Manhã 3mg/kg; MM-5 – Melatonina-Manhã 5mg/kg; MM-10 – Melatonina-Manhã 10mg/kg; MT-3 – Melatonina-Tarde – 3mg/kg; MT-5 – Melatonina-Tarde 5mg/kg; MT-10 – Melatonina-Tarde 10mg/kg; TS– Túbulo seminífero; ES - epitélio seminífero; TP – Túnica Própria; L - Lúmen; VT – Volume de túbulo seminífero; VE – Volume de Epitélio; VTP – Volume de Túnica Própria; VL – Volume de Lúmen; ITS – Índice Tubulossomático; IES – Índice Epiteliossomático. Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, entre tratamentos na mesma linha, diferem significativamente entre si p≤0,05 pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 3. Morfometria de túbulo seminífero de camundongos Balb/c tratados com melatonina de manhã ou à tarde.

Parâmetros	Controle	MM-3	MM-5	MM-10	MT-3	MT-5	MT-10
DT (µm)	213,85±13,3	197,01±5,55	209,81±7,97	212,53±14,40	209,16±9,31	208,68±7,57	197,64 ±6,81
AE (µm)	85,86±2,22	77,38±1,55	82,64±3,55	83,20±3,56	81,32±3,43	80,82±3,58	77,16±2,82
DL (µm)	42,13±8,69	42,24±6,69	44,53±6,17	45,95±7,65	46,51±3,84	47,04±4,07	43,33±7,72
CTS/t (m)	5,22±0,96	5,68±0,79	5,33±0,80	5,74±0,57	5,39±0,50	5,59±0,81	5,78±0,38
CTS/g t (m/g)	22,91±2,69	27,00±1,90	23,12±1,90	22,73±3,66	24,08±2,01	23,51±2,32	26,41±1,02
AT (µm² x 10⁴)	3,60±0,44	3,05±0,17	3,46±0,27	3,55±0,47	3,44±0,31	3,42±0,25	3,07±0,21
AL (µm² x 10⁴)	0,14±0,06	0,14±0,04	0,16±0,04	0,17±0,05	0,17±0,03	0,17±0,03	0,15±0,053
AE (µm² x 10⁴)	3,46±0,39	2,91±0,14	3,30±0,25	3,38±0,42	3,27±0,29	3,25±0,24	2,92±0,18
RTE	1,04±0,01	1,05±0,02	1,05±0,01	1,05±0,01	1,05±0,01	1,05±0,01	1,05±0,02

Controle (água destilada); MM-3 – Melatonina-Manhã 3mg/kg; MM-5 – Melatonina-Manhã 5mg/kg; MM-10 – Melatonina-Manhã 10mg/kg; MT-3 – Melatonina-Tarde – 3mg/kg; MT-5 – Melatonina-Tarde 5mg/kg; MT-10 – Melatonina-Tarde 10mg/kg. DT – Diâmetro de túbulo; AE- Altura do Epitélio; DL- Diâmetro de Lúmen; CTS/t- Comprimento total de túbulo seminífero; CTS/g- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo e AT – Área de túbulo; AL – Área de lúmen; AE – Área de epitélio; RET – Relação Túbulo/Epitélio. Dados expressos como média±DP. Student Newman Keuls, p>0,05.

Tabela 4. Proporção volumétrica e volume dos componentes do intertúbulo de camundongos Balb/c tratados com melatonina de manhã ou à tarde.

Parâmetros	Controle	MM-3	MM-5	MM-10	MT-3	MT-5	MT-10
I (%)	7,62±1,17	7,19±0,90	7,96±0,59	9,20±1,89	7,61±0,56	9,25±1,07	8,37±1,46
VS (%)	0,60±0,20 ^{ab}	0,53±0,06 ^a	0,63±0,27 ^{ab}	0,51±0,20 ^a	0,69±0,23 ^{ab}	1,01±0,21 ^b	0,67±0,14 ^{ab}
EL (%)	1,34±0,59	0,62±0,30	0,85±0,78	0,98±0,54	0,71±0,38	0,70±0,41	0,67±0,37
NL (%)	0,79±0,36	0,97±0,19	1,13±0,34	1,25±0,36	1,01±0,18	1,20±0,24	0,95±0,28
CL (%)	4,63±1,01	4,85±0,79	5,60±1,41	5,86±1,03	4,97±0,34	6,10±1,26	5,72±0,94
LEY (%)	5,42±1,36	5,82±0,79	6,27±1,73	7,11±1,37	5,98±0,46	7,30±1,32	6,66±1,18
TC (%)	0,26±0,08 ^a	0,22±0,03 ^a	0,19±0,08 ^a	0,60±0,28 ^b	0,23±0,08 ^a	0,24±0,05 ^a	0,37±0,18 ^a
MAC (%)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
VI (mL)	0,015±0,003	0,013±0,003	0,016±0,005	0,021±0,005	0,015±0,002	0,020±0,005	0,016±0,004
VVS (mL)	0,001±0,000 ^a	0,001±0,000 ^a	0,001±0,000 ^a	0,001±0,000 ^a	0,001±0,000 ^a	0,002±0,001 ^b	0,001±0,000 ^a
VEL (mL)	0,003±0,001	0,001±0,000	0,002±0,001	0,002±0,001	0,001±0,001	0,001±0,001	0,001±0,001
VNL (mL)	0,002±0,001	0,002±0,001	0,002±0,001	0,003±0,001	0,002±0,000	0,003±0,001	0,002±0,001
VCL (mL)	0,009±0,002	0,009±0,002	0,010±0,003	0,013±0,003	0,010±0,001	0,013±0,005	0,011±0,002
VL (mL)	0,011±0,003	0,011±0,002	0,012±0,003	0,016±0,003	0,012±0,002	0,016±0,005	0,013±0,003
VTC (mL)	0,001±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,001±0,001 ^b	0,001±0,000 ^a	0,0001±0,000 ^a	0,001±0,000 ^a
VMC (mL)	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
IIS	0,04±0,01	0,04±0,01	0,04±0,02	0,05±0,01	0,04±0,01	0,05±0,01	0,04±0,01

Controle (água destilada); MM-3 – Melatonina-Manhã 3mg/kg; MM-5 – Melatonina-Manhã 5mg/kg; MM-10 – Melatonina-Manhã 10mg/kg; MT-3 – Melatonina-Tarde – 3mg/kg; MT-5 – Melatonina-Tarde 5mg/kg; MT-10 – Melatonina-Tarde 10mg/kg; I – Intertúbulo; VS – Vaso sanguíneo; EL – Espaço linfático; NL – Núcleo de Leydig; CL – Citoplasma de Leydig; LEY – Célula de Leydig; TC – Tecido conjuntivo; VI – Volume do intertúbulo; VVS- Volume de vaso sanguíneo; VEL – Volume de espaço linfático; VNL – Volume de núcleo de Leydig; VCL – Volume do citoplasma de Leydig; VL – Volume de Leydig; VTC – Volume de tecido conjuntivo; VMC – Volume de macrófago. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes na mesma linha, diferem significativamente entre si $p \leq 0,05$ pelo teste de Student Newman Keuls.

Tabela 5. Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Balb/c tratados com melatonina de manhã ou à tarde.

Parâmetros	Controle	MM-3	MM-5	MM-10	MT-3	MT-5	MT-10
DNL (μm^3)	6,50±0,30	6,79±0,19	7,11±0,23	7,07±0,26	6,98±0,29	7,16±0,48	7,12±0,36
VN(μm^3)	144,74±20,86	164,02±13,41	188,31±18,25	185,70±20,25	178,25±15,43	193,87±41,64	190,40±28,66
VC (μm^3)	9,15±2,26	8,48±2,47	8,70±1,65	8,84±0,90	8,93±1,81	10,37±4,39	11,94±2,59
VL (μm^3)	10,60±2,39	10,12±2,53	10,58±1,80	10,69±1,02	10,72±1,92	12,31±4,76	13,84±2,74
VL/t (μm^3) x 10²	10,77±2,46	10,89±2,30	11,39±1,92	15,86±3,36	12,00±1,73	15,67±5,08	12,90±2,64
VL/gt (μm^3) x10²	47,89±12,00	51,46±6,91	54,07±13,95	62,21±11,80	53,34±4,18	64,07±9,31	58,73±10,01
ILS (%)	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
NCL/T(x10⁶)	10,69±3,90	11,33±4,20	12,00±3,36	14,84±2,96	11,44±2,48	13,91±5,31	9,55±2,19
NCL/ g T(x10⁶)	49,11±25,26	53,11±14,94	52,07±14,00	58,67±13,26	50,85±9,08	57,00±16,66	43,76±10,60

Controle (água destilada); MM-3 – Melatonina-Manhã 3mg/kg; MM-5 – Melatonina-Manhã 5mg/kg; MM-10 – Melatonina-Manhã 10mg/kg; MT-3 – Melatonina-Tarde – 3mg/kg; MT-5 – Melatonina-Tarde 5mg/kg; MT-10 – Melatonina-Tarde 10mg/kg; DNL- Diâmetro do núcleo de Leydig; VN – Volume nuclear da célula de Leydig; VC- Volume do citoplasma da célula de Leydig; VL – Volume celular de Leydig; VL/t – Volume de Leydig por testículo; VL/gt- Volume de Leydig por grama de testículo; ILS – Índice Leydigossomático; NCL/T – Número de Leydig por testículo; NCL/g T– Número de Leydig por grama de testículo; IIS – Índice intertubulossomático. Dados expressos como média±DP. Student Newman Keuls, p>0,05.

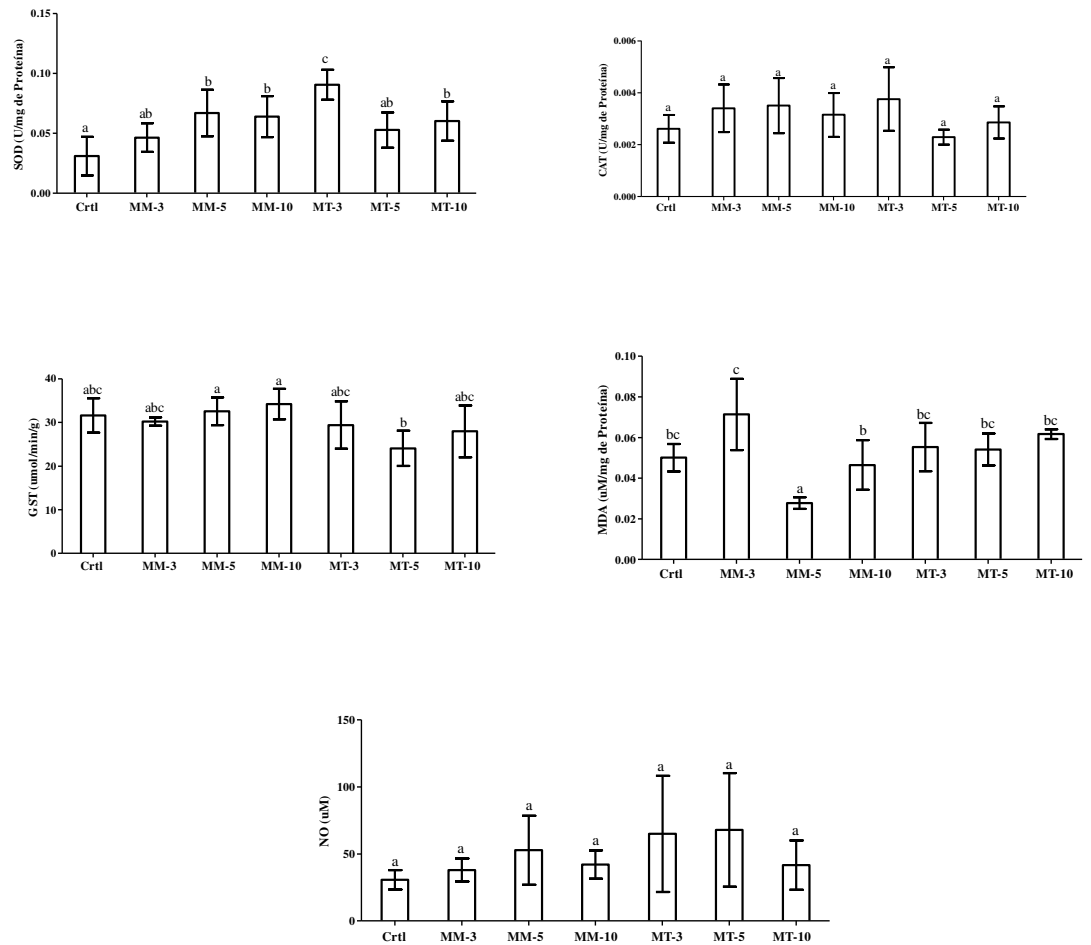


Figura 2. Atividade das enzimas antioxidantes, concentração de malondialdeído e de óxido nítrico do testículo de camundongos tratados com melatonina. Ctrl – Controle; MM-3 – Melatonina-Manhã 3mg/kg; MM-5 – Melatonina-Manhã 5mg/kg; MM-10 – Melatonina-Manhã 10mg/kg; MT-3 – Melatonina-Tarde – 3mg/kg; MT-5 – Melatonina-Tarde 5mg/kg; MT-10 – Melatonina-Tarde 10mg/kg; SOD – Superóxido dismutase; CAT – Catalase; GST – Glutathione S-Transferase; MDA – malondialdeído; NO – óxido nítrico. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Discussão

Neste estudo foi avaliado os efeitos da administração da MLT em dois períodos diferentes do dia, de manhã e à tarde, em camundongos Balb/c. Observaram-se alterações nos parâmetros tubulares com aumento na proporção e volume de túnica própria em animais que receberam MLT pela manhã. Animais tratados com 10mg/Kg de MLT pela manhã apresentaram aumento na proporção e volume de tecido conjuntivo e animais que receberam 5mg/Kg de MLT à tarde apresentaram aumento no volume de vasos sanguíneos. Animais que receberam MLT, tanto de manhã quanto à tarde, mostraram aumento na atividade da SOD. Observou-se redução na concentração de MDA em animais que receberam MLT de manhã.

A administração da MLT nos períodos da manhã e tarde não promoveu alteração nos pesos corporal e testicular. Diferentemente deste estudo, Debeljuk et al., (1970) relataram que ratos que receberam 300 μ g de MLT durante trinta dias apresentaram redução no peso testicular, porém o peso corporal não alterou. Hamster que receberam injeções subcutâneas de 2,5 μ g de MLT, no período da tarde durante quatro semanas, apresentaram redução no peso dos testículos, enquanto que os animais que receberam a mesma dose diurna não apresentaram alterações neste parâmetro (Horton & Yellon, 2001). Sabe-se que em hamster a administração da MLT à tarde induz a regressão testicular, pois a MLT mimetiza o efeito de dias curtos, enquanto a administração diurna da MLT não induz tais efeitos (Stetson & Tay, 1983; Stetson et al., 1986). Estudos demonstram que animais não sazonais, como camundongos, são menos sensíveis aos efeitos da MLT do que animais sazonais, como os hamsters (Turek et al., 1976; Goldman et al., 1981).

O índice gonadossomático (IGS) representa o percentual de massa corporal alocada em testículos. Enquanto o índice tubulossomático (ITS) quantifica o investimento de túbulo seminífero em relação a massa corporal (Costa, 2013). A não alteração nestes parâmetros em ambos os períodos de administração da MLT avaliados sugerem que não houve comprometimento da massa testicular, e que o investimento em túbulos seminíferos não sofreu alterações nos grupos submetidos ao tratamento com a MLT em horários diferentes.

Neste estudo não foram observadas alterações significativas com relação à proporção de patologias avaliadas nos túbulos seminíferos. Animais que receberam 3 e 5mg/Kg de MLT de manhã e à tarde observou-se mais túbulos com patologias moderadas

e graves. Entretanto, não houve comprometimento da espermatogênese após a administração de melatonina em diferentes horários. Ng & Ooi (1990) relataram aumento no percentual de túbulos seminíferos sem espermatozoides em animais que receberam injeções intraperitoniais de 100 µg de MLT no período da tarde, durante seis semanas. Alguns túbulos continham apenas células de Sertoli, espermatogônia e espermatócitos, não apresentando espermátides e espermatozóides. Esquilos que receberam injeção intratesticular de 2,5µg de MLT durante 10 e 20 dias, no período da tarde, apresentaram túbulos seminíferos com diâmetro reduzido, com vacúolos e descamação das células germinativas, evidenciando que a MLT pode interferir diretamente na função endócrina do testículo, reduzindo a atividade espermática nesses animais (Ahmad & Haldar, 2010)

A proporção volumétrica (%) dos túbulos seminíferos em mamíferos pode variar entre 60 a 90 % (Setchell, 1982), e está diretamente relacionada com a eficiência na produção espermática, diferindo entre as espécies (França e Russell, 1998). Assim, os resultados encontrados neste estudo são considerados próximos aos descritos na literatura, não sendo observadas variações significativas entre os animais que receberam MLT em períodos diferentes. Além disso, a ausência de alteração na proporção volumétrica (%) e no volume (mL) do epitélio seminífero nos diferentes períodos de administração da MLT, justifica a manutenção do índice epiteliossomático (IES) nos grupos experimentais com conseqüente não comprometimento da espermatogênese.

Neste trabalho, os grupos MM-3 e MM-5 apresentaram aumento na proporção volumétrica de túnica própria, com conseqüente aumento do volume de túnica própria apenas no grupo MM-5. A túnica própria é particularmente rica em componentes da matriz extracelular, como fibronectina, diferentes tipos de colágeno e proteoglicanos, como a decorina (Ungefroren et al., 1995). A decorina pode ligar a fatores de crescimento, apresenta relação com a fibrologênese em testículos de animais inférteis, em que foi detectado o aumento dessa proteoglicana, sugerindo que ela possa interferir na sinalização parácrina testicular (Ungefroren et al., 1995; Adam et al., 2012). Desse modo, sugere-se que as alterações encontradas na túnica própria podem estar relacionada à maior deposição de colágeno nesta, devido ao possível aumento de decorina.

O diâmetro tubular varia entre os mamíferos, sendo este um dos parâmetro que pode ser considerado como indicador da atividade espermatogênica (França & Russell, 1998). Por outro lado, a altura do epitélio seminífero é uma mensuração mais efetiva quando se avalia a produção espermática, visto que o epitélio sofre sucessivas mudanças durante os estágios do ciclo espermático (Wing & Christensen, 1982). Assim, diâmetro

tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total de túbulo por grama de testículo estão intimamente relacionadas com a atividade espermática (França & Russell, 1998). Dessa forma, essas medidas tubulares são ferramentas amplamente utilizadas como indicadoras da atividade espermatogênicas quando se avalia a função testicular (Caldeira et al., 2010). Como não foram observadas variações significativas no que diz respeito a estes parâmetros entre os grupos tratados com MLT sugere-se que a exposição a MLT em diferentes períodos não alterou a produção espermática.

Diferentemente do presente estudo, Mehraein & Negahdar (2010) observaram redução no diâmetro tubular e na altura do epitélio seminífero de camundongos idosos (16 meses) que receberam dose diária de 10 mg/kg de MLT durante 14 dias, via intraperitoneal, indicando que a dose usada causou efeitos inibitórios sobre os túbulos seminíferos dos animais. Assim, a divergência dos nossos resultados para este estudo com camundongos idosos pode ser devido a uma correlação entre a idade dos animais e os efeitos da MLT.

Não foram encontrados até o presente momento estudos que avaliem quantitativamente os componentes intertubulares de camundongos Balb/c tratados com melatonina, sendo este trabalho possivelmente o primeiro a avaliar a proporção volumétrica (%) e volume (mL) dos componentes do intertúbulo, como vaso sanguíneo, espaço linfático e tecido conjuntivo. Foram avaliados ainda a proporção e volume do núcleo e citoplasma de Leydig e da célula como um todo. Não foram observadas variações quanto a proporção volumétrica e volume do intertúbulo nos animais que receberam MLT em diferentes períodos. Segundo Mori et al., (1982) o intertúbulo corresponde a cerca de 10,7% do volume do parênquima testicular em ratos. Desta forma, nossos resultados encontram-se dentro dos relatos na literatura.

No presente estudo, houve aumento da proporção de vasos sanguíneos no grupos MT-5 quando comparado com os grupos MM-3 e MM-5, porém não diferiu quando comparado ao controle. Este grupo também apresentou aumento no volume de vasos sanguíneos em relação ao grupo controle e aos demais tratados com MLT, tanto de manhã quanto à tarde. Estudos sugerem que a MLT pode ativar as células endoteliais por meio da ligação a receptores, estimulando a produção de óxido nítrico, que por sua vez, estimula a produção de guanilato ciclase, resultando no aumento da produção de cGMP causando vasodilatação (Singh & Jadhav, 2014; Baker & Kimpinski, 2017). Embora estatisticamente a concentração de óxido nítrico, no presente estudo, não tenha diferido entre os grupos, ela foi numericamente maior no grupo MT-5, corroborando a hipótese

que de a MLT atue estimulando a produção de óxido nítrico com consequente vasodilatação, o que explicaria o aumento no volume desse parâmetro nos animais do grupo MT-5.

A proporção volumétrica e o volume de tecido conjuntivo aumentou no grupo MM-10 em comparação com o grupo controle. Sabe-se que o de tecido conjuntivo compromete a movimentação de fluidos e hormônios entre o compartimento intertubular e o tubular, podendo interferir no processo espermatogênico (Mouro, 2018). No entanto, no presente estudo não foi observada alteração nos parâmetros que medem a eficiência da espermatogênese. Assim, verifica-se que o aumento de tecido conjuntivo nos animais do grupo MM-10 não foi o suficiente para levar a prejuízos na espermatogênese.

As células de Leydig são de grande relevância para estudos reprodutivos, uma vez que são responsáveis pela síntese da testosterona e esta tem papel importante na espermatogênese e no desenvolvimento de características sexuais secundárias (Beltrán-Frutos et al., 2016). Assim, qualquer substância que interfira nesse processo pode causar distúrbios funcionais no balanço hormonal podendo comprometer a espermatogênese (Creasy, 2001). Como neste estudo não houve alteração nos parâmetros de Leydig nos grupos tratados com MLT em períodos diferentes, sugere-se que a MLT não causou prejuízos na síntese de testosterona e consequentemente no processo espermatogênico. No entanto diferentemente do presente estudo, a análise da célula de Leydig de camundongos tratados com 100µg de MLT no período da manhã (10:00 h), mostrou redução da proporção volumétrica do núcleo e no volume nuclear e aumento da proporção e volume do citoplasma, após 22 dias de tratamento (Redins et al., 2002). Os autores sugerem que a redução no volume nuclear causado pela MLT tenha reduzido também a atividade sintética da célula de Leydig, sendo que a redução nuclear também foi acompanhada pela redução na proporção de retículo endoplasmático liso e de mitocôndrias, organelas envolvidas na síntese de testosterona.

Vários estudos demonstram a atividade antioxidante da MLT (Hardeland et al., 2010; Carpentieri et al., 2012; Reiter et al., 2016). No presente estudo, observamos aumento significativo da atividade da SOD nos grupos MM-5, MM-10, MT-3 e MT-10, e da GST nos grupos MM-5 e MM-10, embora as atividades da CAT não tenha sofrido alteração quando comparada ao grupo controle. O aumento da atividade da SOD e GST pode indicar que a MLT, administrada tanto de manhã quanto à tarde, tenha atuado estimulando a atividade dessas enzimas, como descrito por Reiter et al., (2003), exercendo atividade antioxidante.

O malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica (Sharma et al., 2004). Assim, a redução na concentração de MDA nos grupos MM-5 e MM-10 indica que a MLT tenha diminuído a formação de lipídios peroxidados neste grupo. O mecanismo envolvido na inibição da peroxidação lipídica pela MLT provavelmente inclui sua ação direta como sequestradora de radicais livres que dão início a este processo (Taysi et al., 2003).

Estudos têm avaliado o efeito da melatonina ao longo do dia sobre os testículos de roedores e os resultados indicam que a hora do dia em que a MLT é administrada é um fator crucial para a ação inibitória desta molécula, em animais sazonais e não sazonais (Reiter et al., 1976; Tamarkin et al., 1976; Lang et al., 1984). A idade pode ser outro fator importante, pois Lang et al. (1984) relataram que animais tratados com melatonina dos 20 dias aos 40 dias de vida apresentaram regressão testicular, enquanto animais pré-puberes (5 a 20 dias) e animais adultos (50 a 70 dias) tratados com melatonina não apresentaram esses efeitos.

O tratamento com melatonina no período da manhã e à tarde causou alterações na morfometria e estereologia de componentes tubulares e intertubulares, embora tais alterações não tenham comprometido o processo espermatogênico e esteroidogênico. As alterações causadas pela administração da MLT à tarde podem ser corroboradas pela hipótese de Reiter (1980), que sugere que a MLT produzida pela pineal durante a noite atue sobre seus receptores, tornando-os temporariamente insensíveis, de forma que durante o início do período de luz, esses receptores poderiam não responder ao tratamento com MLT exógena. Assim, no final da tarde a sensibilidade dos receptores é restabelecida e a administração de MLT é capaz de causar alterações. Porém, esta hipótese refuta os dados do presente estudo relativos aos tratamentos da manhã, onde observaram-se alterações causadas pela administração da MLT. Sugerimos que essas alterações encontradas nos tratamentos do período da manhã estejam relacionadas à ação da MLT independente de receptores, devido à sua capacidade de atravessar membranas celulares. Esse mecanismo direto de ação da MLT pode ser observado pela redução na concentração de malondialdeído no grupo tratado com MLT pela manhã, pois sabe-se que a MLT atua diretamente como sequestradora de radicais livres. Entretanto mais estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese.

Conclusões

O tratamento com MLT, tanto de manhã quanto à tarde, promoveu alterações histomorfométricas e estereológicas tubulares e intertubulares, porém sem comprometer a espermatogênese e esteroidogêneses. A MLT apresentou atividade antioxidante estimulando a atividade da superóxido dismutase e reduziu a formação do malondialdeído, indicando que houve diminuição da formação de lipídios peroxidados. Os animais que receberam melatonina de manhã e à tarde, nas doses de 5 e 10 mg/Kg, apresentaram túbulos seminíferos com mais patologias moderadas e graves.

Referências

Adam, M.; Urbanski, H. F.; Garyfallou, V. T.; Welsch, U.; Köhn, F. M.; Schwarzer, J. U.; Strauss, L.; Poutanen, M.; Mayerhofer, A. High levels of extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular functions. *International Journal of Andrology*, 35 (4), 550 – 561, 2012.

Ahmad, R.; Haldar, C. Effect of intra-testicular melatonin injections on testicular functions, local and general immunity of a tropical rodent *Funambulus pennant*. *Endocrinology*, 37, 479 – 488, 2010.

Amann, R. P. Sperm production rates. In: Johnson A. D.; Gomes, W. R.; Vandemark, N. L. *The testis*. New York: Academic Press, 1970.

Attal, J.; Courot, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 3, 219–241, 1963.

Auld, F.; Maschauer, E. L.; Morrison, I.; Skene, D. J.; Riha, R. L. Evidence for the efficacy of melatonin in the treatment of primary adult sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*, 34, 10-22, 2017.

Baker, J.; Kimpinski, K. Role of melatonin in blood pressure regulation: an adjunct anti-hypertensive agent. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45, 755 – 766, 2018.

Béltran-Frutos, E.; Seco-Roriva, V.; Ferrer, C.; Martínez-Hernández, J.; Madrid, J. F.; Sáez, F. J.; Canteras, M.; Pastor, L. M. Changes in testicular interstitial connective tissue of hamster (*Mesocricetus auratus*) during ageing and after exposure to short photoperiod. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 47-53, 2016.

Brown, G. M.; Pandi-Perumal, S. R.; Trakht, I.; Cardinali, D. P. Melatonin and its relevance to *jet lag*. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7, 69 – 81, 2009.

Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

Cajochen, C.; Krauchi, K.; Wirz-Justice, A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *Journal of Neuroendocrinology*, 15, 432 – 437, 2003.

Caldeira, B. C.; Paula, T. A. R.; Matta, S. L. P.; Balarini, M. K.; Campos, K. A. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Revista Ceres*, 57 (5), 569 – 575, 2010.

Carperntieri, A.; Barboza, G. D.; Areco, V.; López, M. P.; Talamoni, N. T. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*, 65, 437-444, 2012.

Claustrat, B.; Leston, J. B. Melatonin: physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 65, 77 – 84, 2015.

Costa, K. L. C. Danos testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo: avaliação histomorfométrica, ultraestrutural e bioquímica. 2013. 101 f. Tese – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

Creasy, D. M. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicological Pathology*, 29, 64 – 70, 2001.

Debeljuk, L.; Feder, V. M.; Pauluggi, O. A. Effect of the treatment with melatonin on the pituitary-testicular axis of the male rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 21, 363 – 364, 1970.

Dieterich, S.; Bielick, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Journal of the American Heart Association*, v. 101, p. 33-39, 2000.

Droge, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.

França, L. R.; Russell, L. D. The testis of domestic animals. In: *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications, 198 – 219, 1998.

Frungieri, M. B.; Calandra, R. S.; Rossi, S. P. Local actions of melatonin in somatic cells of the testis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-17, 2017.

Goldman, B.; Hall, V.; Hollister, C.; Reppert, S.; Roychoudhury, P.; Yellon, S.; Tamarkin, L. Diurnal changes in pineal melatonin content in four rodent species: relationship to photoperiodism. *Biology of Reproduction*, 24, 778 – 783, 1981.

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

Hardeland, R.; Cardinali, D. P.; Srinivasan, V.; Spende, D. W.; Brown, G. M.; Pandi-Perumal, S. R.D. Melatonin – a pleiotropic, orchestrating molecule. *Progress in Neurobiology*, 93, 350-384, 2010.

Horton, T. H.; Yellon, S. M. Aging, reproduction, and the melatonin rhythm in the Siberian hamster. *Journal of Biological Rhythms*, 16 (2), 243 – 253, 2001.

Johnsen, S. G. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 352 hypogonadal males. *Hormones*, 1, 1–24, 1970.

Johnson, L.; Petty, C. S.; Neaves, W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 25(1), 217-226, 1981.

Lang, U.; Rivest, R. W.; Schlaepfer, L. V.; Bradtke, J. C.; Aubert, M. L.; Sizonenko, p. C. Diurnal rhythm of melatonin action on sexual maturation of male rats. *Neuroendocrinology*, 38, 261 – 268, 1984.

Li, T.; Jiang, S.; Han, M.; Yang, Z.; Lv, J.; Deng, C.; Reiter, R. J.; Yang, Y. Exogenous melatonin as a treatment for sleep disorders: a systematic review and meta-analysis. *Frontier in Neuroendocrinology*, 52, 22 – 28, 2019.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

Mehraein, F.; Negahdar, F. Morphometric evaluation of seminiferous tubules in aged mice testes after melatonin administration. *Cell Journal*, 13(1), 1-4, 2011.

Mori, H.; Shimizu, D.; Fukunishi, R.; Christensen, A. K. Morphometric analysis of testicular Leydig cells in normal adult mice. *The Anatomical Record*, 204, 333 – 339, 1982.

Mouro, V. G. S.; Menezes, T. P.; Lima, G. D. A.; Domingues, R. R.; Souza, A. C. F.; Oliveira, J. A.; Matta, S. L. P.; Machado-Neves, M. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? *Biological Trace Element Research*, 183 (2), 314 – 324, 2017.

Mouro, V. G. S. Ação antioxidante do açaí (*Euterpe oleracea* MART.) frente ao estresse oxidativo induzido pelo cádmio no testículo de camundongos adultos. 2018. 120f. Tese – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

Ng, T. B.; Ooi, V. E. C. Effect of pineal indoles on testicular histology of mice. *Archives of Andrology*, 25, 137 – 145, 1990.

Pevet, P.; Klosen, P.; Felder-Schittbuhl, M. P. P. The hormone melatonin: animal studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31, 547-559, 2017.

Radogna, F.; Diederich, M.; Ghibelli, L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1844 – 1852, 2010.

Redins, C. A.; Redins, G. M.; Novaes, J. C. The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Brazilian Journal of Biology*, v. 63 (3), 517 – 523, 2002.

Reid, K. J.; Abbott, S. M. Jet lag and shift work disorder. *Sleep Medicine Clinics*, 10 (4), 523 – 535, 2015.

Reiter, R. J.; Blask, D. E.; Johnson, L. Y.; Rudden, P. K.; Vaughan, M. K.; Waring, P. J. Melatonin inhibition of reproduction in the male hamster : its dependency on time of day of administration and on an intact and sympathetically innervated pineal gland. *Neuroendocrinology*, 22, 107 – 116, 1976.

Reiter, R. J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Reviews*, 1 (2), 109 - 131, 1980.

Reiter, R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 79, 153-158, 1991.

Reiter, R. J.; Tan, D.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Leon, J.; Czarnocki, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50 (4), 1129 – 1146, 2003.

Reiter, R. J.; Mayo, J. C.; Tan, D.; Sainz, R. M.; Alatorre-Jimenez, M.; Qin, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*, 61 (3), 253-278, 2016.

Revel, F. G.; Masso-Pévet, M.; Pévet, P.; Mikkelsen, J. D.; Simonneaux, V. Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamus targets. *Neuroendocrinology*, 90, 1 – 14, 2009.

Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

Setchell, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin, C. R.; Short, R. V. (Ed.). *Reproduction in mammalian*, London: Elek, 1, 63 - 101, 1982.

Sharma, R.; Yang, Y.; Sharma, A.; Awasthi, S.; Awasthi, Y. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6 (2), 289 – 300, 2004.

Singh, M.; Jadhav, H. R. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discovery Today*, 19(9), 1410 – 1418, 2014.

Smith, L. B.; Walker, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2 – 13, 2014.

Stetson, M. H.; Sarafidis, E.; Rollag, M. D. Sensitivity of adult male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*) to melatonin injections throughout the day: effects in the reproductive system and the pineal. *Biology of Reproduction*, 35, 618 – 623, 1986.

Stetson, M. H.; Tay, D. E. Time course of sensitivity of golden hamster to melatonin injections throughout the day. *Biology of Reproduction*, 29, 432 – 438, 1983.

Tarmakin, L.; Westrom, W. K.; Hamill, A. I.; Goldman, B. D. Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology*, 99 (6), 1534 – 1541, 1976.

Taysi, S.; Koc, M.; Büyükokuroglu, M. E.; Altinkaynark, K.; Sahin, Y. N. Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in the rat liver. *Journal of Pineal Research*, 34 (3), 173 – 177, 2003.

Tjimes, M.; Pedraza, R.; Valladares, L. Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. *Steroids*, 61, 65 – 68, 1996.

Turek, F. W. Desjardins, C. Menaker, M. Differential effects of melatonin on the testis of photoperiodic and nonphotoperiodic rodents. *Biology of Reproduction*, 15, 94-97, 1976.

Ungenfrozen, H.; Ergün, S.; Krull, N. B.; Holstein, A. F. Expression of the small proteoglycans biglycan and decorin in the adult human testis. *Biology of Reproduction*, 52, 1095 – 1105, 1995.

Wing, T. Y.; Christensen, A. K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *The American Journal of Anatomy*, 165, 13 – 25, 1982.

Yu, K.; Deng, S.; Sun, T.; Li, Y.; Liu, Y. Melatonin regulates the synthesis of steroid hormones on male reproduction: A Review. *Molecules*, 23 (447), 1 – 7, 2018.