

ANÁLISE HISTOQUÍMICA DE TESTÍCULOS DE RATOS SUBMETIDOS À ILUMINAÇÃO CONSTANTE, TRATAMENTO DE MELATONINA E GELDANAMICINA DURANTE 60 DIAS

Marcos Aurélio Santos da Costa¹
Bárbara da Silva Gonzaga²
Danyella Santana da Costa³
Bruno Eduardo Arruda Alves⁴
Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio⁵

INTRODUÇÃO

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio secretado pela glândula pineal, cuja produção e concentração no corpo é sempre vinculada à noite – ritmo regulado pelos sinais enviados do Núcleo supraquiasmático (NSQ) para o Núcleo paraventricular (NPV) e deste, para a pineal –, (Cajochen, Kräuchi e Wirz-Justice, 2003). Sabe-se que a alta produção desse hormônio é mantida durante a fase escura do ciclo claro/escuro, desde que não haja luz no ambiente, já que a luz durante a noite bloqueia a produção de melatonina (Brainard et al., 1983; Shalin et al., 2013).

Nos homens, a melatonina afeta a regulação reprodutiva de três maneiras principais. Primeiro, regula a secreção de dois principais neuro-hormônios, GnRH e LH. Em segundo lugar, regula a síntese de testosterona e a maturação testicular. Terceiro, como um potente depurador de radicais livres que é tanto lipofílico como hidrofílico, evita danos testiculares causados por toxinas ambientais ou inflamação (LI, Chunjin; ZHOU, Xu, 2015). No geral, os dados da literatura indicam que a melatonina afeta a secreção de gonadotrofinas e testosterona, além de melhorar a qualidade do esperma. Isto implica que tem efeitos importantes na regulação do desenvolvimento testicular e da reprodução masculina (LI, Chunjin; ZHOU, Xu, 2015).

O testículo de mamíferos é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que comprometem a espermatogênese e a análise dos túbulos seminíferos (parâmetros morfológicos e morfométricos) é uma estratégia simples para avaliar alterações

¹Mestrando do Curso de **MORFOTECNOLOGIA** da Universidade Estadual - UFPE, marcosxp17@gmail.com;

²Graduanda do Curso de **BIOMEDICINA** Universidade Federal de Pernambuco- UFPE; barbaragonzaga@outlook.com;

³ Graduado do Curso de **ODONTOLOGIA** da UNINOVE - SP, brunoalvvesodontologia24@gmail.com;

⁴ Graduada pelo Curso de **FARMÁCIA** da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, danyell.farma@gmail.com;

⁵Professora orientador: Dra, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, fcas14@hotmail.com.

nesse processo (Pannocchia M, 2008). Uma preocupação pública tem sido expressa sobre a possibilidade de que fatores ambientais, incluindo uso indevido de drogas, possam afetar adversamente a função testicular e espermática (Nudell et al., 2002).

A geldanamicina (GA) pertencente à família das ansamicinas provenientes do metabolismo secundário de actinobactérias, é um agente anticancerígeno produzido por *Streptomyces hygroscopicus* (SILVA, 2016). A geldanamicina é uma substância que induz a degradação de proteínas mutantes em tumores que afetam a infertilidade testicular. Este efeito é o resultado de inibição de HSP90 que normalmente atua para manter a dobragem correta de proteínas mutantes (Silva G.A. et al., 2018). Embora o mecanismo, exato, de ação da geldanamicina frente ao testículo ainda não seja claramente entendido, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência da iluminação constante, a melatonina e geldanamicina sob a histoquímica dos testículo de ratos tratados durante 60 dias.

METODOLOGIA (OU MATERIAIS E MÉTODOS)

Animais Experimentais

O presente projeto foi submetido ao comitê de ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob número nº. 23082.009629/2010. foram utilizados 20 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água ad libitum.

Design Experimental

Os machos foram divididos, ao acaso, em 4 grupos, cada um constituído por 5 animais, a saber:

Grupo I - ratos controle (sem tratamento);

Grupo II – ratos submetidos à iluminação constante por 60 dias;

Grupo III- ratos submetidos à iluminação constante por 60 dias e tratados com melatonina por 60 dias;

Grupo IV - ratos submetidos à iluminação constante por 60 dias, tratados com melatonina e geldanamicina por 60 dias.

Estimulo Luminoso Constante Artificial

Foi obtido utilizando-se uma caixa de madeira com área 0,5 m³, com frestas para permitir a ventilação, contendo duas lâmpadas fluorescentes, marca PHILLIPS, de 40 W, as quais forneceram luminosidade adequada e suficiente, em torno de 400 lux. Esta caixa

permaneceu durante todo o experimento dentro do biotério a uma temperatura de aproximadamente 22°C, contendo os animais dos grupos II a IV.

Tratamento com Melatonina

O tratamento com melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por (PRATA LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004). Foi administrada na dose de 200 µg de melatonina por 100g de peso corporal do animal por meio de injeções por via intraperitoneal no início da noite (18:00h) durante 60 dias. A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída em solução salina (NaCl a 0,9%). Os animais do grupo controle receberam, respectivamente, solução NaCl 0,9% e 0,02 mL de etanol.

Tratamento com Geldanamicina

A 17-Dimethylaminopropylamino-17-demethoxy-geldanamicina (17-DMAP-GA / Invivogen - USA) foi utilizada na dose de 10µM (Hinzpeter et al., 2006) via intraperitoneal.

Análise Histoquímica

Os fragmentos foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Em sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pelo Tricrômico de Mallory para pesquisa de fibras colágenas e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para pesquisa de glicosaminoglicanas ácidas (GAGs), analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50. A análise histoquímica foi classificada como reação intensa (++) , moderada (±) e fraca (+).

DESENVOLVIMENTO

Toda forma de vida que se desenvolveu precisou se adaptar às variações do ciclo claro-escuro e por isso diz-se que houve uma necessidade evolutiva de ritmicidade. De acordo com sua frequência, esses ritmos podem ser classificados em circadianos, ultradianos e infradianos. Entre estes, os mais estudados e mais frequentes nos organismos são os ritmos circadianos (circa = cerca de; diem = dia), que se ajustam às variações cíclicas do dia e da noite (Gruart et al., 2002; Moore RY, 2013).

A luz é o principal zeitgebers, termo alemão que significa (o que doa ou marca o tempo), capaz de encarrilhar os nossos ritmos pois, na retina, possuímos os cones e bastonetes, células especializadas em detectar luz, bem como suas características de espectro e intensidade e, através do trato retino hipotalâmico (TRH), essa mensagem chega ao núcleo supraquiasmático (NSQ) (LeGates TA et al., 2014). É sabido que ver a luz do sol no

amanhecer pode elevar a pressão arterial e a glicemia em preparação para a rotina em animais diurnos. Não menos importante, o período do escuro também é essencial para a fisiologia adequada do organismo (Vásquez-Ruiz et al., 2014). A glândula pineal, que recebe inervação do NSQ, produz e libera melatonina na ausência do estímulo luminoso (Reiter RJ, 1991).

Dentre os processos sob controle circadiano encontram-se neurotransmissão, metabolismo, imunidade e sinalização endócrina, como da glândula pineal, da hipófise e da adrenal. A pineal é uma glândula localizada no encéfalo com aproximadamente 5 mm de comprimento, 1-4 mm de espessura e com peso de cerca de 100mg que recebe aferências do núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo. Esta glândula possui dois tipos celulares: células neurogliais e, predominantemente, pinealócitos, cujo principal produto é o hormônio melatonina (Wu e Swaab, 2004). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio secretado pela glândula pineal, cuja produção e concentração no corpo é sempre vinculada à noite – ritmo regulado pelos sinais enviados do NSQ para o NPV e deste, para a pineal –, (Cajochen, Kräuchi e Wirz-Justice, 2003).

Sabe-se que a alta produção desse hormônio é mantida durante a fase escura do ciclo claro/escuro, desde que não haja luz no ambiente, já que a luz durante a noite bloqueia a produção de melatonina (Brainard et al., 1983; Shalin et al., 2013). Nos homens, a melatonina afeta a regulação reprodutiva de várias formas. Regula a secreção de GnRH e LH, a síntese de testosterona e a maturação testicular e atua como um potente depurador de radicais livres que é tanto lipofílico como hidrofílico, evita danos testiculares causados por toxinas ambientais ou inflamação (LI, Chunjin; ZHOU, Xu, 2015).

O testículo de mamíferos é um órgão suscetível a agentes tóxicos ambientais ou terapêuticos que comprometem a espermatogênese, e a análise dos túbulos seminíferos (parâmetros morfológicos e morfométricos) é uma estratégia simples para avaliar alterações nesse processo (Pannocchia M, 2008).

A geldanamicina (GA) pertencente à família das ansamicinas provenientes do metabolismo secundário de actinobactérias cuja função é atividade antitumoral. Embora o mecanismo exato de toxicidade testicular induzida por GA ainda não seja claramente entendido, o estresse oxidativo e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio sintase e radical hidroxila têm sido implicados na fisiopatologia da toxicidade GA (Pedraza-Chaverrí et al., 2004; Hong et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histoquímica dos testículos não apresentou alteração significativa quanto a coloração com Tricrômico de Mallory e PAS. Este resultado corrobora com o estudo feito por FERREIRA, et al. (2013) em que a análise histoquímica das gônadas de ratos com 30 e 60 dias de vida nascidos de matrizes submetidas à ausência de luz, não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados.

A melatonina parece exercer papel controlador na síntese de colágeno, atuando diretamente sobre a atividade dos fibroblastos. Medeiros et al. (2003) analisaram o efeito da melatonina sobre a remodelação de colágeno no útero de ratas e observaram no grupo em que as ratas foram mantidas em condição de ausência de luz durante um período três meses, que o endométrio apresentou uma redução no número de fibroblastos, quando comparado as ratas pinealectomizadas, indicando assim que ocorre redução na atividade de síntese de colágeno. Dessa forma, devido a condição de escuro contínuo, sabe-se que ocorre o aumento dos níveis séricos circulantes da melatonina, que parece inibir a síntese de colágeno.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A melatonina parece exercer papel controlador na síntese de colágeno, atuando diretamente sobre a atividade dos fibroblastos. A ação sinérgica da melatonina, geldanamicina e iluminação constante não acarretou alteração na produção de fibras colágenas e de glicosaminoglicanas ácidas.

Palavras-chave: Testículos; Melatonina, Geldanamicina, Iluminação Constante, Histoquímica.

REFERÊNCIAS

- BRAINARD GC, et al. The suppression of pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity by different light irradiances in the Syrian hamster: a dose-response relationship. *Endocrinology*, 1983; 113(1):293-6.
- CAJOCHEN C, et al. Role of Melatonin in the Regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. *Journal of Neuroendocrinology*, 2003; 15(4): 432–437.
- FERREIRA, Cintia Giselle Martins et al. Análise morfológica, histoquímica e morfométrica das gônadas de ratos com 30 e 60 dias de vida nascidos de matrizes submetidas à ausência de luz. *Resumo JEPEX*, 2013.
- HINZPETER A, et al. Association between Hsp90 and the ClC-2 chloride channel upregulates channel function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2006; 290(1): C45-C56.
- MEDEIROS, J.P.; Wanderley-Teixeira, V.; Teixeira, A.A.C.; Baratella-Evêncio, L.; Evêncio Neto, J. Ultrastructural analysis of pinealectomy and lack of light influence over collagen in

the endometrium of rats. *International Journal of Morphology*. 2003, v. 21, n.3, p. 231-235. 2003

PANNOCCHIA M, et al. Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero. *ConScientiae Saúde*, 2008; 7 (2): 227-233.

PRATA LIMA MF, et al. Effects of mel-atonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: Similarity with polycystic ovary syndrome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2004; 37: 987–995

SILVA G.A. Efeito da geldanamicina na infertilidade testicular: uma revisão de literatura. *International Journal of Sex Research*, 2018; 1:3