

THIAGO AUGUSTO PEREIRA DE MORAES

**INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA NO
DESENVOLVIMENTO TESTICULAR NEONATAL E NO
PROCESSO ESPERMATOGÊNICO
DE RATOS WISTAR ADULTOS**

**RECIFE-PERNAMBUCO
Fevereiro / 2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA NO
DESENVOLVIMENTO TESTICULAR NEONATAL E NO
PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DE
RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa
Guerra

RECIFE-PERNAMBUCO
Fevereiro / 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA NO DESENVOLVIMENTO
TESTICULAR NEONATAL E NO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DE
RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação de Mestrado elaborada por

THIAGO AUGUSTO PEREIRA DE MORAES

Aprovada em 28/02/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE
Orientadora

Prof. Dr Rômulo José Vieira/UFPI

Prof Dr^a. Érika Christina Santos Oliveira/UFRPE

Prof. Dr Frederico Celso Lyra Maia/UFRPE

A duas pessoas especiais na minha vida, que, juntos comigo, formam uma linda família...meu filho, **Gustavo**, o melhor presente que Deus já me deu na vida... **Aline**, esposa, amiga, companheira, o amor da minha vida...

Dedico

Aos meus pais, **Gildo** e **Tereza**, e ao meu irmão **Gustavo** (*in memoriam*), pela educação, amor e grandes lições de vida as quais procurei assimilar, levando-as comigo em todos os momentos da minha vida.

Dedico

Aos meus compadres e amigos
Júnior e sua esposa **Mariza**,
obrigado pela grande amizade,
consideração e auxílio nos
momentos difíceis. Mais uma vez,
obrigado por tudo!

Dedico

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. **Maria Madalena Pessoa Guerra**, pela competência, por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado, me proporcionando um grande crescimento profissional, pelos ensinamentos e pela pessoa que é;

Ao professor e amigo **Valdemiro Amaro da Silva Júnior**, pelo compromisso e competência, pelos importantes ensinamentos científicos e lições de vida, orientando de maneira extremamente dedicada e atenciosa;

Às pessoas que me auxiliaram na execução do experimento, nas pessoas de Victor Hugo, Patrícia Jasset, Aline Moraes, Sandra Torres, Bruno e André;

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, pela oportunidade de grandes aprendizagens durante o Mestrado.

A **CAPES**, pela concessão de bolsa de estudos durante a realização do mestrado.

RESUMO

Objetivou-se estudar a influência da pentoxifilina no desenvolvimento testicular durante o período neonatal e no processo espermatogênico de ratos Wistar adultos. Foram utilizados 37 ratos neonatos Wistar, os quais foram submetidos aos diversos tratamentos, durante os primeiros 21 dias de vida, de acordo com o grupo experimental: controle (n=10), 1mg/kg (n=10), 5mg/kg (n=9) e 10mg/kg (n=8) de pentoxifilina. Para o segundo experimento, foram utilizados 39 ratos Wistar adultos, os quais foram submetidos aos diversos tratamentos, entre 90 e 150 dias de vida, de acordo com o grupo experimental: controle (n=9), 15mg/kg (n=10), 30mg/kg (n=10) e 60mg/kg (n=10) de pentoxifilina. A pesagem dos animais foi realizada diariamente, nos grupos controle e tratados de cada experimento. Para a realização das análises histológicas e histométricas, os ratos de cada experimento foram submetidos à heparinização e anestesia e, posteriormente, submetidos à perfusão intracárdica com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica e nitroprussiato. Após a lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M. Posteriormente, os testículos, epidídimos e vesícula seminal foram removidos e pesados. Os testículos foram seccionados em fragmentos de 2mm e refixados na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados. Em relação ao primeiro experimento, o peso testicular dos animais tratados com 5mg/kg foi maior 13,3% do que o observado nos animais tratados com a maior dose. O número de células de Sertoli por secção transversal sofreu redução significativa nos grupos tratados com 5mg/kg e 10mg/kg em relação aos grupos controle e tratado com 1mg/kg. O índice de célula de Sertoli (ICS) aumentou significativamente nos animais tratados com 5mg/kg em comparação ao grupo controle. Em se tratando do segundo experimento, as maiores doses de pentoxifilina promoveram redução no volume do parênquima testicular alocado no lume dos túbulos seminíferos e aumentaram a túnica própria destes túbulos. A volumetria das células de Leydig aumentou nos grupos tratados com as doses de 30 e 60mg/kg de pentoxifilina quando comparada com os animais tratados com a menor dose. Conclui-se que a utilização da pentoxifilina durante o período crítico do desenvolvimento testicular neonatal em ratos Wistar não foi capaz de induzir aumento na população das células de Sertoli, assim como a utilização da pentoxifilina durante 60 dias em ratos Wistar adultos não foi capaz de aumentar o rendimento intrínseco da espermatogênese e produção espermática.

Palavras-chave: Pentoxifilina, testículo, células de Sertoli, células de Leydig, produção espermática, espermatogênese.

ABSTRACT

It was objectified to use increasing doses of pentoxifylline on the critical period of the testicular development of Wistar rats, aiming to keep high levels of AMPc in the Sertoli cells and to increase the intrinsic income of spermatogenesis and sperm production in adult rats. There were used 37 neonate Wistar rats, which were submitted to many treatments during first 21 days of life, according to experimental groups: control (n=10), 1mg/kg (n=10), 5mg/kg (n=9) and 10mg/kg (n=8) of pentoxifylline. The animal weight was obtained daily, in this period, on the control and treated groups. On the second experiment, it was used 39 adult Wistar rats, which were submitted to many treatments, between 90 and 150 days of life. in accordance with the experimental group: control (n=9), 15mg/kg (n=10), 30mg/kg (n=10) and 60mg/kg (n=10) of pentoxifylline. The animal weight was carried through daily, in this period, on the control and treated groups. At the 90 days (Exp. 1) and 150 days (Exp. 2) of the experimental period, the rats of each group were submitted to anesthesia and intracardiac perfusion. Later, the testis, epididimes and seminal vesicle were removed and weighted. The testis were fragmented (2mm) and put in perfusion solution. For studies with light microscope, the fragments were processed routinely for inclusion in plastic resin with glycol methacrylate. Histologic cuts (4 μ m) were stained in blue of toluidine/borate of sodium (1%) and analyzed. On the Experiment 1, the testis weight of animals treated with 5mg/kg was higher (13%) than those observed in the animals treated with biggest dose. The seminal vesicle of the animals treated with 5mg/kg presented increase of 17% and 26% in weight in relation to the 1mg/kg and control groups, respectively. The net weight of testis had significant reduction in the group treated with 10 mg/kg when compared to the group treated with 5mg/kg. The seminiferous tubule and epithelium volumes increased in the group of 5mg/kg when compared to the control and 10mg/kg groups. The number of Sertoli cell per transversal section had significant reduction in the groups treated with 5mg/kg and 10mg/kg when compared to control and 1mg/kg groups. Spermatides rounded by transversal section had numerical reduction in the group treated with 10mg/kg when compared with animals treated with 1mg/kg. The index of Sertoli cell (ICS) significantly increased in the animals treated with 5mg/kg in comparison to the control group. On the animals that received increased doses of pentoxifylline between 90 and 150 days of life, the higer doses of pentoxifylline had decrease of testicular parenchyma on the lume of seminiferous tubules and increased the proper tunic theses tubules. On the intertubular compartment, the highest doses of this PDE's inhibitor increased the conjutive tissue volume and decreased the lymphatic space. The volumetry of Leydig cells increased on the treated groups with the doses of 30 and 60 mg/kg de pentoxifyllina when compared with animals treated with lower doses. The number of spermatogonia A increased on the 30 and 60 mg/kg when compared to control group. In accordance with the results, the use of the pentoxifylline during the critical period of the neonatal testis development in Wistar rats was not capable to induce increase in the population of Sertoli cells, as well the pentoxifylline during 60 days in adult Wistar rats was not capable to increase the intrinsic income of spermatogenesis and sperm production.

Word-key: Pentoxifylline, testis, Sertoli cells, Leydig cells, sperm production, spermatogenesis.

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
SUMÁRIO.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Fosfodiesterases e sua relação com o sistema endócrino.....	13
2.2 Pentoxifilina e suas aplicações farmacológicas.....	14
2.3 Controle endócrino da função testicular e pentoxifilina.....	16
2.4 Pentoxifilina e os parâmetros espermáticos.....	18
2.5 Células de Sertoli e seu período proliferativo.....	20
2.6 Hormônio folículo estimulante e a proliferação de células de Sertoli...	22
2.7 Métodos para aumento da produção espermática.....	23
3 EXPERIMENTOS.....	25
3.1 Utilização de pentoxifilina no período neonatal aumenta a produção espermática em ratos Wistar adultos?	26
3.2 Efeito da pentoxifilina sobre a produção espermática, rendimento da espermatogênese e produção de testosterona em ratos Wistar adultos.	52
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 Introdução

Recentemente, novos caminhos de regulação molecular e suas respectivas funções têm sido estudados com maior frequência, incluindo as fosfodiesterases, enzimas que controlam a concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos. Em função disso, algumas substâncias têm sido utilizadas com intuito de interferir na regulação de AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico) e GMPc (Guanosina Monofosfato cíclico) promovida pelas fosfodiesterases durante a sinalização celular, como por exemplo, a pentoxifilina, um inibidor da fosfodiesterase frequentemente utilizada no tratamento de alterações vasculares (CONTI, 2000; SALAM, 2003; OCHIAI, 2004).

Nas pesquisas destinadas à reprodução humana e animal, a pentoxifilina vem sendo utilizada na tentativa de melhorar a diferenciação *in vitro* de células germinativas masculinas de alguns pacientes com interrupção da espermatogênese ou com espermatogênese normal (TESARIK et al., 2000). Além disso, a pentoxifilina tem sido empregada na melhoria da motilidade espermática *in vitro* e *in vivo* através da redução da degradação de AMPc, além de induzir a capacitação e a reação acrossômica pela inibição de reações oxidativas em processos de fertilização *in vitro* (FIV), gerando quantidade de energia suficiente para a célula espermática (CALOGERO et al., 1998; NASSAR et al., 1998).

O controle do processo espermatogênico está sob ação conjunta de hormônios gonadotróficos, testosterona e diversos fatores de sinalização intratesticular. Entretanto, o FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e a testosterona assumem o papel principal na regulação deste processo, através da ação sobre receptores presentes nas células de Sertoli (SHARPE, 1994; GRISWOLD, 1998; SKINNER, 2005; WALKER e CHENG, 2005).

A população de células de Sertoli, estabelecida antes da instalação da puberdade, está diretamente relacionada com a capacidade de produção espermática na maioria dos mamíferos devido à sua correlação positiva com alguns parâmetros como: peso testicular, comprimento total de túbulos seminíferos, volume de túbulo e epitélio seminífero e produção espermática. Portanto, durante esta fase, qualquer alteração hormonal pode modificar os níveis proliferativos desta célula, podendo acarretar aumento ou diminuição da capacidade produtiva espermatogênica no adulto (SILVA JÚNIOR et al., 2006).

Durante o período proliferativo das células de Sertoli, o FSH parece ser o principal fator mitogênico destas células. O mecanismo de ação deste hormônio está baseado na sua ligação com um receptor transmembrana acoplado a uma proteína G. Esta, por sua vez, tem o papel de ativar outra proteína transmembrana, a adenilatociclase, cuja finalidade é gerar um segundo mensageiro, o AMPc, a partir de uma molécula de ATP. Este segundo mensageiro tem o papel de ativar o metabolismo celular e a atividade proliferativa de células de Sertoli imaturas (CONTI, 2000; FRANÇA et al., 2000).

O mecanismo de formação de segundos mensageiros nas células de Sertoli e de Leydig é dependente dos hormônios gonadotróficos, FSH e LH, respectivamente. A formação do segundo mensageiro nas células de Sertoli e Leydig segue mecanismos comuns; a inativação destes depende da ação das fosfodiesterases, as quais fazem parte de um dos mecanismos de modulação hormonal intracelular também comum às células citadas anteriormente (WALKER e CHENG, 2005).

A pentoxifilina é um inibidor inespecífico das fosfodiesterases largamente prescrito nas desordens vasculares (SALAM et al., 2003; OCHIAI et al., 2004). Além disso, a utilização desta droga na reprodução animal e humana apresenta bons resultados na melhoria da espermatogênese *in vitro* (TESARIK et al., 2000) e redução de efeitos colaterais nos testículos, oriundos de quimioterapia (SAAD et al., 2004).

Baseado no exposto anteriormente, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da pentoxifilina sobre o desenvolvimento testicular, suas conseqüências sobre a espermatogênese em ratos Wistar e a sua possível utilização como metodologia para aumento da produção espermática.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Fosfodiesterases e sua relação com o sistema endócrino

Nos últimos anos, novas vias de regulação molecular têm sido identificadas com o objetivo de mapear os diversos tipos de transdução de sinais relacionados com a formação de moléculas sinalizadoras dentro da célula. Novos componentes de sinalização foram estabelecidos e suas funções vêm sendo continuamente descobertas. Estas funções são complexas, principalmente quando integrada ao metabolismo intermediário, como no caso dos nucleotídeos cíclicos dependentes da transdução do sinal e seus componentes, incluindo as fosfodiesterases (PDE's), enzimas que controlam a concentração intracelular de AMPc e GMPc (CONTI et al., 1995; CONTI, 2000).

As PDE's são derivadas de 21 tipos de genes diferentes presentes no genoma de mamíferos (CONTI, 2000). Com base na similaridade de sua estrutura e função, esses genes podem ser agrupados em sete diferentes famílias. Nas gônadas masculinas de humano e ratos existem quatro genes pertencentes à família das CaM-PDE's (Fosfodiesterases cálcio-calmodulina dependentes), capazes de promover a hidrólise do AMPc com alta afinidade, sendo, portanto, esperado que a ativação desta enzima tenha maior impacto nos níveis de AMPc intracelular (CONTI et al., 1995; POLSON e STRADA, 1996).

A PDE apresenta, em sua composição, três regiões: uma de domínio regulatório, uma de domínio inibitório e uma de domínio catalítico, estruturalmente conservadas em todas as PDE's estudadas (CONTI et al., 1995; SALANOVA et al., 1999). O domínio regulatório funciona como sensor de sinais intracelulares, estimulado pelos segundos mensageiros (AMPc e Ca^{+2}). A recepção destes sinais produz mudança na conformação da PDE de maneira que o domínio inibitório exerce, não por muito tempo, efeito negativo sobre a catálise do segundo mensageiro. Por sua vez, o domínio catalítico é o local onde esta enzima promove a hidrólise do segundo mensageiro quando estimulada pelo complexo cálcio-calmodulina (CONTI, 2000).

Existem algumas substâncias que podem interferir na regulação intracelular de AMPc e GMPc, as quais são denominadas de inibidoras das fosfodiesterases, que promovem aumento nas concentrações de nucleotídeos cíclicos intracelular (SALAM et al., 2003).

As xantinas, incluindo a cafeína e a teofilina presentes no café e no chá, são inibidores de PDE's utilizados em tratamentos de alterações cardiovasculares e pulmonares. Seus múltiplos efeitos são devido à deficiência na seletividade por conta da inibição de todas as PDE's expressadas nos mamíferos, exceto a PDE8 e 9 (BEAVO, 1995). Algumas drogas que apresentam alta seletividade pelas PDE3, PDE4, PDE5/6 e, possivelmente, PDE1 têm sido sintetizadas e desenvolvidas para várias indicações (TORPHY, 1998). Partindo deste princípio, alguns inibidores de PDE's podem ser utilizados para modular o sistema endócrino, principalmente no controle de secreção hormonal e na manipulação da sensibilidade de órgãos alvo aos hormônios (HADLEY, 1996; KUMARI, 1997).

A secreção hormonal da pituitária pode ser outro possível local de manipulação de PDE's. O eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) é muito sensível ao inibidor de PDE4, dembufilina. A administração oral ou intraperitoneal marcou a elevação nos corticosteróides séricos a partir do uso desse inibidor de PDE4. A liberação do hormônio luteinizante (LH) também é estimulada por esses inibidores, sugerindo que esta estratégia pode ser utilizada para manipular a secreção de pituitária, uma vez que a inibição de PDE pode aumentar a liberação hormonal e a estimulação de órgãos alvo (HADLEY et al., 1996; KUMARI et al., 1997). Portanto, acredita-se que a manipulação da atividade da PDE em células endócrinas pode ter considerável potencial terapêutico (CONTI, 2000).

2.2 Pentoxifilina e suas aplicações farmacológicas

A pentoxifilina ou 1-(5-oxohexil)-3, 7-dimetilxantina (Fig. 1), derivada de metilxantina, é um inibidor inespecífico das fosfodiesterases largamente prescrito nas alterações vasculares caracterizadas por deficiência na microcirculação regional, em virtude do seu efeito vasodilatador (SALAM et al., 2003; OCHIAI et al., 2004), inibindo vários mecanismos inflamatórios, incluindo a cascata do complemento, a aderência dos neutrófilos, a produção de citocinas e a proliferação de fibroblastos dérmicos (CARNEIRO, 2005). Este fármaco possui importante propriedade vasodilatadora, diminuindo a agregação de células sanguíneas, ativação do fibrinogênio e a viscosidade do plasma, causando aumento na perfusão tecidual local e na hemodinâmica. Em ratos com torção testicular, a pentoxifilina melhorou a circulação sanguínea devido, provavelmente, a vasodilatação (SAVAS et al., 2002).

Além da capacidade de incremento da perfusão tecidual, a pentoxifilina possui atividade antiinflamatória em artrites e edemas causados por inflamações cutâneas oriundas de raios ultravioletas, em gastrites induzidas por terapia com antiinflamatórios não esteróides e esteróides, além de acelerar a recuperação de úlceras, prevenção de fibrose hepática, hipertensão portal e cardiopatia dilatada de origem idiopática (SALAM et al., 2003).

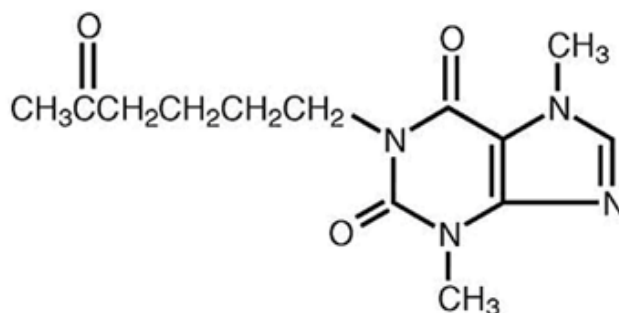


Figura 1 – Estrutura química da pentoxifilina.

Segundo Radfar et al. (2005), a pentoxifilina possui alguns efeitos na produção do fator de crescimento epidermal (EGF) e nos níveis de óxido nítrico em pacientes com diabetes do tipo II, pois esta droga inibe a xantina oxidase, a qual é considerada como a principal formadora de radicais de oxigênio livre nas células. Além disso, a pentoxifilina diminui a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TnF- α), uma das principais moléculas de sinalização parácrina produzida principalmente por macrófagos ativados em processos inflamatórios inespecíficos crônicos e imunomediados.

Nas pesquisas relacionadas com reprodução, a utilização da pentoxifilina melhorou a diferenciação *in vitro* de células germinativas masculinas em pacientes com interrupção na maturação *in vivo* e pacientes com espermatogênese normal (TESARIK et al., 2000). Ainda relacionado à reprodução, a administração deste fármaco diminuiu marcadamente a nefrotoxicidade e a toxicidade testicular induzida pela Cisplatina, uma droga anticancerígena que promove alterações histológicas e bioquímicas neste órgão (SAAD et al., 2004).

Estudos mostraram que a pentoxifilina tem propriedades antioxidantes devido à redução de danos ao embrião induzido pelo peróxido de hidrogênio, o que, conseqüentemente, melhorou a fertilização *in vitro* (ZHANG et al., 2005). Além disso, esta droga vem sendo testada no sêmen com o objetivo de melhorar a motilidade dos

espermatozóides (CALOGERO et al., 1998; NASSAR et al., 1998), e nos processos de FIV (Fertilização *in vitro*) para intensificar a ligação de espermatozóides na zona pelúcida, aumentando a eficácia da fertilização e, conseqüentemente, melhorando a incidência de gravidez (RUPASRI et al., 1995; NASSAR et al., 1998).

2.3 Controle endócrino da função testicular e pentoxifilina

A espermatogênese é um processo complexo e organizado que ocorre nos túbulos seminíferos com duração de 40 a 60 dias, na maioria dos mamíferos (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Este processo pode ser dividido em três fases com base em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica (espermátides), na qual as espermátides apresentam enormes modificações, transformando-se em células especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (RUSSELL et al., 1990).

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados e, usualmente, existe somente um estádio por secção transversal de túbulo seminífero (LEBLOND e CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta seqüência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (LEBLOND e CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990; ORTAVANT et al., 1997).

O processo espermatogênico é regulado por uma complexa interrelação de sinais endócrinos e parácrinos. O principal regulador hormonal é o GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), um decapeptídeo produzido por neurônios especializados do hipotálamo. A produção de sinais pulsáteis de GnRH sobre as células gonadotróficas da adenohipófise promovem incremento na síntese e secreção de FSH e LH, os quais agem no testículo regulando o potencial espermatogênico (WALKER e CHENG, 2005). Além dos hormônios gonadotróficos, outros fatores intratesticulares

produzidos pelos componentes do compartimento tubular e intersticial também influenciam o processo espermatogênico, entre os quais podem ser citados testosterona, inibina, endorfina, AMH (Hormônio anti-Mülleriano) e fatores de crescimento regulatório, tais como: TGF α e β (Fator de crescimento transformador alfa e beta), IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina-I), FGF (Fator de crescimento fibroblástico) e EGF (Fator de crescimento epidermal) (TINAJERO et al., 1992; SHARPE, 1994; FRANÇA e RUSSELL, 1998; WALKER e CHENG, 2005).

O FSH estimula as células de Sertoli a produzirem outros hormônios (estrógeno, inibina), proteínas (ABP-proteína ligante de andrógeno, transferrina), lactato e fatores necessários ao metabolismo das células germinativas. O mecanismo de estimulação desta célula está baseado no aumento intracelular de AMPc em decorrência da ligação hormônio-receptor a uma proteína G e ativação de adenilatociclase (SKINNER, 2005).

O LH estimula a esteroidogênese nas células de Leydig com mecanismo semelhante ao descrito anteriormente para células de Sertoli. Nestas células, o AMPc é, aparentemente, o sistema de segundo mensageiro utilizado na transdução do sinal. Entretanto, outros sistemas de transdução podem estar envolvidos, como por exemplo, proteínas G ligadas a canais de cálcio e cloro, como também os derivados de fosfolípidios de membrana e prostaglandinas (HUHTAHNIEMI e TOPPARI, 1998).

A testosterona, sintetizada e secretada pelas células de Leydig, liga-se à proteína receptora citoplasmática apropriada. Esta ligação faz com que proteínas inibidoras se soltem do receptor e, com isso, o complexo hormônio-proteína receptora migra para o núcleo estimulando ou inibindo determinados genes. As proteínas cuja síntese é aumentada ou reduzida são as responsáveis pela resposta celular induzida pela testosterona (HUHTAHNIEMI e TOPPARI, 1998).

A pentoxifilina, inibidora inespecífica de PDE, pode ser utilizada na manipulação da atividade de células endócrinas da adenohipófise e células alvo dos hormônios produzidos por esta glândula (CONTI, 2000). Por conseguinte, este fármaco pode ser empregado para proteger o parênquima testicular de agressões provenientes de distúrbios vasculares, inflamatórios, térmicos e inespecíficos, que por ventura afetem o desempenho funcional deste órgão. Alguns estudos *in vitro* indicaram que a pentoxifilina aumentou as concentrações de AMPc intracelular através da inibição da fosfodiesterase (NEGRI et al., 1996; ESTEVES et al., 1998; TESARIK et al., 2000; SAVAS et al., 2002; STANIC et al., 2002;), simulando os efeitos do FSH na

diferenciação e sobrevivência de células germinativas e na capacidade de suporte das células de Sertoli (TESARIK et al., 2000).

2.4 Pentoxifilina e os parâmetros espermáticos

A motilidade é uma característica importante para se estimar a capacidade fertilizante do espermatozóide. Várias substâncias têm sido utilizadas com o objetivo de melhorar a motilidade espermática *in vitro* e *in vivo*, como por exemplo, as substâncias inibidoras da fosfodiesterase, como a pentoxifilina, por serem responsáveis pela estimulação da motilidade flagelar através da redução da degradação de AMPc, propiciando seu aumento no conteúdo intracelular, gerando energia desejável para a motilidade espermática (CALOGERO et al., 1998).

Evidências indicaram que a adição de dibutilil AMPc, pentoxifilina ou Ca^{2+} ao sêmen de ratos Wistar com seis meses de idade ativou a motilidade espermática (WADE et al., 2003). Embora os mecanismos envolvidos na regulação da motilidade espermática não sejam completamente entendidos, sabe-se que os processos metabólicos dos espermatozóides são principalmente glicolíticos; entretanto, em menor grau, ocorre a fosforilação oxidativa, sendo todos esses processos controlados pelo AMP cíclico (NASSAR et al., 1998). A intensificação da motilidade espermática pode estar relacionada com a modulação intracelular de cálcio (HONG et al., 1985). No entanto, têm-se demonstrado que a pentoxifilina estimula as funções espermáticas sem depender do aumento do cálcio intracelular (NASSAR et al., 1998). Outros autores têm descrito que o efeito benéfico da pentoxifilina no espermatozóide humano pode ser mediado pela neutralização das reações formadoras de radicais de oxigênio reativo (YOVICH et al., 1993).

De acordo com Goulart et al. (2004), a adição de 3,6 Mm (milimolar) de pentoxifilina, equivalente a 1,0 mg/mL, no ejaculado de eqüinos *in vitro*, diluído e resfriado a 5 °C, melhorou a viabilidade espermática. Entretanto, os mesmos autores sugeriram a execução de outros experimentos testando diferentes concentrações de pentoxifilina, seu uso na pré e pós-congelação, avaliação do poder antioxidante, alteração no tempo de capacitação espermática e seus efeitos em ejaculados de indivíduos com baixas taxas de fertilidade.

Segundo Gradil et al. (2000), a adição de pentoxifilina (3,5 ou 7mM) ao sêmen de eqüinos, antes da criopreservação, diminuiu significativamente a motilidade total e

progressiva pós-descongelamento. No entanto, a adição da pentoxifilina ao sêmen equino imediatamente após a descongelamento aumentou significativamente as motilidades total e progressiva. Não se sabe até que ponto a pentoxifilina poderá afetar significativamente a fertilidade, ao ser adicionado ao sêmen equino criopreservado.

Stanic et al. (2002) também concluíram que a pentoxifilina melhora a motilidade pós-descongelamento de espermatozóides humanos criopreservados, quando adicionada ao sêmen pós-descongelamento, sem constatar melhora na fertilidade. Por outro lado, Esteves et al. (1998) afirmaram que o tratamento com pentoxifilina antes da criopreservamento do sêmen humano pareceu minimizar os danos ao espermatozóide durante o processo de congelamento/descongelamento, além de melhorar as taxas de fertilizamento após o uso de procedimentos de reproduo assistida, como a inseminamento artificial intrauterina ou a FIV.

A produo de oxidantes, como o ânion superóxido, pode resultar em dano oxidativo nas membranas celulares. Embora o efeito inibitório da pentoxifilina tenha sido demonstrado *in vitro*, em concentraoes milimolares na produo de ânion superóxido pelas células espermáticas, e alguns estudos da membrana afirmem que a pentoxifilina reduz os danos à membrana espermática durante os processos de congelamento e descongelamento, ainda não foi constatado que a pentoxifilina influencia a integridade espermática após a descongelamento. Por conseguinte, a pentoxifilina pode não apresentar papel protetor na manuteno da integridade da membrana espermática, pois a adio de pentoxifilina em outros experimentos falhou em reduzir o efeito negativo relacionado ao choque osmótico e não resultou na preservamento do estado funcional da membrana espermática durante o processo de congelamento/descongelamento de espermatozóides (STANICK et al., 2002).

A habilidade de espermatozóides mamíferos para fertilizar é dependente da capacitao e da reao acrossomica (NUMABE et al., 2001). Dessa forma, têm-se utilizado a pentoxifilina com a funo de inibir as reaoes oxidativas, melhorando a capacitao e a reao acrossomica (NUMABE et al., 2001; STANICK et al., 2002). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a adio de pentoxifilina ao sêmen induziu a reao acrossomica e acelerou o tempo de formao dos pró-núcleos, promovendo o desenvolvimento precoce do embrião (LEE et al., 1997).

2.5 Células de Sertoli e seu período proliferativo

Em animais adultos, as células de Sertoli completamente diferenciadas constituem uma população estável. Durante o desenvolvimento testicular ocorre um aumento relativamente rápido da população de certos tipos celulares, tanto no período fetal quanto no período neonatal. As células que constituem população testicular se expandem em períodos particulares do desenvolvimento e, pelo menos no caso das células de Sertoli e das células espermatogênicas, esses períodos são distintos e inversamente correlacionados. Além de distintos, estes períodos de multiplicação das células testiculares são controlados por fatores específicos para cada população (ORTH, 1993).

Fortes evidências indicaram que o número de células de Sertoli em qualquer espécie é importante para determinar a capacidade espermatogênica e o tamanho do testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Portanto, a população de células de Sertoli, segundo Johnson et al. (1984), Berndtson et al. (1987), Berndtson e Thompson (1990) e França e Russell (1998) correlacionou-se linear e positivamente com o peso do testículo, volume e comprimento total de túbulos seminíferos, população de espermatogônias A₁ e com a produção espermática diária. O estabelecimento desta população ocorre em idades muito precoces do desenvolvimento testicular, após o que as células de Sertoli perderam sua habilidade mitótica e permaneceram numericamente estáveis (GONDOS e BERNDSTON, 1993).

A maioria das mitoses das células de Sertoli nos mamíferos ocorre na vida intra-uterina e por um curto período pós-natal. O final do processo mitogênico está relacionado com a formação da barreira de células de Sertoli e o estabelecimento da puberdade. Após estes dois eventos nenhum aumento sazonal ou relacionado com a idade é observado na população de células de Sertoli (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

De acordo com Cooke et al. (1994a), existe grande variação no padrão de proliferação entre as espécies. O período mitogênico é muito curto em ratos e camundongos; ele se inicia no final da gestação para ambas as espécies e continua até o 12^o-15^o dia pós-natal em camundongos (JOYCE et al., 1993; VERGOUWEN et al., 1993) e até o 15^o-18^o dia pós-natal em ratos (CLERMONT e PEREY, 1957; STEINBERGER e STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; VAN HAASTER et al., 1992). Portanto, durante o período fetal destas espécies observa-se maior expansão da população de células de Sertoli, e, após o nascimento, a proliferação destas células já

está em declínio (ORTH 1982; VERGUOWEN et al., 1991; VAN HAASTER et al., 1992; JOYCE et al., 1993).

É importante salientar que, além das diferentes extensões nos períodos proliferativos pós-natais entre as espécies, a intensidade de proliferação é um outro fator que deve ser levado em consideração durante este período (COOKE et al., 1994b). Portanto, alguns mamíferos podem apresentar longos períodos de proliferação de células de Sertoli com baixa média mitogênica e diminuição gradual desta média. Por outro lado, outros podem apresentar períodos mais condensados de proliferação de células de Sertoli, caracterizados por altos índices mitóticos, porém, que declinam rapidamente e culminam com a maturação das células de Sertoli (COOKE et al., 1994b).

Em algumas espécies, a mitogênese da célula de Sertoli no período fetal não foi quantificada, entretanto é sabido que em coelhos o período de proliferação pode se estender até o 60^o dia pós-natal (COOKE et al., 1994a). Segundo Hochereau-De Reviers et al. (1995), entre o 42^o e o 100^o dia do período fetal, em carneiros, ocorre elevada proliferação de células somáticas e germinativas, sem qualquer diferenciação. Nesta espécie, as divisões mitóticas das células de Sertoli são mais numerosas antes do nascimento do que depois; por outro lado, no período pós-natal observou-se que a proliferação deste tipo celular, apesar de discreto, prolongou-se até o 40^o dia (COOKE et al., 1994a; HOCHEREAU-DE REVIERS et al. 1995). Em touros, a proliferação de células de Sertoli no período pós-natal inicia-se por volta da 20^a e se prolonga até a 32^a semana, a partir da qual ocorre estabilização no número de células de Sertoli por testículo nesta espécie (CURTIS e AMANN, 1981). No homem, a população de células de Sertoli aumenta gradativamente no período pós-natal até atingir um platô entre 25 e 40 anos (GONDOS e BERNDTSON, 1993). Por outro lado, a partir dos 40 anos se observa declínio gradativo na população de células de Sertoli acompanhado também pela diminuição na produção espermática (JOHNSON et al., 1984).

Em suínos, a proliferação de células de Sertoli apresenta duas fases distintas. A primeira ocorre entre o nascimento e o primeiro mês de vida. Período no qual o número de células de Sertoli por testículo aumenta aproximadamente seis vezes. A segunda ocorre entre três e quatro meses de idade, ou seja, imediatamente antes da puberdade, quando as células de Sertoli quase duplicam o seu número no testículo. Este período de proliferação ocorre concomitantemente à elevação dos níveis plasmáticos de FSH (FRANÇA et al., 2000).

2.6 Hormônio folículo estimulante e a proliferação de células de Sertoli

O FSH é um membro da família de hormônios glicoprotéicos, juntamente com o LH, o hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) e o TSH (Hormônio Tireotrófico). Esses hormônios são heterodímeros ricos em ligação dissulfeto que compartilham uma subunidade α comum; no entanto, possuem subunidades β com características únicas para cada tipo de hormônio, o que confere a especificidade de cada um deles (WALKER e CHENG, 2005).

O FSH provavelmente é o mais importante regulador da replicação da população de células de Sertoli durante o período fetal e neonatal do desenvolvimento testicular, o que se confirma pela redução deste tipo celular, quando se induz a supressão deste fator mitogênico e pelo efeito inverso obtido com a sua administração suplementar (HOCHEREAU-DE-REVIERS e COUROT, 1978; ORTH, 1984; ORTH et al., 1984; VAN VORSTENBOSCH et al., 1987; ORTH, 1993; SHARPE, 1994; MEACHEM et al., 1996; SINGH e HANDELSMAN, 1996). Este efeito mitogênico do FSH sobre as células de Sertoli imaturas é mediado pelo aumento dos níveis intracelulares do AMP cíclico. Entretanto, pouco se sabe sobre os eventos específicos que causariam o início da divisão das células de Sertoli em resposta ao FSH, ou que controlariam uma superestimulação por esta gonadotrofina. Especula-se que o estrógeno, produzido pela aromatização de andrógenos nas células de Sertoli imaturas, sob o estímulo do FSH, teria papel importante em mediar a divisão celular, através de bloqueio parácrino da produção de testosterona pelas células de Leydig e da produção de FSH pelas células da hipófise (ULISSE et al., 1994). Por outro lado, por ação endócrina sistêmica e local, a inibina produzida pelas células de Sertoli sob estímulo do FSH, seria capaz de regular a produção e secreção de FSH pela hipófise, como também estimular a produção de testosterona em células de Leydig imaturas (ORTH, 1993; DE KRETZER et al., 1996).

Este controle endócrino e parácrino exercido conjuntamente através das células de Leydig e de Sertoli imaturas podem estar envolvidos no controle dos níveis de FSH e, portanto, poderiam ter papel indireto em determinar o tamanho final da população de células de Sertoli (ORTH, 1993; SHARPE, 1994).

De acordo com Griswold (1993), as respostas das células de Sertoli ao FSH variam de acordo com o período de desenvolvimento testicular em que o animal se encontra. Durante o período fetal e neonatal do desenvolvimento testicular o FSH é

considerado o fator regulador de maior relevância na mitogênese da população de células de Sertoli (HOCHEREAU-DE-REVIERS e COUROT, 1978; ORTH, 1984; ORTH et al., 1984; VAN VORSTENBOSCH et al., 1987; ORTH, 1993; SHARPE, 1994; MEACHEM et al., 1996; SINGH e HANDELSMAN, 1996). Ao longo destes períodos, os níveis séricos normais de FSH são cruciais para a determinação do tamanho adequado da população de células de Sertoli do testículo no indivíduo adulto (ORTH, 1984; ORTH et al., 1988).

2.7 Métodos para aumentar a produção espermática

Diversos métodos que visam aumentar a produção espermática têm sido descritas. A castração unilateral de machos jovens leva à hipertrofia compensatória do testículo remanescente em suínos (KOSKO et al., 1989) e ratos (SIMORANGKIR et al., 1995), devido ao aumento da concentração plasmática de FSH (KOSKO et al., 1987), sem aumentar a produção espermática total (THOMPSON e BERNDTSON, 1993). A imunização de machos contra o estradiol (E2) também aumenta a concentração plasmática do FSH (aparentemente pela diminuição do controle “feedback” negativo deste último), induzindo o aumento do tamanho testicular. Apesar de relativamente eficiente em ovinos (MONET-KUNTZ et al., 1988), este método não é eficiente em outras espécies, como ratos e macacos. Outra alternativa, neste sentido, pode ser a imunização contra a inibina, proteína secretada pelas células de Sertoli e que atua no controle do “feedback” negativo do FSH, cujos resultados, em bovinos, ainda não são conclusivos (MARTIN et al., 1991; SHANBACHER, 1991). A injeção de FSH durante o período impúbere promove o aumento do comprimento dos túbulos seminíferos em suínos (SWANLUND et al., 1995) e do tamanho dos testículos em ratos (MEACHEM et al., 1996) e camundongos deficientes em gonadotrofinas (SINGH e HANDELSMAN, 1996). Da mesma forma, em primatas (*Macaca mulata*), tanto o FSH quanto a testosterona, ou a associação dos dois hormônios, promoveram o aumento do peso testicular (ARSLAN et al., 1993). A associação de hemicastração neonatal com o hipotireoidismo, em ratos, aumentou o peso do testículo remanescente em cerca de 50%, comparado com os dois métodos isoladamente (SIMORANGKIR et al., 1995).

Em todos estes procedimentos citados anteriormente, o aumento de peso dos testículos foi atribuído ao aumento na população de células de Sertoli. O FSH é

considerado o principal fator mitogênico para as células de Sertoli, enquanto o T3 (triiodotironina) inibe esta mitogênese antagonizando os efeitos do FSH (COOKE, 1996). Portanto, potencialmente, a administração de FSH durante o período impúbere pode também ser utilizada com o objetivo de aumentar a produção espermática. No entanto, o hipotireoidismo neonatal é o modelo experimental que tem demonstrado os melhores resultados para aumentar o tamanho dos testículos e a produção espermática, em diversas espécies (COOKE et al., 1994b).

3. EXPERIMENTOS

3.1 Utilização de pentoxifilina no período neonatal aumenta a produção espermática em ratos Wistar adultos?

MORAES, T.A.P.; JASSET, P.F.; De TORRES, S.M.; MORAES, A.V. De;
SILVA JÚNIOR, V.A.; GUERRA, M.M.P.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

RESUMO

Objetivou-se utilizar doses crescentes de pentoxifilina no período crítico do desenvolvimento testicular de ratos Wistar, visando manter elevado os níveis de AMPc nas células de Sertoli e aumentar a produção espermática no indivíduo adulto. Foram utilizados 37 ratos neonatos Wistar, os quais foram submetidos aos diversos tratamentos durante os primeiros 21 dias de vida, de acordo com o grupo experimental: controle (n=10), 1mg/kg (n=10), 5mg/kg (n=9) e 10mg/kg (n=8) de pentoxifilina. A pesagem dos animais foi realizada diariamente, neste período, nos grupos controle e tratados. Aos 90 dias do período experimental, os ratos de cada grupo foram heparinizados e anestesiados e, posteriormente, submetidos à perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica e nitroprussiato. Após a lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M. Posteriormente, os testículos, epidídimos e vesícula seminal foram removidos e pesados. Os testículos foram seccionados em fragmentos de 2mm e refixados na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados. O peso testicular dos animais tratados com 5mg/kg foi maior 13% do que o observado nos animais tratados com a maior dose ($P<0,05$). O número de células de Sertoli por secção transversal sofreu redução significativa nos grupos tratados com 5mg/kg e 10mg/kg em relação aos grupos controle e tratado com 1mg/kg ($P<0,05$). O índice de célula de Sertoli (ICS) aumentou significativamente os animais tratados com 5mg/kg em comparação ao grupo controle ($P<0,05$). De acordo com os resultados, a utilização da pentoxifilina durante o período crítico do desenvolvimento testicular não foi capaz de induzir aumento na população das células de Sertoli. Por conseguinte, o uso deste fármaco para aumentar a produção espermática e a eficiência da espermatogênese em ratos adultos mostrou-se inviável.

Palavras-chave: Testículo, células de Sertoli, produção espermática, espermatogênese, rato.

ABSTRACT

It was objectified to use increasing doses of pentoxifylline on the critical period of the testicular development of Wistar rats, aiming to keep high levels of AMPc in the Sertoli cells and to increase the sperm production in the adult rats. There were used 37 neonate Wistar rats, which were submitted to many treatments during first 21 days of life, according to experimental groups: control (n=10), 1mg/kg (n=10), 5mg/kg (n=9) and 10mg/kg (n=8) of pentoxifylline. The animal weight was obtained daily, in this period, on the control and treated groups. At 90 days of the experimental period, the rats of each group were submitted to anesthesia and intracardiac perfusion. Later, the testis, epididimes and seminal vesicle were removed and weighted. The testis were fragmented (2mm) and put in perfusion solution. For studies with light microscope, the fragments were processed routinely for inclusion in plastic resin with glycol methacrylate. Histologic cuts (4 μ m) were stained in blue of toluidine/borate of sodium (1%) and analyzed. The testis weight of animals treated with 5mg/kg was higher (13%) than those observed in the animals treated with biggest dose ($P<0,05$). The number of Sertoli cell per transversal section had significant reduction in the groups treated with 5mg/kg and 10mg/kg when compared to control and 1mg/kg groups ($P<0,05$). The index of Sertoli cell (ICS) significantly increased in the animals treated with 5mg/kg in comparison to the control group ($P<0,05$). In accordance with the results, the use of the pentoxifylline during the critical period of the neonatal testis development in Wistar rats was not capable to induce increase in the population of Sertoli cells. Therefore, the use of this substance revealed impracticable to increase the sperm production and the efficiency of spermatogenesis in adult rats.

Keywords: Testis, Sertoli cells, sperm production, spermatogenesis, rat.

1 Introdução

A ontogênese das células germinativas está associada com o desenvolvimento das células de Leydig e Sertoli, as quais possuem um papel importante no funcionamento apropriado do sistema reprodutor dos machos (DADUONI e DEMUOLIN, 1993; FRANÇA e RUSSELL, 1998). O crescimento das populações das células de Sertoli e células germinativas ocorre em diferentes períodos do desenvolvimento testicular, com momentos distintos para cada população celular, sendo que a maior expansão da população de células de Sertoli ocorre durante o período perinatal, seguido de um rápido declínio após o nascimento (ORTH, 1982).

O número de células de Sertoli é estabelecido durante o período pré-púbere determinando, desta forma, o tamanho final do testículo e a produção espermática diária em animais sexualmente maduros (FRANÇA et al., 2000). O período neonatal é, portanto, o de maior importância para o desenvolvimento normal da espermatogênese em adultos e a produção normal do número de células germinativas depende do

tamanho da população de células de Sertoli no final do período perinatal. (ORTH, 1982; ORTH et al., 1988;).

O FSH (Hormônio Folículo Estimulante) é o principal agente mitogênico responsável pela proliferação das células de Sertoli (ORTH, 1982; ORTH, 1984; ALMIRON e CHEMES, 1988;); portanto, níveis adequados deste hormônio são necessários para o estabelecimento do tamanho final do testículo e a produção espermática, uma vez que estas variáveis são controladas pela população de células de Sertoli durante o período crítico do desenvolvimento testicular (ORTH, 1988; ORTH, 1993).

Nas células de Sertoli, o FSH se liga a receptores transmembrana, os quais sofrem mudanças conformacionais que alteram a sua face intracelular, permitindo-o interagir com proteínas de ligação, denominadas proteínas G. Estas proteínas, quando ativadas, estimulam outras proteínas, como adenilato ciclase ou guanilato ciclase na face interna da membrana, que produzem aumento nas concentrações de AMPc (Adenosina Monofosfato cíclica) ou GMPc (Guanosina Monofosfato cíclica). Uma vez aumentados, estes segundo mensageiros intracelulares ativam proteínquinases, que auxiliam a fosforilação de proteínas. A resposta celular específica depende do tipo de proteína fosforilada (HUHTANIEMI e TOPPARI, 1998). Na célula de Sertoli neonatal, o aumento intracelular do AMPc pode estimular o processo proliferativo deste tipo celular (SILVA JUNIOR, 2006).

A pentoxifilina, derivada de metilxantina, é um inibidor inespecífico das fosfodiesterases largamente prescrito nas desordens vasculares caracterizadas por deficiência na microcirculação regional (SALAM et al., 2003; OCHIAI et al., 2004).

As fosfodiesterases (PDE's) são enzimas que controlam a concentração intracelular de AMP cíclico e GMP cíclico (CONTI et al., 1995; CONTI, 2000). No testículo de humanos e ratos existem quatro genes pertencentes à família dos CaM-PDE's (Fosfodiesterases Cálcio-Calmodulina Dependentes), os quais são capazes de promover a hidrólise do AMPc com alta afinidade, sendo, portanto, esperado que a ativação da enzima cálcio dependente possa ter maior impacto nos níveis de AMPc intracelular (CONTI et al., 1995; POLSON e STRADA, 1996).

A inibição de PDE deve ser utilizada para aumentar a estimulação hormonal. O tratamento de folículos ovarianos com inibidores de PDE4 causa maturação de oócito e ovulação, imitando os efeitos do LH. Isto mostra que é possível utilizar esses inibidores para potencializar o efeito de gonadotrofinas no ovário. Contrariamente,

inibidores de PDE3 são considerados bloqueadores de maturação de oócitos, afetando células da granulosa, demonstrando novas estratégias contraceptivas (CONTI, 2000).

Estudos *in vitro* indicaram que a pentoxifilina aumentou as concentrações de AMPc intracelular através da inibição da fosfodiesterase (NEGRI et al., 1996; ESTEVES et al., 1998; TESARIK et al., 2000; STANIC et al., 2002), simulando os efeitos do FSH na diferenciação e na sobrevivência de células germinativas *in vitro* e na capacidade de suporte das células de Sertoli em relação às células germinativas (TESARIK et al., 2000).

O presente experimento teve por objetivo utilizar doses crescentes de um inibidor inespecífico de PDE, a pentoxifilina, no período crítico do desenvolvimento testicular de ratos, visando manter elevado os níveis de AMPc no principal tipo celular em proliferação, as células de Sertoli. Consequentemente objetivou-se, também, aumentar a produção espermática no indivíduo adulto.

2 Material e Métodos

Foram utilizados 37 ratos neonatos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) pertencentes ao biotério da Área de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/Universidade Federal Rural de Pernambuco, os quais foram mantidos juntos com as mães, na temperatura 23 ± 1 °C, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e ração comercial foram oferecidos *ad libitum* até o final do experimento. Os ratos neonatos foram escolhidos por amostragem não probabilística de conveniência e submetidos aos diversos tratamentos, de acordo com o grupo experimental: controle (n=10), 1mg/kg (n=10), 5mg/kg (n=9) e 10mg/kg (n=8) de pentoxifilina (A Fórmula, Brasil).

Os tratamentos foram realizados durante os primeiros 21 dias pós-natal. A pesagem dos animais foi realizada diariamente, neste período, nos grupos controle e tratados, para acompanhamento da curva de crescimento corporal e cálculo das doses de pentoxifilina, administradas via intraperitoneal. Aos 90 dias do período experimental, os ratos de cada grupo foram heparinizados (125 UI/100g de peso corporal) e anestesiados por injeção intraperitoneal de Tiopental sódico (30mg/kg; ROCHE, Brasil), e submetidos à perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L; AKZO ORGANON TEKNIKA,

Brasil) e nitroprussiato (100mg/L; SIGMA, U.S.A.), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Após a lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído (VETEC, Brasil) a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos.

Após a perfusão com solução fixadora foram removidos e pesados: testículos, epidídimos e glândula vesicular. Os testículos foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura e submetidos à refixação na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA, Germany). Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados.

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidas em aumento de 100X usando retículo micrométrico linear (10mm/100 – Olympus, Japan) calibrado com um micrômetro padrão. O diâmetro tubular médio para cada rato foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, tomaram-se duas medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lume e epitélio germinativo determinando-se, desta forma, a altura média do epitélio seminífero.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de graticula micrométrica (Olympus, Japan) com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lume; enquanto no segundo foram investigados as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04 (FRANÇA, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo, expresso em µL foi estabelecido á partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o

peso líquido do testículo (mg). O valor deste último foi obtido pela subtração 6,5% da albugínea do peso testicular bruto (RUSSEL e FRANÇA, 1995).

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo expresso em metros foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada: $CT = VTS / \pi R^2$, onde VTS = Volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI 1974).

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio sete do ciclo, classificado de acordo com o método acrossômico (RUSSELL et al., 1990) foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas cinco secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados: espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno (SPT I Pl/L); espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P); espermátides arredondadas (SPD Ar); nucléolo de células de Sertoli.

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almqvist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM^2}{2}\right) - \left(\frac{DM^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de retículo micrométrico linear (10mm/100; Olympus, Japan) adaptado a uma das oculares de 10x e acoplado à objetiva de 100x, propiciando aumento final de 1000x. No caso das espermatogônias do tipo A que apresentam núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e a espessura do corte histológico; em virtude disto, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente.

A população total de células de Sertoli por testículo foi obtida a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de Reviers e Lincoln (1978): Número de células de Sertoli por testículo= [Comprimento total de túbulos Seminíferos (μm) X Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal]/ Espessura do corte (μm).

A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Júnior et al. (2006): PED = N° Total de células de Sertoli por testículo X proporção de espermátides redondas no estágio VII x estágio VII com frequência relativa / duração do estágio (dias).

Os dados biométricos e histométricos foram expressos em média \pm desvio padrão. Foram realizadas as análises de variância entre os grupos (ANOVA) e o teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

O desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controle e tratados com diferentes doses de pentoxifilina do nascimento ao 21º dia pós-natal encontram-se na Tabela 1. De acordo com os resultados, só foram observadas alterações estatisticamente significativas em dias isolados entre os grupos experimentais durante 21 dias pós-natal.

No primeiro dia do período experimental, o grupo tratado com 10mg/kg apresentava peso corporal superior aos demais grupos ($p < 0,05$). Por outro lado, 13 dias após os animais deste grupo evidenciaram redução de peso corporal em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), o que não se verificou com os demais grupos que receberam 1 e 5mg/kg de pentoxifilina via intraperitoneal (Tabela 1).

No décimo quarto dia pós-natal observou-se redução do peso corporal nos animais tratados com 10mg/kg, quando comparados aos do grupo que receberam a menor dosagem de pentoxifilina ($p < 0,05$). Entretanto, não se verificou diferença significativa entre os demais grupos.

O peso corporal dos animais que receberam a dose de 1mg/kg de pentoxifilina aumentou em relação ao grupo controle no 19º dia pós-natal ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina do nascimento aos 21 dias pós-natal (Média ± desvio padrão)

Dia	Grupos Experimentais				P
	Controle (n=10)	1 mg/Kg (n=10)	5 mg/Kg (n=9)	10 mg/Kg (n=8)	
1	7,60 ± 0,57a	7,89 ± 0,96a	7,66 ± 0,67a	9,09 ± 1,03b	0,0022
2	8,87 ± 0,64	9,27 ± 1,89	9,32 ± 0,90	10,14 ± 0,79	0,1819
3	10,56 ± 0,76	10,75 ± 2,66	10,93 ± 1,04	11,67 ± 1,00	0,5080
4	12,60 ± 0,56	12,49 ± 2,53	12,66 ± 1,21	13,01 ± 1,11	0,9100
5	14,41 ± 1,00	14,87 ± 3,54	14,57 ± 1,21	15,40 ± 1,08	0,7737
6	16,29 ± 1,10	17,22 ± 3,98	16,89 ± 1,47	17,34 ± 1,30	0,6220
7	18,85 ± 0,58	19,68 ± 3,96	18,78 ± 1,31	19,41 ± 1,23	0,7890
8	20,93 ± 0,74	22,16 ± 4,16	20,97 ± 1,69	20,80 ± 1,00	0,5778
9	22,75 ± 1,23	24,41 ± 4,14	23,50 ± 2,21	21,62 ± 1,85	0,1698
10	24,81 ± 1,49	27,11 ± 4,53	25,58 ± 2,29	23,75 ± 2,65	0,1278
11	27,32 ± 1,63	29,21 ± 4,47	27,56 ± 1,96	26,18 ± 2,16	0,1737
12	29,48 ± 2,08	31,76 ± 4,34	29,11 ± 2,71	28,37 ± 2,06	0,1071
13	32,25 ± 1,88a	34,72 ± 5,01ab	31,64 ± 3,37ab	29,88 ± 2,34b	0,0395
14	34,19 ± 2,18ab	37,57 ± 5,17a	34,00 ± 3,15ab	32,63 ± 1,88b	0,0260
15	36,15 ± 2,54	39,83 ± 5,55	36,36 ± 3,65	34,88 ± 2,56	0,0517
16	38,36 ± 2,68	42,27 ± 5,42	38,62 ± 4,11	37,49 ± 2,40	0,0565
17	40,77 ± 2,80	44,65 ± 5,70	40,73 ± 3,16	41,48 ± 2,71	0,0989
18	43,20 ± 3,48	47,31 ± 6,37	43,10 ± 3,04	45,67 ± 2,38	0,1007
19	45,59 ± 3,70a	50,84 ± 7,85b	45,14 ± 2,60ab	50,04 ± 2,75ab	0,0281
20	49,65 ± 4,87	54,68 ± 8,53	48,57 ± 2,04	52,52 ± 2,87	0,0655
21	53,11 ± 3,85	58,69 ± 9,02	53,40 ± 2,03	56,75 ± 3,06	0,0850

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

O desenvolvimento ponderal entre o 28º e 90º dia pós-natal está representado na Tabela 2. No quadragésimo nono dia observou-se redução de peso corporal nos animais tratados com 1mg/kg de pentoxifilina em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Enquanto no sexagésimo terceiro dia, o grupo tratado com 10mg/kg apresentou redução no peso corporal em relação ao controle ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados de desenvolvimento corporal, durante o período em que os animais neonatos receberam aplicações diárias de pentoxifilina, aparentemente, não se observou influência deste inibidor inespecífico de PDE's sobre ganho de peso, como também, nenhuma diferença significativa ficou caracterizada no período subsequente, compreendido entre o final da aplicação do fármaco e o 90º dia de vida. Por outro lado, com raras exceções, a inibição farmacológica da atividade das PDE's resulta em aumento da sinalização através via AMPc-dependente, um efeito que mimetiza a estimulação por hormônios e neurotransmissores. Entretanto, a disrupção do sistema de inativação do AMPc pelas PDE's pode prejudicar a homeostase e a diferenciação celular (THOMPSON, 1993). De acordo com Jim et al. (1999),

camundongos deficientes de PED4D apresentaram decréscimo de 30 a 40% no peso corporal entre a 1ª e 2ª semanas após o nascimento. A taxa de crescimento retornou ao normal após duas semanas, contudo, o peso dos camundongos adultos continuou abaixo do normal. Desordens metabólicas relacionadas a septicemias possuem sintomas como perda de peso corporal, perda de massa muscular e síntese protéica hepática aguda que estão relacionadas com o TNF α (Fator de crescimento tumoral α), uma citocina pró-inflamatória (BREUILLE et al., 1993; BATCHELDER e MAYOSI, 2005). A utilização da pentoxifilina em animais com septicemia promoveu diminuição da anorexia, perda de peso e massa muscular devido à inibição desta citocina nas concentrações plasmáticas (BREUILLE et al., 1999).

Até o momento, pelo menos 20 genes para PDE e quase 50 tipos de proteínas distintas para PDE's foram descritas em células de mamíferos (CONTI, 2000). Estas isoenzimas são caracterizadas por suas diferenças bioquímicas e propriedades cinéticas, localização subcelular e mecanismos de regulação. Entretanto, as razões pelas quais uma célula necessita de expressão de uma grande variedade de PDE's com sobreposições de função ainda não foram completamente compreendidas (JIM et al., 1999). Esta diversidade de PDE's e as prováveis diferenças entre espécies pode estar relacionada aos resultados encontrados no presente experimento, no que se refere a ausência de alterações marcantes no peso corporal, em virtude da utilização do inibidor inespecífico para estas enzimas.

Parâmetros biométricos aos 90 dias, tais como: peso corporal, testicular, epididimário, da glândula vesicular e índice gonadossomático (IGS) estão evidenciados na Tabela 3.

Tabela 2. Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de Pentoxifilina dos 28 dias aos 90 dias pós-natal (Média \pm desvio padrão)

Dias	Controle (n=10)	1 mg/Kg (n=10)	5 mg/Kg (n=9)	10 mg/Kg (n=8)	P
28	81,75 \pm 14,71	90,46 \pm 16,90	104,82 \pm 24,56	88,36 \pm 20,22	0,0860
35	104,19 \pm 23,28	92,38 \pm 10,28	97,45 \pm 5,50	99,02 \pm 5,62	0,3116
42	133,78 \pm 23,29	119,78 \pm 13,76	122,33 \pm 7,03	114,95 \pm 11,18	0,0763
49	172,56 \pm 22,19a	150,02 \pm 16,66b	156,74 \pm 12,35ab	151,54 \pm 12,54ab	0,0214
56	208,02 \pm 28,17	188,59 \pm 17,70	191,60 \pm 10,80	187,56 \pm 7,88	0,0717
63	245,98 \pm 27,77a	222,05 \pm 19,39ab	221,93 \pm 18,78ab	214,62 \pm 5,58b	0,0107
70	272,52 \pm 18,18	257,26 \pm 31,19	262,25 \pm 20,28	260,13 \pm 17,23	0,4825
77	296,46 \pm 32, 53	285,02 \pm 31,21	277,94 \pm 31,33	292,36 \pm 4,77	0,5131
84	333,77 \pm 27, 16	328,83 \pm 39,46	338,03 \pm 33,83	313,63 \pm 36,83	0,4946
90	359,3 \pm 22,6	362,6 \pm 45,5	388,9 \pm 31,5	367,9 \pm 29,1	0,2434

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

Tabela 3. Parâmetros biométricos de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina aos 90 dias de idade (Média ± desvio padrão)

Parâmetros	Grupos Experimentais				P
	Controle (n=10)	1mg/kg (n=10)	5mg/kg (n=9)	10mg/kg (n=8)	
Peso Corporal (g)	359,3 ± 22,6	362,6 ± 45,5	388,9 ± 31,5	367,9 ± 29,1	0,2434
Peso Testicular (g)	1,66 ± 0,10ab	1,69 ± 0,07ab	1,79 ± 0,11a	1,57 ± 0,17b	0,0058
Epidídimo (g)	0,57 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,62 ± 0,13	0,55 ± 0,04	0,2104
Vesícula Seminal (g)	1,23 ± 0,26a	1,38 ± 0,23a	1,66 ± 0,18b	1,40 ± 0,16ab	0,0013
IGS	0,46 ± 0,04	0,47 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,43 ± 0,07	0,4417

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$; IGS (%) = Índice Gonadossomático.

O peso testicular dos animais tratados com 5mg/kg foi 13,3% maior do que o observado nos animais tratados com a maior dose (10mg/kg). Apesar do aumento de 7,3% do peso testicular dos animais tratados com 5mg/kg em relação ao controle, não se observou significância neste resultado ($p < 0,05$). De acordo com França e Russell (1998), o peso testicular é altamente correlacionado com a produção espermática. Esta, por sua vez, possui relação direta com eventos decorridos durante o período crítico de desenvolvimento testicular em ratos (ORTH, 1982; ORTH et al., 1988). Portanto, mudanças experimentais induzidas durante este período podem aumentar ou diminuir o peso testicular e, conseqüentemente, a produção espermática (SILVA JUNIOR, 2000).

Até o momento, a administração da pentoxifilina durante o período crítico do desenvolvimento testicular não havia sido utilizada como metodologia para aumentar o peso dessa gônada. Neste trabalho, a dose de 5mg/Kg parece ter sido a mais adequada para obtenção do aumento do peso testicular, visto que a maior dose produziu efeito contrário ao que era esperado, muito embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos tratados e o controle.

A glândula vesicular dos animais do grupo de 5mg/kg apresentou aumento de 17,0% e 26,0% no seu peso em relação ao grupo 1mg/kg e controle, respectivamente ($p < 0,05$). Esta glândula sexual acessória tem origem nos ductos de Wolff e seu crescimento, assim como diferenciação, são estimulados pela testosterona fetal. A atividade desta glândula no indivíduo adulto possui íntima correlação com as concentrações de andrógenos, principalmente a testosterona testicular, uma vez que a orquiectomia ou drogas com atividades farmacológicas anti-androgênicas promovem atrofia das glândulas sexuais acessórias (NERI, 1989; LUKE e COFFEY, 1994; TUCKER e JONES, 1996; ISWARAN et al., 1997). Por outro lado, o aumento das

concentrações séricas de testosterona e andrógenos de outras fontes podem produzir hiperplasia ou hipertrofia de glândulas sexuais acessórias (BRUENGER et al., 1986, MCGINNIS et al., 2002).

A capacidade secretora de testosterona não está correlacionada com o número de células de Leydig por grama de testículo, volume de vasos sanguíneos, forma alongada das células ou macrófagos, mas com o volume destas células e com o seu número por testículo (SILVA JÚNIOR, 2000). Neste trabalho, as diferentes doses de pentoxifilina não produziram alterações no volume total de células de Leydig, entretanto verificou-se tendência à redução deste parâmetro nos animais tratados com 5mg/kg. Sabendo-se da relação andrógeno-dependente da glândula vesicular, é provável que o aumento do peso deste órgão esteja também relacionado à capacidade produtora de testosterona nos animais tratados no período neonatal com a dose intermediária da pentoxifilina.

A volumetria do parênquima testicular expressa em μL está evidenciada na Tabela 4. O peso líquido testicular teve redução significativa no grupo tratado com 10 mg/kg em relação ao grupo tratado com 5mg/kg, contudo em nenhum dos grupos tratados com pentoxifilina constatou-se relação de significância com o controle.

No experimento realizado constatou-se aumento no volume de túbulo seminífero e do epitélio seminífero no grupo de 5mg/kg em relação ao controle e 10mg/kg (Tabela 4).

Tabela 4. Peso líquido do testículo (μl), parâmetros volumétricos do parênquima testicular (μl) de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina aos 90 dias de idade (Média \pm desvio padrão)

Parâmetros	Grupos Experimentais				P
	Controle (n=10)	1mg/kg (n=10)	5mg/kg (n=9)	10mg/kg (n=8)	
Peso Líquido	1562,4 \pm 107,19ab	1581,6 \pm 70,94ab	1677,1 \pm 103,68a	1473,0 \pm 163,39b	0,0079
Túbulo Seminífero	1269,8 \pm 79,03a	1294,5 \pm 64,53abc	1411,7 \pm 102,46b	1209,9 \pm 181,53ac	0,0056
Epitélio Seminífero	1103,5 \pm 85,82a	1103,2 \pm 107,52ab	1254,7 \pm 93,33b	1044,8 \pm 157,39ac	0,0031
Lume	89,60 \pm 41,69	122,40 \pm 79,34	89,33 \pm 23,91	99,87 \pm 43,77	0,4684
Túnica Própria	76,80 \pm 16,58	69,20 \pm 15,03	68,00 \pm 11,06	65,12 \pm 6,24	0,2823
Leydig	34,00 \pm 7,21	31,90 \pm 5,99	28,89 \pm 7,44	32,25 \pm 2,05	0,3628
Conjuntivo	36,70 \pm 7,86a	29,60 \pm 4,88ab	24,67 \pm 6,65b	27,87 \pm 6,01b	0,0024
Vaso Sanguíneo	62,40 \pm 3,56a	59,20 \pm 6,81ab	59,89 \pm 7,41a	50,50 \pm 9,35b	0,0072
Espaço Linfático	191,30 \pm 39,59	197,20 \pm 51,28	176,67 \pm 59,43	180,00 \pm 48,61	0,7941

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria (células mióides e membrana basal), epitélio germinativo ou seminífero e lume tubular (KARL e CAPEL, 1998). O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando na maioria dos mamíferos de 70,0 a 90,0% da área, bem como o volume de túbulos seminíferos tem correlação direta com parâmetros testiculares, como comprimento tubular, produção espermática e população de células de Sertoli (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Portanto, neste trabalho pode-se constatar que 5mg/kg de pentoxifilina administradas durante o período crítico do desenvolvimento testicular influenciaram positivamente a densidade volumétrica (%) e no volume de túbulos seminíferos ($p < 0,05$). Por outro lado, a dose de 10mg/kg mostrou-se ineficiente para modificar os parâmetros descritos anteriormente.

O volume do parênquima testicular alocado ao tecido conjuntivo sofreu redução em todos os grupos tratados, entretanto somente nos grupos de 5 e 10mg/kg de pentoxifilina houve diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Na volumetria dos vasos sanguíneos do grupo de 10mg/kg, observou-se redução em relação ao grupo controle e 5mg/Kg ($p < 0,05$). A mesma tendência foi verificada nos animais do grupo com 1mg/kg, todavia esta redução não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No presente experimento contabilizou-se células do estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, presentes em túbulos seminíferos com perfil mais arredondado. Neste estágio estão presentes espermatogônias A, espermatócitos I em fase de pré-leptóteno, espermatócitos I em fase de paquíteno, espermátides arredondadas e espermátides alongadas próximas do lume. Na Tabela 5 estão expressos os valores numéricos médios destes tipos celulares nos grupos experimentais.

Tabela 5. População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do Ciclo do Epitélio Seminífero (CES) de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina aos 90 dias de idade (Média \pm desvio padrão)

Grupos Experimentais					
Parâmetros	Controle (n=10)	1mg/kg (n=10)	5mg/kg (n=9)	10mg/kg (n=8)	P
Espermatogônia	0,55 \pm 0,22	0,46 \pm 0,15	0,46 \pm 0,20	0,45 \pm 0,12	0,5672
Nucléolo Cel.Sertoli	9,10 \pm 1,03a	8,92 \pm 0,94a	7,46 \pm 1,05b	7,69 \pm 0,65b	0,0007
Pré-leptóteno	25,81 \pm 2,35	24,29 \pm 3,39	25,73 \pm 3,48	25,44 \pm 1,84	0,6271
Paquíteno	27,85 \pm 1,13	27,28 \pm 1,20	25,49 \pm 2,10	26,46 \pm 3,02	0,0695
Espermátide Arredondada	62,44 \pm 3,31ab	63,88 \pm 1,91a	59,78 \pm 2,12ab	59,27 \pm 5,72b	0,0223

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

O número de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero (núcleo de célula de Sertoli) sofreu redução significativa nos grupos tratados com 5mg/kg e 10mg/kg em relação aos grupos controle e tratado com 1mg/kg ($p < 0,05$) (Tabela 5). Por outro lado, outros métodos para aumentar a produção espermática, como o FSH isoladamente ou em associação com testosterona administrados em macacos pré-púberes promoveu o aumento numérico de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero (ARSLAN et al., 1993). Entretanto, a administração pré-natal de etinil-estradiol em fêmeas do 11º ao 17º dia de gestação reduziu a população de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no testículo de camundongos neonatos, provavelmente devido ao desequilíbrio na concentração de hormônios gonadotróficos durante a gestação (YASUDA et al., 1985).

A utilização de pentoxifilina no período neonatal teve como proposta, amplificar o efeito do FSH sobre as células de Sertoli através da inibição da PDE3 e 4 presentes nestas células (SWINNEN et al., 1991), produzindo aumento deste tipo celular por secção transversal ou ao longo do túbulo seminífero. Entretanto, o fármaco teve efeito contrário ao esperado, reduzindo o número destas células por secção transversal. Segundo Jin et al. (1999), a manipulação farmacológica das fosfodiesterases *in vivo* pode alterar a diferenciação e a homeostase celular, o que produziria mais perda do que ganho funcional. Esta afirmação pode servir de suporte para justificar a redução na população de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero observado neste trabalho.

As espermátides arredondadas por secção transversal apresentaram redução numérica significativa no grupo tratado com 10mg/kg quando comparadas àquelas observadas nos animais tratados com 1mg/kg ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Na Tabela 6 estão evidenciados parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli, produção espermática diária por testículo (PED) e por grama de testículo (PED/g) de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina aos 90 dias de idade.

O Índice de célula de Sertoli (ICS) apresentou diferença significativa entre os animais tratados com 5mg/kg e o grupo controle ($p < 0,05$). Este reflete a eficiência funcional desta célula, como também a eficiência da produção espermática por unidade de área de túbulos seminíferos, expressa pela relação entre o número de espermátides alongadas, suportadas pelas células de Sertoli (RUSSELL e PETERSON, 1984;

SINHA-HIKIN et al., 1989). Este aumento pode ser justificado nos animais do grupo tratado com 5mg/kg devido à redução significativa no número de células de Sertoli por secção transversal, no mesmo grupo. Além disso, a manutenção do número de espermátides arredondadas neste grupo em relação ao controle também justifica o aumento na capacidade de suporte das células de Sertoli.

Tabela 6. Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular (μm), população de células de Sertoli, produção espermática diária por testículo (PED) e por grama de testículo (PED/g) em ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina aos 90 dias de idade. (Média \pm desvio padrão)

Parâmetros	Grupos Experimentais				P
	Controle (n=10)	1mg/kg (n=10)	5mg/kg (n=9)	10mg/kg (n=8)	
Peso Líquido do Testículo (mg)	1562,4 \pm 107,2ab	1581,6 \pm 70,9ab	1677,1 \pm 103,7a	1473,0 \pm 163,4b	0,0079
Diâmetro Tubular (μm)	305,1 \pm 19,7	298,7 \pm 26,4	300,7 \pm 25,6	303,2 \pm 29,3	0,9457
Altura do Epitélio Sertoli/secção transversal de TS	89,8 \pm 6,9	88,0 \pm 7,6	91,7 \pm 12,0	93,3 \pm 8,5	0,6223
SPDAr/secção transversal	9,1 \pm 1,0a	8,9 \pm 0,9a	7,5 \pm 1,0b	7,7 \pm 0,6b	0,0007
ICS	62,4 \pm 3,3ab	63,9 \pm 1,9a	59,8 \pm 2,1ab	59,3 \pm 5,7b	0,0223
Comprimento Total de TS (m)	6,9 \pm 0,8a	7,2 \pm 0,9ab	8,0 \pm 1,0b	7,7 \pm 0,8ab	0,0450
Pop. Cel. Sertoli ($\times 10^7$)	17,8 \pm 2,7	18,8 \pm 2,9	20,2 \pm 3,6	17,0 \pm 3,4	0,1826
PED/Testículo ($\times 10^6$)	4,0 \pm 0,8	4,1 \pm 0,5	3,8 \pm 1,0	3,3 \pm 0,8	0,1365
PED/g/Testículo ($\times 10^6$)	20,8 \pm 3,3	22,5 \pm 4,0	22,4 \pm 4,2	18,8 \pm 4,2	0,1993
	13,2 \pm 1,7	14,2 \pm 2,3	13,3 \pm 2,2	12,9 \pm 2,9	0,6258

Letras distintas linha indicam $p < 0,05$; TS = Túbulo seminífero; ICS = Índice de célula de Sertoli; SPDAr = espermátide arredondada.

O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero refletem diferentes graus da atividade do epitélio, ocasionados por influência sazonal (ABDEL-RAOUF et al, 1975; PARREIRA, 1990; SINHA HIKIN et al., 1991; RUSSELL et al., 1994; MUÑOZ et al., 1998), pelo estabelecimento da puberdade (FRANÇA e CARDOSO, 1988; JONES, 1997), ou por efeitos deletérios da idade avançada (WANG et al., 1993; PAULA e CARDOSO, 1994; NIPKEN e WRÖBEL, 1997), de drogas bociogênicas (VAN HAASTER et al., 1992; HESS et al., 1993; COOKE et al., 1994; MEISAMI et al., 1994; KIRBY et al., 1996) e de hormônios gonadotróficos endógenos e exógenos (PUTRA e BLACKSHAW, 1985; KOSCO et al., 1989, SWANLUND et al., 1995), o que os tornam parâmetros importantes na avaliação quantitativa da espermatogênese, uma vez que existe correlação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica do testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1998). De acordo com França e Russell (1998), o diâmetro tubular médio não sofre alteração significativa após o

estabelecimento da maturidade sexual e permanece aparentemente constante ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em determinada espécie, mesmo ocorrendo variações expressivas, interespecíficas e raciais.

A altura do epitélio seminífero, na maioria de espécies domésticas, apresenta pequenas variações relacionadas à composição variada das associações celulares ou a possíveis alterações no volume das células de Sertoli, observada em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

Nos resultados relacionados ao diâmetro tubular e à altura do epitélio seminífero (Tabela 6) não se verificou alteração entre os grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle ($P>0,05$). Por outro lado, a redução do número de células de Sertoli por secção transversal do túbulo seminífero nos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg poderia acarretar diminuição nestes parâmetros. Entretanto, o aumento da capacidade de suporte das células de Sertoli e a manutenção do número de espermatídes arredondadas, principalmente em relação ao controle, manteve a igualdade entre grupos experimentais, no que se refere ao diâmetro e à altura de epitélio.

Não foi observado aumento significativo ($P>0,05$) do comprimento total de túbulo seminífero nos animais tratados em relação ao grupo controle. Este parâmetro apresenta correlação direta e significativa com os pesos bruto e líquido testicular, volume de túbulo seminífero e epitélio seminífero, população de célula de Sertoli e produção espermática diária (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Por outro lado, é importante registrar a tendência de aumento do comprimento total de túbulos seminíferos e da produção espermática por testículo nas doses de 1 e 5mg/Kg de pentoxifilina. Os resultados de volume de túbulo e epitélio seminífero observados nos animais tratados com 5mg/kg corroboram esta tendência observada nos parâmetros citados anteriormente, para este grupo.

O processo espermatogênico em ratos adultos não sofreu qualquer mudança quantitativa em função da aplicação neonatal da pentoxifilina. Isto se confirmou pela manutenção do rendimento intrínseco da espermatogênese, o qual é determinado pela produção espermática diária por grama de testículo (PED/g/t), onde nenhum grupo diferiu do outro (Tabela 6). De acordo com França e Russell (1998), a produção espermática diária por grama de testículo é utilizada como parâmetro de avaliação da eficiência da espermatogênese, que pode ser relacionada como menor duração da espermatogênese, maior número de células de Sertoli por grama de testículo e maior

capacidade de suporte da célula de Sertoli, maior densidade volumétrica (%) e volume dos túbulos seminíferos no testículo, maior número de gerações de espermatogônias e menor perda de células germinativas durante a espermatogênese.

O FSH interage especificamente com receptores na membrana da célula de Sertoli, aumentando os níveis de cAMP e desencadeando o processo de divisão mitótica destas células (GRISWOLD, 1993; SHARPE, 1994, HUHTANIEMI e TOPPARI, 1998). A população de células de Sertoli em ratos é definida durante o período perinatal e se estende aproximadamente até o 21º dia pós-natal (ORTH, 1984; ORTH et al., 1988). Neste experimento, a proposta de se utilizar um inibidor inespecífico de PDE's visou ampliar a duração intracelular dos níveis de AMPc e, por conseguinte, aumentar a proliferação de células de Sertoli. Entretanto, a aplicação do inibidor de fosfodiesterase, a pentoxifilina, em diferentes doses durante os primeiros 21 dias pós-natal em ratos, não alterou significativamente a população deste tipo celular.

Segundo França et al. (2000) e Silva Júnior et al. (2006), o número total de células de Sertoli define quantitativamente a PED/testículo em um animal adulto. Portanto, os dados de população de células de Sertoli por testículo nos demais grupos deste experimento corroboram os dados obtidos para PED por testículo e por grama de testículo.

De acordo com a histologia qualitativa testicular (Figura 1), foi possível observar que o tratamento com diferentes doses de pentoxifilina durante o período crítico do desenvolvimento testicular em ratos Wistar não produziu qualquer modificação na estrutura do parênquima, no que diz respeito à relação entre compartimento tubular e espaço intersticial. Este resultado corrobora os dados morfométricos obtidos com a histometria quantitativa testicular.

4 Conclusão

O emprego da pentoxifilina, nas dosagens utilizadas, durante o período crítico do desenvolvimento testicular neonatal em ratos Wistar não foi capaz de induzir aumento na população das células de Sertoli. Por conseguinte, o uso deste fármaco, nestas dosagens, para aumentar a produção espermática e a eficiência da espermatogênese em ratos adultos mostrou-se inviável.

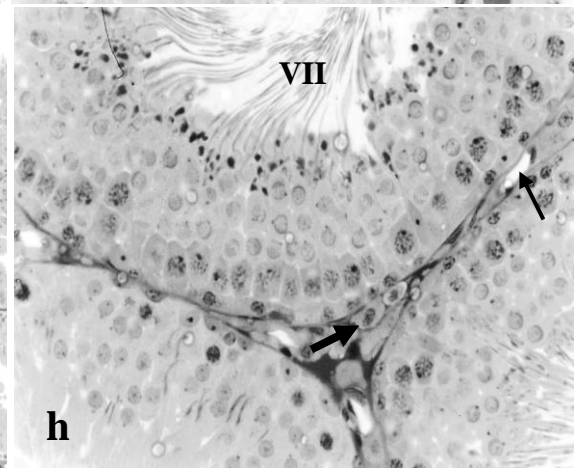
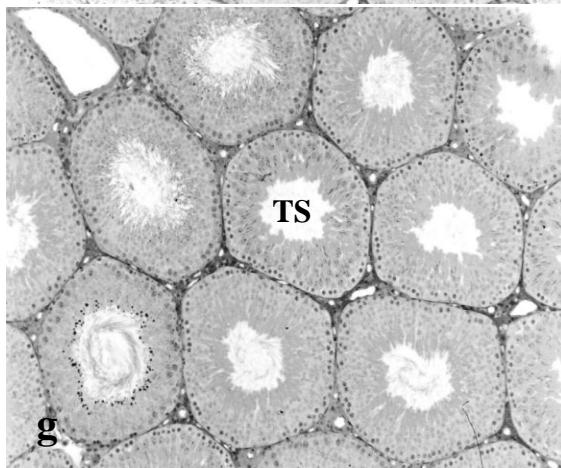
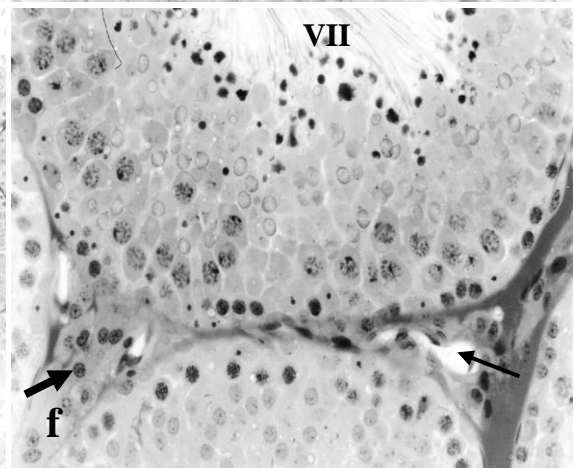
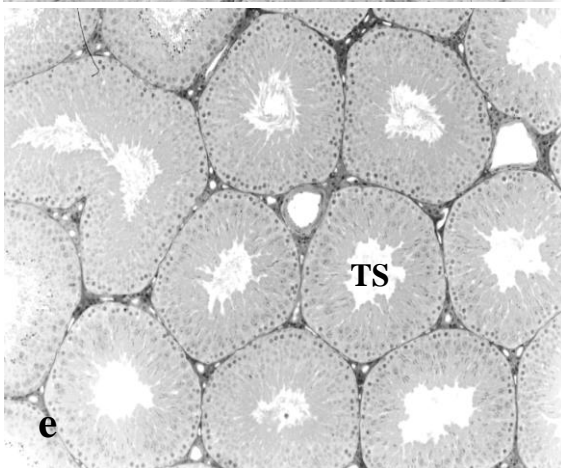
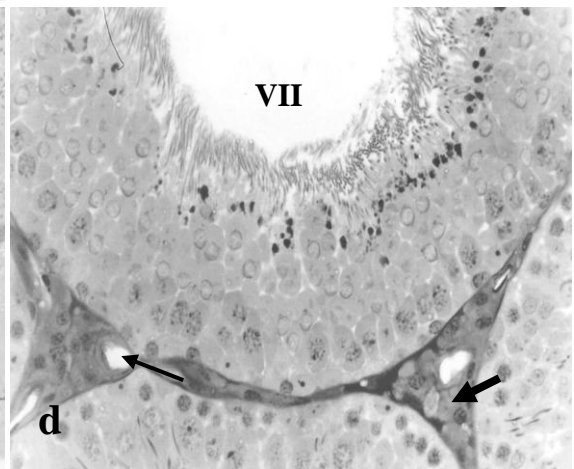
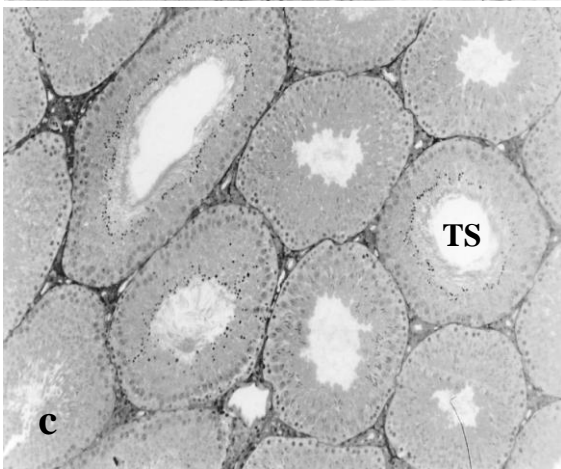
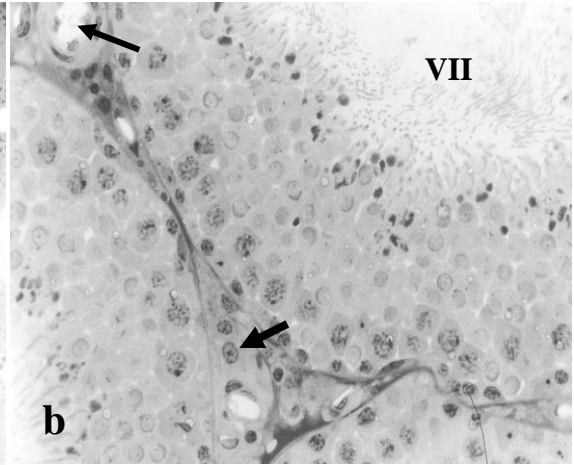
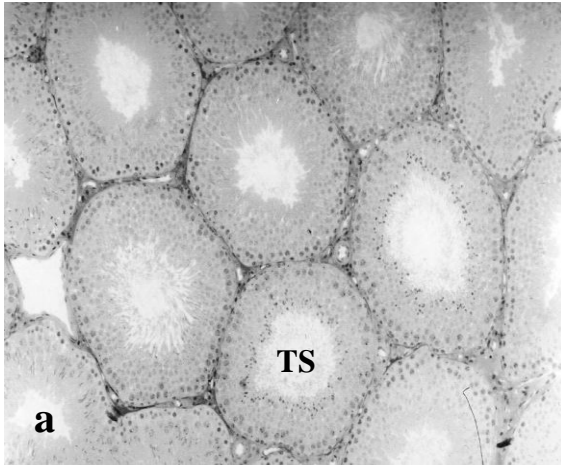


Figura 1 – Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos Wistar tratados com diferentes doses de pentoxifilina.

Figura 1a – Parênquima testicular de animais do grupo controle. Túbulos seminíferos (TS) em secção transversal. Aumento 50X.

Figura 1b – Detalhe do túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (CES) e espaço intertubular do grupo controle. TS no estágio VII; Espaço intertubular contendo vasos (seta fina) e células de Leydig (seta larga) Aumento 200X.

Figura 1c – Parênquima testicular de animais do grupo tratado com 1mg/kg de pentoxifilina. TS em secção transversal. Aumento 50X.

Figura 1d – Detalhe do túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do CES do grupo tratado com 1mg/kg de pentoxifilina. Túbulo seminífero no estágio VII; Espaço intertubular contendo vasos (seta fina) e células de Leydig (seta larga) Aumento 200X.

Figura 1e – Parênquima testicular de animais do grupo tratado com 5mg/kg de pentoxifilina. TS em secção transversal. Aumento 50X.

Figura 1f – Detalhe do TS no estágio VII do CES do grupo tratado com 5mg/kg de pentoxifilina. TS no estágio VII; Espaço intertubular contendo vasos (seta fina) e células de Leydig (seta larga) Aumento 200X.

Figura 1g – Parênquima testicular de animais do grupo tratado com 10mg/kg de pentoxifilina. TS em secção transversal. Aumento 50X.

Figura 1h – Detalhe do TS no estágio VII do CES do grupo tratado com 10mg/kg de pentoxifilina. TS no estágio VII; Espaço intertubular contendo vasos (seta fina) e células de Leydig (seta larga) Aumento 200X.

5 Referências Bibliográficas

ABEL-RAOUF, M.; EL-BAB, M. R.; OWAIDA, M. M. Studies on reproduction in the camel (*Camelus dromedarius*) V. Morphology of the testis in relation to age and season. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, p.109-116, 1975.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anatomical Records**, v. 94, p. 238-248, 1946.

ALMIRÓN, I.; CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. **International Journal of Andrology**, v. 11, p. 235-246, 1988.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal Dairy Science**, v. 45, p. 774-781, 1962.

ARSLAN, M.; WEINBAUER, G.F.; SCHLATT, S. et al. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in juvenile non-human primate (*Macaca mulata*). **Journal of Endocrinology**, v. 136, p. 235-243, 1993.

ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie, Biophysique**, v. 3, p. 219-241, 1963.

BATCHELDER, K.; MAYOSI, B.M. Pentoxifylline for heart failure: a systematic review. **South African Medical Journal**, v. 95, n. 3, p. 171-174, 2005.

BREUILLE, D.; FARGE, M.C.; ROSE, M. et al. Pentoxifylline decreases the body weight loss and muscle protein wasting characteristics of sepsis. **American Journal Physiology**. v. 265, p. 660-666, 1993.

BREUILLE, D.; VOISIN, L.; CONTREPOIS, M. et al. A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p.1079-1085, 1999.

BRUENGGER, A.; MARIOTI, A.; ROHR, H.P. et al. Androgen and estrogen effect on guinea pig seminal vesicle muscle: a combined stereological and biochemical study. **Prostate**, v. 9, p. 303-310, 1986.

CONTI, M.; NEMOZ, G.; SETTE, C. et al. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **The Endocrinology Society.**, v. 16, n. 3, p. 370-389, 1995.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 9, p. 1317-1327, 2000.

COOKE, P.S.; HESS, R.A.; KIRBY, J.D. et al. Neonatal propylthiouracil treatment as a model system for studying factors controlling testis growth and sperm production. In: ANDRZEJ BARTKE. **Function of somatic cells in the testis**. Norwell: Springer-Verlag, 1994. Cap.26, p.400-406.

DADUONE, J.P.; DEMUOLIN, A. Structure and functions of the testis. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M., HUNTER, R.H.F. **Reproduction in mammals and man**. (Ed.) Paris: Ellipses, 1993. Cap.13, p. 227-250.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatshafte für Veterinar Medizin.**, v. 29, p. 650-652, 1974.

ESTEVEZ, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS, A.J. et al. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrossome reaction rate. **Human Reproduction**, v. 13, n. 12, p. 3384-3389, 1998.

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. **Tissue and Cell**, v. 30, p. 573-582, 1998.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Belo Horizonte: UFMG, ICB, 1991, 180p. (tese, doutorado)

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.) **Male Reproduction**: a multidisciplinary overview. Madrid; Churchill communications, 1998, cap. 16, p. 198-219.

FRANÇA, R.L.; SILVA Jr, V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1629-1636, 2000.

GRISWOLD, M.D. Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. Cap. 23, p.493-508.

HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D. et al. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. **Endocrinology**, v. 132, p. 2607 - 2613, 1993.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M-T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 209-213, 1978.

HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Hormonal regulation of the testis. In: MARTINEZ – GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications, 1998, cap. 7, p. 67-77.

ISWARAN, T.J.; IMAI, M.; BETTON, G.R. et al. An overview of animal toxicology studies with bicalutamide (ICI 176, 334). **Journal of Toxicology Science**, v. 22, p. 75-88, 1997.

JIN, S.-L CATHERINE; RICHARD, F.J. et al. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE-deficient mice. **Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 21, p. 11998-12003, 1999.

JONES, D. N. **Desenvolvimento testicular do cavalo brasileiro de hipismo de 1 aos 30 meses de idade**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária-UFMG, 1997. Tese (Mestrado em Ciência Animal).

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**, v. 203, p. 323-333, 1998.

KIRBY, J.D.; MANKAR, M.V.; HARDESTY, D. et al. Effects of transient prepubertal 6-N- propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in domestic fowls. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 910-916, 1996.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 1-11, 1989a.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the testicular interstitium after neonatal hemicastration in boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 13-21, 1989b.

LUKE, M.C.; COFFEY, D.S. The Male Sex Accessory Tissues. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York, 1994, cap.23, p.1435-1487.

- MCGINNIS, M.Y.; LUMIA, A.R.; POSSIDENTE, B.P. Effects of withdrawal from anabolic androgenic steroids on aggression in adult male rats. **Physiology and Behavior**, v. 75, p. 541-549, 2002.
- MEISAMI, E.; NAJAFI, A.; TIMIRAS, P.S. Enhancement of seminiferous tubular growth and spermatogenesis in testes of rats recovering from early hypothyroidism: a quantitative study. **Cell Tissue Research**, v. 275, p. 503 - 511, 1994.
- MUÑOZ, E. M.; FOGAL, T.; DOMINGUEZ, S. et al. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). **Anatomical Record**, v. 252, p. 8-16, 1998.
- NEGRI, P.; GRECHI, E.; TOMASI, A. Effectiveness of pentoxifylline in sêmen preparation for intrauterine insemination. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1236-1239, 1996.
- NERI, R. Pharmacology and pharmacokinetics of flutamide. **Urology**, v. 34 (4 Suppl), p. 19-21, 1989.
- NIPKEN, C.; WROBEL, K. H. A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. **Andrologia**, v. 29, p. 149-161, 1997.
- OCHIAI, H.; ISHIDA, A.; OHTANI, T. et al. Discovery of new orally active phosphodiesterase(PDE4) inhibitors. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1098-1104, 2004.
- ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, v. 203, p. 485-492, 1982.
- ORTH, J.M. The role of follicle stimulating in controlling Sertoli cell proliferation in testis of fetal rats. **Endocrinology**, v. 115, p. 1248-1255, 1984.
- ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 787-794, 1988.
- ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing L.L. (Eds), **Cell and Molecular Biology of the Testis**, 1st ed, Oxford University Press, New York, p. 3-42, 1993.

PARREIRA, G. G. **Morfologia e variação sazonal da atividade dos testículos e órgãos genitais acessórios de *Bolomys lasiurus* Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae).** Belo Horizonte: UFMG, 1990. 97p. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

PAULA, T. A. R.; CARDOSO, F. M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, p. 19-30, 1994.

POLSON, J.B.; STRADA, S.J. cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, p. 403-427, 1996.

PUTRA, D.K.H.; BLACKSHAW, A.W. Quantitative studies of compensatory testicular hypertrophy following unilateral castration in the boar. **Australian Journal of Biological Science**, v. 38, p. 429-434, 1985.

ROCHA, D.M.C.; MIRANDA, J.R.; DEBELJUK, L. et al. Testis size, Sertoli cell population and daily sperm production in adult wistar rats treated neonatally with FSH and PTU. In: Testis Workshop, XV, 1999, Louisville. **The testis: from stem cell to sperm function**. Norwell: Serono Symposia USA, Inc. April 7-10, 1999, p. 60(II-16)a.

RUSSELL, L.D.; PETERSON, N. Sertoli cell junction: morphological and functional correlates. **International Review of Cytology**, v. 94, p. 177-221, 1985.

RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P. (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, pp. 1-40.

RUSSELL, L.D.; SINHA-HIKIM, A.P.; GHOSH, S. et al. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: Bartke. **A Function of somatic cells in the testis**; ed. New York: Springer-Verlag, 1994. cap. 3, p. 55-84.

RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R.; HESS, R. et al. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. **Tissue and Cell**, v. 27, p. 105-128, 1995.

SALAM, O.; BAIUOMY, A.R.; EL-SHENAWY, S. et al. The anti-inflammatory effects of the Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 331-340, 2003.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E, Neill, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**, ed. 2, New York: Raven Press, 1994. v.1, cap 22, p.1363-1434

SILVA JÚNIOR, V.A. **Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular em suínos**. Belo Horizonte: UFMG, ICB, 2000, 191p. (tese, Doutorado)

SILVA JÚNIOR, V. A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development.**, v. 45, p.1-10, 2006.

SINHA-HIKIM, A. P.; AMADOR, A.G.; BARTKE, A. et al. Structure/function relationships in active and inactive hamster Leydig cells: a correlative morphometric and endocrine study. **Endocrinology**, v. 125, p. 1844-1856, 1989a.

SINHA-HIKIM, A. P.; AMADOR, A.G.; KLEMCKE, H. G. et al. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. **Endocrinology**, v. 125, p. 1829-1843, 1989b.

SINHA-HIKIM, A. P.; SINHA-HIKIM, I. S.; AMADOR, A.G. et al. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotrophins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. **American Journal of Anatomy**, v. 192, p. 194-213, 1991.

STANIC, P.; SONICK, Z.; SUCHANEK, E. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 186-190, 2002.

SWALUND, D.J.; N'DIAYE, M.R.; LOSETH, K.J. et al. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepuberal boars. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 749-757, 1995.

SWINNEN, J.V.; TSIKALAS, K. E.; CONTI, M. Properties and Hormonal Regulation of Two Structurally Related cAMP Phosphodiesterases from the Rat Sertoli Cell. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 27, p. 18370-18377, 1991.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. The effect of FSH on male germ cell survival and differentiation in vitro is mimicked by pentoxifylline but not insulin. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 10, p. 877-881, 2000.

THOMPSON, T.L.; BERNDTSON, W.E. Testicular weight, Sertoli cell number, daily sperm production, and sperm output of sexually mature rabbits after neonatal or prepuberal hemicastration. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 952-957, 1993.

TUCKER, M.J.; JONES, D.V. Effects of cyproterone acetate in C57B1/10J mice. **Human and Experimental Toxicology**, v. 15, p. 64-66, 1996.

VAN HASTER, H.L.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. et al. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v. 131, p. 1574 - 1576, 1992.

WANG, C.; LEUNG, A.; SINHA-HIKIM A. P. Reproductive aging in the male brown-norway rat: a model for human. **Endocrinology**, v. 133, p. 2773-2781, 1993.

YASUDA, Y.; KIHARA, T.; TANIMURA, T. Effect of ethinil estradiol on the differentiation of mouse fetal testis. **Teratology**, v. 32, p.113-118, 1985.

3.2 Efeito da pentoxifilina sobre a produção espermática, rendimento da espermatogênese e produção de testosterona em ratos Wistar adultos

MORAES, T.A.P.; JASSET, P.F.; De TORRES, S.M.; MORAES, A.V. De;
SILVA JÚNIOR, V.A.; GUERRA, M.M.P.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

RESUMO

Objetivou-se utilizar doses crescentes de um inibidor inespecífico de PDE, a pentoxifilina, visando manter elevados os níveis de AMPc nas células de Sertoli e Leydig, na tentativa de aumentar o rendimento intrínseco da espermatogênese e produção espermática no indivíduo adulto. Foram utilizados 39 ratos Wistar adultos, os quais foram submetidos aos diversos tratamentos, entre 90 e 150 dias de vida, de acordo com o grupo experimental: controle (n=9), 15mg/kg (n=10), 30mg/kg (n=10) e 60mg/kg (n=10) de pentoxifilina. A pesagem dos animais foi realizada diariamente, neste período, nos grupos controle e tratados. Aos 150 dias do período experimental, os ratos de cada grupo foram heparinizados e anestesiados e, posteriormente, submetidos à perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica e nitroprussiato. Após a lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M. Posteriormente, os testículos, epidídimos e glândula vesicular foram removidos e pesados. Os testículos foram seccionados em fragmentos de 2mm e refixados na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados. O peso testicular, epididimário e da glândula vesicular não foi alterado. As maiores doses de pentoxifilina promoveram redução no volume do parênquima testicular alocado ao lume dos túbulos seminíferos e aumentaram a túnica própria (membrana basal e células mióides) destes túbulos ($p < 0,05$). No compartimento intertubular, as maiores doses deste inibidor de PDE aumentaram o volume de tecido conjuntivo e reduziram o espaço linfático ($p < 0,05$). Por outro lado, neste mesmo compartimento testicular, não se verificou alterações na volumetria vascular entre os grupos. A volumetria das células de Leydig aumentou nos grupos tratados com as doses de 30 e 60mg/kg de pentoxifilina quando comparada com os animais tratados com a menor dose ($p < 0,05$). O número de espermatogônias A aumentou nos grupos de 30 e 60mg/kg em relação ao controle ($p < 0,05$). As dosagens de testosterona não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$). De acordo com os resultados, a utilização da pentoxifilina durante 60 dias em ratos Wistar adultos não foi capaz de aumentar o rendimento intrínseco da espermatogênese e produção espermática.

Palavras-chave: Pentoxifilina, testículo, células de Sertoli, células de Leydig, produção espermática, espermatogênese, testosterona.

ABSTRACT

It was objectified to use increasing doses of an inespecific inhibitor of PDE, the pentoxifylline, aiming to keep high the levels of AMPc in the Sertoli and Leydig cells in the attempt to increase the intrinsic income of spermatogenesis and sperm production in adult rats. There were used 39 adult Wistar rats, which were submitted to many treatments between 90 and 150 days of life, in accordance with the experimental group: control (n=9), 15mg/kg (n=10), 30mg/kg (n=10) and 60mg/kg (n=10) of pentoxifylline. The animal weight was carried through daily, in this period, on the control and treated groups. At the 150 days of the experimental period, the rats of each group were submitted to anesthesia and intracardiac perfusion. Later, the testis, epididimis and seminal vesicle were removed and weighted. The testis were fragmented (2mm) and put in perfusion solution. For studies with light microscope, the fragments were processed routinely for inclusion in plastic resin with glycol methacrylate. Histologic cuts (4 μ m) were stained in blue of toluidine/borate of sodium (1%) and analyzed. The testicular, epididimis and seminal vesicle weight was not modified. The higher doses of pentoxifylline promoted reduction in the parenchyma volume of the testis on the lume of seminiferous tubules and increased the proper tunic (basal membrane and mioides cells) of these tubules ($p < 0,05$). In the intertubular compartment, the higher doses of this inhibitor of PDE's increased the conjunctive tissue volume and reduced the lymphatic space ($p < 0,05$). On the other hand, in this same testicular compartment, it was no verified alterations in the vascular volumetry among groups. The Leydig cells volumetry increased in the groups treated with doses of 30 and 60mg/kg of pentoxifylline when compared with animals treated with lower doses ($p < 0,05$). The number of spermatogonia A increased in the groups of 30 and 60mg/kg in relation to the control ($p < 0,05$). There was no difference on the testosterone dosage among groups ($p > 0,05$). In accordance with the results, the use of the pentoxifylline during 60 days in adult Wistar rats was not capable to increase the intrinsic income of spermatogenesis and sperm production.

Keyword: Pentoxifylline, testis, Sertoli cells, Leydig cells, sperm production, spermatogenesis, testosterone.

1 Introdução

A espermatogênese e a secreção de testosterona pelos testículos são dependentes de estimulação pelas gonadotrofinas adenohipofisárias, FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante), as quais são secretadas em resposta ao GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), um decapeptídeo produzido por neurônios especializados do hipotálamo (WALKER e CHENG, 2005). O FSH age nas células de Sertoli e o LH nas células de Leydig, via aumento intracelular de AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico), decorrente da ligação

hormônio-receptor a uma proteína G e ativação da adenilato ciclase (HUHTAHNIEMI e TOPPARI, 1998; SILVA JÚNIOR e FRANÇA, 2000; SKINNER, 2005).

A testosterona é considerada o estímulo hormonal primário para manutenção da espermatogênese no adulto (ZIRKIN et al., 1993). Este hormônio é secretado pelas células de Leydig, sob estimulação do LH, e age via receptores de andrógenos nas células de Sertoli, Leydig e peritubulares. Já o FSH tem efeitos qualitativos sobre a espermatogênese similares aos da testosterona (KERR et al., 1992; RUSSELL et al., 1993; MCLACHLAN et al., 1995).

A presença de receptores para FSH em estágios específicos do ciclo do epitélio seminífero em ratos (RANNIKO et al., 1996), de receptores de andrógeno estágio-específicos nas células de Sertoli e células germinativas (SUÁREZ-QUIAN et al., 1998); assim como o aumento da produção de ABP (proteína ligante de andrógeno) sob a estimulação conjunta de FSH e testosterona em ratos hipofisectomizados (HUANG et al., 1991), reforçam a idéia de uma ação sinérgica ou aditiva entre o FSH e testosterona no controle da espermatogênese em ratos adultos (FRANÇA et al., 1998; RUSSELL et al., 1998; SHENNAWY et al., 1998). Entretanto, de acordo com Huang et al. (1999) e Ottenweller et al. (2000), além do FSH e da testosterona, fatores endócrinos e ou parácrinos no microambiente do epitélio seminífero, sob controle neural, podem afetar a proliferação e a diferenciação de células espermatogênicas.

A pentoxifilina é um inibidor inespecífico das fosfodiesterases (PDE's) (SALAM et al., 2003; OCHIAI et al., 2004). Estas, por sua vez, são enzimas que modulam a concentração intracelular de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e GMP (guanosina monofosfato cíclico) (CONTI et al., 1995; CONTI, 2000). No testículo de humanos e ratos existem quatro genes pertencentes à família dos CaM-PDE's (fosfodiesterase cálcio-calmodulina-dependente), os quais são capazes de hidrolisar o AMPc com alta afinidade, sendo, portanto, esperado que a ativação da enzima cálcio dependente possa ter maior impacto nos níveis de AMPc intracelular (CONTI et al., 1995; POLSON e STRADA, 1996).

A inibição de PDE deve ser utilizada para aumentar a estimulação hormonal, simulando os efeitos do FSH e do LH sobre as células de Sertoli e de Leydig, respectivamente (CONTI, 2000; TESARIK, 2000).

O presente experimento teve por objetivo utilizar doses crescentes de um inibidor inespecífico de PDE, a pentoxifilina, visando manter elevados os níveis de AMPc nas

células de Sertoli e Leydig, na tentativa de aumentar o rendimento intrínseco da espermatogênese e a produção espermática no indivíduo adulto.

2 Material e Métodos

Foram utilizados 39 ratos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), pertencentes ao biotério da Área de Fisiologia do Departamento da Morfologia e Fisiologia Animal/Universidade Federal Rural de Pernambuco, os quais foram mantidos na temperatura 23 ± 1 °C, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e comida foram oferecidas *ad libitum* até o final do experimento. Os ratos com 90 dias de idade foram escolhidos por amostragem não probabilística de conveniência e submetidos aos diversos tratamentos, de acordo com o grupo experimental: controle (n=9), 15mg/kg (n=10), 30mg/kg (n=10) e 60mg/kg (n=10) de pentoxifilina (A Formula, Brasil).

Os tratamentos foram realizados durante 60 dias. A pesagem dos animais foi realizada diariamente para acompanhamento do peso corporal e cálculo das doses de pentoxifilina, administradas via intraperitoneal. Aos 150 dias do período experimental, os ratos de cada grupo foram heparinizados (125 UI/100g de peso corporal) e anestesiados por injeção intraperitoneal de Tiopental sódico (30mg/kg; ROCHE, Brasil). Posteriormente colheu-se sangue total por punção no seio venoso (confluência das veias cavas), centrifugação (1000 RPM) durante 15 minutos e acondicionamento de duas alíquotas de 1mL de plasma sanguíneo em tubos de microcentrífuga à -20 °C, para posterior dosagem de testosterona.

Após colheita de sangue, realizou-se perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L; AKZO ORGANON TEKNIKA, Brasil) e nitroprussiato (100mg/L; SIGMA, USA), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído (VETEC, Brasil) a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos.

Após a perfusão com solução fixadora foram removidos e pesados: testículos, epidídimos e glândula vesicular. Os testículos foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à refixação na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA,

Germany). Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados.

O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero foram medidos em aumento de 100X usando retículo micrométrico linear (10mm/100 – Olympus, Japan), calibrado com um micrômetro padrão. O diâmetro tubular médio para cada rato foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, tomaram-se duas medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lume e epitélio germinativo determinando-se, desta forma, a altura média do epitélio seminífero.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de graticula micrométrica (Olympus, Japan), com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lume; enquanto, no segundo, foram investigadas as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sangüíneos e linfáticos. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04 (FRANÇA, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo (expresso em µL) foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido do testículo (mg). O valor deste último foi obtido pela subtração de 6,5% da albugínea do peso testicular bruto (RUSSEL et al, 1995).

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo (expresso em metros) foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada: $CT = VTS / \pi R^2$, onde VTS = Volume total de túbulos seminíferos; $\pi R^2 = \text{Área da secção transversal dos túbulos seminíferos}$ (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI 1974).

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio sete do ciclo, classificado de acordo com o método acrossômico (RUSSELL

et al., 1990), foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas cinco secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados: espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/leptóteno (SPT I Pl/L); espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P); espermátides arredondadas (SPD Ar); nucléolo de células de Sertoli.

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e a espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{\text{DM}^2}{2}\right) - \left(\frac{\text{DM}^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de retículo micrométrico linear (10mm/100 – Olympus, Japan) adaptada a uma das oculares de 10x e acoplada à objetiva de 100x, propiciando um aumento final de 1000x. No caso das espermatogônias do tipo A que apresentam núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e a espessura do corte histológico, em virtude disto, contabilizaram-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente.

A população total de células de Sertoli por testículo foi obtida a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli, por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de Reviers e Lincoln (1978): Número de células de Sertoli por testículo = [Comprimento total de túbulos Seminíferos (µm) X Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal]/ Espessura do corte (µm)

A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Júnior et al. (2006): PED = N° Total de células de Sertoli por testículo X a proporção de espermátides redondas no estágio VII x estágio VII com frequência relativa/duração do estágio (dias).

Para análise da concentração de testosterona, as amostras de sangue foram descongeladas e os níveis séricos totais de testosterona foram avaliados em duplicata através do teste de ELISA, de acordo com Pugh et. al. (2003).

Os dados biométricos e histométricos foram expressos em média \pm desvio padrão. Foram realizadas as análises de variância entre os grupos (ANOVA) e o teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0.05$.

3 Resultados e Discussão

Os resultados de desenvolvimento ponderal de ratos Wistar controle e tratados com diferentes doses de pentoxifilina dos 90 aos 150 dias de idade estão representados na Tabela 1. De maneira geral, os animais dos grupos controle e tratados possuíram uma curva de crescimento corporal bastante similar, onde se observou ganho de peso durante todo período experimental. Entretanto, vale ressaltar que os animais tratados com 15mg/kg de pentoxifilina tiveram tendência de ganho de peso corporal superior aos animais controle e tratados com 30 e 60mg/kg. Diferenças significativas relevantes só foram constatadas entre os grupos tratados com 15 e 30mg/kg ($p < 0,05$), contudo é importante ressaltar que no início do experimento os animais do grupo de 15mg/kg possuíam, em média, peso corporal 11% superior aos demais grupos e este percentual se manteve ao término do experimento.

Tabela 1. Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar adultos controles e tratados com diferentes doses pentoxifilina dos 90 aos 150 dias de idade (Média \pm desvio padrão)

Grupos Experimentais					
Dias	Controle (n=9)	15 mg/Kg (n=10)	30 mg/Kg (n=10)	60 mg/Kg (n=10)	P
90	364,0 \pm 56,9ab	410,5 \pm 39,0a	348,1 \pm 31,7b	384,4 \pm 37,6ab	0,0133
96	386,2 \pm 37,6ab	422,4 \pm 44,5a	351,5 \pm 35,8b	393,8 \pm 39,8ab	0,0036
103	394,7 \pm 40,0ab	434,8 \pm 44,0a	363,8 \pm 36,8b	387,6 \pm 12,2ab	0,0034
110	401,4 \pm 40,1ab	445,7 \pm 40,1a	373,7 \pm 38,3b	412,7 \pm 41,3ab	0,0032
117	398,8 \pm 40,3a	450,0 \pm 42,8b	382,8 \pm 38,0ac	429,2 \pm 37,9ab	0,0028
124	405,3 \pm 39,5ac	457,9 \pm 38,7b	393,9 \pm 33,8c	442,7 \pm 37,1ab	0,0013
131	419,1 \pm 42,0ab	468,2 \pm 36,8a	402,3 \pm 36,8b	455,5 \pm 43,6a	0,0023
138	439,1 \pm 42,1ab	478,3 \pm 41,4a	410,1 \pm 45,2b	462,6 \pm 40,4a	0,0059
145	459,0 \pm 43,8ab	491,1 \pm 46,1a	412,5 \pm 39,7b	456,0 \pm 45,4ab	0,0036
150	463,8 \pm 41,1ab	498,3 \pm 47,2a	419,7 \pm 45,3b	453,4 \pm 43,3ab	0,0040

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

A lisofilina é um inibidor de PDE's 100 vezes mais potente do que a pentoxifilina (RICE et al., 1994). Striffler e Nadler (2004) após induzirem diabetes em ratos e tratarem com lisofilina, não observaram influência deste fármaco no ganho de peso dos animais diabéticos tratados em relação aos diabéticos controle.

Os resultados de desenvolvimento corporal deste experimento corroboram os obtidos por Striffler e Nadler (2004), uma vez que, durante o período em que os animais adultos receberam aplicações diárias de pentoxifilina, não se observou qualquer influência deste inibidor inespecífico de PDE's sobre ganho de peso.

Na Tabela 2 estão representados os resultados de alguns parâmetros biométricos aos 150 dias, de ratos Wistar adultos tratados com diferentes doses de pentoxifilina por 60 dias. De acordo com os resultados evidenciados na tabela 2, o tratamento diário durante 60 dias com um inibidor inespecífico de PDE's não alterou significativamente o peso testicular, epididimário e da vesícula seminal ($p>0,05$). O peso testicular possui correlação alta e positiva com a produção espermática no indivíduo adulto (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Esta, por sua vez, possui relação direta com eventos decorridos durante o período crítico de desenvolvimento testicular em ratos (ORTH, 1982; ORTH et al., 1988). As populações celulares somáticas e germinativas no testículo possuem períodos de crescimento distintos e divergentes (FRANÇA et al., 2000). Após o estabelecimento da puberdade, o aumento do peso testicular está diretamente relacionado à proliferação de células germinativas (FRANÇA et al., 2000). Em indivíduos adultos ocorre estabilização do diâmetro tubular e da altura do epitélio germinativo, do comprimento de túbulos seminíferos e da produção espermática (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

Induções experimentais que dinamizassem a produção espermática poderiam ser utilizadas na reprodução e em situações de infertilidade; portanto, a pentoxifilina, devido às suas propriedades, poderia se prestar para este intento. Por outro lado, levando-se em consideração os resultados de peso testicular, epididimário e da vesícula seminal, pode-se dizer que a pentoxifilina não contribuiu efetivamente na melhoria de parâmetros biométricos reprodutivos.

Tabela 2. Parâmetros biométricos de ratos Wistar adultos controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina dos 90 aos 150 dias de idade (Média ± desvio padrão)

Grupos Experimentais					
Parâmetros	Controle (n=9)	15 mg/kg (N=10)	30mg/kg (n=10)	60mg/kg (n=10)	P
Peso Corporal (g)	463,8 ± 41,1ab	498,3 ± 47,2a	419,7 ± 45,3b	453,4 ± 43,3ab	0,0040
Peso Testicular (g)	1,72 ± 0,34	1,89 ± 0,14	1,75 ± 0,13	1,74 ± 0,20	0,2758
Epidídimo (g)	0,71 ± 0,12	0,76 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,71 ± 0,05	0,4455
Vesícula Seminal (g)	1,76 ± 0,26	1,84 ± 0,29	1,66 ± 0,28	1,53 ± 0,20	0,0712
IGS	0,37 ± 0,08	0,38 ± 0,03	0,42 ± 0,04	0,39 ± 0,03	0,1845

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$; IGS (%) = Índice Gonadossomático.

Tabela 3. Peso líquido do testículo (μ l) e parâmetros volumétricos do parênquima testicular (μ l) de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina dos 90 aos 150 dias de idade (Média ± desvio padrão)

Grupos Experimentais					
Parâmetros	Controle (n=9)	15mg/kg (n=10)	30mg/kg (n=10)	60mg/kg (n=10)	P
Peso Líquido	1610 ± 320	1770 ± 130	1640 ± 120	1630 ± 180	0,2624
Túbulo Seminífero	1309 ± 280	1540 ± 130	1460 ± 90	1450 ± 170	0,3380
Epitélio Seminífero	1210 ± 250	1320 ± 100	1270 ± 80	1260 ± 160	0,4800
Lume	123 ± 37a	151 ± 33a	63 ± 21b	46 ± 26b	0,0001
Túnica Própria	58 ± 12a	66 ± 9a	131 ± 22b	146 ± 21b	0,0001
Leydig	50 ± 13ab	41 ± 7a	55 ± 13b	55 ± 8b	0,0049
Conjuntivo	3 ± 2a	3 ± 1a	59 ± 14b	64 ± 16b	0,0001
Vaso Sanguíneo	9 ± 5	9 ± 5	11 ± 4	13 ± 19	0,8515
Espaço Linfático	161 ± 35a	183 ± 30a	52 ± 13b	54 ± 20b	0,0001

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

O parênquima do testículo consiste em sua maior parte (70-90%) de túbulos seminíferos, os quais são formados pelo epitélio germinativo e limitados no espaço intertubular por uma membrana basal e células mióides peritubulares (RUSSELL et al., 1990; SETCHELL, 1991; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994). O tecido intersticial, que circunda os túbulos seminíferos, consiste de células de Leydig, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável como fibroblastos, macrófagos e mastócitos (SETCHELL, 1991). Apesar da variabilidade entre as espécies quanto à proporção volumétrica do tecido intersticial (FAWCETT et al., 1973; FRANÇA et al., 1998), a célula de Leydig é o tipo celular mais freqüente neste compartimento (RUSSELL et al., 1990).

A volumetria do parênquima testicular expressa em μ L está evidenciada na tabela 4. As maiores doses de pentoxifilina promoveram redução no volume do parênquima testicular alocado ao lume dos túbulos seminíferos ($p < 0,05$) e aumentaram a túnica própria (membrana basal e células mióides) destes túbulos ($p < 0,05$).

No compartimento intertubular, as maiores doses deste inibidor de PDE's aumentaram o volume de tecido conjuntivo e reduziram o espaço linfático. Por outro lado, neste mesmo compartimento testicular, não se verificou alterações na volumetria vascular entre os grupos.

O aumento da túnica própria e do tecido conjuntivo testicular, ambos de origem mesenquimal, nos animais tratados com 30 e 60mg/kg é um achado surpreendente pelo fato de que a pentoxifilina inibe a atividade proliferativa de fibroblastos, células mesangiais e reduz a produção de proteínas da matriz extracelular (LIN et al., 2002). Esta atividade antifibrogênica da pentoxifilina está relacionada à sua capacidade de inibir a transcrição do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), Smad3/4, dependente através da proteína quinase A (LIN et al., 2005). Portanto, a pentoxifilina é capaz de atenuar a fibrose túbulo intersticial em rins com obstrução ureteral unilateral (LIN et al., 2005) e hepática induzida por obstrução de ducto biliar (RAETSCH et al., 2002). Contudo, vale ressaltar que estes eventos proliferativos e fibróticos ocorrem em órgãos onde existe presença de injúria celular, fatores pró-inflamatórios e células necróticas. Neste trabalho, o aumento do tecido conjuntivo parece não estar relacionado a qualquer injúria testicular induzida pela droga. Portanto, maiores investigações devem ser conduzidas para elucidação deste achado.

Neste trabalho, a volumetria das células de Leydig aumentou nos grupos tratados com as doses de 30 e 60 mg/kg de pentoxifilina, quando comparada com os animais tratados com a menor dose ($p < 0,05$). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada entre os grupos que receberam o fármaco e o grupo controle ($p < 0,05$). A proliferação e a diferenciação pós-natal das células de Leydig parecem ser controladas por múltiplos fatores reguladores. Através de fatores de crescimento, produzidos pelas células de Sertoli, juntamente com outros produzidos pelos macrófagos tais como IL- β 1, IGF-I, TGF- α , ocorre proliferação de células de Leydig a partir de células precursoras mesenquimais do intertúbulo. Andrógenos e o IGF-I aumentam a sensibilidade das células de Leydig progenitoras ao LH, que juntamente com o FSH, induzem a diferenciação e maturação das células de Leydig (ORTH, 1993; GAYTAN et al., 1994; DOMBROWICZ et al., 1996; GE et al., 1996; LEJEUNE et al., 1998). A ação inibidora da pentoxifilina sobre as citocinas e fatores de crescimento pode estar relacionada à ausência de efeito sobre aumento volumétrico no "pool" de células de Leydig nos animais tratados em relação aos controles (RAETSCH et al., 2002).

A capacidade secretora de testosterona não é correlacionada com o número de células de Leydig por grama de testículo, volume de vasos sanguíneos, forma alongada das células ou macrófagos, mas com o volume destas células e com o seu número por testículo (SILVA JÚNIOR e FRANÇA, 2000). A produção deste hormônio esteróide é estimulada nas células de Leydig pelo LH, via aumento intracelular de AMPc decorrente da ligação hormônio-receptor a uma proteína G e ativação da adenilatociclase (HUHTAHNIEMI e TOPPARI, 1998; SILVA JÚNIOR e FRANÇA, 2000; SKINNER, 2005). Neste experimento, a utilização da pentoxifilina em ratos adultos destinava-se a melhoria do processo espermatogênico por amplificação das ações dos hormônios gonadotróficos sobre as células alvo. No que diz respeito às células de Leydig, esta metodologia mostrou-se ineficiente em aumentar a atividade funcional desta célula, visto que não se observou alterações volumétricas e nas concentrações séricas de testosterona ($P > 0,05$).

Neste trabalho, foram quantificadas células germinativas do estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, presentes em túbulos seminíferos com perfil mais arredondado possível. Neste estágio estão presentes: espermatogônias A, espermátocitos I em fase de pré-leptóteno, espermátocitos I em fase de paquíteno, espermátides arredondadas e espermátides alongadas próximas do lume. Na Tabela 4 estão expressos os valores numéricos médios destes tipos celulares nos grupos experimentais.

Tabela 4. População celular por secção transversal de túbulo seminífero de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina dos 90 aos 150 dias de idade. (Média \pm desvio padrão)

Grupos Experimentais					
Parâmetros	Controle (n=9)	15mg/kg (n=10)	30mg/kg (n=10)	60mg/kg (n=10)	P
Espermatogônia A	0,8 \pm 0,3a	0,9 \pm 0,2ab	1,2 \pm 0,2b	1,1 \pm 0,3b	0,0084
Nucléolo Cel.Sertoli	7,57 \pm 0,63a	7,48 \pm 0,79ab	8,69 \pm 0,50c	8,24 \pm 0,72ac	0,0007
Pré-leptóteno	18,07 \pm 2,80ab	17,1 \pm 0,67a	18,49 \pm 2,25ab	20,52 \pm 1,78b	0,0051
Paquíteno	22,06 \pm 1,86	22,07 \pm 1,49	22,36 \pm 1,21	23,78 \pm 1,93	0,0790
Espermátide					
Arredondada	65,92 \pm 4,26	68,00 \pm 3,36	69,57 \pm 5,86	71,27 \pm 4,41	0,0882

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

De acordo com os resultados observados na Tabela 4, o número de espermatogônias A aumentou nos grupos de 30 e 60mg/kg em relação ao controle. As espermatogônias são classificadas em células tronco, proliferativas e diferenciadas,

porém, o mecanismo pelo qual as espermatogônias tronco e as proliferativas se transformam em diferenciadas e simultaneamente renovam a sua população ainda demanda maiores esclarecimentos (RUSSELL et al., 1990). De acordo com Boitani et al. (1993), o FSH é essencial para progressão da espermatogônia do tipo A até o estágio de espermatócito I em paquíteno; entretanto, este não influencia a atividade proliferativa de espermatogônias indiferenciadas. As células de Sertoli sob influência do FSH produzem o fator estimulante de células tronco (SCF), os quais agem como importante fator de sobrevivência de células germinativas no testículo de ratos adultos e este efeito é mediado parcialmente através da via SCF/c-kit (YAN et al., 2000).

A produção de espermátides por espermatogônia A é utilizada como medida da eficiência da espermatogênese, assim como o maior número de gerações de espermatogônias e baixa degeneração durante a fase proliferativa espermatogonial (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Neste trabalho, as maiores doses de pentoxifilina aplicadas durante 60 dias aumentaram o número de espermatogônias A por secção transversal; entretanto, isto não significou aumento da eficiência da espermatogênese, uma vez que o número de espermátides arredondadas no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero permaneceu inalterado (Tabela 4). O efeito da pentoxifilina sobre o número de espermatogônias pode estar relacionado ao provável aumento de AMPc, por inibição da fosfodiesterase na células de Sertoli e, conseqüentemente, aumento na produção de fatores mitogênicos espermatogoniais por este tipo celular.

A população de células de Sertoli é definida, em ratos, nos primeiros 21 dias do período pós-natal, não se observando mitoses deste tipo celular em indivíduos adultos (SILVA JUNIOR et al., 2006). Entretanto, o inibidor geral de fosfodiesterase na dose de 30mg/kg aumentou o número deste tipo celular por secção transversal em indivíduos adultos coincidindo com aumento na volumetria da túnica própria, neste grupo. Outros estudos serão necessários para elucidar claramente, este aumento na população de células de Sertoli, por secção transversal de túbulos, em animais adultos tratados com pentoxifilina.

Na Tabela 5 estão evidenciados parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli, produção espermática diária por testículo (PED) e por grama de testículo (PED/g) de ratos Wistar controles e tratados com diferentes doses de pentoxifilina dos 90 aos 150 dias de idade.

Tabela 5. Peso líquido do testículo, parâmetros biométricos do parênquima testicular, população de células de Sertoli, produção espermática diária por testículo (PED) e por grama de testículo (PED/g) em ratos Wistar controle e tratados com diferentes doses de pentoxifilina dos 90 aos 150 dias de idade. (Média ± desvio padrão)

Parâmetros	Grupos Experimentais				P
	Controle (n=9)	15mg/kg (n=10)	30mg/kg (n=10)	60mg/kg (n=10)	
Peso Líq. Testículo (g)	1,61 ± 0,32	1,77 ± 0,13	1,64 ± 0,12	1,63 ± 0,18	0,2624
Diâmetro Tubular	346,9 ± 14,96	352,6 ± 17,8	365,2 ± 20,37	348,4 ± 37,9	0,3580
Altura do Epitélio	113,2 ± 5,67	110,5 ± 9,82	111,5 ± 3,98	107,5 ± 5,31	0,3128
Sertoli/secção transversal de TS	7,57 ± 0,63a	7,48 ± 0,79ab	8,69 ± 0,50c	8,24 ± 0,72ac	0,0007
SPDar/secção transversal	65,92 ± 4,26	68,00 ± 3,36	69,57 ± 5,86	71,27 ± 4,41	0,0882
ICS	8,73 ± 0,67	9,15 ± 0,97	8,02 ± 0,81	8,75 ± 1,19	0,0740
Comprimento Total de TS (m)	14,59 ± 2,55	15,81 ± 1,61	14,02 ± 1,2	15,45 ± 4,01	0,4112
Pop. Cel. Sertoli(x10 ⁷)	27,65 ± 5,88	29,71 ± 5,16	30,45 ± 3,28	32,95 ± 11,60	0,4627
PED/Testículo(x10 ⁶)	18,13 ± 3,93	20,15 ± 2,68	8,25 ± 2,31	21,28 ± 7,09	0,3388
PED/g/Testículo(x10 ⁶)	11,28 ± 1,00	11,38 ± 1,39	11,22 ± 1,67	12,98 ± 3,65	0,2445

Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$; TS=Túbulo seminífero; ICS = Índice de célula de Sertoli; SPDar=espermátide arredondada

O diâmetro tubular e a altura do epitélio refletem diferentes graus da atividade do epitélio seminífero que podem ser influenciados por efeito de hormônios gonadotróficos endógenos e exógenos (PUTRA e BLACKSHAW, 1985; KOSCO et al., 1989a, KOSCO et al., 1989b, SWANLUND et al., 1995). Isto faz destes parâmetros biométricos testiculares importantes na avaliação quantitativa da espermatogênese, uma vez que existe correlação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica do testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

Nos resultados relacionados ao diâmetro tubular e altura do epitélio (Tabela 6), não se constatou influência da pentoxifilina entre os grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle.

Não foi observado aumento significativo ($p > 0,05$) do comprimento total de túbulos seminíferos nos animais tratados em relação ao grupo controle. Este parâmetro tem correlação direta e significativa com parâmetros, como pesos bruto e líquido

testicular, volume de túbulo e epitélio seminífero, população de célula de Sertoli e produção espermática diária (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

O processo espermatogênico não sofreu qualquer alteração quantitativa em função da aplicação de pentoxifilina durante 60 dias em indivíduos adultos. Isto se confirmou pela manutenção do rendimento intrínseco da espermatogênese, o qual é determinado pela produção espermática diária por grama de testículo (PED/g/t), onde nenhum grupo diferiu do outro (Tabela 5). De acordo com França e Russell (1998), a produção espermática diária por grama de testículo é utilizada como parâmetro de avaliação da eficiência da espermatogênese, que pode ser relacionada como menor duração da espermatogênese, maior número de células de Sertoli por grama de testículo e maior capacidade de suporte da célula de Sertoli, maior densidade volumétrica (%) e volume dos túbulos seminíferos no testículo, maior número de gerações de espermatogônias e, finalmente, menor perda de células germinativas durante a espermatogênese.

De acordo com a histologia qualitativa testicular (Figura 1), não foi possível observar qualquer modificação na estrutura do parênquima testicular no que diz respeito à relação entre compartimento tubular e espaço intersticial em decorrência do tratamento com diferentes doses de pentoxifilina em ratos Wistar adultos durante 60 dias.

O processo espermatogênico em ratos adultos está sob o controle de hormônios gonadotróficos, testosterona e diversos fatores intratesticulares que modulam quantitativa e qualitativamente este processo (SILVA JUNIOR, 2000). As fosfodiesterases fazem parte de um dos mecanismos moduladores da ativação celular em face da interação ligante-receptor-proteína G para gerar AMPc (CONTI, 2000).

De acordo com a hipótese deste experimento, a inibição desta enzima aumentaria os níveis intracelulares de AMPc e, conseqüentemente, manteria as células de Sertoli e Leydig ativadas por mais tempo, influenciando positivamente no processo espermatogênico. Entretanto, esta metodologia não se mostrou eficiente em aumentar o rendimento intrínseco da espermatogênese e produção espermática no indivíduo adulto.

4 Conclusão

A utilização de pentoxifilina, nas dosagens utilizadas, durante 60 dias em ratos Wistar adultos não foi capaz de aumentar a concentração de testosterona, o rendimento intrínseco da espermatogênese e a produção espermática, mostrando-se um método inviável para melhorar a performance reprodutiva destes animais.

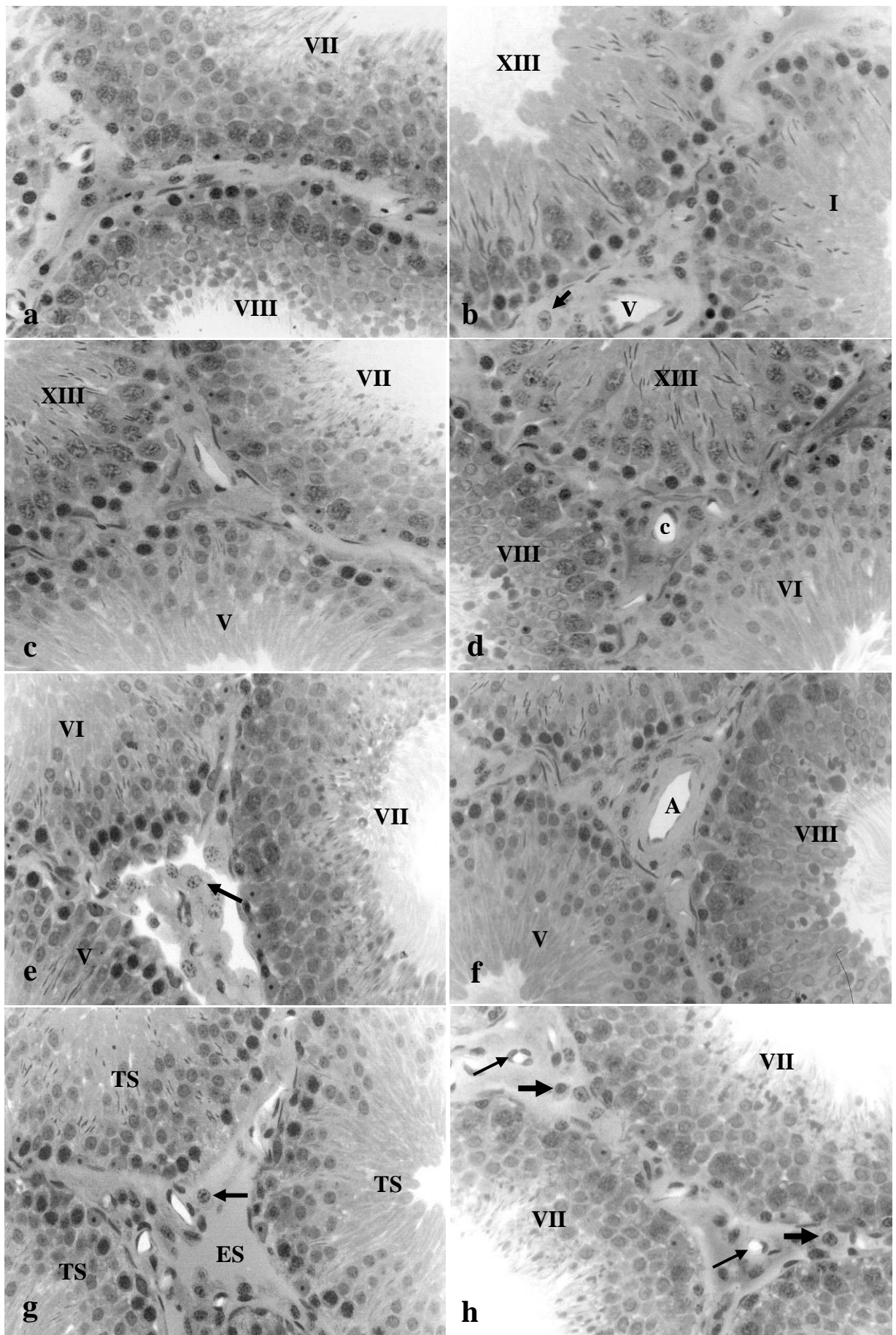


Figura 1 – Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos Wistar adultos tratados com doses crescentes de pentoxifilina durante 60 dias;

Figura 1a – Parênquima testicular de animais do grupo controle. Túbulos seminíferos (TS) nos estágios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero (CES) em secção transversal. Aumento 150X;

Figura 1b – Detalhe de TS nos estágios I e XIII do ciclo do CES;

Figura 1c – Parênquima testicular de animais do grupo tratado com 15mg/kg de pentoxifilina. TS em secção transversal. Detalhe de TS nos estágios V, VII e XIII do CES e espaço intertubular. Aumento 150X;

Figura 1d – Detalhe de TS nos estágios VI, VIII e XIII do CES do grupo tratado com 15mg/kg de pentoxifilina. Espaço intertubular contendo capilar (c) cercado de células de Leydig. Aumento 150X;

Figura 1e – Parênquima testicular de animais do grupo tratado com 30mg/kg de pentoxifilina. TS em secção transversal nos estágios V, VI e VII do CES. Célula de Leydig no espaço intertubular (seta). Aumento 150X;

Figura 1f – Detalhe de TS nos estágios V e VIII do CES do grupo tratado com 30mg/kg de pentoxifilina. Espaço intertubular contendo artéria (A). Aumento 150X;

Figura 1g – Parênquima testicular de animais do grupo tratado com 60mg/kg de pentoxifilina. TS em secção transversal. Espaço linfático (ES) e células de Leydig (seta). Aumento 150X;

Figura 1h – Detalhe de TS no estágio VII do CES do grupo tratado com 60mg/kg de pentoxifilina. Espaço intertubular contendo vasos (seta fina) e células de Leydig (seta larga) Aumento 150X.

5 Referências Bibliográficas

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal Dairy Science**, v.45, p.774-781, 1962.

ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimique, Biophysique**, v.3, p.219-241, 1963.

BOITANI, C.; POLITI, M.G.; MENNA, T. Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. **Biology of Reproduction**, v.48, n.4, p.761-767, 1993.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n.9, p.1317-1327, 2000.

CONTI, M.; NEMOZ, G.; SETTE, C. et al. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **The Endocrinology Society**, v.16, n.3, p. 370-389, 1995.

DOMBROWICZ, D.; SENTE, B.; REITER, E. et al. Pituitary control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. **Journal of Andrology**, v.17, p. 639-650, 1996.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatshafte für veterinar Medizin**, v.29, p. 650-652, 1974.

FAWCETT, D.W.; NEAVES, W.B.; FLORES, M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v.9, p.500-532, 1973.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Belo Horizonte: UFMG, ICB, 1991, 180p. (tese, doutorado)

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. **Tissue & Cell**, v. 30, p.573-582, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.) **Male Reproduction**: a multidisciplinary overview. Madrid; Churchill communications, 1998, cap. 16, p. 198-219.

FRANÇA, L.R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R. et al. Germ cell genotype control cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, R.L.; SILVA Jr, V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.1629-1636, 2000.

GAYTAN, F.; BELLIDO, C.; AGUILAR, E. et al. Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepuberal development in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.393-399, 1994.

GE, R.S.; SHAN, L.X.; HARDY, M.P. Pubertal development of Leydig cells. In:PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D.(Eds.). **The Leydig cell**. Ed. Viena: Cache River Press, 1996. Cap,6, p. 159-174

HOCHEREAU-DE REVIERS, M-T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal Reproduction and Fertility**, v.54, p.209-213, 1978.

HUANG, H.F.S.; POGACH, L.M.; NATHAN, E. et al. Synergistic effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: relationship with the androgen-binding protein status. **Endocrinology**, v.128, p.3152-3161, 1991.

HUANG, H.F.S.; GIGLIO, W.; ANESETTI, R. et al. The Detrimental Effects of Spinal Cord Injury on Spermatogenesis in the Rat Is Partially Reversed by Testosterone, but Enhanced by Follicle-Stimulating Hormone. **Endocrinology**, v.140, no.3, p.1349-1355, 1999.

HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Hormonal regulation of the testis. In: MARTINEZ – GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male Reproduction**: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications, 1998, cap. 7, p. 67-77.

KERR, J.B.; MADDOCKS, S.; SHARPE, R.M. Testosterona and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. **Cell and Tissue Research**, v.268, p.179-189, 1992.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.1-11, 1989a.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the testicular interstitium after neonatal hemicastration in boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.13-21, 1989b.

LEJEUNE, H.; HABERT, R.; SAEZ, J.M. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.20, p.1-25, 1998.

LIN, S.L.; CHEN, Y.M.; CHIEN, C.T. et al. Pentoxifylline attenuated the renal disease progression in rats with remnant Kidney. **Journal of American Society Nephrology**, v.13, n.12, p.2916-2929, 2002.

LIN, S.L.; CHEN, R.H.; CHEN, Y.M. et al. Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking Smad3/4-activated transcription and profibrogenic effects of connective tissue growth factor. **Journal of American Society Nephrology**, v.16, n.9, p.2702-2713, 2005.

MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; DE KRETZER, D.M. et al. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotrophin-releasing hormone-immunized adult rat. **Endocrinology**, v.136, p.4035-4043, 1995.

OCHIAI, H.; ISHIDA, A.; OHTANI, T. et al. Discovery of new orally active phosphodiesterase(PDE4) inhibitors. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1098-1104, 2004.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, v.203, p.485-492, 1982.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v.122, n.3, p.787-794, 1988.

ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing L.L. (Eds), **Cell and Molecular Biology of the Testis**, 1st ed, Oxford University Press, New York, p. 3-42, 1993.

OTTENWELLER, J.E.; LI, M.; GIGLIO, W. et al. Alteration of Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone Regulation of Messenger Ribonucleic Acid for Sertoli Cell Proteins in the Rat During the Acute Phase of Spinal Cord Injury. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.730-735, 2000.

POCCIA, D., Molecules of the somatic cells. In: POCCIA, D. **Molecular biology intelligence unit; molecular aspects of spermatogenesis**. Austin: R.G.Landes Company, 1994. Cap.4, p.75-90.

POLSON, J.B.; STRADA, S.J. cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, p. 403-427, 1996.

PUGH, P.J.; JONES, T.H.; CHANNER, K.S. Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure. **European Heart Journal**. V.24, p.909-915, 2003.

PUTRA, D.K.H.; BLACKSHAW, A.W. Quantitative studies of compensatory testicular hypertrophy following unilateral castration in the boar, **Australian Journal of Biological Science**, v.38, p.429-434, 1985.

RAETSCH, C.; JIA, J.D.; BOIGK, G. et al. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. **An International Journal of gastroenterology and hepatology**. v.50, p.241-247, 2002.

RANNIKKO, A.; PENTTILA, T-L.; ZHANG, F-P. et al. Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepurbetal and adult rat seminiferous epithelium. **Journal of Endocrinology**, v.151, p.29-35, 1996.

RICE, G.C.; BROWN, P.A.; NELSON, R.J. et al. Protection from endotoxic shock in mice by pharmacologic inhibition of phosphatidic acid., **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.91, n.9, p.3857-3861, 1994.

ROCHA, D.M.C.; MIRANDA, J.R.; DEBELJUK, L. et al. Testis size, Sertoli cell population and daily sperm production in adult wistar rats treated neonatally with FSH and PTU. In: Testis Workshop, XV, 1999, Louisville. **The testis: from stem cell to sperm function**. Norwell: Serono Symposia USA, Inc. April 7-10, 1999, p. 60(II-16)a.

RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D., (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, pp. 1-40.

RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D., (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, pp. 1-40.

RUSSELL, L.D. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships Sertoli cells. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. Cap.16, p. 365-390, 1993.

RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R.; HESS, R. et al. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. **Tissue and Cell**, v.27, p.105-128, 1995.

RUSSELL, L.D.; KERSHAW, M.; BORG, K.E. et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: fsh maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. **Journal of Andrology**, v.19, p.308-319, 1998.

SALAM, O.; BAIUOMY, A.R.; EL-SHENAWY, S. et al. The anti-inflammatory effects of the Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 331-340, 2003.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. **Reproduction in Domestic Animals**. 4th Ed. San Diego: Academic Press, Inc.,1991. cap. 6, pp. 221-250.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil. E, Neill, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**, ed.2, New York: Raven Press, 1994. v.1, cap 22, pp.1363-1434.

SHENAWY, A.E.; GATES, R.J.; RUSSELL, L.D. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: cell viability after hormonal replacement in adults after periods of hypophysectomy. **Journal of Andrology**, v.19, p.320-334, 1998.

SILVA JÚNIOR, V.A.; FRANÇA, L.F. Ultra-estrutura de células de Leydig e esteroidogênese em diferentes espécies de mamíferos. **Ciência Veterinária nos trópicos**, v.3, n.3, p.117-134, 2000.

SILVA JÚNIOR, V. A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p.1-10, 2006

SKINNER, M.K. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: **Sertoli cell biology**, p.107-120, 2005. Eds MK SKINNER e MD GRISWOLD. San Diego: Elsevier Science.

STRIFFLER, J. S.; NADLER, J. L. Lisofylline, a novel anti-inflammatory agent, enhances glucose-stimulated secretion in vivo and in vitro: studies in prediabetic and normal rats. **Health Science Journals**, v.53, p.290-296, 2004.

SUÁREZ-QUIAN, C.A.; OKE, B.O.; MUSTO, N. Localization of the androgen receptor in the rodent testis. In: **Male reproduction**; a multidisciplinary overview. Ed. Spain: Churchill Communications Europe España, 1998. Cap 10, p.114-124.

SWALUND, D.J.; N'DIAYE, M.R.; LOSETH, K.J. et al. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepuberal boars. **Biology of Reproduction**, v.53, p.749-757, 1995.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. The effect of FSH on male germ cell survival and differentiation in vitro is mimicked by pentoxifylline but not insulin. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 10, p. 877-881, 2000.

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

ZIRKIN, B.R. Regulation of spermatogenesis in the adult mammal: gonadotrophins and androgens. In: DESJARDINS, C.; EWING, L.L. **Cell and molecular biology of the testis**. New York: Oxford University Press, 1993. Cap.8, p.166-188, 1993.

YAN, W.; SAMSON, M.; JEGOU, B. et al. Bcl-w forms complexes with Bax and Bk, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. **Molecular Endocrinology**, v.14, n.5, p.682-699, 2000.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMIRÓN, I.; CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. **International Journal of Andrology**, v. 11, p. 235-246, 1988.

ARSLAN, M.; WEINBAUER, G.F.; SCHLATT, S. et al. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in juvenile non-human primate (*Macaca mulata*). **Journal of Endocrinology**, v.136, p.235-243, 1993.

BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiology Reviews**, v.75, p.725-748, 1995.

BERNDTSON, W.E.; THOMPSON, D.L. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-daw-ley rats. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 429-435, 1990.

BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PICKETT, B.W. Relationship of absolute number of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. **Journal of the Animal Science**, v. 64, p. 241-246, 1987.

CALOGERO, A.E.; FISHEL, S.; HALL, J.; et al. Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hiperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 911-915, 1998.

CARNEIRO, S.C.S. Ação da pentoxifilina nos dendrócitos dérmicos FXIIIa de placas de psoríase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80 (Supl. 3), p. 314-322, 2005.

CLERMONT, Y., PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **American Journal of Anatomy**. v. 100, p. 241-267, 1957.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 9, p. 1317-1327, 2000.

CONTI, M.; NEMOZ, G.; SETTE, C. et al. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **The Endocrinology Society**, v. 16, n. 3, p. 370-389, 1995.

COOKE, P.S. Thyroid hormone and regulation of testicular development. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 333 - 341, 1996.

COOKE, P.S.; HESS, R.A.; KIRBY, J.D. A model system for increasing testis size and sperm production: Potencial application to animal science. **Journal of Animal Science**, v. 72 (Suppl. 3), p. 43-54, 1994a.

COOKE, P.S.; ZHAO, Y.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1000 - 1005, 1994b.

CURTIS, S.K.; AMANN, R.P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v. 53, p. 1645-1657, 1981.

DADUONE, J.P.; DEMUOLIN, A. Structure and functions of the testis. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M., HUNTER, R.H.F. **Reproduction in mammals and man**.(Ed.) Paris: Ellipses, 1993. Cap.13, p. 227-250.

DE KRETZER, M.; McFARLANE, J.R. Inhibin in the male. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 179-182, 1996.

ESTEVEZ, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS, A.J. et al. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrossome reaction rate. **Human Reproduction**, v. 13, n. 12, p. 3384-3389, 1998.

FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and sertoli cell index. In: **International Congress on Animal Reproduction, 12th, 1992, Netherlands**. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction. Hague: Netherlands, 1992. p.1716-1718.

FRANÇA, L.R.; RUSSEL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.) **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid; Churchill communications, 1998, cap. 16, p. 198-219.

FRANÇA, R.L.; SILVA Jr, V.A.; CHIARINI-GARCIA, H.; et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.1629-1636, 2000.

GONDOS, B., BERNDSTON. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, cap. 4, p. 115-154, 1993.

GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; MCMANUS, C.; et al. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5 °C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 112-122, 2004.

GRADIL, C.M.; BALL, B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 1041-1047, 2000.

GRISWOLD, M.D. Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: In:RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. **The Sertoli cell**. Ed. Clearwater: Cache River Press, Cap. 23, p. 493-508, 1993.

GRISWOLD, M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 411-416, 1998.

HADLEY, A.J.; KUMARI, M.; COVER, P.O. et al. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by the type 4 phosphodiesterase (PDE-4) inhibitor, denbufylline. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 463-470, 1996.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T., COUROT, M. Sertoli cell and development of seminiferous epithelium. **Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique.**, v.18 (2 B), p. 573-583, 1978.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; PERREAU, C., et al. Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 41-46, 1995.

HONG, C.; CHIANG, P.; WU, P. Involvement of calcium in the caffeine stimulation of human sperm motility. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 739-743, 1985.

HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Hormonal regulation of the testis. In: MARTINEZ – GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications, 1998, cap. 7, p. 67-77.

JOHNSON, L.; ZANE, R.S.; PETTY, C.S. et al. Quantification of human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell number, and age-related decline. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 785-795, 1984.

JOYCE, K.L.; PORCELLI, J.; COOKE, P.S. Neonatal goitrogen treatment increased adult testis size and sperm production in the mouse. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 448 - 455, 1993.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 1-11, 1989a.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the testicular interstitium after neonatal hemicastration in boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 13-21, 1989b.

KOSKO, M.S.; BOLT, D.J.; WHEATON, J.E. et al. Endocrine responses in relation to compensatory testicular growth after neonatal hemicastration in boars. **Biology of Reproduction**, v. 36, p.1177-1185, 1987.

KUMARI, M.; COVER, P.O.; POYSER, R.H. et al. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by three selective type-4 phosphodiesterase inhibitors: *in vitro* and *in vivo* studies. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 459-464, 1997.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of New York Academic Science**, v. 55, p. 548-584, 1952.

LEE, D.R.; LEE, J.E.; YOON, H.S. et al. Induction of acrossome reaction in human spermatozoa accelerates the time of pronucleus formation of hamster oocytes after intracytoplasmatic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 2, p. 315-320, 1997.

MARTIN, T.L.; WILLIAMS, G.L.; LUNSTRA, D.D. et al. Immunoneutralization of inhibin modifies hormone secretion and sperm production in bulls. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 73-77, 1991.

MEACHEM, S.J.; MCLACHLAN, R.I.; DE KRETZER, D.M. et al. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 36-44, 1996.

- MONET-KUNTZ, M.; HOCHEREAU-de REVIERS, M.T.; PISSELET, C. et al. Endocrine parameters, hormone receptors and functions of the testicular interstitium and seminiferous epithelium in estradiol-immunized Ile-de-France rams. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 278, 1988.
- NASSAR, A.; MAHONY, M.; BLACKMORE, P. et al. Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline-induced hyperactivated motility or acrossome reaction in human sperm. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 4, p. 748-754, 1998.
- NEGRI, P.; GRECHI, E.; TOMASI, A. Effectiveness of pentoxifylline in sêmen preparation for intrauterine insemination. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1236-1239, 1996.
- NUMABE, T.; OIKAWA, T; KIKUCHI, T. et al. Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 56, p. 225-233, 2001.
- OCHIAI, H.; ISHIDA, A.; OHTANI, T. et al. Discovery of new orally active phosphodiesterase(PDE4) inhibitors. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1098-1104, 2004.
- ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In COLE, H.H.; CUPS, P.T.(eds). **Reproduction in domestic animals**. 3 ed. New york: Academic press.cap. 8, p. 203-227, 1997.
- ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing L.L. (Eds), **Cell and Molecular Biology of the Testis**, 1st ed, Oxford University Press, New York, p. 3-42, 1993.
- ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, v. 203, p. 485-492, 1982.
- ORTH, J.M. The role of follicle stimulating in controlling Sertoli cell proliferation in testis of fetal rats. **Endocrinology**, v. 115, p. 1248-1255, 1984.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 787-794, 1988.

ORTH, J.M.; HIGGINBOTHAM, C.; SALISBURY, R. Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of ³H-thymidine by Sertoli cells in testis of immature rats. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 263-270, 1984.

POLSON, J.B.; STRADA, S.J. cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology.**, v. 36, p. 403-427, 1996.

RADFAR, M.; LARIJANI, B.; HADJIBABAIE, M. et al. Effects of Pentoxifylline on oxidative stress and levels of EGF and NO in blood of diabetic type – 2 patients; a randomized, double - blind placebo – controlled clinical trial. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 59, p. 302-306, 2005.

RUPASRI, A.; JAYAPRAKASH,D.; PETER, A.T. et al. Pentoxifylline improves sperm capacitation and in vitro fertilization of oocytes in the golden hamster. **Theriogenology**, v. 44, p. 553-562, 1995.

RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D., (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, p. 1-40.

SAAD, S.Y.; NAJJAR, T.A.; ALASHARI, M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. **Clinical and experimental Pharmacology and Physiology**. v. 31, p. 862-867, 2004.

SALAM, O.; BAIUOMY, A.R.; EL-SHENAWY, S. et al. The anti-inflammatory effects of the Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 331-340, 2003.

SALANOVA, M.; CHUN, S.; IONA, S. et al. Type 4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterases are expressed in discrete subcellular compartments during rat spermiogenesis. **Endocrinology**, v. 140, n. 5, p. 2297-2305, 1999.

SAVAS, C.; DINDAR, H.; ARAS, T. et al. Pentoxifylline improves blood flow to both testes in testicular torsion. **International Urology and Nephrology.**, v. 33, p. 81 – 85, 2002.

SCHANBACHER, B.D. Pituitary and testicular responses of beef bulls to active immunization against inhibin alpha. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 252-257, 1991.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E, Neill, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**, ed.2, New York: Raven Press., v. 1, cap. 22, p. 1363-1434, 1994.

SILVA JÚNIOR, V. A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition. Development**, v. 45, p. 1-10, 2006.

SIMORANGKIR, D.R.; KRETSER, D.M.; WREFORD, N.G. Increased numbers of Sertoli and germ cells in adult rat testes induced by synergistic action of transient neonatal hypothyroidism and neonatal hemicastration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 201 - 213, 1995.

SINGH, J.,HANDELSMAN, D.J. Neonatal administration of FSH increase Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. **Journal of Endocrinology**, v. 151, p. 37-48, 1996.

SKINNER, M.K. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: **Sertoli cell biology**, p.107-120, 2005.Eds MK SKINNER e MD GRISWOLD. San Diego: Elsevier Science.

STANIC, P.; SONICK, Z.; SUCHANEK, E. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 186-190, 2002.

STEINBERG, A.; STEINBERG, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis *in vivo* and in organ culture. **Biology of Reproduction**, v. 4, p. 84-87, 1971.

- SWALUND, D.J.; N'DIAYE, M.R.; LOSETH, K.J. et al. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepuberal boars. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 749-757, 1995.
- TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. The effect of FSH on male germ cell survival and differentiation in vitro is mimicked by pentoxifylline but not insulin. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 10, p. 877-881, 2000.
- THOMPSON, T.L.; BERNDTSON, W.E. Testicular weight, Sertoli cell number, daily sperm production, and sperm output of sexually mature rabbits after neonatal or prepuberal hemicastration. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 952-957, 1993.
- THORPHY, T.J. Phosphodiesterases isoenzymes: molecular targets for novel antiasthma agents. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 157, p. 351-370, 1998.
- TINAJERO, J.C.; FABBRI, A.; DUFAU, L. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. **Endocrinology**, v. 130, p. 1780-1788, 1992.
- ULISSE, S.; JANNINI, E.A.; CAROSA, E. et al. Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 140, p. 431-436, 1994.
- VAN HASTER, H.L.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. et al. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v. 131, p. 1574 - 1576, 1992.
- VAN VORSTENBOSCH, C.J.A.H.V.; SPEK, E.; COLENBRANDER, B. et al. The ultrastructure of normal fetal and neonatal pig testis germ cells and the influence of fetal decapitation on germ cell development. **Development**, v. 99, p. 553-563, 1987.
- VERGOUWEN, R.P.; HUISKAMP, R.; BAS, R.J. et al. Postnatal development of testicular cell population in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 479-485, 1993.
- VERGOUWEN, R.P.; JACOBS, S.G.P.M.; HUISKAMP, R. et al. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p. 233-243, 1991.

WADE, M.A.; JONES, R.C.; MURDOCH, R.N. et al. Motility activation and second messenger signalling in spermatozoa from rat cauda epididymidis. **Reproduction**, v. 125, p. 175-183, 2003.

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

YOVICH, J.M. Pentoxifylline: action and applications in assisted reproduction. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1786-1791, 1993.

ZHANG, X.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. et al. Effect of Pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 22, p. 415 – 417, 2005.