

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

Edson Vinícius Leite Veloso

L-Carnitina atenua danos testiculares em ratos tratados na fase pré-púbere com sulfato de vincristina

Patos/PB
2022

Edson Vinícius Leite Veloso

L-Carnitina atenua danos testiculares em ratos tratados na fase pré-púbere com sulfato de vincristina

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes
Orientador

Prof. Dr. Otávio Brilhante de Sousa
Coorientador

Patos/PB
2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM CIENCIA E SAUDE ANIMAL
Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

EDSON VINÍCIUS LEITE VELOSO

L-CARNITINA ATENUA DANOS TESTICULARES EM RATOS TRATADOS NA FASE PRÉ-PÚBERE COM SULFATO DE VINCRISTINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Aprovada em: 22/02/2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes (Orientador - UFRN)
Prof. Dr. Otávio Brilhante de Sousa (Examinador Interno - PPGCSA/UFCG)
Prof. Dr. Antônio Fernando de Melo Vaz (Examinador Interno - UFCG)
Profa. Dra. Naisandra Bezerra da Silva Farias (Examinadora Externa - UFRN)
Profa. Dra. Maurina Lima Porto (Examinadora Externa - UFPB)

OBSERVAÇÕES:

- 1 - Por não possuir cadastro como usuário externo no SEI, a examinadora Naisandra Bezerra da Silva Farias receberá cópia do presente documento e dará ciência e aprovação dos termos por e-mail.
- 2 - Os examinadores internos signatários certificam que a examinadora externa acima identificada participou da defesa da tese e tomou conhecimento do teor deste documento.



Documento assinado eletronicamente por **ANTONIO FERNANDO DE MELO VAZ, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/02/2022, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **OTAVIO BRILHANTE DE SOUSA, PROFESSOR 3 GRAU**, em 22/02/2022, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **MAURINA LIMA PORTO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/02/2022, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANILO JOSE AYRES DE MENEZES, Usuário Externo**, em 22/02/2022, às 18:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **2132812** e o código CRC **C5329164**.

V4431

Veloso, Edson Vinícius Leite.

L-Carnitina atenua danos testiculares em ratos tratados na fase pré-púbere com sulfato de vincristina / Edson Vinícius Leite Veloso. – Patos, 2022.

119 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2022.

"Orientação: Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes; Coorientação: Prof. Dr. Otávio Brilhante de Sousa".

Referências.

1. Farmacologia. 2. L-Carnitine. 3. Antineoplásico. 4. Testículo. I. Menezes, Danilo José Ayres de. II. Sousa, Otávio Brilhante de. III. Título.

CDU 615(043)

Agradecimentos

A Deus, por ter dado sabedoria, coragem e determinação para a realização deste trabalho.

A minha mãe Maria Inês Leite Veloso, e a minha tia Olga Rosina Fitipalde Veloso pela paciência e confiança.

A minha família pela credibilidade e apoio.

A minha esposa Lorena da Cruz Moreira de Figueirêdo Veloso, pelo amor, paciência e companheirismo em todos os momentos.

Aos professores Otávio Brilhante de Sousa e Danilo José Ayres de Menezes pela orientação, dedicação, e amizade durante toda a realização deste trabalho.

Aos professores Gildenor Xavier de Medeiros, Rosane Maria Trindade de Medeiros, e Verônica Medeiros da Trindade Nobre pelos ensinamentos e amizade.

Aos colegas de pós graduação em Ciência e Saúde Animal José Emanuel de Souza Sales, Ruthyanna Camila Medeiros da Silva, Ediane Freitas Rocha, Artur Carreiro, Ana Yasha de La Salles e Joyce Galvão.

Aos graduandos Maria Eduarda Camargo Caldeira, Raul Anderson de Souza Machado, Paula Páglia Braga Araújo e Jerffeson Luiz dos Santos Machado pela paciência e colaboração no trabalho.

As colegas de profissão Wanesk Kerly Barbosa Lucena e Carmen Fidelis.

Aos funcionários Jonas Alves, Maria das Neves, Dona Joana, Sara Maia, Helaine Cristiane, Socorro, Cibelle Nunes, Fernanda Medeiros, Adriano Lócio e Leonardo Santos pela paciência e colaboração no trabalho.

A Maria de Figueredo Candeia e demais membros da Família Candeia pelo apoio, amizade e carinho durante todo esse tempo.

A UFCG, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, pela ajuda e oportunidade.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente contribuindo para realização deste trabalho.

Obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	14
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO I: Efeitos citoprotetores de L-carnitine sobre testículos de ratos submetidos a tratamento com drogas antineoplásicas: Uma revisão sistemática.	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
RESUMEN	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. METODOLOGIA	24
2.1 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	24
2.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA	25
2.3 SELEÇÃO DAS PUBLICAÇÕES	25
2.4 CRITÉRIOS AVALIATIVOS	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4. REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO II: Efeitos citoprotetores de L-carnitine sobre a biometria e estereologia testicular de ratos albinos, tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere.	50
RESUMO	51
ABSTRACT	51
RESUMEN	52
1. INTRODUÇÃO	52
2. METODOLOGIA	53
2.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	53
2.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E CONTROLES	54
2.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	54
2.4 BIOMETRIA E ESTEREOLOGIA	55
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
3. RESULTADOS	56
4. DISCUSSÃO	68
5. CONCLUSÃO	73
6. REFERÊNCIAS	73
CAPÍTULO III: Efeitos de L-carnitine sobre alterações morfométricas testiculares e epitélio seminífero de ratos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere.	78
RESUMO	79
ABSTRACT	80
RESUMEN	81

1. INTRODUÇÃO	82
2. METODOLOGIA	82
2.1 LOCAL DO TRABALHO	83
2.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E TRATADO	83
2.3 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	84
2.4 MORFOMETRIA E ANÁLISE HISTOLÓGICA	84
2.5 AVALIAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO.....	85
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4. REFERÊNCIAS	109
CONCLUSÕES	118

RESUMO

A ampliação dos serviços em saúde humana e animal, e a utilização das novas técnicas diagnósticas têm aumentado a perspectiva de vida do homem e dos animais domésticos. Conseqüentemente, o número de diagnósticos oncológicos nessas espécies tem crescido na mesma proporção. A quimioterapia tem se destacado como alternativa importante no tratamento de diversos tipos de tumores. Apesar da eficácia terapêutica de muitos protocolos quimioterápicos, a utilização dessas drogas apresenta severas limitações, as quais estão relacionadas aos seus efeitos adversos. As drogas antineoplásicas agem durante o processo de divisão celular impedindo a multiplicação das células neoplásicas, e conseqüentemente, o crescimento e expansão das neoplasias. Todavia, muitos tecidos normais apresentam alto grau de proliferação celular, tornando-os alvo da ação dos quimioterápicos, razão de origem de muitos efeitos adversos limitantes ao uso das drogas antineoplásicas. A avaliação de substâncias citoprotetoras tem se tornado cada vez mais frequente e necessária para garantir a integridade dos tecidos normais de pacientes submetidos a quimioterapia. Entre os fatores que impactam a capacidade reprodutiva, a manutenção da integridade da gônada masculina de pacientes oncológicos tem grande importância, sobretudo em indivíduos pré-púberes, cuja imaturidade reprodutiva inviabiliza a conservação de gametas para emprego posterior em biotecnias da reprodução assistida. L-carnitine tem demonstrado efeitos protetores promissores sobre o testículo submetido a ação de diversos agentes agressores, inclusive quimioterápicos. O objetivo desse estudo foi compilar informações referentes ao uso de antineoplásicos e substâncias que protegem as gônadas masculinas dos efeitos adversos destas drogas e analisar os efeitos do sulfato de vincristina e a ação protetora da L-carnitina sobre as gônadas masculinas de ratos albinos. Este trabalho compreende uma revisão sistemática que agrupa os trabalhos que abordam diretamente a temática e dois experimentos científicos cujo o objetivo foi determinar os efeitos citoprotetores de L-carnitine sobre os testículos de ratos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere. Os resultados indicam severo grau de danos ao epitélio seminífero e as células de Sertoli causados pela ação do antineoplásico. L-carnitine reduziu os efeitos deletérios do antineoplásico sobre as variáveis testiculares estudadas.

Palavras-chave: L-carnitine; antineoplásico; testículo.

ABSTRACT

The expansion of services in human and animal health, and the use of new diagnostic techniques have increased the life expectancy of man and domestic animals. Consequently, the number of oncological diagnoses in these species has grown at the same rate. Chemotherapy has emerged as an important alternative in the treatment of various types of tumors. Despite the therapeutic efficacy of many chemotherapy protocols, the use of these drugs has severe limitations, which are related to their adverse effects. Antineoplastic drugs act during the process of cell division, preventing the multiplication of neoplastic cells, and consequently, the growth and expansion of neoplasms. However, many normal tissues present a high degree of cell proliferation, making them the target of the action of chemotherapeutics, the reason for the origin of many adverse effects that limit the use of antineoplastic drugs. The evaluation of cytoprotective substances has become increasingly frequent and necessary to ensure the integrity of normal tissues in patients undergoing chemotherapy. Among the factors that impact reproductive capacity, maintaining the integrity of the male gonads of cancer patients is of great importance, especially in prepubertal individuals, whose reproductive immaturity makes it impossible to conserve gametes for later use in assisted reproduction biotechnologies. L-carnitine has shown promising protective effects on the testis subjected to the action of several aggressive agents, including chemotherapy. The aim of this study was to compile information regarding the use of antineoplastics and substances that protect the male gonads from the adverse effects of these drugs and to analyze the effects of vincristine sulfate and the protective action of L-carnitine on the male gonads of albino rats. This work comprises a systematic review that groups works that directly address the subject and two scientific experiments whose objective was to determine the cytoprotective effects of L-carnitine on the testes of rats treated with vincristine sulfate in the prepubertal phase. The results indicate a severe degree of damage to the seminiferous epithelium and Sertoli cells caused by the action of the antineoplastic. L-carnitine reduced the deleterious effects of the antineoplastic on the testicular variables studied.

Keywords: L-carnitine; antineoplastic; testis.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática contendo primeiro autor e ano de publicação (PAP), desenho do estudo (DE), N amostral (NA), cronograma de avaliação (CDA), medida avaliativa (MA), resultados (R) e pontuação de resumo de qualidade (PRQ).....	27
TABELA 1: Peso corpóreo (PC), peso testicular absoluto (PTA), peso testicular relativo (PTR), volume testicular total (VTT), eixo testicular maior (ETMA) e eixo testicular menor (ETME) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC ₄₀ , GV ₄₀ , GC ₆₄ , GV ₆₄ , GC ₁₂₇ e GV ₁₂₇)	57
TABELA 2: Densidade de volume dos túbulos seminíferos (DVT), densidade de volume do tecido intersticial (DVI), volume dos túbulos seminíferos (VT), volume tecido intersticial (VI), densidade de volume da célula de Sertoli (DVS), volume da célula de Sertoli (VS), densidade de volume de espermatogônia (DVE), volume de espermatogônia (VE) e densidade de comprimento (DC) em grupos de ratos albinos controles (GC) e tratados (GV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC ₄₀ , GV ₄₀ , GC ₆₄ , GV ₆₄ , GC ₁₂₇ e GV ₁₂₇)	58
TABELA 1: Diâmetro do túbulo seminífero (DT), altura do epitélio seminífero (ALES), diâmetro do lúmen tubular (DL), eixo menor do túbulo seminífero (EMTS), área do túbulo seminífero (ART), área do lúmen tubular (ARL) e área do epitélio seminífero (AREP) com os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias	86

de idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127 e GV127, GCV127)

TABELA 2: Valores percentuais médios das frequências dos tipos celulares espermatogônia A (GA), espermatogônia intermediária e B (GIB), espermatócito primário (EP), espermátide jovem (SJ), espermátide tardia (ST) e células de Sertoli (S) e desvio padrão (\pm DP) nos túbulos seminíferos em grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127 e GV127, GCV127) 93

TABELA 3: Médias das frequências dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e respectivo desvio padrão (\pm DP) nos túbulos seminíferos de grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127 e GV127, GCV127)..... 102

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GCV ₁₂₇). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Observa-se aumento das vacuolizações do epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V)	59
FIGURA 2: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GV ₁₂₇). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Evidencia-se comprometimento severo dos túbulos seminíferos, desorganização e vacuolizações do epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V)	59
FIGURA 3: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 127 dias de vida (GC ₁₂₇). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); núcleo da célula de Sertoli (S); lúmen tubular (Lt); espermatócito primário (Ep); espermátide jovem (Sj); espermátide tardia (St)	60
FIGURA 4: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GCV ₆₄). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Observa-se vacuolização, porém, em menor grau. Tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V)	61

- FIGURA 5:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GV₆₄). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Observam-se restos celulares oriundos da descamação do epitélio seminífero. Tecido intersticial (Ti); lâmina limitante (Lm); célula multinucleada (CM); vacuolização (V); restos celulares da descamação do epitélio seminífero (DC) 62
- FIGURA 6:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 64 dias de vida (GC₆₄). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); espermatogônia (G); lúmen tubular (Lt); célula mioide (M); lâmina limitante (Lm) 63
- FIGURA 7:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GCV₄₀). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Observa-se redução dos efeitos deletérios no epitélio seminífero. Tecido intersticial (Ti); célula mioide (M); espermátide jovem (Sj); vacuolização (V) 64
- FIGURA 8:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GV₄₀). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x. Observam-se efeitos deletérios no epitélio seminífero. Tecido intersticial (Ti); espermatogônia (G); célula multinucleada (CM); restos celulares da descamação do epitélio seminífero (DC) 65
- FIGURA 9:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 40 dias de vida

(GC₄₀). Coloração Hematoxilina-Eosina. Objetiva de 20x.
 Cápsula testicular (C); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial
 (Ti); espermátide jovem (Sj); núcleo da célula de Sertoli
 (S);

66

FIGURA 1: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 40 dias de vida (GC₄₀). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Cápsula testicular (C); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VI, espermátide jovem (Sj); núcleo da célula de Sertoli (S); espermátide jovem (Sj); espermatogônia (G). Obj.50x.....

96

FIGURA 2: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 64 dias de vida (GC₆₄). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); célula mioide (M); lâmina limitante (Lm). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio IX, espermatogônia (G); núcleo da célula de Sertoli (S); espermátide jovem (Sj); espermátide primário (Ep). Obj.50x.....

96

FIGURA 3: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 127 dias de vida (GC₁₂₇). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); célula mioide (M); lâmina limitante (Lm). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VIII, núcleo da célula de Sertoli (S); espermatogônia (G); espermátide primário (Ep); espermátide jovem (Sj); espermátide tardia (St); lúmen tubular (Lt). Obj.50x.....

97

FIGURA 4: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GV40). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observam-se efeitos deletérios no epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); lâmina limitante (Lm); vacuolização (V). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VII, núcleo da célula de Sertoli (S); espermatogônia (G); célula mioide (M); célula multinucleada (CM); lúmen tubular (Lt); espermátocito primário (Ep); espermátide jovem (Sj). Obj.50x..... 97

FIGURA 5: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GV64). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observam-se restos celulares oriundos da descamação do epitélio seminífero. Tecido intersticial (Ti); lâmina limitante (Lm); lúmen tubular (Lt). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio XII-XIII, restos celulares da descamação do epitélio seminífero (DC); núcleo da célula de Sertoli (S); espermatogônia (G); espermátocito primário (Ep); espermátide tardia (St); espaços existentes entre células do epitélio seminífero (Seta vermelha). Obj.50x..... 98

FIGURA 6: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GV127). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Evidencia-se vacuolização severa dos túbulos seminíferos, descaracterização celular e desorganização do epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V); lâmina limitante (Lm). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio XII-XIII, vacuolização (V); lúmen tubular

(Lt); espermatócito primário (Ep); espermatíde tardia (St).
Obj.50x..... 98

FIGURA 7: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GCV40). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observa-se redução dos efeitos deletérios no epitélio seminífero, observa-se vacuolização, porém, em menor grau. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V); lâmina limitante (Lm). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VII, espermatócito primário (Ep); espermatíde jovem (Sj); núcleo da célula de Sertoli (S); célula mioide (M). Obj.50x..... 100

FIGURA 8: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GCV64). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observa-se vacuolização, porém, em menor grau. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VII, núcleo da célula de Sertoli (S); lúmen tubular (Lt); espermatócito primário (Ep); espermatíde jovem (Sj); vacuolização (V); tecido intersticial (Ti). Obj.50x..... 100

FIGURA 9: Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GCV127). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observa-se aumento das vacuolizações do epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio IX, lúmen tubular (Lt); espermatócito primário (Ep); espermatíde jovem (Sj). Obj.50x..... 101

1 INTRODUÇÃO

2
3 Os estudos científicos das últimas décadas evidenciam um aumento no número de casos
4 de tumores em humanos e em animais domésticos. A quimioterapia antineoplásica ou
5 antiblástica tem sido, em muitos casos, a alternativa mais indicada para o tratamento curativo
6 de diferentes tipos de tumores (Almeida et al., 2005; Faro et al., 2008).

7 Os primeiros quimioterápicos foram descobertos em 1946 quando, na Segunda Guerra
8 Mundial, observou-se que pessoas expostas ao gás mostarda (até então arma de guerra)
9 desenvolviam hipoplasia medular e linfóide. A partir daí iniciaram-se pesquisas com objetivo
10 de empregar essas substâncias no tratamento de linfomas malignos. A cada período, uma nova
11 gama de antineoplásicos quimioterápicos é descoberta ou desenvolvida em laboratórios,
12 possibilitando a elaboração de diversos protocolos e estratégias de tratamento, os quais
13 permitem maior efetividade e segurança no uso destes medicamentos, com redução dos seus
14 efeitos indesejados (Costa-Lotufo et al, 2010; Ferdinandi & Ferreira, 2009; Maciel et al., 2013).

15 O alvo das drogas quimioterápicas é a célula neoplásica, com o intuito de promover a
16 sua destruição, porém, o mecanismo de ação dessas substâncias está ligado aos ciclos celulares
17 de divisão e a alta capacidade proliferativa das células tumorais. Desta forma, tecidos saudáveis
18 com níveis elevados de divisão celular, podem ser alvo da ação dos antineoplásicos
19 quimioterápicos (Akay et al., 2005).

20 O organismo animal possui diversos tipos de tecidos normais que apresentam altos
21 índices de replicação celular, incluindo tecido hematopoiético, epitélio da mucosa
22 gastrointestinal e epitélio seminífero. Em alguns casos, o índice de replicação celular pode ser
23 igual ou até superior ao observado em alguns tipos de células neoplásicas, tornando essas
24 células e tecidos altamente suscetíveis a ação de fármacos quimioterápicos, que tem como alvo
25 moléculas existentes no processo de divisão celular. A partir desse mecanismo se originam
26 grande parte dos efeitos adversos existentes na quimioterapia, considerados fatores limitantes
27 ao uso de drogas quimioterápicas (Maciel et al, 2013).

28 A necessidade de controlar, mitigar ou anular os efeitos deletérios dos quimioterápicos
29 sobre as células e tecidos normais tem justificado a realização de estudos que investigam as
30 capacidades citoprotetoras de diversas moléculas, capazes de impedir ou amenizar os efeitos
31 adversos das drogas antineoplásicas sem interferir na ação farmacológica existente junto as
32 células cancerosas (Costa-Lotufo et al, 2010).

33 Dentre inúmeras substâncias estudadas, a l-carnitine tem sido empregada, com esta
34 finalidade, em associação a diversos protocolos anticâncer, no intuito de amenizar ou anular os

1 efeitos deletérios sobre os tecidos testiculares. A literatura tem apontado para uma mitigação
2 dos efeitos adversos das drogas quimioterápicas sobre os tecidos testiculares tratados com L-
3 carnitine. Efeitos citoprotetores de L-carnitine em maior ou menor grau tem sido relatados em
4 gônadas tratadas com diversos fármacos quimioterápicos (Sampaio & Mancini, 2007).

5 Esse estudo teve por objetivo analisar os efeitos citoprotetores de L-carnitine sobre o
6 testículo tratado com drogas antineoplásicas.

1 REFERÊNCIAS

2
3 AKAY, S. et al. Successful treatment of liver transplant-associated Kaposi's sarcoma with long-
4 term vincristine. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2005. p. 2188-2189.

5
6 ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e
7 ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v.
8 28, p. 118-129, 2005.

9
10 COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos
11 fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da
12 Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

13
14 FARO, A. M. et al. Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico
15 com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. **Ars Veterinaria**,
16 v. 24, n. 1, p. 001-008, 2008.

17
18 FERDINANDI, Damiana Maria; FERREIRA, Adriano Araújo. Agentes alquilantes: reações
19 adversas e complicações hematológicas. **AC & Científica**, v. 1, p. 1-12, 2009.

20
21 MACIEL, M. A. M. et al. Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes
22 antitumorais e antimutagênicos. **Revista Fitos**, 2007.

23
24 Sampaio, R. F., & Mancini, M. C. (2007). Systematic review studies: a guide for careful
25 synthesis of the scientific evidence. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, 11, 83-89.

16 **CAPÍTULO I: Efeitos citoprotetores de L-carnitine sobre testículos de ratos submetidos**
17 **a tratamento com drogas antineoplásicas: Uma revisão sistemática**

18

19

20 Edson Vinícius Leite Veloso, José Emanuel de Souza Sales, Ruthyanna Camila Medeiros da
21 Silva, Maria Eduarda Camargo Caldeira, Paula Páglia Braga Araújo, Raul Anderson de Souza
22 Machado, Otávio Brilhante de Sousa, Danilo José Ayres de Menezes

23

24 Trabalho submetido a revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* (A4)

1 **Efeitos citoprotetores de L-carnitina sobre testículos de ratos submetidos a tratamento**
 2 **com quimioterápicos antineoplásicos: Uma revisão sistemática¹**

3
 4 Edson V.L. Veloso², Jose E.S. Sales ², Ruthyanna C.M. Silva ², Maria E.C. Caldeira²,
 5 Paula P.B Araújo^{2*}, Raul A.S. Machado², Otávio B. Sousa²
 6 and Danilo J.A Menezes³

7
 8
 9 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1533-8499>

Edson V.L. Veloso

10 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1317-0856>

Jose E.S. Sales

11 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1296-3106>

Ruthyanna C.M.

12 Silva

13 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6897-7545>

Maria E.C. Caldeira

14 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4777-9862>

Paula P.B Araújo

15 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0784-7402>

Raul A.S. Machado

16 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5729-2081>

Otávio B. de Sousa

17 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6089-3283>

Danilo J.A de

18 Menezes

19
 20 **ABSTRACT.** - Veloso E.V.L., Sales J.E.S., Silva R.C.M., Caldeira M.E.C., Araújo P.P.B.,
 21 Machado R.A.S., Sousa O.B. & Menezes D.J.A. 2022. **Cytoprotective effects of L-carnitine**
 22 **on the testes of rats undergoing treatment with antineoplastic chemotherapy: A**
 23 **systematic review.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2022. Unidade de Medicina Veterinária,
 24 Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária, s/n, Cx Postal 61 - Patos/PB.
 25 CEP: 58708-110, Brazil. E-mail: araujo.paglia@gmail.com

26 Chemotherapy is an indispensable therapeutic tool in the treatment of different types of
 27 neoplasms. However, antineoplastic chemotherapy drugs do not have selectivity for tumor
 28 cells, indistinctly reaching normal and cancer cells that are in the process of cell replication.
 29 Germ cells and other testicular cell components are affected by the action of these drugs,
 30 compromising their functionality. Ensuring the reproductive capacity of the male gonads of
 31 cancer patients has proved to be an important challenge for the biomedical sciences. L-carnitine
 32 and several other substances have shown beneficial effects in the preservation of normal
 33 testicular tissues exposed to anticancer drugs. A search in multiple databases (ScienceDirect,
 34 PubMed, Scopus, Web of Science) without distinction of publication date was performed,

1 identifying 1380 unique articles, of which 35 fully met the established inclusion criteria. Of the
2 35 studies, 24 (68.5%) were cross-sectional and 11 (31.4%) were longitudinal in design. Most
3 studies included a healthy control group in the study design, 5.8% were randomized trials. There
4 was diversity in the methodologies used in the administration of drugs and evaluation methods.
5 Overall, all studies pointed to some beneficial effect of L-carnitine administration on the testes
6 of individuals undergoing chemotherapy. The review found widespread heterogeneity in the
7 use of dosages, routes of administration and methods to assess the cytoprotective effects of L-
8 carnitine on testicular tissues undergoing chemotherapy. This research highlights the need to
9 standardize appropriate methods to quantitatively and qualitatively assess the effects of L-
10 carnitine on testicular tissues.

11
12 **INDEX TERMS:** Male gonads, cytoprotection, anticancer therapy.

13
14 **RESUMO.** - [Efeitos citoprotetores de L-carnitina sobre testículos de ratos submetidos a
15 tratamento com quimioterápicos antineoplásicos: Uma revisão sistemática.] A
16 quimioterapia é uma ferramenta terapêutica indispensável no tratamento de diversos tipos de
17 neoplasias. Todavia, os quimioterápicos antineoplásicos não possuem seletividade para células
18 tumorais, atingindo indistintamente células normais e cancerosas que se encontrem em processo
19 de replicação celular. As células germinativas e outros componentes celulares testiculares são
20 afetados por ação destas drogas, comprometendo suas funcionalidades. Assegurar a capacidade
21 reprodutiva da gônada masculina de pacientes oncológicos tem se revelado um importante
22 desafio para as ciências biomédicas. A L-carnitina e diversas outras substâncias têm
23 demonstrado efeitos benéficos na preservação dos tecidos testiculares normais expostos aos
24 antineoplásicos. Uma busca em múltiplas bases de dados (ScienceDirect, PubMed, Scopus,
25 Web of Science) sem distinção de data de publicação foi realizada, identificando 1380 artigos
26 únicos, dos quais 35 preencheram integralmente os critérios de inclusão estabelecidos. Dos 35
27 estudos, 24 (68,5%) eram transversais e 11 (31,4%) eram longitudinais em delineamento. A
28 maioria dos estudos incluiu grupo controle saudável no desenho de estudo, 5,8% foram ensaios
29 randomizados. Houve diversidade nas metodologias empregadas na administração dos
30 fármacos e métodos avaliativos. No geral, todos os estudos apontaram para algum efeito
31 benéfico da administração de L-carnitina sobre os testículos de indivíduos submetidos ao
32 tratamento quimioterápico. A revisão encontrou heterogeneidade generalizada no emprego de
33 posologias, vias de administração e métodos avaliativos dos efeitos citoprotetores de L-
34 carnitina sobre os tecidos testiculares submetidos a quimioterapia. Esta pesquisa destaca a

1 necessidade de se padronizar métodos apropriados para avaliar quantitativamente e
2 qualitativamente os efeitos de L-carnitina sobre os tecidos testiculares.

3
4 **TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Gônada masculina, citoproteção, terapia anticâncer.

5 6 **INTRODUÇÃO**

7 Os diagnósticos de câncer em humanos e animais domésticos têm crescido
8 geometricamente nas últimas décadas. Em muitos casos, a quimioterapia antineoplásica ou
9 antiblástica compreende a alternativa mais indicada para o tratamento curativo ou paliativo de
10 diferentes tipos de câncer, podendo ser indicada de forma adjuvante a outras medidas
11 terapêuticas como radioterapia, crioterapia e intervenções cirúrgicas (Almeida et al. 2005;
12 Wagner et al. 2006; Munson & Moresco 2007; Faro et al. 2008; Schirmacher 2019).

13 O principal objetivo dos protocolos quimioterápicos é a destruição específica das células
14 cancerígenas, porém, o mecanismo de ação de grande parte dessas substâncias está diretamente
15 ligado aos ciclos de divisão celular e a alta capacidade proliferativa das células tumorais. Desta
16 forma, os tecidos normais com níveis elevados de divisão celular, podem ser alvo da ação dos
17 antineoplásicos quimioterápicos. (Akay et al. 2005).

18 O organismo animal possui diversos tipos de tecidos normais que apresentam altos
19 índices de replicação celular, incluindo tecido hematopoiético, epitélio da mucosa
20 gastrointestinal e epitélio seminífero. Em alguns casos, o índice de replicação celular pode ser
21 igual ou até superior ao observado em alguns tipos de células neoplásicas, tornando essas
22 células não cancerosas e tecidos normais altamente suscetíveis a ação de fármacos
23 quimioterápicos que tem como alvo as moléculas existentes no processo de divisão celular. A
24 partir desse mecanismo se originam grande parte dos efeitos adversos, considerados fatores
25 limitantes ao uso de drogas quimioterápicos (Faro et al. 2008; Munson & Moresco 2007).

26 A necessidade de controlar, mitigar ou anular os efeitos deletérios dos quimioterápicos
27 sobre as células e tecidos normais tem justificado a realização de diversos estudos que
28 investigam as capacidades citoprotetoras de diversas moléculas, capazes de impedir ou
29 amenizar os efeitos adversos das drogas antineoplásicas sobre células saudáveis, sem interferir
30 na ação farmacológica existente entre o fármaco e as células cancerosas (Almeida et al. 2005;
31 Wagner et al. 2006; Schirmacher 2019).

32 Dentre inúmeras substâncias estudadas, L-carnitina tem sido empregada em associação
33 a diversos protocolos anticâncer, no intuito de amenizar ou anular os efeitos deletérios sobre os
34 tecidos normais, incluindo os tecidos testiculares. A literatura tem apontado para uma mitigação

1 dos efeitos adversos das drogas quimioterápicas sobre os tecidos testiculares tratados com L-
2 carnitina. Efeitos citoprotetores em maior ou menor grau tem sido relatados em gônadas tratadas
3 com diversos fármacos quimioterápicos (Okada et al. 2009; Cabral et al. 2018; Yaman &
4 Topcu-Tarlacalisir 2018).

5 Este trabalho tem por objetivo compilar, por meio de uma revisão sistemática ampla da
6 literatura publicada, os principais resultados dos estudos científicos que dispõem sobre os
7 efeitos de L-carnitina sobre os tecidos das gônadas masculinas tratados com fármacos
8 antineoplásicos, considerando aspectos farmacológicos, clínicos, morfológicos e funcionais das
9 células e tecidos testiculares. Com o detalhamento do nível de conhecimento sobre o assunto,
10 espera-se jogar luz sobre o tema, por meio da indicação de procedimentos metodológicos mais
11 eficientes de investigação e novos protocolos terapêuticos que assegurem a integridade
12 morfológica e funcional das gônadas de pacientes submetidos a quimioterapia antineoplásica.

13 14 **MATERIAIS E MÉTODOS**

15 A revisão sistemática foi conduzida de acordo com as recomendações PRISMA para os
16 principais itens relatados em revisões sistemáticas integrativa (Page et al. 2021).

17 **Critérios de elegibilidade.** Foram considerados estudos publicados em inglês, que
18 abordam diretamente o tema objeto dessa revisão, pesquisas cujo desenho experimental
19 incluam ensaios clínicos randomizados, estudos comparativos, estudo multicêntrico, estudos
20 prospectivos e estudos experimentais com grupo controle pareado foram consideradas dentro
21 dos critérios de inclusão. Medidas de resultados específicos não foram critérios de inclusão. Os
22 principais critérios de exclusão foram trabalhos que não apresentaram claramente os métodos e
23 ferramentas avaliativas e artigos de revisão.

24 A indisponibilidade do texto completo, relatos de caso, editoriais, capítulo de livro e
25 resumo de conferências foram considerados critérios de exclusão adicionais. Estudos em
26 duplicata também tiveram cópia excluída. Quando os artigos de revisão continham dados
27 relevantes, os artigos originais eram analisados e incluídos na presente Revisão Sistemática se
28 preenchessem os critérios de elegibilidade. Para artigos que atenderam aos nossos critérios de
29 inclusão, foram rastreadas referências listadas identificando publicações ausentes na sequência
30 de pesquisa. Quando várias publicações relatavam dados de um único estudo, o manuscrito com
31 os dados de acompanhamento mais completo foi selecionado para inclusão.

32 **Estratégia de busca.** Artigos originais adequados foram identificados nas bases de
33 dados ScienceDirect, PubMed, Scopus e Web of Science. A busca utilizou as palavras-chave
34 “carnitine”, “chemotherapy”, “cytoprotective effect” e “testis”. As palavras-chave foram

1 combinadas usando os operadores booleanos AND e OR. Dois revisores autônomos
2 examinaram todos os títulos e resumos recuperados pelas pesquisas para identificar estudos
3 potencialmente elegíveis. Qualquer registro considerado potencialmente elegível por pelo
4 menos um dos revisores foi recuperado na íntegra e avaliado por ambos os revisores em relação
5 aos critérios de elegibilidade. Um terceiro revisor resolveu quaisquer divergências. Foram
6 adicionados limites restringindo os estudos aos conduzidos em humanos e animais. A busca foi
7 feita em pares e revisada por um terceiro autor, no período entre julho de 2021 a fevereiro de
8 2022.

9 **Seleção das publicações.** Os títulos obtidos a partir da estratégia de busca foram
10 revisados pelo primeiro autor e decidiu-se proceder à revisão do resumo. Quando atendidos aos
11 critérios de elegibilidade, título, e os resumos foram considerados relevantes, cópias do texto
12 completo dos artigos foram obtidas e revisadas pelo primeiro autor (EVLV) e outros membros
13 da equipe de pesquisa. Qualquer discordância quanto à elegibilidade do estudo foi resolvida por
14 consenso e o envolvimento de todos os autores.

15 Os dados dos estudos incluídos foram recuperados usando formulário próprio aplicado
16 pelos autores. Um revisor, trabalhando independentemente, de forma padronizada não cega,
17 procurando por literatura relevante, extraiu os dados dos estudos incluídos. A coleta dos dados
18 foi concluída pelo primeiro autor (EVLV). Decisões finais sobre as inclusões de estudos foram
19 tomadas após conclusão da coleta dos dados, casos de divergência foram discutidas com os
20 autores sêniores (OBS e DJAM) e o segundo autor (JESS).

21 Quando disponíveis, foram recuperados dados referentes a detalhes da publicação,
22 primeiro autor, ano de publicação, desenho da pesquisa, número amostral, drogas
23 quimioterápicas empregadas, cronograma de avaliação, incluindo o momento da primeira
24 avaliação em relação ao início do tratamento; as ferramentas avaliativas empregadas para medir
25 os efeitos dos fármacos utilizados e resultados principais descritos no estudo.

26 **Avaliação das características dos estudos e análise dos dados.** A qualidade de cada
27 estudo foi avaliada usando critérios de avaliação de qualidade padrão para estudos
28 quantitativos. Os critérios avaliativos foram determinados pelas diretrizes PRISMA (Page et al.
29 2021). Um total de cinco itens foram avaliados e pontuados: Descrição do objetivo; se houve
30 cegamento ou intervenção dos investigadores; descrição dos métodos avaliativos;
31 aplicabilidade dos resultados; conclusões apoiadas nos resultados. Uma pontuação total foi
32 calculada para cada estudo, somando a pontuação total nos itens relevantes e dividindo pela
33 pontuação total possível (Kmet et al. 2004). Por critério que foi atendido, um ponto foi dado e
34 as pontuações gerais foram posteriormente subdivididas em 5 categorias diferentes (A – E),

1 onde A representa um estudo que cumpriu (quase) todos os critérios e estudos E que não o
2 fizeram (Linschoten, 2018).

3 4 **RESULTADOS**

5 A busca resultou em 1380 artigos, sem distinção de data de publicação, que
6 posteriormente, passaram por etapas de filtragem considerando os critérios de inclusão e
7 exclusão acima descritos. Dos 1380 estudos identificados, apenas 35 pesquisas contemplaram
8 todos os critérios de inclusão estabelecidos nesse estudo.

9 Das 1380 pesquisas identificadas nas bases de dados, 10 (0,66%) eram duplicatas, 26
10 eram revisões (1,7%). Do total de estudos compilados, 114 (7,5%) artigos abordavam os efeitos
11 protetores de L-carnitina em outros órgãos ou tecidos, enquanto que 24 (1,5%) empregaram
12 injúrias físicas ou outras drogas não quimioterápicas no intuito de avaliar o potencial
13 citoprotetor de L-carnitina, demonstrando que o potencial científico e terapêutico dessa
14 substância não se limita ao paciente quimioterápico (Figura 1).

15 Dos 35 estudos incluídos, todos apontaram algum efeito benéfico em maior ou menor
16 grau do uso de L-carnitina sobre o testículo submetido a quimioterapia, todavia, a intensidade
17 dos efeitos citoprotetores parece estar diretamente relacionado a duração e intensidade de
18 exposição tanto ao quimioterápico como também a L-carnitina.

19 O resumo dos artigos selecionados incluindo nome do primeiro autor, ano de
20 publicação, desenho do estudo, número amostral, cronograma de avaliação, medidas
21 avaliativas, resultados e pontuação estabelecida estão dispostos no Quadro 1.

22 23 **DISCUSSÃO**

24 A L-carnitina é um aminoácido não essencial ramificado sintetizado a partir de
25 sucessivas metilações da lisina, por ação da S-adenosil-metionina no hepatócito. Também pode
26 ser adquirida de forma exógena, farmacológica ou dietética pelo consumo de carne e leite (Tein
27 et al. 1996; Vaz & Wanders, 2002; Gomes et al. 2020).

28 A quase um século L-carnitina tem sido considerada importante na fisiologia tecidual,
29 sem que, no entanto, seu papel tenha sido mensurado e registrado com exatidão pelos
30 pesquisadores. As atividades de cofator no transporte de ácidos graxos, redução da oxidação e
31 aumento na produção de energia tem sido aceitas como desempenhadas por L-carnitina. A alta
32 concentração dessa substância em tecidos com alta demanda energética como músculos, células
33

1 de Sertoli, células do epidídimo e espermatozoides aponta importante participação de L-
2 carnitina na geração de energia e no desenvolvimento e maturação dos gametas masculinos. A
3 beta-oxidação de ácidos graxos é uma das principais vias metabólicas de geração de energia
4 dos espermatozoides (Menchini-Fabris et al. 1984; Jarow, 2003; Lenzi et al. 2003; Caviglia et
5 al. 2004; Aboul-Naga et al. 2020).

6 A necessidade de mais estudos para esclarecer as reais atividades de L-carnitina sobre
7 células e tecidos é reconhecida. Todavia, acumulam-se as pesquisas relatando efeitos benéficos
8 da substância em diversos tipos de células e tecidos submetidos a diferentes agentes agressores.
9 Já foram descritos efeitos protetores de L-carnitina sobre cardiomiócitos submetidos a isquemia
10 (Shug et al. 1991). Efeitos antiapoptóticos foram descritos em linfócitos (Moretti et al. 2002),
11 hepatócitos (Revoltella et al. 1994), miócitos (Arrigoni-Martelli & Caso, 2001), neurônios (Ishii
12 et al. 2001) e células germinativas (Costa et al. 1994). Muito embora o mecanismo exato pelo
13 qual a apoptose é evitada permanece desconhecido.

14 Um dos mecanismos reconhecidamente desencadeadores da apoptose celular passa pela
15 ativação do Ligante ao receptor “*associated death domain*” (FASL). Estudos *in vitro* sugerem
16 que L-carnitina interfere na produção de componentes do sistema FAS-FASL, além de inibir
17 algumas das caspases recombinantes, impedindo o estabelecimento do apoptose celular. Em
18 células submetidas a apoptose, constatou-se que os níveis de L-carnitina eram menores que o
19 normal (Andrieu-Abadie et al. 1999; Mutomba et al. 2000; Vescovo et al. 2002).

20 Estudos sugerem que L-carnitina também altera a permeabilidade da membrana celular
21 por meio da interação com cardiolipina, é antioxidante, protegendo mitocôndrias e outras
22 organelas da ação de moléculas exógenas, preservando funções celulares (Di Marzio et al. 1999;
23 Arrigoni-Martelli & Caso, 2001; Solarska et al. 2010).

24 A preservação das mitocôndrias impede a liberação do citocromo C no citoplasma, o
25 que ativaria caspase 9, que por sua vez resultaria na ativação das caspases 3, 6 e 7; responsáveis
26 pela clivagem do DNA e consequente ativação da apoptose (Hikim et al. 2003). O aumento da
27 capacidade de geração de energia, também atribuída a ação de L-carnitina, pode resultar em
28 uma velocidade maior de restauração de alterações na molécula de DNA, reduzindo assim as
29 chances de apoptose celular (Amendola et al. 1991).

30 As concentrações de L-carnitina no sêmen e nos espermatozoides parece ser diretamente
31 proporcional a contagem de espermatozoides e ao aumento de variáveis do espermograma como
32 motilidade e grau de maturação, havendo testes promissores em pacientes portadores de

1 infertilidade (Menchini-Fabris et al. 1984; Costa et al. 1994; Vitali et al. 1995; Goumenou et
2 al. 2000; Jarow, 2003; Lenzi et al. 2003).

3 A administração prévia de L-carnitina em ratos tratados com doxorubicina mostrou-se
4 eficaz na preservação do acrossomo, amenizou os danos ao DNA dos espermatozoides e
5 atenuou outras alterações de longo prazo causadas pela ação do quimioterápico sobre as células
6 da linhagem germinativa (Cabral et al. 2018).

7 Outro estudo avaliou o efeito citoprotetor de L-carnitina sobre os testículos de ratos
8 tratados com cisplatina, por meio da quantificação do índice de apoptose de células
9 germinativas e análise da morfologia, motilidade, quantidade e vitalidade dos espermatozoides
10 no epidídimo. A L-carnitina reduziu significativamente o número de células em apoptose, com
11 melhoras na contagem de espermatozoides epididimários e sua viabilidade (Yaman & Topcu-
12 Tarladacalisir 2018).

13 A L-carnitina mostrou-se eficaz na preservação dos níveis séricos de LH, FSH e
14 testosterona de ratos tratados com cisplatina. Também se observou uma diferença nos níveis de
15 marcadores antioxidantes (malondialdeído) e de catalases, sendo forte indício da ação
16 antioxidante de L-carnitina, impedindo a formação de radicais livres com potencial de interação
17 com moléculas de DNA que podem induzir a apoptose. Houve mitigação de danos ao DNA e
18 dos efeitos deletérios sobre a contagem de espermatozoides, viabilidade e motilidade (Aboul-
19 Naga et al. 2020).

20 Uma avaliação da expressão gênica dos efeitos antioxidantes de vitamina E, melatonina,
21 L-carnitina e atorvastatina em ratos tratados com busulfan revelou que vitamina E foi mais
22 eficaz que os demais antioxidantes na amenização dos efeitos deletérios de busulfan sobre a
23 expressão gênica e melhoria da espermatogênese, embora também tenha sido observados
24 efeitos antiapoptóticos de algumas dos outros antioxidantes estudados ([Salehinezhad](#) et al.
25 2019).

26 Os efeitos citoprotetores de L-carnitina não se limitam as drogas quimioterápicas, sendo
27 igualmente eficazes na redução de danos testiculares causados pelo estresse oxidativo resultante
28 da ingestão de cobre. Nestes casos, a L-carnitina conserva o diâmetro de túbulos seminíferos,
29 as funções testiculares, a espermatogênese e os parâmetros relativos à qualidade do esperma e
30 dos espermatozoides (Khushboo et al. 2018).

31 A existência de diferentes mecanismos de atuação sugeridos para L-carnitina na
32 literatura advém de parâmetros distintos aferidos por metodologias igualmente diferentes,

1 aplicadas em diversos modelos animais submetidos a condições próprias. O mecanismo de ação
2 da droga tem sido investigado através de estudos que condensam diferentes doses, via de
3 aplicação e duração do tratamento diversos, e a seleção de número amostral adequado para a
4 realização de cada pesquisa, o que contribui para disparidade de resultados e interpretações
5 pelos diferentes grupos de pesquisadores. Muito embora haja a possibilidade de L-carnitina
6 exercer seus efeitos sob várias frentes, mais pesquisas são necessárias para determinar quais
7 dessas hipóteses científicas tem real peso sobre a proteção de células submetidas a um agente
8 agressor.

9 Ainda que os mecanismos de citoproteção desempenhados por L-carnitina não estejam
10 bem definidos, o efeito protetor sobre células do epitélio germinativo, em maior ou menor grau,
11 parece estar consolidado por vários grupos de estudo já citados. Muitos experimentos
12 descrevem reduções de efeitos deletérios sob condições específicas, tornando o esclarecimento
13 do mecanismo de ação ainda mais necessário para que estudos futuros possam estender os
14 efeitos protetores a protocolos quimioterápicos mais adequados a atuação de L-carnitina.

15

16

CONCLUSÃO

17

18

19

20

21

22

23

24

25

Declaração de conflito de interesse - Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

26

27

REFERÊNCIAS

28

29

30

31

32

33

Abd-Allah A.R., Helal G.K., Al-Yahya A.A., Aleisa A.M., Al-Rejaie S.S. & Al-Bakheet S.A.
2009. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and
survival may be altered by L-carnitine. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(2), 73-81.
<<https://doi.org/10.4161/oxim.2.2.8177>>

- 1 Abd-Elrazek A M. & Ahmed-Farid O.A.H. 2018. Protective effect of L-carnitine and L-
2 arginine against busulfan-induced oligospermia in adult rat. *Andrologia*, 50(1), e12806.
3 <<https://doi.org/10.1111/and.12806>>
4
- 5 Abo-Ghanema I.I., El-Nasharty M.A., El-Far A.H. & Ghonium H.A. 2012. Effect of ginger and
6 L-carnitine on the reproductive performance of male rats. *World Acad Sci Eng Technol*, 64,
7 980-6. <<https://doi.org/10.5281/zenodo.1057985>>
8
- 9 Aboul-Naga A.M., Hamam E.T., Awadalla A. & Shokeir A.A. 2020. The protective role of l-
10 carnitine on spermatogenesis after cisplatin treatment during prepubertal period in rats: A
11 pathophysiological study. *Life Sciences*, 258, 118242.
12 <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118242>>
13
- 14 Akay S., Karasu Z., Akyildiz M., Tokat Y. & Goker E. 2005. Successful treatment of liver
15 transplant-associated Kaposi's sarcoma with long-term vincristine. In *Transplantation*
16 *proceedings*. Elsevier. <<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.03.024>>
17
- 18 Aliabadi E., Mehranjani M.S., Borzoei Z., Talaei-Khozani T., Mirkhani H. & Tabesh H. 2012.
19 Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin
20 quality. *Iranian journal of reproductive medicine*, 10(2), 77. <PMid: 25242977>
21
- 22 Alm-Eldeen A.A., Masoud A.A., Darwesh S.K. & Hassan S.I. 2020. L-Carnitine ameliorates
23 Cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Delta Journal of Science*, 42(1), 125-134.
24 <<https://doi.org/10.21608/djs.2020.149627>>
25
- 26 Almeida V.L.D., Leitão A., Reina L.D.C.B., Montanari C.A., Donnici C.L. & Lopes M. T.P.
27 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos
28 que interagem com o DNA: uma introdução. *Química nova*, 28, 118-129.
29 <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>>
30
- 31 Alshabanah O.A., Hafez M.M., Al-Harbi M.M., Hassan Z.K., Al Rejaie S.S., Asiri Y.A. &
32 Sayed-Ahmed M.M. 2010. Doxorubicin toxicity can be ameliorated during antioxidant L-
33 carnitine supplementation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(6), 428-433.
34 <<https://doi.org/10.4161/oxim.3.6.14416>>

- 1
2 Altun Z., Olgun Y., Ercetin P., Aktas S., Kirkim G., Serbetcioglu B., Olgun N. & Guneri E.A.
3 2014. Protective effect of acetyl-l-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis-
4 related genes and pro-inflammatory cytokines. *Cell proliferation*, 47(1), 72-80.
5 <<https://doi.org/10.1111/cpr.12080>>
6
7 Amendola R., Bartoleschi C., Cordelli E., Mauro F., Uccelli R. & Spanò M. 1989. Effects of
8 L-Acetylcarnitine (LAC) on the Post-Injury Recovery of Mouse Spermatogenesis Monitored
9 by Flow Cytometry 1. Recovery after X-Irradiation/Über den Einfluß von L-Acetylcarnitin
10 (LAC) auf die Wiederherstellung der Mäusespermatogenese mittels Überwachung durch Flow-
11 Cytometrie (nach einer exogenen Schädigung) 1. Wiederherstellung nach Strahlenexposition.
12 *Andrologia*, 21(6), 568-575. <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1989.tb02472.x>>
13
14 Amendola R., Cordelli E., Mauro F. & Spano M. 1991. Effects of L-acetylcarnitine (LAG) on
15 the post-injury recovery of mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. 2. Recovery
16 after hyperthermic treatment. *Andrologia*, 23(2), 135-140. <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1991.tb02516.x>>
17
18
19 Andrieu-Abadie N., Jaffrézou J.P., Hatem S., Laurent G., Levade T. & Mercadier J.J. 1999. L-
20 carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of
21 ceramide generation. *The FASEB Journal*, 13(12), 1501-1510.
22 <<https://doi.org/10.1096/fasebj.13.12.1501>>
23
24 Aouida M., Poulin R. & Ramotar D. 2010. The human carnitine transporter SLC22A16
25 mediates high affinity uptake of the anticancer polyamine analogue bleomycin-A5. *Journal of*
26 *Biological Chemistry*, 285(9), 6275-6284. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046151>>
27
28 Arrigoni-Martelli E. & Caso V. 2001. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls
29 from xenobiotics. *Drugs under experimental and clinical research*, 27(1), 27-49. <PMid:
30 11276827>
31
32 Ayoub M.G., Elshinety R.M., Zahran N.M. & Abd Elmonsef A. 2019. Protective effect of l-
33 carnitine and vitamin e on cyclophosphamide induced toxicity on rat testes. *The Egyptian*
34 *Journal of Anatomy*. <<https://doi.org/10.21608/ejana.2019.13634.1030>>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Cabral R.E.L., Okada F.K., Stumpp T., Vendramini V. & Miraglia S.M. 2014. Carnitine partially protects the rat testis against the late damage produced by doxorubicin administered during pre-puberty. *Andrology*, 2(6), 931-942. <<https://doi.org/10.1111/andr.279>>

Cabral R.E.L., Mendes T.B., Vendramini V. & Miraglia S.M. 2018. Carnitine partially improves oxidative stress, acrosome integrity, and reproductive competence in doxorubicin-treated rats. *Andrology*, 6(1), 236-246. <<https://doi.org/10.1111/andr.12426>>

Cao Y., Wang X., Li S., Wang H., Yu L. & Wang P. 2017. The effects of l-carnitine against cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 120(2), 152-158. <<https://doi.org/10.1111/bcpt.12679>>

Caviglia D., Scarabelli L. & Palmero S. 2004. Effects of carnitines on rat sertoli cell protein metabolism. *Hormone and metabolic research*, 36(04), 221-225. <<https://doi.org/10.1055/s-2004-814451>>

Coşkun N., Hatipoğlu M.T., Özoğul C., Korkmaz C., Akyol S.N., Mıcılı S.C., Arik G.S. & Erdoğan D. 2013. The protective effects of acetyl L-carnitine on testis gonadotoxicity induced by cisplatin in rats. *Balkan medical journal*, 30(2), 235. <<https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2013.7340>> <PMid: 25207106>

Costa M., Canale D., Filicori M., D'Iddio S., Lenzi A. & Italian Study Group on Carnitine and Male Infertility. 1994. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. *Andrologia*, 26(3), 155-159. <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1994.tb00780.x>>

Dehghani F., Hassanpour A., Poost-Pasand A., Noorafshan A. & Karbalay-Doust S. 2013. Protective effects of L-carnitine and homogenized testis tissue on the testis and sperm parameters of busulfan-induced infertile male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(9), 693. <PMid: 24639808>

Di Marzio L., Moretti S., D'Alò S., Zazzeroni F., Marcellini S., Smacchia C., Alesse E., Cifone M.G. & De Simone C. 1999. Acetyl-L-carnitine administration increases insulin-like growth factor 1 levels in asymptomatic HIV-1-infected subjects: correlation with its suppressive effect

- 1 on lymphocyte apoptosis and ceramide generation. *Clinical Immunology*, 92(1), 103-110.
2 <<https://doi.org/10.1006/clim.1999.4727>>
3
- 4 Eid A. 2016. Protective effect of L-carnitine against cisplatin-induced testicular toxicity in
5 rats. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(1), 123-142.
6 <<https://doi.org/10.21608/AJPS.2016.6891>>
7
- 8 Evageliou A. & Matalliotakis G. 2000. Sperm Quality. *Int J Fertil*, 45(3), 236-240.
9 <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1997.00043.x>>
10
- 11 Faro A.M., Daleck C.R., Santana A.E., Nardi A.B., Motta F.R. & Eurides D. 2008. Avaliação
12 hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina,
13 prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. *Ars Veterinaria*, 24(1), 001-008.
14
- 15 Gomes A.L.M., Magalhães J.A., Neves J.P., da Silva L.R.L., de Sousa Gomes R.V., de Oliveira
16 França R.G. & Nogueira T.R. 2020. Efeitos da suplementação de arginina, glutamina e ômega-
17 3 sobre a resposta inflamatória e estado nutricional de pacientes oncológicos. *Research, Society
18 and Development*, 9(5), e193953285-e193953285. <<https://doi.org/10.33448/rsd-v9i5.3285>>
19
- 20 Goumenou A. & Koumantakis E. 2000. L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and
21 infertile men: correlation with sperm quality. *Int J Fertil Womens Med*, 45(236240),
22 106123Nair. <PMid: 10929687>
23
- 24 Hassanpour A., Dehghani F., Poost-pasand A. & Noorafshan A. 2012. P-36: Administration of
25 L-Carnitine and Homogenized Testis Tissue on The Structure of Testis and Sperm Parameter
26 in Busulfan-Treated Rats. *International Journal of Fertility and Sterility*, 6(2).
27
- 28 Hikim A.P.S., Lue Y., Yamamoto C.M., Vera Y., Rodriguez S., Yen P.H., Soeng K., Wang C.
29 & Swerdloff R.S. 2003. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death
30 in the testis. *Endocrinology*, 144(7), 3167-3175. <<https://doi.org/10.1210/en.2003-0175>>
31
- 32 Hu, C., Lancaster, C. S., Zuo, Z., Hu, S., Chen, Z., Rubnitz, J. E., Baker S.D. & Sparreboom A.
33 2012. Inhibition of OCTN2-mediated transport of carnitine by etoposide. *Molecular cancer
34 therapeutics*, 11(4), 921-929. <<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0980>>

- 1
2 Ishii T., Shimpo Y., Matsuoka Y. & Kinoshita K. 2000. Anti-apoptotic effect of acetyl-L-
3 carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons. *The Japanese Journal of*
4 *Pharmacology*, 83(2), 119-124. <<https://doi.org/10.1254/jjp.83.119>>
5
6 Jarow J.P. 2003. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-
7 blind crossover trial. *The Journal of urology*, 170(2 Pt 1), 677. <[https://doi.org/10.1016/S0015-](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04679-4)
8 [0282\(02\)04679-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04679-4)>
9
10 Kmet L.M., Cook L.S. & Lee R.C. 2004. Standard quality assessment criteria for evaluating
11 primary research papers from a variety of fields. <<https://doi.org/10.7939/R37M04F16>>
12
13 Khushboo M., Murthy M.K., Devi M.S., Sanjeev S., Ibrahim K.S., Kumar N.S., Roy V.K. &
14 Gurusubramanian G. 2018. Testicular toxicity and sperm quality following copper exposure in
15 Wistar albino rats: ameliorative potentials of L-carnitine. *Environmental Science and Pollution*
16 *Research*, 25(2), 1837-1862. <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0624-8>>
17
18 Lenzi A., Lombardo F., Sgrò P., Salacone P., Caponecchia L., Dondero F. & Gandini L. 2003.
19 Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover
20 trial. *Fertility and sterility*, 79(2), 292-300. <[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04679-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04679-4)>
21
22 Linschoten M., Teske A.J., Cramer M.J., Van Der Wall E. & Asselbergs F.W. 2018.
23 Chemotherapy-related cardiac dysfunction: a systematic review of genetic variants modulating
24 individual risk. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, 11(1), e001753.
25 <<https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.117.001753>>
26
27 Menchini-Fabris G.F., Canale D., Izzo P.L., Olivieri L. & Bartelloni M. 1984. Free L-carnitine
28 in human semen: its variability in different andrologic pathologies. *Fertility and Sterility*, 42(2),
29 263-267. <[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)48024-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)48024-6)>
30
31 Moncada M.L., Vicari E., Cimino C., Calogero A.E., Mongioi A. & D'Agata R. 1992. Effect of
32 acetylcarnitine treatment in oligoasthenospermic patients. *Acta Europaea Fertilitatis*, 23(5),
33 221-224. <PMid: 1343182>
34

- 1 Moretti S., Famularo G., Marcellini S., Boschini A., Santini G., Trinchieri V., Lucci L., Alesse
2 E. & De Simone C. 2002. L-carnitine reduces lymphocyte apoptosis and oxidant stress in HIV-
3 1-infected subjects treated with zidovudine and didanosine. *Antioxidants and Redox*
4 *Signaling*, 4(3), 391-403. <<https://doi.org/10.1089/15230860260196191>>
5
- 6 Munson, L., & Moresco, A. (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in
7 domestic and wild animals. *Breast disease*, 28(1), 7-21. <[https://doi.org/10.3233/BD-2007-](https://doi.org/10.3233/BD-2007-28102)
8 [28102](https://doi.org/10.3233/BD-2007-28102)>
9
- 10 Mutomba M.C., Yuan H., Konyavko M., Adachi S., Yokoyama C.B., Esser V., McGarry J.D.,
11 Babior B.M. & Gottlieb R.A. 2000. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and
12 palmitoylcarnitine. *FEBS letters*, 478(1-2), 19-25. <[https://doi.org/10.1016/S0014-](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01817-2)
13 [5793\(00\)01817-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01817-2)>
14
- 15 Nabila S.H., Fatma G.M. & Amina G.H. 2003. Light and electron microscopic study on the
16 effect of L-carnitine and B-carotene on the Doxorubicin toxicity in the heart and testes of albino
17 rats.
18
- 19 Okada F.K., Stumpp T. & Miraglia S.M. 2009. Carnitine reduces testicular damage in rats
20 treated with etoposide in the prepubertal phase. *Cell and tissue research*, 337(2), 269-280.
21 <<https://doi.org/10.1007/s00441-009-0801-2>>
22
- 23 Okada F.K., Stumpp T. & Miraglia S.M. 2020. Carnitine diminishes etoposide toxic action on
24 spermatogonial self-renewal and sperm production in adult rats treated in the prepubertal
25 phase. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 68(5), 327-342.
26 <<https://doi.org/10.1369/0022155420916274>>
27
- 28 Page M.J., McKenzie J.E., Bossuyt P.M., Boutron I., Hoffmann T.C., Mulrow C.D., Shamseer
29 L., Tetzlaff J.M., Akl E.A., Brennan S.E., Chou R., Glaville J., Grimshaw J.M., Hróbjartsson
30 A., Lalu M.M., Li T., Loder E.W., Wilson E.M., McDonald S., McGuinness L.A., Stewart L.A.,
31 Thomas J., Tricco A.C., Welch V.A., Whiting P. & Moher D. 2021. The PRISMA 2020
32 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *International Journal of*
33 *Surgery*, 88, 105906. <<https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2021.105906>>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

Revoltella R.P., Dal Canto B., Caracciolo L. & D'Urso C.M. 1994. L-carnitine and some of its analogs delay the onset of apoptotic cell death initiated in murine C2. 8 hepatocytic cells after hepatocyte growth factor deprivation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1224(3), 333-341. <[https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90265-8](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90265-8)>

Salehinezhad F., Eshraghi H., Kadivar A., Shirian S., Asghari A., Aali E. & Davoodian N. 2019. Amelioration effects of vitamin E, melatonin, L-carnitine, and atorvastatin, on destructive effects of busulfan in the testes of male rats: A gene expression evaluation. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. <<https://doi.org/10.9775/kvfd.2019.21726>>

Sallam A.O., Rizk H.A., Emam M.A., Fadl S.E., Abdelhiee E.Y., Khater H., Elkomy. A & Aboubakr, M. 2021. The Ameliorative Effects of L-Carnitine against Cisplatin-Induced Gonadal Toxicity in Rats. *Pakistan Veterinary Journal*, 41(1). <<https://doi.org/10.29261/pakvetj/2020.082>>

Schirmacher V. 2019. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology*, 54(2), 407-419. <<https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>>

Shug A., Paulson D., Subramanian R. & Regitz V. 1991. Protective effects of propionyl-L-carnitine during ischemia and reperfusion. *Cardiovascular drugs and therapy*, 5(1), 77-83. <<https://doi.org/10.1007/BF00128246>>

Solarska K., Lewińska A., Karowicz-Bilińska A. & Bartosz G. 2010. The antioxidant properties of carnitine in vitro. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 15(1), 90-97. <<https://doi.org/10.2478/s11658-009-0036-y>>

Tein I., Bukovac S.W. & Xie Z.W. 1996. Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 329(2), 145-155. <<https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0203>>

- 1 Topcu-Tarladacalisir Y., Kanter M. & Uzal M.C. 2009. Role of L-carnitine in the prevention
2 of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic
3 study. *Archives of toxicology*, 83(8), 735-746. <<https://doi.org/10.1007/s00204-008-0382-y>>
4
- 5 Tremblay A.R. & Delbes G. 2018. In vitro study of doxorubicin-induced oxidative stress in
6 spermatogonia and immature Sertoli cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 348, 32-42.
7 <<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.04.014>>
8
- 9 Vaz F.M. & Wanders R.J. 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical*
10 *Journal*, 361(3), 417-429. <<https://doi.org/10.1042/bj3610417>>
11
- 12 Veloso E.V.L., Sales J.E.De S., Lucena W.K.B., Caldeira M.E.C., Araújo P.P.B., Silva R.C.M.,
13 Machado R.A.S., Sousa O.B.De., Menezes D.J.A. 2022. Cytoprotective effects of L-carnitine
14 on testicular biometry and stereology of albino rats treated with vincristine sulfate in the
15 prepubertal phase. *Research, Society and Development*, [S. 1.], v. 11, n. 3, p. e2011326121.
16 <<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26121>>
17
- 18 Vescovo G., Ravara B., Gobbo V., Sandri M., Angelini A., Della Barbera M., Dona M., Peluso
19 G., Calvani M., Mosconi L. & Dalla Libera L. 2002. L-Carnitine: a potential treatment for
20 blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *American Journal*
21 *of Physiology-Cell Physiology*, 283(3), C802-C810.
22 <<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00046.2002>>
23
- 24 Vicari E., La Vignera S. & Calogero A.E. 2002. Antioxidant treatment with carnitines is
25 effective in infertile patients with prostatovesiculopididymitis and elevated seminal leukocyte
26 concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertility and*
27 *Sterility*, 78(6), 1203-1208. <[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04350-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04350-9)>
28
- 29 Vitali G., Parente R. & Melotti C. 1995. Carnitine supplementation in human idiopathic
30 asthenospermia: clinical results. *Drugs under experimental and Clinical Research*, 21(4), 157-
31 159. <PMid: 8529529>
32
- 33 Wagner A.D., Grothe W., Haerting J., Kleber G., Grothey A. & Fleig W.E. 2006.
34 Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on

1 aggregate data. Journal of clinical oncology, 24(18), 2903-2909.
 2 <<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.0245>> <PMid: 16782930>

3

4 Yaman O. & Topcu-Tarlacalisir Y. 2018. L-carnitine counteracts prepubertal exposure to
 5 cisplatin induced impaired sperm in adult rats by preventing germ cell apoptosis. Biotechnic &
 6 Histochemistry, 93(3), 157-167. <<https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1401661>>

7

8 Zhu, B., Zheng, Y. F., Zhang, Y. Y., Cao, Y. S., Zhang, L., Li, X. G., Liu t., Jiao Z.Z., Wang
 9 Q. & Zhao Z.G. 2015. Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell
 10 apoptosis. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 16(9), 780-787.
 11 <<https://doi.org/10.1631/jzus.B1500015>>

12

13

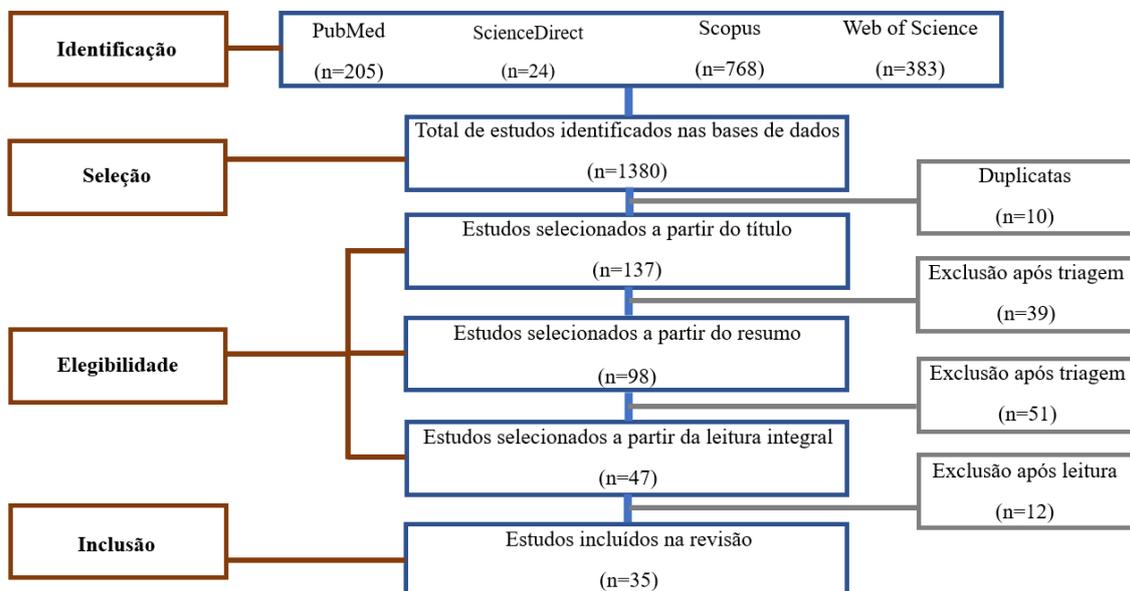
14

15

Figure Legends

16

17 Fig.1. Fluxograma da busca, seleção e inclusão dos estudos no processo de revisão sistemática.
 18 Patos/PB, 2022.



19

20

21

Table Titles

22

- 1 Table 1. Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática de acordo o primeiro autor e ano de publicação.
- 2 Primeiro autor e anos de publicação (PAP), desenho do estudo (DE) transversal (T) ou longitudinal (L), N amostral (NA), cronograma de avaliação
- 3 (CDA), medida avaliativa (MA), resultados (R) e pontuação de resumo de qualidade (PRQ).

PAP	DE	NA	CDA	MA	R	PRQ
Abd-Allah, 2009	T	60 ratos albinos suíços machos	Dose única de L-carnitina em animais com 200-250g, avaliação em fase aguda de tratamento.	Histopatológico. Bioquímica. A motilidade e a contagem de espermatozoides. O estresse oxidativo foi avaliado medindo teor glutathione reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e 8-hidroxidesoxiguanosina (8-HDG) no DNA. Óxido nítrico (NO) a atividade de lactato desidrogenase (LDHx). O nível de interleucina (IL) -2	L-carnitina melhora parâmetros testiculares por mecanismos antioxidantes e / ou antiinflamatórios, sugerindo um papel protetor contra a infertilidade masculina	B
Abd-Elrazek, 2018	T	20 ratos adultos machos Sprague Dawley	Dose única de L-carnitina em ratos com 180g. Avaliação após 28 dias.	Contagem, motilidade e velocidade de espermatozoides. Morfologia dos espermatozoides. Metabólitos de DNA, estresse oxidativo e parâmetros de energia celular	Melhora significativa na morfologia, motilidade, velocidade e contagem dos espermatozoides nos grupos tratados com L-arginina e L-carnitina.	A
Abo-Ghanea 2012	T	60 ratos albinos machos adultos	Dose única de L-carnitina em ratos com 85g. Avaliação após um mês do início do tratamento.	Contagem, motilidade e viabilidade de espermatozoides. Redução da glutathione, catalase, superóxido dismutase e capacidade antioxidante total. Níveis de testosterona, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)	Efeitos positivos foram observados no grupo que recebeu a combinação de gengibre e L-carnitina. A administração combinada de gengibre e L-carnitina pode ser benéfico para o desempenho sexual masculino.	A
Abou I-Naga, 2020	L	96 ratos pré-púberes machos Sprague Dawley com	Dose única de L-carnitina com 8 semanas de vida (agudo), avaliação aos	Análises bioquímicas, moleculares e histopatológicas. Avaliação da motilidade, viabilidade, morfologia e fragmentação do DNA dos espermatozoides	L-Carnitina melhora a espermatogênese melhora a atividade antioxidante, a atividade hormonal, a qualidade do esperma e a integridade do DNA	B

		trinta dias de idade	37, 60 e 90 dias de idade			
Aliabadi, 2012	T	30 camundongos machos	Dose única de L-carnitina em 0,2 ml de esperma. Avaliação aos 30, 90 e 180 min após a incubação	Motilidade espermática e a qualidade da cromatina dos espermatozoides	L-carnitina e Acetil L-carnitina aumentaram a motilidade espermática e qualidade da cromatina dos espermatozoides	B
Alm-Eldeen, 2020	T	18 ratos albinos Wistar machos	14 doses consecutivas de L-carnitina, uma vez ao dia começando um dia após aplicação de cisplatina	Histopatológico e análise morfométrica. Níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH).	Comprometimento da espermatogênese induzido pela cisplatina, diminuição no peso dos testículos, do número de espermatozoides, aumento de MDA e diminuição de GSH. Degeneração, necrose, parada da espermatogênese, congestão e diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos. Os ratos que receberam cisplatina e L-carnitina não diferiram significativamente em relação ao peso dos testículos em comparação com o controle e restauraram o nível de MDA e GSH.	A
Alshabana, 2010	T	60 ratos albinos Wistar machos adultos	Dez doses consecutivas de L-carnitina uma vez ao dia. Avaliação 24 após o término do tratamento	Alanina transaminase, fosfatase alcalina, bilirrubina total, ácido tiobarbitúrico (TBARs), nitrato / nitrito total (NOx), glutathiona (GSH), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSHP x), glutathiona-s-transferase (GST), glutathiona redutase (GR) e atividade da catalase (CAT)	L-carnitina reverteu completamente alterações bioquímicas e de expressão gênica induzidas pela doxorubicina	B
Altun, 2014	T	Linha celular House Ear	Dose única de L-carnitina em cultura de	Avaliação de genes apoptóticos com matriz de PCR para apoptose e os	Morte celular apoptótica foi reduzida em 22% com com acetil- 1 -carnitina-	B

		Institute-Organ of Corti 1	células <i>in vitro</i> . Avaliação em fase aguda.	níveis de citocinas pró-inflamatórias medidas por ELISA.	cisplatina em comparação com a cisplatina isolada.	
Amen dola, 1989	L	24 camundongos machos adultos.	Dose única de L-carnitina em camundongos de 8 semanas. Avaliação aos 28,35, 40,45, 50, 55 e 60 dias após tratamento	Análise de citometria de fluxo do conteúdo de DNA celular	L-carnitina promoveu recuperação mais rápida do epitélio germinativo, desde tetraploides até espermátides redondas e alongadas. L-carnitina contribui para a recuperação das espermatogônias	C
Amen dola, 1991	L	24 camundongos machos adultos.	Dose única de L-carnitina em camundongos de 8 semanas. Avaliação aos 8, 14, 21, 28, 35, 40, 45 e 60 dias após o tratamento	Citometria de fluxo. Frequências relativas dos tipos de células testiculares. Histopatológico	L-carnitina promoveu recuperação mais rápida da espermatogênese normal	C
Aouida, 2010	T	Cultura de células NT2 / D1 <i>in vitro</i> .	Dose única de L-carnitina em cultivo celular <i>in vitro</i> . Avaliação em fase aguda	Western Blotting. Análise RT-PCR. Captação de F-BLM e microscopia de fluorescência	L-carnitina protegeu as células NT2 / D1 dos efeitos letais da bleomicina-A5	B
Ayoub, 2019	T	30 ratos machos adultos	Avaliação duas semanas após tratamento	Peso e dimensões testiculares. Histopatológico. Número de espermatozoides	L-carnitina e vitamina E podem ser usados como agentes protetores contra toxicidade reprodutiva induzida por ciclofosfamida	C
Cabr al, 2014	L	48 ratos machos de 30 dias de vida	Dose única de L-carnitina aos 30 dias de vida. Avaliação aos 64 e cem dias de vida	Densidade numérica de células germinativas apoptóticas (método TUNEL). Contagem de espermátides maduras (19 estágios) e produção diária de espermatozoides por testículo; número de espermatozoides e tempo de trânsito através do caput /	parâmetros testiculares e espermáticos em ambas as idades melhoraram em ratos tratados com L-carnitina antes da doxorubicina. L-carnitina reduziu os danos testiculares e espermáticos tardios	A

				corpus epididimal e cauda; frequência de espermatozoides morfologicamente anormais (do líquido epididimal), integridade do DNA do esperma (ensaio Cometa).		
Cabral, 2018	L	48 ratos Wistar machos adultos	Dose única de L-carnitina aos 30 dias de vida (agudo), avaliação aos 100 dias	Avaliação da motilidade dos espermatozoides, da integridade acrossômica, atividade mitocondrial, análise da estrutura da cromatina espermática (SCSA) e avaliação do estresse oxidativo e da competência reprodutiva	L-carnitina atenuou as alterações de longo prazo causadas pela doxorrubicina nas células germinativas e melhorou a capacidade reprodutiva dos machos na fase adulta.	A
Cao, 2017	T	60 Camundongos machos adultos	Cinco doses consecutivas de L-carnitina uma vez ao dia. Avaliação após 24 horas de tratamento	Análise de espermatozoides e imunohistoquímica, RT-PCR e Western blot para as avaliações de occludina, fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e TGF- β 3 mRNA e expressão de proteínas.	L-carnitina promove conservação de expressões de occludina e GDNF, TGF- β 3. Protege as células de Sertoli do testículo dos danos causados pelo CTX e promove a espermatogênese	A
Coskun, 2013	T	24 ratos albinos Wistar machos	Dose única de L-carnitina em ratos machos adultos. Avaliação após 72 horas de tratamento	Diâmetro do túbulo seminífero e a espessura da parede. Método terminal de desoxinucleotidil transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL). Análise de sêmen. Imunohistoquímica.	Perda de peso, degeneração dos túbulos seminíferos na região periférica, separação de células espermatogênicas da parede tubular, detritos celulares no lúmen e edema intersticial central. Morfologia do esperma anormal. O diâmetro tubular e a espessura da parede diminuíram, e o número de células positivas para TUNEL e caspase ativa aumentou. Os achados histológicos no estudo com L-carnitina foram melhores do que aqueles apenas com quimioterápico	A

Dehghani, 2013	T	20 ratos machos adultos	Dose única de L-carnitina em ratos machos adultos. Avaliação 48 dias após o tratamento	Volume e diâmetro dos testículos, túbulos seminíferos e tecido intersticial, comprimento dos flagelos, altura do epitélio germinativo e número de células espermatogênicas. A análise do sêmen.	L-carnitina e THT diminui os efeitos colaterais do bussulfan no sistema reprodutor masculino. No entanto, em nosso estudo, o THT é mais eficaz do que a L-carnitina e leva à recuperação da estrutura do testículo e dos parâmetros do espermatozoide	B
Eid, 2016	T	40 ratos Sprague-Dawley machos adultos	15 doses consecutivas de L-carnitina uma vez ao dia. Avaliação 24 horas após o término do tratamento	Peso dos órgãos reprodutivos, a contagem de espermatozoides, a motilidade espermática e o nível de testosterona sérica. Histopatológico	L-carnitina atenuou a lesão induzida por cisplatina por supressão de estresse oxidativo / Nitrosativo e inflamação, alteração das defesas antioxidantes, bem como melhora da esteroidogênese, espermatogênese e características histológicas testiculares.	A
Evageliou, 2000	T	101 homens tiveram o sêmen obtido por masturbação	Análise da presença de L-carnitina. Avaliação em fase aguda.	Espermiograma e quantidade de L-carnitina no plasma seminal	A determinação dos valores de L-carnitina seminal pode fornecer ao médico um meio adicional de avaliar a infertilidade masculina.	C
Hassanpour, 2012	T	20 ratos machos adultos	Dose única de L-carnitina em ratos machos adultos. Avaliação 48 dias após o tratamento	Volumes dos testículos, túbulos seminíferos e tecido intersticial, o comprimento e diâmetro dos túbulos seminíferos, a altura do epitélio germinativo, comprimento dos flagelos e o número total de algumas linhagens celulares espermatogênicas	L-carnitina e tecido testicular homogeneizado com busulfan diminui alguns efeitos colaterais dessa droga. No entanto, o tecido testicular homogeneizado é mais eficaz do que a L-carnitina	C
Hu, 2012	T	Cultura de células transfectadas semeadas 48	Dose única de L-carnitina sobre cultura de células <i>in vitro</i> .	Excreção de L-carnitina e acetilcarnitina foi medida na urina coletada de camundongos e pacientes	Etoposídeo pode inibir a função do hOCTN2, perturbar a homeostase da L-carnitina e contribuir para as toxicidades do tratamento	B

		horas antes de cada experimento	Avaliação em fase aguda	pediátricos com câncer antes e após a administração de etoposídeo.		
Khus hboo, 2018	T	70 ratos albinos Wistar machos adultos (3 meses de idade)	Dose única de L-carnitina e de sulfato de cobre (agudo), avaliação após 2 semanas	Pesos de corpos e órgãos, consumo de comida e água, ensaios de danos aos tecidos do fígado e rim, avaliação de testículo e esperma epididimário, histologia do testículo, pontuação de dano e histomorfometria, imunohistoquímica,	L-carnitina em doses de 50 e 100 mg / kg protege o testículo contra o dano induzido por cobre	A
Lenzi, 2003	T	86 homens inférteis, com idade entre 40 e 60 anos.	2 g/dia de L-carnitina durante 2 meses. Avaliação em fase aguda	Análise microscópica e computadorizada do sêmen, concentração seminal de L-carnitina, concentração de alfa-glicosidase seminal, potencial de peroxidação lipídica espermática.	L-carnitina foi eficaz em aumentar a qualidade do sêmen.	A
Moncada, 1992	T	20 homens com oligoastenopermia	4 g/dia de acetilcarnitina durante 60 dias. Avaliação após o término do tratamento	Densidade espermática e motilidade total de espermatozoides	Cinco prenhez ocorreram durante o tratamento e apenas 2 durante os 4 meses de acompanhamento após a descontinuação da terapia.	C
Nabila, 2003	T	Ratos machos albino com peso entre 150 a 180 g	Doxorrubicina 2 mg/kg 2x na semana por 2 semanas e como dose única de 15 mg/kg, 200 mg/kg de L-carnitina e 30 mg/kg caroteno durante duas semanas. Avaliação um dia após o término do tratamento	Os danos testiculares e cardíacos foram determinados histologicamente e histoquimicamente por microscópios de luz e eletrônicos de transmissão	Diminuição relativa nas reações de DNA, proteína e PAS, nos miócitos cardíacos e nas células espermatogênicas e intersticiais de ratos tratados com Doxorrubicina. Alterações tornaram-se menos graves nos grupos com L-carnitina, sugerindo L-carnitina e B-Caroteno como protetores desses tipos celulares	C
Okada, 2009	L	120 ratos Wistar machos com	250 mg/kg de L-carnitina, 40 mg/kg etoposídeo	Análises histopatológicas e histomorfométricas, sendo esta última através da medição do diâmetro do	L-carnitina	A

		25 dias de vida	(5mg/kg/dia), 250 mg/kg de L-carnitina mais 40 mg/kg etoposido (5 mg/kg/dia) durante 8 dias. Avaliação aos 32, 64 e 95 dias após o tratamento.	túbulo seminífero e a altura do epitélio seminífero por meio de microscópio binocular	protege parcialmente o testículo contra danos causados pelo etoposídeo, embora o mecanismo seja desconhecido.	
Okada, 2020	L	100 ratos Wistar machos com 25 dias de idade	2 g/kg de L-carnitina, 40 mg/kg de etoposídeo (5 mg/kg/dia), 2 g/kg de L-carnitina mais 40 mg/kg de etoposido (5 mg/kg/dia) durante 8 dias. Avaliação aos 32, 64 e 95 dias após o tratamento.	Volume testicular e volume total do epitélio seminífero com imunomarcção das proteínas UTF1, SOX2 e PLZF. Medição de parâmetros espermáticos e DNA dos espermatozoides.	L-carnitina melhora a auto-renovação das espermatogônias indiferenciadas e promove uma proteção parcial sobre elas, aliviando os efeitos tardios prejudiciais do etoposídeo e levando a um aumento dos parâmetros dos espermatozoides.	A
Saleh inezhad, 2019	T	30 ratos albinos machos	24 h após o tratamento com busulfan, administrações intraperitoneais diárias por 6 semanas de diversos citoprotetores. Avaliação em fase aguda	Avaliações moleculares	Antioxidantes usados em diferentes combinações não tiveram efeitos de melhoria na espermatogênese em ratos machos tratados com busulfan, embora houve efeitos positivos de alguns antioxidantes na redução da apoptose.	C
Sallam, 2021	T	28 ratos machos	100 mg/kg/dia por 30 dias de L-carnitina mais solução salina via oral, dose única de cisplatina com 7,5 mg/kg intraperitoneal, dose de L-carnitina e cisplatine.	Medições bioquímicas, imagens histológicas e medições imunohistoquímicas	L-carnitina ameniza estresse oxidativo induzido por Cisplatina em ratos.	B

			Avaliação em fase aguda			
Topcu-Tarladacalisir, 2009	L	42 ratos Wistar albinos machos	200 mg/kg de L-carnitina começando 1 dia antes do tratamento e 21 dias após (3 vezes por semana). Avaliação 21, 44 e 70 dias após tratamento	Análise microscópicas dos testículos	L-carnitina é eficaz na proteção contra danos testiculares de ratos, melhora a qualidade de vida do paciente após a terapia	C
Tremblay, 2018	T	Linha celular GC-6SpG e linha celular Ser-W3 em meio de cultura de Eagle modificado (<i>In vitro</i>)	Administração antioxidante 24 h antes e durante o tratamento. Avaliação 3 horas e 6 horas após tratamento (agudo)	Culturas de células, medição de ROS e GSH intracelular, imunofluorescência para 8-oxodeoxyguanosine (8-oxoDG)	L-carnitina reduz estresse oxidativo induzido por doxorubicina	D
Vellos, 2022	L	90 ratos Wistar machos	Dose única de L-carnitina. Avaliação aos 35, 49 e 112 dias após a aplicação	Variáveis biométricas, estereológicas e histológicas	L-carnitina previne a redução do peso e volume testicular, volume das células de Sertoli e volume dos túbulos seminíferos de ratos tratados com quimioterápico	B
Vicari, 2002	L	98 homens com prostatovesiculopididimit e (PVE) e com média de idade de 31 anos	L-carnitina ou antiinflamatórios não esteroidais por 4 meses, antiinflamatórios não esteroidais por 2 meses, seguido de tratamento por L-carnitina por 2 meses, ou tratamento antiinflamatório não	Variáveis de sêmen, produção de espécies reativas de oxigênio e resultados de gravidez foram avaliados antes e após o tratamento e após um período de eliminação de 3 meses	L-carnitina é eficaz em pacientes com PVE abacteriano e concentrações aumentadas de leucócitos seminais, se esses pacientes foram pré-tratados com antiinflamatórios não esteroides	A

			esteroidal administrado concomitantemente por 4 meses. Avaliação após 3 meses de tratamento			
Yama n, 2018	L	44 Ratos Wistar machos	Injeção dose única de L-carnitina uma hora antes da administração da cisplatina e durante os 3 dias seguintes. Eutanásia aos 31 ou 90 dias de vida	Avaliação da morfologia, motilidade, quantidade e vitalidade dos espermatozoides no epidídimo	Melhora na contagem de espermatozoides epididimários e a viabilidade em ratos tratados com L-carnitina e cisplatina. L-carnitina pode reduzir o dano espermático testicular tardio causado pela cisplatina, além de induzir a proliferação de células germinativas em ratos pré-púberes e prevenir a apoptose.	A
Zhu, 2015	T	24 ratos Wistar machos, com 180-200 g de peso e seis semanas de idade	Ciclofosfamida (CP) na dose de 35 mg/kg por um período de 5 dias, por injeção intraperitoneal. O grupo CP mais L-carnitina recebeu a dose de 2,1 ml/kg/dia via oral de solução de L-carnitina. Avaliação cinquenta dias após o tratamento	Avaliação da mobilidade e viabilidade dos espermatozoides, utilização de ELISA para a medição dos níveis plasmáticos de testosterona, extração de RNA e PCR, análise de Western Blot, imunohistoquímica para LC3 e Beclin-1, marcação terminal de desoxinucleotidil transferase dUTP nick and TUNEL	Redução da autofagia em células germinativas, L- carnitina influencia positivamente na infertilidade masculina.	A

1 **Efeitos citoprotetores de L-carnitine sobre a biometria e estereologia testicular de ratos**
2 **albinos, tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere**

3
4 **Cytoprotective effects of L-carnitine on testicular biometry and stereology of albino rats**
5 **treated with vincristine sulfate in the prepubertal stage**

6
7 **Efectos citoprotectores de la L-carnitina en la biometria y estereología testicular de**
8 **ratas albinas tratadas con sulfato de vincristina en la fase prepuberal**

9
10 **Resumo**

11
12 Esta pesquisa avaliou os efeitos citoprotetores de L-carnitine sobre os testículos de ratos albinos
13 tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere. Foram utilizados 90 animais, sendo 30
14 animais controles, 30 tratados com sulfato de vincristine e 30 animais tratados com L-carnitine
15 e sulfato de vincristine. As aplicações das drogas ocorreram aos 15 dias de vida, e a eutanásia
16 aos 40, 64 e 127 dias de vida, possibilitando a análise da gônada em diferentes fases de
17 desenvolvimento. Foram realizadas medidas biométricas (peso corpóreo, peso testicular
18 absoluto, peso testicular relativo, volume testicular, eixos testiculares maior e menor) e medidas
19 estereológicas (densidade de comprimento, densidades de volume dos túbulos seminíferos e do
20 tecido intersticial). Os resultados demonstraram que o uso preventivo da L-carnitine pode
21 reduzir os efeitos deletérios testiculares provocados pelo sulfato de vincristine, uma vez que
22 variáveis como peso testicular absoluto, peso testicular relativo e eixo menor testicular
23 apontaram mitigação dos danos decorrentes da ação do antineoplásico, principalmente em fase
24 aguda e subaguda.

25
26 **Palavras-chave:** L-carnitine, sulfato de vincristine, testículo.

27
28 **Abstract**

29
30 This research evaluated the cytoprotective effects of L-carnitine on the testes of albino rats
31 treated with vincristine sulfate in the prepubertal phase. Ninety animals were used, being 30
32 control animals, 30 treated with vincristine sulfate and 30 animals treated with L-carnitine and
33 vincristine sulfate. Drug applications occurred at 15 days of life, and euthanasia at 40, 64 and
34 127 days of life, enabling the analysis of the gonads at different stages of development.

1 Biometric measurements (body weight, absolute testicular weight, relative testicular weight,
2 testicular volume, major and minor testicular axes) and stereological measurements (length
3 density, seminiferous tubule and interstitial tissue volume densities) were performed. The
4 results showed that the preventive use of L-carnitine can reduce the harmful testicular effects
5 caused by vincristine sulfate, since variables such as absolute testicular weight, relative
6 testicular weight and testicular minor axis pointed to mitigation of damage resulting from the
7 action of the antineoplastic agent, mainly in acute and subacute phase.

8
9 Keywords: L-carnitine, vincristine sulfate, testis.

11 **Resumen**

12
13 Esta investigación evaluó los efectos citoprotectores de la L-carnitina en los testículos de ratas
14 albinas tratadas con sulfato de vincristina en la fase prepuberal. Se utilizaron noventa animales,
15 siendo 30 animales control, 30 tratados con sulfato de vincristina y 30 animales tratados con L-
16 carnitina y sulfato de vincristina. Las aplicaciones de los fármacos ocurrieron a los 15 días de
17 vida y la eutanasia a los 40, 64 y 127 días de vida, lo que permitió el análisis de las gónadas en
18 diferentes etapas de desarrollo. Se realizaron medidas biométricas (peso corporal, peso
19 testicular absoluto, peso testicular relativo, volumen testicular, ejes testiculares mayor y menor)
20 y medidas estereológicas (densidad de longitud, túbulo seminífero y densidades de volumen de
21 tejido intersticial). Los resultados mostraron que el uso preventivo de L-carnitina puede reducir
22 los efectos nocivos testiculares provocados por el sulfato de vincristina, ya que variables como
23 el peso testicular absoluto, el peso testicular relativo y el eje menor testicular apuntaban a
24 mitigar el daño resultante de la acción del antineoplásico, principalmente en fase aguda y
25 subaguda.

26
27 Palabras clave: L-carnitina, sulfato de vincristina, testículo.

29 **1. Introdução**

30
31 O sulfato de vincristine é um quimioterápico largamente utilizado na medicina humana,
32 sendo eficaz contra vários tipos de neoplasias de pacientes pediátricos, jovens e adultos. Na
33 Medicina Veterinária o sulfato de vincristine é a droga de eleição no tratamento de Tumor
34 Venéreo Transmissível em cães e integra vários protocolos quimioterápicos contra leucemias e

1 linfomas, entretanto a não seletividade por células neoplásicas faz com que tecidos e células
2 normais em processo de replicação sejam afetados pelo fármaco, sendo este um fator limitante
3 à terapêutica (Borges et al., 2021; Groth et al., 2021; Jark et al., 2020; Lima et al., 2021; Morais
4 et al., 2021; Miranda et al., 2021; Oliveira et al., 2021). Vários estudos já descreveram efeitos
5 deletérios de sulfato de vincristine sobre os testículos (Daleck et al., 1995; Delbès et al., 2010;
6 Diniz et al., 1999; Hodel, Ettlin & Zschauer, 1984; Martins et al., 2011; Vaisheva et al., 2007).

7 L-carnitine é um derivado do aminoácido lisina encontrado em mitocôndrias
8 contribuindo com o processo de oxidação lipídica (Gomes et al., 2020). L-carnitine tem sido
9 apontado como uma substância com potencial citoprotetor para tecidos expostos a drogas
10 quimioterápicas. Minimizar ou neutralizar os efeitos danosos dos quimioterápicos sobre os
11 tecidos normais é crucial para pacientes jovens que pretendem se reproduzir e ainda não podem
12 conservar os gametas devido a imaturidade sexual (Okada, Stumpp & Miraglia, 2009;
13 Salehinezhad et al., 2019; Zarbakhsh et al., 2019; Zhu et al., 2015).

14 Esta pesquisa objetiva avaliar a capacidade citoprotetora de L-carnitine sobre testículos
15 de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere, e eutanasiados nas fases
16 pré-púbere, púbere e adulta.

17

18 **2. Metodologia**

19

20 A pesquisa foi executada na Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV) do
21 Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande
22 (UFCG). O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da
23 mesma Instituição, sob o protocolo CEUA/CSTR N° 099/2018.

24

25 **2.1 Obtenção dos animais**

26

27 Noventa (90) ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) oriundos do
28 acasalamento de matrizes do biotério do CSTR/UFCG, e tratados com sulfato de vincristine,
29 foram utilizados para avaliar os efeitos citoprotetores de L-carnitine. Os acasalamentos
30 ocorreram no período noturno e no dia seguinte foram realizados esfregaços vaginais para
31 averiguar a presença de espermatozoides, atestando assim a cobertura. Este dia foi considerado
32 dia 0 de gestação.

33 Os animais foram desmamados aos 21 dias e mantidos em gaiolas de 06 (seis) animais
34 cada, sob maravalha, e monitorados quanto à higiene e saúde. As condições de criação foram

1 padronizadas e mantidas durante todo o experimento, com regime diário de 12 horas luz
2 (circadiano), sob temperatura controlada, e sendo alimentados com ração comercial e água ad
3 libitum.

4 5 **2.2 Formação dos grupos experimentais e controles**

6
7 Após o desmame os animais foram distribuídos em três grupos principais: Grupo C (GC)
8 (controle) de 30 animais, Grupo V (GV) (tratados com sulfato de vincristine) de 30 animais e
9 Grupo CV (GCV) (tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine) de 30 animais.

10 O grupo GC recebeu solução salina por via intraperitoneal na mesma dose empregada
11 no grupo GV e GCV aos 15 dias de idade. Com isso objetivou-se simular as condições de
12 manipulação dos grupos tratados, efetuando-se os mesmos procedimentos em todos os grupos.
13 Os animais do grupo GV receberam 0,05 mg/kg de peso vivo de sulfato de vincristine em dose
14 única por via intraperitoneal aos 15 dias idade (Hodel, Ettlin & Zschauer, 1984). O grupo GCV
15 recebeu 250mg/kg de peso vivo de L-carnitine “inner salt” **SIGMA®** em dose única por via
16 intraperitoneal aos 15 dias de idade, em processo semelhante ao descrito por outros autores
17 (Okada, Stumpp & Miraglia, 2009), após uma hora mantidos sob observação, esses animais
18 receberam a mesma dose de sulfato de vincristine empregada no grupo GV. O dia de
19 administração da droga foi escolhido com base no desenvolvimento das células de Sertoli e da
20 barreira hematotesticular, visto que até 18º dia de vida essas células ainda não estão
21 completamente maduras e a barreira hematotesticular ainda está em formação (Clegg, 1960;
22 Zarbakhsh et al., 2019).

23 Os grupos GC, GV e GCV foram divididos em três subgrupos de dez animais cada, de
24 acordo com as idades em que foram eutanasiados: 40 dias de vida (subgrupos GC40, GV40 e
25 GCV40); 64 dias de vida (subgrupos GC64, GV64 e GCV64) e 127 dias de vida (subgrupos
26 GC127, GV127 e GCV127). Os grupos experimentais de mesma idade foram comparados entre
27 si. As idades foram escolhidas com base nas fases de desenvolvimento do aparelho reprodutor
28 masculino da espécie (Clegg, 1960), onde os ratos de 40 dias são considerados pré-pubere, com
29 64 dias são púberes, mas não são sexualmente maduros, e com 127 dias são sexualmente
30 maduros. Nas idades especificadas os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico (89
31 mg/kg de peso corpóreo) (Brilhante et al., 2012) e efetuada a eutanásia seguida de remoção de
32 ambos os testículos para posterior avaliação estereológica.

33 34 **2.3 Coleta e processamento das amostras**

1
2 Nas idades especificadas, os ratos foram pesados e submetidos à eutanásia. Os testículos
3 foram removidos e pré-fixados por imersão em Bouin. Após 30 minutos foram seccionados e
4 as secções retornaram à solução de Bouin, permanecendo por 24 horas. Após a fixação as
5 amostras foram lavadas e conservadas em álcool 70%, depois foram cortadas, desidratadas em
6 álcool em concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Michalany,
7 1960). Foram obtidas secções de 5µm de cada testículo (direito/esquerdo) por meio do
8 micrótomo manual **LEICA RM2125 RT** e navalhas descartáveis **Easy Path DURAEDGE**. As
9 amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), possibilitando a realização da
10 avaliação estereológica e do parênquima testicular.

11 12 **2.4 Biometria e estereologia**

13
14 A biometria incluiu o peso corpóreo no momento da eutanásia. Também foi aferido o
15 peso dos testículos, após a remoção, em balança semi analítica de precisão **BG 1000**
16 **GEHAKA®**, o peso testicular relativo foi calculado segundo a fórmula (peso testicular/100g
17 de peso vivo) (Brilhante, Stumpp & Miraglia, 2011). Os eixos maiores e menores foram
18 mensurados com auxílio de um paquímetro **MITUTOYO**. O volume testicular foi aferido pelo
19 método de Scherle (Mandarin-de-Lacerda, 1995; Scherle, 1970). O volume testicular total foi
20 obtido a partir da seguinte fórmula:

$$21 \qquad \qquad \qquad \text{VOLUME} = \text{Densidade} \times \text{Massa}$$

22
23
24 A média do volume testicular total de cada grupo foi obtida por meio do cálculo das
25 médias ponderadas dos volumes dos dois testículos de cada animal dos seus respectivos grupos
26 controles e experimentais.

27 A análise estereológica foi realizada em cortes dos testículos esquerdos e direito, as
28 secções foram submetidas à análise da densidade de volume (V_v) tubular e do tecido intersticial
29 testicular. As variáveis estereológicas de densidade de volume (V_v) foram obtidas por meio da
30 contagem dos pontos por alocação sistemática e aleatória das imagens obtidas através do
31 software **IMAGE-PRO EXPRESS 6.0** em computador acoplado em microscópio binocular de
32 luz **OLYMPUS BX40** no aumento de 20x e posteriormente empregada no software **IMAGEJ**
33 para a contagem dos pontos totalizando 840 pontos por testículo para a densidade de volume

1 dos tecidos e 3190 pontos para densidade de volume das células de Sertoli e espermatogônias
2 (Mandarim-de-Lacerda, 1995; Gundersen et al., 1988).

3 A densidade de volume dos tecidos intersticiais e dos túbulos seminíferos em mm^3 foi
4 calculada a partir do percentual obtido na densidade de volume (V_v) de cada tecido, a densidade
5 de volume das células de Sertoli e espermatogônias também foi aferida por meio da mesma
6 metodologia (Miraglia & Hayashi, 1993). Os volumes tubulares e intersticiais médios por
7 animal também foram obtidos através do cálculo com os dados obtidos para o volume total dos
8 testículos direito e esquerdo.

9 A densidade de comprimento dos túbulos seminíferos (L_v) foi obtida utilizando a fórmula
10 $L_v=2Qa$, sendo Qa a somatória das secções tubulares existentes na área teste gravada em escala
11 de 1mm e intervalos do sistema métrico de $10\mu m$. Desta forma $Qa=\sum perfis/At$ (Gundersen et
12 al., 1988).

13 14 **2.5 Análise estatística**

15
16 Os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico ANOVA de Kruskal-Wallis, que
17 se aplica a comparações pareadas entre grupos tratados e seus respectivos controles. Os
18 resultados foram considerados significantes quando $p\leq 0,05$. A análise estatística foi realizada
19 com o auxílio do software **Bioestat 5.0**.

20 Os resultados das variáveis avaliadas foram obtidos mediante o cálculo da média
21 ponderada dos dados individuais de cada testículo (direito e esquerdo), de cada animal e por
22 conseguinte, de cada grupo (40, 64 e 127 dias). Os resultados foram dispostos em tabelas
23 contendo três grupos tratados com sulfato de vincristine (GV), três grupos tratados com L-
24 carnitine e sulfato de vincristine (GCV), e seus respectivos controles (GC). A pesquisa abrangeu
25 avaliações de caráter biométrico e estereológico.

26 27 **3. Resultados**

28
29 Os pesos corpóreos (Tabela 1) dos animais do grupo GCV127 não diferiram
30 estatisticamente ($p>0,05$) quando comparado ao grupo controle GC127 e ao grupo tratado
31 GV127. Nos grupos GC64, GV64 e GCV64 também não foram observadas diferenças ($p>0,05$).
32 Porém, o grupo GC40 diferiu dos grupos GV40 e GCV40. Quando comparados os grupos GC40
33 e GV40 $p=0,0023$; quando comparados os grupos GC40 e GCV40 resultado foi $p=0,0096$.

1 **Tabela 1:** Peso corpóreo (PC), peso testicular absoluto (PTA), peso testicular relativo (PTR),
 2 volume testicular total (VTT), eixo testicular maior (ETMA) e eixo testicular menor (ETME)
 3 em grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados
 4 com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC40, GV40,
 5 GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127, GV127 e GCV127).

	GRUPOS					
	PC (g)	PTA (g)	PTR (%)	VTT (mm ³)	ETMA (mm)	ETME (mm)
GC127	308,7a±27,2	1,8a*±0,06	0,59a*±0,04	1657,16a*±88,6	17,02a*±0,3	7,73a*±0,4
GV127	283,0a±39,8	0,9b*±0,18	0,34b*±0,05	1081,11b*±323	12,55b*±1,1	5,46b*±0,6
GCV127	277,4a±40,3	1,2b*±0,2	0,44b*±0,08	1172,17b*±197	13,17b*±2,5	6,52b±0,9
GC64	228,2a±17	1,6a*±0,04	0,71a*±0,05	1450,12a±131	16,88a*±0,4	6,79a*±0,3
GV64	225,0a±23,2	1,2b*±0,06	0,56b*±0,08	1293,01b±109	13,43b*±0,8	5,55b*±0,5
GCV64	226,7a±45,6	1,3b*±0,1	0,60b±0,11	1297,09a±211	13,56b*±2,4	6,07b±0,7
GC40	136,4a*±9,1	0,6a*±0,03	0,51a*±0,03	600,16a±69	16,88a*±0,4	4,41a*±0,3
GV40	116,6b*±6,2	0,4b*±0,02	0,42b*±0,04	517,11b±58	6,43b*±0,7	2,28b*±0,4
GCV40	114,2b*±25,6	0,5a±0,3	0,45a±0,02	527,17a±288	9,49b*±4,6	3,27c±1,1

6 **Fonte:** Arquivo do autor.

7 Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

8 Letras diferentes com “*” -Médias diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,01$).

9 Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

10

11 Os pesos testiculares absolutos e relativos apresentaram tendência de diminuição
 12 progressiva. Vale salientar que em todos os grupos experimentais (GV40, GV64 E GV127)
 13 tratados apenas com sulfato de vincristine houve reduções significantes ($p \leq 0,01$) do peso
 14 testicular absoluto. O peso testicular relativo também reduziu ($p \leq 0,05$) em todos os grupos
 15 tratados com o quimioterápico.

16 Os volumes testiculares totais acompanharam a tendência de redução observada nas
 17 demais variáveis biométricas, todavia, tal redução só se consolidam no grupo tratado de 127
 18 dias (G127). Os animais dos grupos GV127 e GCV127 mostraram reduções significativas
 19 ($p \leq 0,01$) em comparação com o grupo GC127, mostrando que os efeitos citotóxicos do
 20 quimioterápico incidem sobre o volume do testículo de forma tardia.

21 Os animais dos grupos GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64 e GCV64 não apresentaram
 22 reduções significantes ($p > 0,05$) do volume da gônada. Ao mesmo tempo não houve diferença
 23 ($p > 0,05$) entre os grupos GV127 e GCV127, comprovando que o emprego de L-carnitine não
 24 foi eficaz na preservação do volume testicular total de ratos tratados com sulfato de vincristine.

25 Os eixos testiculares maiores e menores se mostraram diminuídos nos animais dos
 26 grupos tratados com sulfato de vincristine (Eixo maior $p = 0,0001$, eixo menor $p = 0,0001$) e

1 tratados com sulfato de vincristine e L-carnitine (Eixo maior $p=0,0004$, eixo menor $p=0,0448$)
2 quando comparados a seus respectivos controles.

3 O eixo testicular menor apresentou tendência de redução em todos os grupos tratados,
4 porém no grupo GCV40 verificou-se mitigação ($p=0,0308$) nessa tendência de redução em
5 relação ao grupo GV de mesma idade (GV40), esse resultado é forte indicativo de efeito
6 citoprotetor de L-carnitine nos primeiros dias após a aplicação.

7 Constatou-se que as densidades de volume dos túbulos seminíferos (Tabela 2) dos
8 grupos G64 e G40 tiveram discretas oscilações quando comparados os grupos experimentais
9 com seus relativos controles, porém, tais variações não diferiram significativamente ($p>0,05$).
10

11 **Tabela 2:** Densidade de volume dos túbulos seminíferos (DVT), densidade de volume do tecido
12 intersticial (DVI), volume dos túbulos seminíferos (VT), volume tecido intersticial (VI) em
13 grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados com
14 L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC40, GV40, GCV40,
15 GC64, GV64, GCV64, GC127, GV127 e GCV127).

GRUPOS				
	DVT (%)	DVI (%)	VT (mm ³)	VI (mm ³)
GC127	71,42a*±11,7	28,57a*±11,7	1185,55a*±219,3	471,6a±191
GV127	37,42b*±5,6	62,57b*±5,6	407,13b*±141,1	673,97b±206
GCV-127	43,42b*±3,7	59,57b*±3,7	521,16b*±70,3	687,85b±142
GC64	73,42a±9,4	26,57a±9,4	1058,81a*±119,7	391,31a±148
GV64	69,14a±8	30,85a±8	891,43b*±105,7	401,57a±119
GCV-64	69,71a±4,7	30,28a±4,7	907,23b±176,6	389,85a±68
GC40	77,42a±12,5	22,57a±12,5	462,72a*±77,2	137,44a±75
GV40	72,57a±7,9	27,42a±7,9	375,1b*±58,7	142a±44
GCV-40	72,28a±5	27,71a±5	385,75a±217,3	141,4a±81

16 **Fonte:** Arquivo do autor.

17 Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p\leq 0,05$).

18 Letras diferentes com “*” -Médias diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p\leq 0,01$).

19 Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).
20

21 A comparação entre os grupos GC127 e GV127 ($p=0,0001$), e entre os grupos GC127 e
22 GCV127 ($p=0,0022$), demonstra que os efeitos deletérios de sulfato de vincristine sobre a
23 densidade de volume dos túbulos seminíferos foram tardios e incidiram significativamente em
24 animais adultos (127 dias). Em contrapartida, não houve diferenças entre GV127 e GCV127.

25 Entretanto, os animais do grupo GCV127 (Figura 1) apresentaram médias de densidade
26 de volume dos túbulos seminíferos estatisticamente diferentes em relação ao GV127 (Figura 2)

1 e ao GC127 (Figura 3). É provável que o efeito citoprotetor da L-carnitine não se estenda até a
2 vida adulta dos animais.

3

4 **Figura 1:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-
5 carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GCV₁₂₇). Coloração
6 Hematoxilina-Eosina 20x. Observa-se aumento das vacuolizações do epitélio seminífero.
7 Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V).



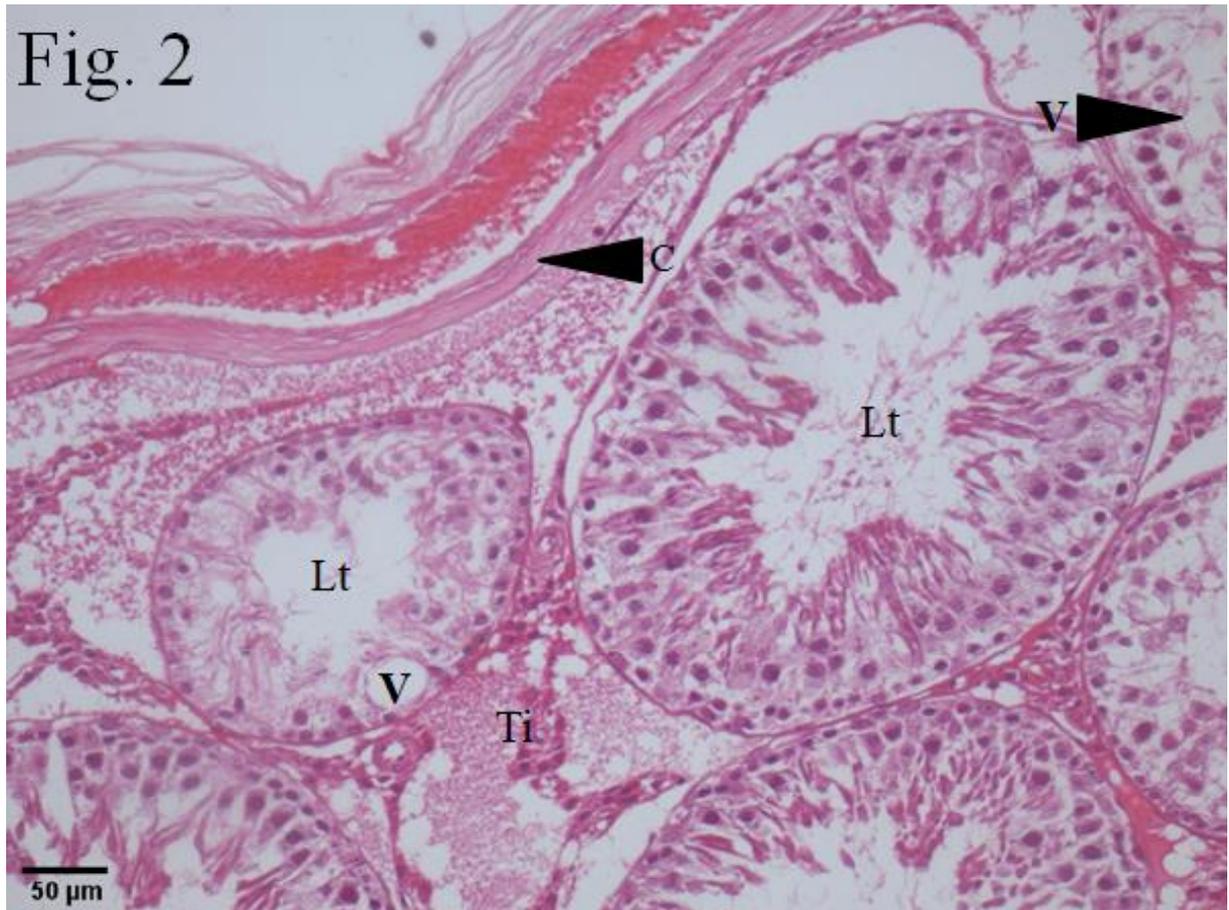
8

9 **Fonte:** Arquivo do autor.

10

11

12 **Figura 2:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com
13 sulfato de vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GV₁₂₇). Coloração Hematoxilina-
14 Eosina E 20x. Evidencia-se comprometimento severo dos túbulos seminíferos, desorganização
15 e vacuolizações do epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen
16 tubular (Lt); vacuolização (V).

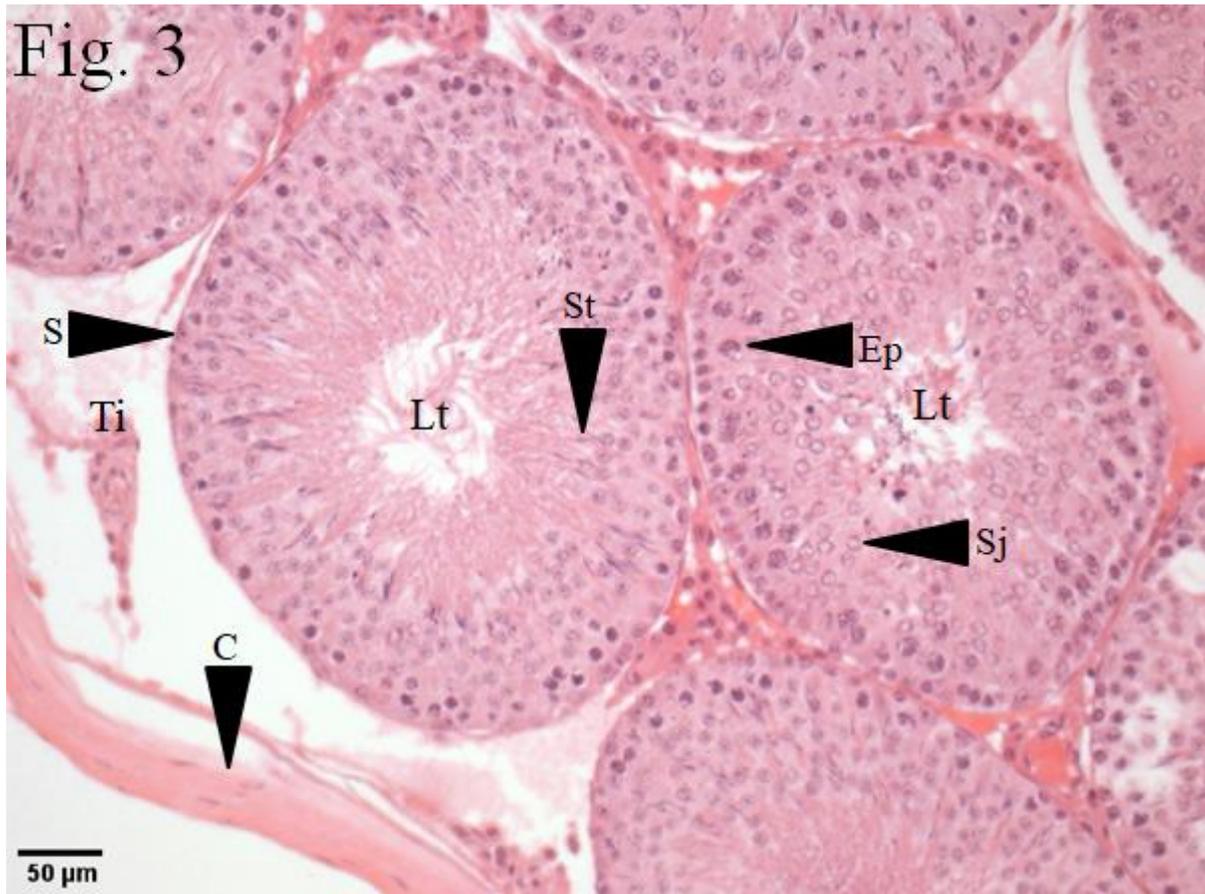


1

2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

4 **Figura 3:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle
 5 e sacrificados aos 127 dias de vida (GC₁₂₇). Coloração Hematoxilina-Eosina 20x. Cápsula
 6 testicular (C); tecido intersticial (Ti); núcleo da célula de Sertoli (S); lúmen tubular (Lt);
 7 espermátócito primário (Ep); espermátide jovem (Sj); espermátide tardia (St).



1

2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

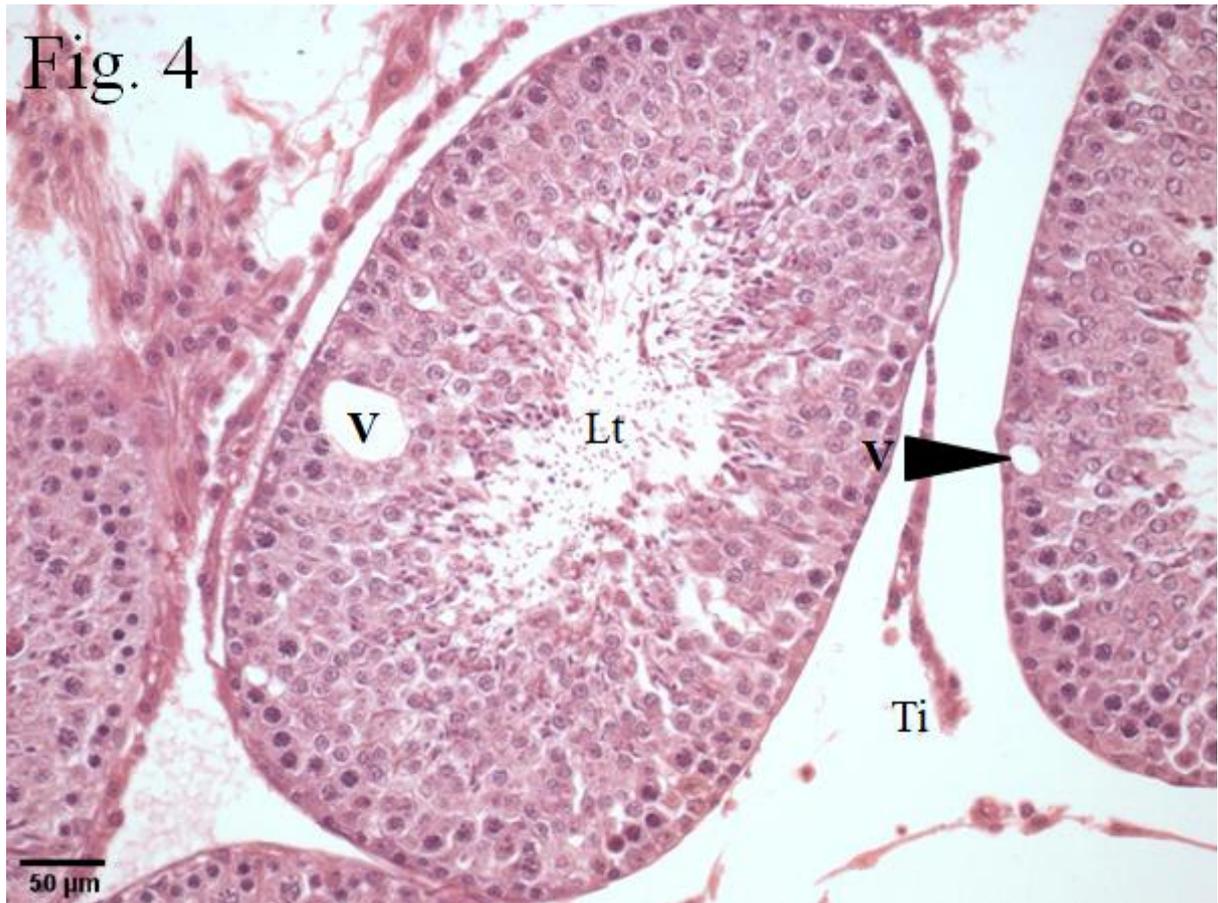
4 As densidades de volume do tecido intersticial acompanharam as tendências observadas
 5 na densidade de volume dos túbulos seminíferos, porém, de forma inversa, visto a relação de
 6 proporcionalidade existente entre as duas variáveis. Desse modo, os grupos GV127 e GCV127
 7 demonstraram aumento significativo ($p=0,0001$) da densidade de volume do tecido intersticial
 8 testicular quando comparado ao seu controle respectivo (GC127).

9

10 O volume dos túbulos seminíferos apresentou tendência de redução das médias,
 11 semelhante a observada no volume testicular total, mostrando diferenças significantes ($p \leq 0,05$)
 12 nos grupos experimentais GCV64 (Figura 4), GV64 (Figura 5), GC64 (Figura 6), GCV127,
 13 GV127 e GC127; quando comparados os grupos tratados com seus controles respectivos.

14

15 **Figura 4:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-
 16 carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GCV₆₄). Coloração
 17 Hematoxilina-Eosina 20x. Observa-se vacuolização, porém, em menor grau. Tecido intersticial
 (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V).

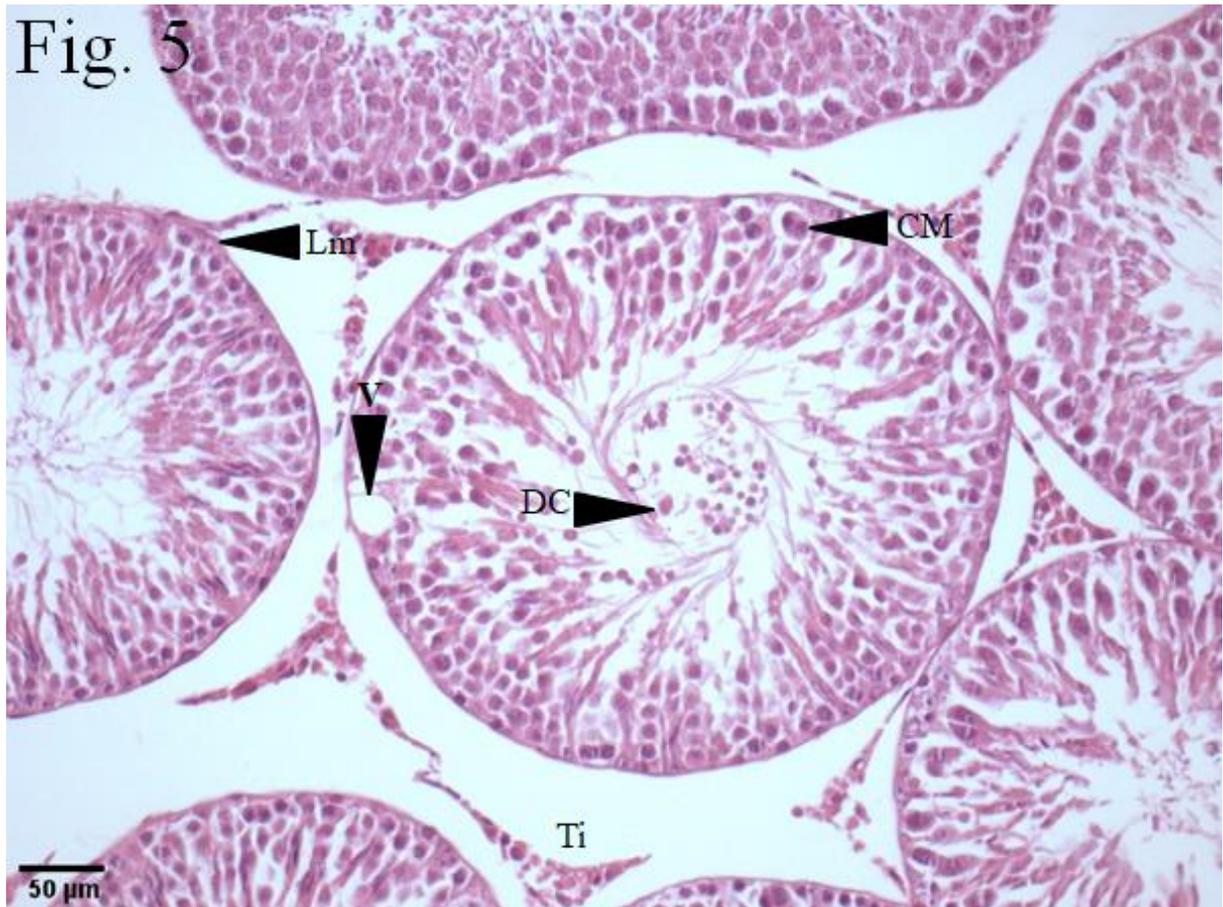


1

2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

4 **Figura 5:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com
5 sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GV₆₄). Coloração Hematoxilina-Eosina
6 20x. Observam-se restos celulares oriundos da descamação do epitélio seminífero. Tecido
7 intersticial (Ti); lâmina limitante (Lm); célula multinucleada (CM); vacuolização (V); restos
8 celulares da descamação do epitélio seminífero (DC).

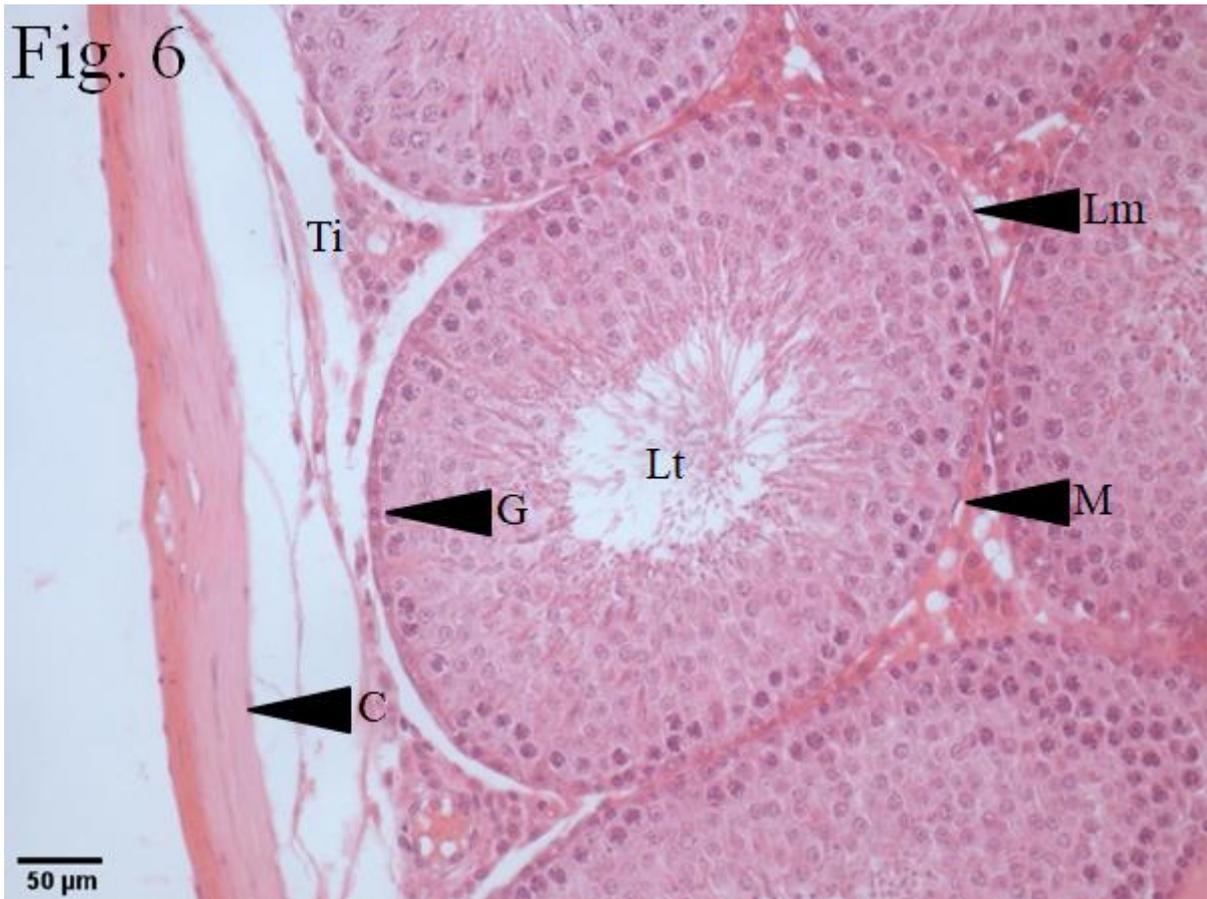


1

2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

4 **Figura 6:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle
 5 e sacrificados aos 64 dias de vida (GC₆₄). Coloração Hematoxilina-Eosina 20x. Cápsula
 6 testicular (C); tecido intersticial (Ti); espermatogônia (G); lúmen tubular (Lt); célula mioide
 7 (M); lâmina limitante (Lm).



1

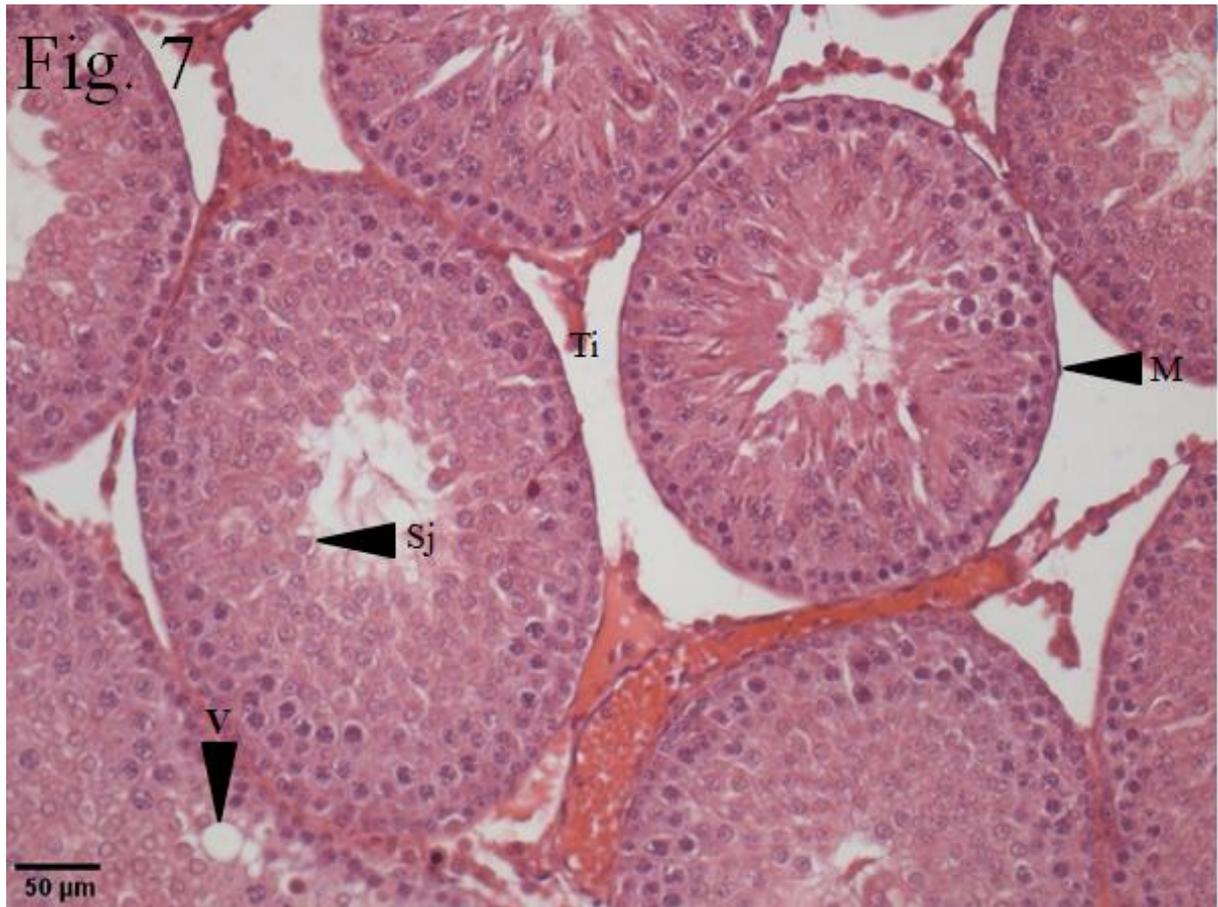
2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

4 O volume do tecido intersticial testicular mostrou variações não significantes ($p > 0,05$)
 5 nos grupos GCV64, GV64, GC64, GCV40 (Figura 7), GV40 (Figura 8) e GC40 (Figura 9);
 6 quando comparados os grupos tratados e controles respectivos. Porém, os grupos GV127 e
 7 GCV127 demonstraram aumento significativo ($p \leq 0,05$) do volume do tecido intersticial
 8 testicular quando comparados ao grupo controle (GC127) de mesma idade.

9

10 **Figura 7:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-
 11 carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GCV₄₀). Coloração
 12 Hematoxilina-Eosina 20x. Observa-se redução dos efeitos deletérios no epitélio seminífero.
 13 Tecido intersticial (Ti); célula mioide (M); espermátide jovem (Sj); vacuolização (V).

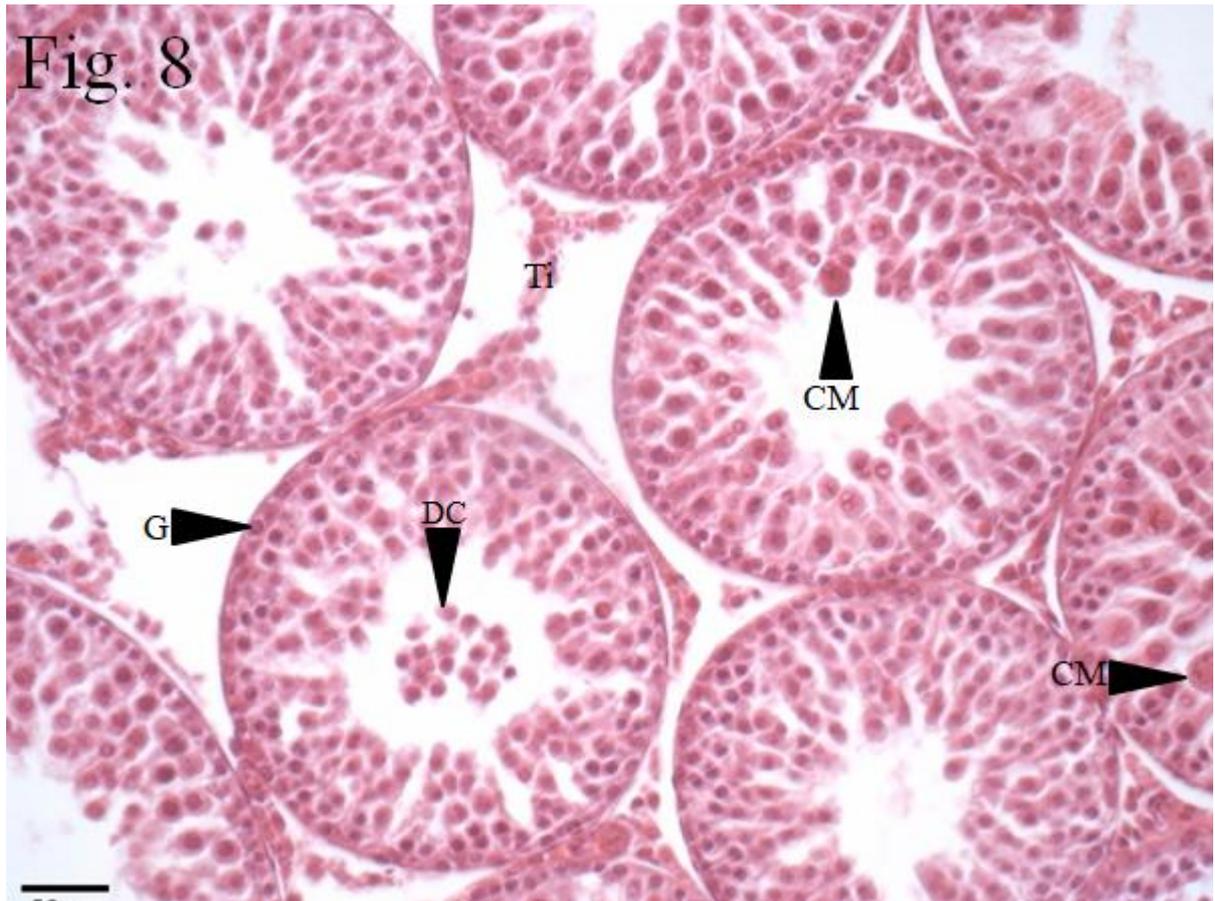


1

2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

4 **Figura 8:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com
5 sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GV₄₀). Coloração Hematoxilina-Eosina
6 20x. Observam-se efeitos deletérios no epitélio seminífero. Tecido intersticial (Ti);
7 espermatogônia (G); célula multinucleada (CM); restos celulares da descamação do epitélio
8 seminífero (DC).



1

2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

4 **Figura 9:** Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle
5 e sacrificados aos 40 dias de vida (GC₄₀). Coloração Hematoxilina-Eosina 20x. Cápsula
6 testicular (C); lúmen tubular (Lt); tecido intersticial (Ti); espermátócito primário (Ep); núcleo
7 da célula de Sertoli (S); espermátide jovem (Sj).



1

2 **Fonte:** Arquivo do autor.

3

4 As densidades de volume das células de Sertoli (Tabela 3) e das espermatogônias
5 apontaram redução quando comparados os grupos controle e tratados de 127 dias de vida.

6

7 **Tabela 3:** Densidade de volume da célula de Sertoli (DVS), volume da célula de Sertoli (VS),
8 densidade de volume de espermatogônia (DVE), volume de espermatogônia (VE) e densidade
9 de comprimento (DC) em grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de
10 vincristine (GV) e tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias
11 de idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127, GV127 e GCV127).

	GRUPOS				
	DVS (%)	VS (mm ³)	DVE (%)	VE (mm ³)	DC (μm ²)
GC127	1,77a*±0,2	29,41a*±5,2	1,37a*±0,1	22,93a*±3,8	28,34a*±2,2
GV127	1,03b*±0,1	11,33b*±4	0,86b*±0,1	9,25b*±3,1	34,31b*±1,7
GCV-127	1,55a*±0,1	18,79c*±3,9	0,76b*±0,1	9,26b*±2,1	32,7b*±2,6
GC64	0,92a±0,1	13,37a±1,8	0,94a±0,1	13,70a±2,5	20,74a±2,2
GV64	0,95a±0,1	12,34a±1,9	0,92a±0,1	11,93a±1,6	23,67b±2,7
GCV-64	0,90a±0,1	11,85a±3,3	0,95a±0,1	12,39a±2,4	23,04b±1,7
GC40	1,64a±0,1	9,90a±1,7	0,75a±0,1	4,55a±1,1	37,88a*±2,9

GV40	1,58a±0,1	8,19a±1,2	0,73a±0,1	3,82a±0,9	43,69b*±3
GCV-40	1,75a±0,1	9,36a±5,2	0,72a±0,1	3,77a±2,2	43,73b*±2,3

1 **Fonte:** Arquivo do autor.

2 Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

3 Letras diferentes com “*” -Médias diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,01$).

4 Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

5

6 A densidade de volume das células de Sertoli mostrou-se diferente quando comparados
7 os grupos GC127 e GV127 ($p=0,0001$) e os grupos GCV127 e GV127 ($p=0,0016$), entretanto
8 não houve diferença quando comparados os grupos GC127 e GCV127. A densidade de volume
9 das espermatogônias apontou redução quando comparados os grupos GC127 e GV127
10 ($p=0,0007$), e os grupos GC127 e GCV127 ($p=0,0001$), porém não houve diferença ao se
11 comparar os grupos GV127 e GCV127 ($p=0,44$). Os grupos experimentais de 64 e 40 dias não
12 apresentaram diferenças quanto a densidade de volume das células de Sertoli e
13 espermatogônias.

14 Os volumes das células de Sertoli e espermatogônias acompanharam a tendência de
15 redução observada na densidade de volume desses tipos celulares. O volume das células de
16 Sertoli demonstrou diferenças entre os três grupos experimentais de 127 dias de vida quando
17 comparados entre si, inclusive quando comparados os grupos GC127 e GCV127 ($p=0,0119$).
18 Também houve diferenças ao se comparar o volume das espermatogônias dos grupos GC127 e
19 GV127 ($p=0,0002$), e os grupos GC127 e GCV127 ($p=0,0001$), respectivamente. Todavia, não
20 houve diferenças entre os grupos GV127 e GCV127 nessa variável ($p=0,91$).

21 Quanto a densidade de comprimento, não houve diferenças entre os grupos
22 experimentais de 40 (G40) e 64 (G64) dias de vida, respectivamente. Os grupos GV127 e
23 GCV127 diferiram do grupo controle de mesma idade, sendo que essa diferença foi significativa
24 ($p=0,0001$).

25

26 **4. Discussão**

27 As oscilações de peso corpóreo dos animais tratados em relação aos seus respectivos
28 controles, neste experimento, apresentam semelhança com os dados apresentados em outros
29 estudos (Daleck et al., 1995; Delbès et al., 2010; Diniz et al., 1999; Hodel, Ettlin & Zschauer,
30 1984; Martins et al., 2011; Vaisheva et al., 2007).

31 É sabido que sulfato de vincristine, assim como outros quimioterápicos, produzem efeitos
32 deletérios sobre o epitélio e glândulas intestinais, interferindo indiretamente no processo
33 digestório e reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes, e consequentemente o ganho de

1 peso. Dados semelhantes foram relatados por outros autores (Moura et al., 2006; Peixoto Júnior
2 et al., 2009; Russell & França, 1995; Vendramini, Sasso-Cerri & Miraglia, 2010).

3 Os pesos corpóreos dos animais tratados e eutanasiados aos 40 dias de vida (GV40 e
4 GCV40) revelaram diferenças significativas ($p \leq 0,01$) quando comparados ao controle de
5 mesma idade (GC40). Entretanto, estes mesmos grupos (GV40 e GCV40), quando comparados
6 entre si, não diferiram em relação aos pesos corpóreos. Estes resultados confirmam que o uso
7 prévio da L-Carnitina não impede a ocorrência dos efeitos adversos da vincristina sobre a
8 variável peso corpóreo, ou seja, o citoprotetor não conseguiu, a curto prazo, impedir ou mitigar
9 a ação deletéria do quimioterápico sobre a mucosa digestiva, fato expresso pela manutenção da
10 redução do peso corpóreo dos animais do grupo GCV40. Este fato tem sido relatado em estudos
11 realizados com outros quimioterápicos em associação com a L-carnitine, os quais apresentaram
12 características semelhantes quanto à variável peso corpóreo (Cabral et al., 2014; Cao et al.,
13 2017; Coşkun et al., 2013; Dehghani et al., 2013; Okada, Stumpp & Miraglia, 2009; Yaman &
14 Topcu-Tarladacalisir, 2018).

15 Em contrapartida, as oscilações não significantes observadas nos grupos de 64 e 127
16 dias sugerem que a ampliação do tempo entre a aplicação do quimioterápico e a idade de
17 eutanásia, possibilitou a recuperação do trato digestivo. A capacidade regenerativa das células
18 das glândulas intestinais e do epitélio intestinal já foi descrita (Dekaney et al., 2009), e essa
19 característica possibilita a recuperação do peso corpóreo perdido na fase aguda do tratamento
20 com sulfato de vincristine. Reduções nos pesos corpóreos de animais tratados com
21 quimioterápicos têm sido relatadas como alterações comuns não só com o uso de sulfato de
22 vincristine, mas, com outras drogas antineoplásicas (Brilhante, Stumpp & Miraglia, 2011;
23 Coşkun et al., 2013; Dehghani et al., 2013; Hodel, Ettlín & Zschauer, 1984; Okada, Stumpp &
24 Miraglia, 2009; Vasiliausha et al., 2016; Vendramini, Sasso-Cerri & Miraglia, 2010).

25 O peso testicular é considerado diretamente proporcional a produção espermática,
26 porém, não existe proporcionalidade quanto ao peso testicular e o peso corporal, por esse
27 motivo, nesse estudo não se observam correlações entre peso corpóreo e peso testicular,
28 evidenciado na diferença existente no peso relativo do órgão. O tamanho testicular interfere
29 diretamente no comportamento reprodutivo do animal, indivíduos com maior tamanho
30 testicular apresentam maior produção espermática e, conseqüentemente, tendem a apresentar
31 maior atividade reprodutiva, correlação embasada pelo índice gonadossomático (Amann &
32 Schanbacher, 1983; França & Russell, 1998; Kenagy & Trombulak, 1986; Olar, Amann &
33 Pickett, 1983).

1 A redução do peso testicular, assim como das demais variáveis biométricas estudadas
2 possui relação dose dependente na maioria das drogas quimioterápicas, as reduções observadas
3 nessa pesquisa estão em conformidade com outros estudos (Okada, Stumpp & Miraglia, 2009;
4 Vendramini, Sasso-Cerri & Miraglia, 2010). Ademais, a diminuição do peso testicular é
5 considerada um indício importante de perda de células do epitélio seminífero (Bordallo et al.,
6 2001; Hacker-Klom, Meistrich & Göhde, 1986; Howell & Shalet, 2001), embora alterações do
7 interstício também devam ser consideradas.

8 Nos estudos onde se observa redução do volume testicular total, a necessidade de
9 discriminação dos volumes dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial se torna evidente
10 para que seja possível determinar qual dos integrantes do tecido testicular foi alterado, ou no
11 caso de ambos terem sido afetados, determinar a gravidade e extensão das alterações.

12 Os animais tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e eutanasiados aos 40 dias
13 de vida, demonstraram um abrandamento das reduções dos pesos testiculares absoluto e
14 relativo, demonstrando que houve efeitos citoprotetores que reduziram os efeitos danosos do
15 quimioterápico à gônada masculina. Tais resultados corroboram com outros estudos feitos com
16 o citoprotetor associado a outras drogas quimioterápicas, o que sugere que a atividade
17 citoprotetora de L-carnitine independe das características farmacológicas dos quimioterápicos
18 empregados. Todavia, em virtude da diversidade de interações químicas que podem ocorrer
19 entre fármacos de diferentes classes, tornam-se necessárias mais pesquisas a respeito do
20 mecanismo de ação de L-carnitine (Okada, Stumpp & Miraglia, 2009; Zhu et al., 2015;
21 Dehghani et al., 2013).

22 Pesquisa que comparou os efeitos citoprotetores de L-carnitine com a proteção conferida
23 por tecido testicular homogeneizado (*Homogenized Testis Tissue-THT*) em testículos de ratos
24 tratados com busulfan constatou que THT é mais eficaz na conservação de variáveis como
25 volume testicular, peso testicular, volume tubular e intersticial de tecidos, e contagem de
26 espermatozoides do que os tratados com a L-carnitine (Dehghani et al., 2013).

27 A redução do peso testicular dos animais tratados com a droga sugere a ocorrência de
28 efeitos danosos persistentes sobre a gônada, os quais se expressam de forma cumulativa, e são
29 evidenciados pela incapacidade de recomposição do peso testicular a longo prazo.

30 Ratos tratados com raios-x podem demonstrar diminuições significativas dos volumes
31 dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial com conseqüente atrofia da gônada, dependendo
32 das idades em que ocorreu a exposição (Cabral, Hayashy & Miraglia, 1997). Todavia, nessa
33 pesquisa observou-se redução do volume testicular total sem que houvesse, necessariamente,
34 redução de componentes do tecido intersticial.

1 Reduções de volume testicular total e eixos maiores e menores de testículos de animais
2 tratados com antineoplásicos como sulfato de vincristine corroboram com os achados
3 encontrados por outros autores e robustecem a constatação de que as gônadas desses animais
4 foram severamente danificadas pela ação citotóxica do quimioterápico (Brilhante, Stumpp &
5 Miraglia, 2011).

6 Diminuição do volume testicular é forte indicativo de dano ao epitélio seminífero, já
7 que grande parte do tecido testicular é formada pelos túbulos seminíferos, os quais acomodam
8 o epitélio germinativo. Entretanto, a ausência de variações no volume testicular não significa a
9 inexistência de efeitos danosos sobre as células germinativas, visto que o volume testicular total
10 é composto pela somatória do volume dos túbulos seminíferos e do volume do tecido intersticial
11 testicular, sendo que esses dois componentes teciduais estão sujeitos a variações para mais e
12 para menos (Amann & Schanbacher, 1983).

13 As densidades de volume dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial são variáveis
14 percentuais das quantificações dos túbulos seminíferos, estruturas células e matriz intersticiais
15 vasos sanguíneos, linfáticos, inervação e espaços intersticiais das gônadas masculinas. Desta
16 forma, são medidas que representam, de forma proporcional, a quantidade de túbulos
17 seminíferos e tecido intersticial existente no órgão.

18 L-carnitine foi ineficiente na preservação da densidade de volume dos túbulos
19 seminíferos de ratos tratados com sulfato de vincristine e eutanasiados na fase adulta. Pesquisa
20 sobre os efeitos de L-carnitine nos testículos de ratos tratados com etoposide, relatou um
21 aumento expressivo no número de células germinativas em processo de apoptose (Okada,
22 Stumpp & Miraglia, 2009). A perda de células dos túbulos seminíferos de testículos tratados
23 com sulfato de vincristine ainda precisa ser melhor investigada. Embora a redução na densidade
24 de volume dos túbulos seminíferos seja forte indicativo de redução na população de células do
25 parênquima testicular, sobretudo células de linhagem germinativa por estarem em maior
26 quantidade.

27 Neste estudo, a redução das densidades de volume dos túbulos seminíferos em ratos
28 tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine, assim como no grupo tratado somente com
29 sulfato de vincristine, pode ter ocorrido devido a morte de células germinativas, levando a crer
30 que a L-carnitine não foi eficiente na proteção dessas células, e que este fato impactou
31 indiretamente sobre a densidade de volume dos túbulos seminíferos. Danos a células de Sertoli
32 também pode resultar, indiretamente, em redução da população de células da linhagem
33 germinativa devido desestruturação do epitélio seminífero. Efeitos do sulfato de vincristine
34 sobre as células de Sertoli já foram descritos (Salehinezhad et al., 2019).

1 Estudos voltados para a dinâmica do ciclo do epitélio seminífero revelam que as
2 espermatogônias sobreviventes aos efeitos agudos do quimioterápico necessitariam de 56 dias
3 para produzir a primeira geração de espermátides após a exposição à droga (Cabral, Hayashi &
4 Miraglia, 1997; Clermont & Bustos-Obregon, 1968). Dessa forma, torna-se evidente que alguns
5 dos efeitos danosos do antineoplásico sobre os túbulos seminíferos (incluindo redução da
6 densidade de volume) não puderam ser observados no grupo experimental de 40 dias (GV40).
7 No que concerne ao grupo GV64, é possível que a ação do quimioterápico resulte em retardo
8 no processo espermatogênico, tornando os efeitos deletérios tardios (Clermont & Hermo, 1975;
9 Hodel, Ettlin & Zschauer, 1984).

10 Os resultados estereológicos revelaram um aumento da densidade de volume do tecido
11 intersticial e do volume do tecido intersticial, os quais podem ter ocorrido em virtude do
12 aumento da dispersão dos túbulos seminíferos dos animais tratados (GV127 e GCV127). A
13 ampliação das estruturas linfáticas testiculares é efeito comumente descrito em animais sujeitos
14 ao tratamento quimioterápico (Madhu, Reddy & Reddy, 2016; Nikpour et al., 2018; Rosenthal,
15 1981; Sherif et al., 2018).

16 A redução das densidades de volume das células de Sertoli e espermatogônias associado
17 a reduções dos volumes desses tipos celulares são fortes indicadores de diminuição da
18 população celular no interior dos túbulos seminíferos.

19 Houve preservação da densidade de volume da célula de Sertoli dos animais do grupo
20 GCV127, indicando efeito citoprotetor de L-carnitine sobre esse tipo celular, contudo, o mesmo
21 efeito não foi observado na densidade de volume das espermatogônias. A redução do volume
22 das células de Sertoli são um sinal de provável dano estrutural irreversível aos túbulos
23 seminíferos, uma vez que não há substituição da população perdida desse tipo celular, tornando
24 crucial a sua preservação (Salehinezhad et al., 2019).

25 A densidade de comprimento é tida por alguns autores como o parâmetro ideal na
26 avaliação de estruturas tubulares com distribuição retilínea (Mandarim-de-Lacerda, 1995).
27 Observou-se que os animais tratados com sulfato de vincristine apresentaram na idade adulta
28 (127 dias), aumento do número de perfis em uma determinada área teste em decorrência da
29 diminuição dos eixos maiores (diâmetro) e menores dos túbulos seminíferos.

30 Substâncias com efeitos deletérios para a espermatogênese podem acarretar aumento do
31 número de perfis em uma determinada área teste, pois, dentre as alterações causadas pelas
32 substâncias destaca-se a diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, dessa forma, as
33 estruturas ocupam espaços físicos menores aumentando o número de perfis computados
34 (Bustos-Obregon & Lopez, 1973; Eboetse et al., 2011).

5. Conclusão

A administração de sulfato de vincristine causa redução de parâmetros importantes que demonstram grau severo de dano testicular. A administração prévia de L-carnitine na dosagem utilizada, em associação ao tratamento com sulfato de vincristine, é uma alternativa viável que propicia abrandamento dos danos observado nos tecidos testiculares.

Avaliações mais completas da morfofisiologia testicular são necessárias para determinar os mecanismos citoprotetores da L-carnitine no testículo tratado na fase pré-púbere. Avaliações morfométricas, moleculares, imuno-histoquímicas e análises do ciclo do epitélio seminífero, que podem fornecer pistas importantes para a compreensão dos mecanismos pelos quais se estabelecem os efeitos deletérios do sulfato de vincristine em células germinativas e células de Sertoli imaturas, além dos mecanismos L- citoprotetores de L-carnitine nesses tipos de células.

6. Referências

- Amann, R. P., & Schanbacher, B. D. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of animal science*, 57(2), 380-403.
- Bordallo, M. A. N., Guimarães, M. M., Carriço, M. K., & Dobbin, J. (2001). Função gonadal de sobreviventes de doença de Hodgkin tratados na infância e adolescência com quimioterapia. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 45, 87-95.
- Borges, M. S., Salles, M. M., & Camuzi, R. C. (2021). Perfil das reações adversas imediatas à infusão de quimioterapia em pacientes ambulatoriais em um Hospital Universitário fluminense. *Research, Society and Development*, 10(15), e416101523009-e416101523009.
- Brilhante, O., Okada, F. K., Sasso-Cerri, E., Stumpp, T., & Miraglia, S. M. (2012). Late morfofuncional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-16.
- Brilhante, O., Stumpp, T., & Miraglia, S. M. (2011). Long-term testicular toxicity caused by doxorubicin treatment during pre-pubertal phase. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3(2), 52-60.
- Bustos-Obregon, E., & Lopez, M. L. (1973). Selective effect of Vinca rosea L. alkaloids on type A4 rat spermatogonium* Selektive Wirkung von Vinca rosea L. Alkaloiden an Typ A4 der Rattenspermatogonie/Effets sélectifs des alcaloïdes des Vinca rosea L. sur les spermatogenesis A4 de rat. *Andrologia*, 5(3), 245-247.
- Cabral, M. D. G. B., Hayashi, H., Miraglia, S. M. (1997). Histomorphometry of sexually immature albino rat testis after X ray-irradiation. *Interciencia*, 22, 71-80.

- 1 Cabral, R. E. L., Okada, F. K., Stumpp, T., Vendramini, V., & Miraglia, S. M. (2014). Carnitine
2 partially protects the rat testis against the late damage produced by doxorubicin administered
3 during pre-puberty. *Andrology*, 2(6), 931-942.
- 4 Cao, Y., Wang, X., Li, S., Wang, H., Yu, L., & Wang, P. (2017). The effects of l-carnitine
5 against cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis. *Basic & clinical pharmacology &
6 toxicology*, 120(2), 152-158.
- 7 Clegg, E. J. (1960). The age at which male rats become fertile. *Journal of reproduction and
8 fertility*, 1, 119-120.
- 9 Clermont, Y., & Bustos-Obregon, E. (1968). Re-examination of spermatogonial renewal in the
10 rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *American Journal of Anatomy*, 122(2),
11 237-247.
- 12 Clermont, Y., & Hermo, L. (1975). Spermatogonial stem cells in the albino rat. *American
13 Journal of Anatomy*, 142(2), 159-175.
- 14 Coşkun, N., Hatipoğlu, M. T., Özoğul, C., Korkmaz, C., Akyol, S. N., Mıçılı, S. C., & Erdoğan,
15 D. (2013). The protective effects of acetyl L-carnitine on testis gonadotoxicity induced by
16 cisplatin in rats. *Balkan medical journal*, 30(2), 235.
- 17 Daleck, C. R., Franceschini, P. H., Padilha Filho, J. G., Alessi, A. C., Garcia, J. M., Martins,
18 M. I. M., & da Costa Neto, J. M. (1995). Alterações produzidas a nível de testículo e sêmen de
19 cães submetidos à administração de sulfato de vincristina. *Brazilian Journal of Veterinary
20 Research and Animal Science*, 32(1), 51-56.
- 21 Dehghani, F., Hassanpour, A., Poost-Pasand, A., Noorafshan, A., & Karbalay-Doust, S. (2013).
22 Protective effects of L-carnitine and homogenized testis tissue on the testis and sperm
23 parameters of busulfan-induced infertile male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*,
24 11(9), 693.
- 25 Dekaney, C. M., Gulati, A. S., Garrison, A. P., Helmrath, M. A., & Henning, S. J. (2009).
26 Regeneration of intestinal stem/progenitor cells following doxorubicin treatment of mice.
27 *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(3), G461-G470.
- 28 Delbès, G., Vaisheva, F., Luu, T., Marcon, L., Hales, B. F., & Robaire, B. (2010). Reversibility
29 of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin lymphoma,
30 cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive
31 system and progeny outcome. *Reproductive Toxicology*, 29(3), 332-338.
- 32 Diniz, P. P. V. P., Camacho, A. A., Santana, A. E., Sobreira, M. F. R., & Velasque, F. G. (1999).
33 Eletrocardiografia e avaliação das enzimas musculares em cães tratados com sulfato de
34 vincristina. *Ars Veterinaria*, 15(3), 170-176.
- 35 Eboetse, Y. O., Ifeanyi, A. C., Adewale, O. S., Carmel, N. C., Chai, S. L., & Olugbenga, O. A.
36 (2011). Three-dimensional quantitative analysis of testicular tissue sections of sprague-dawley
37 rat: the after treatment responses to varying doses of *Momordica charantia*. *Agricult. Biol. JN
38 Am*, 2(11), 1390-1394.
- 39 França, L. R., & Russell, L. D. (1998). The testis of domestic animals. *Male reproduction: a
40 multidisciplinary overview*, 197, 219.
- 41 Gomes, A. L. M., Magalhães, J. A., Neves, J. P., da Silva, L. R. L., de Sousa Gomes, R. V., de
42 Oliveira França, R. G., & Nogueira, T. R. (2020). Efeitos da suplementação de arginina,

- 1 glutamina e ômega-3 sobre a resposta inflamatória e estado nutricional de pacientes
2 oncológicos. *Research, Society and Development*, 9(5), e193953285-e193953285.
- 3 Groth, A., dos Santos Silva, L. A., Martins, M. I. M., Fernandes, M. P., Gregghi, J. R., de Souza
4 Amaral, L. M., ... & Bracarense, A. P. F. R. L. (2021). Tumor venéreo transmissível em
5 cavidade abdominal de cadela: Relato incomum. *Research, Society and Development*, 10(8),
6 e0110816429-e0110816429.
- 7 Gundersen, H. J. G., Bendtsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., &
8 West, M. J. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in
9 pathological research and diagnosis. *Apmis*, 96(1-6), 379-394.
- 10 Hacker-Klom, U. B., Meistrich, M. L., & Göhde, W. (1986). Effect of doxorubicin and 4'-epi-
11 doxorubicin on mouse spermatogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular*
12 *Mechanisms of Mutagenesis*, 160(1), 39-46.
- 13 Hodel, C., Ettlin, R. A., & Zschauer, A. (1984). Morphological changes produced in rat testis
14 by anticancer drugs. In *Disease, Metabolism and Reproduction in the Toxic Response to Drugs*
15 *and Other Chemicals* (pp. 147-150). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 16 Howell, S. J., & Shalet, S. M. (2001). Testicular function following chemotherapy. *Human*
17 *reproduction update*, 7(4), 363-369.
- 18 Kenagy, G. J., & Trombulak, S. C. (1986). Size and function of mammalian testes in relation
19 to body size. *Journal of Mammalogy*, 67(1), 1-22.
- 20 Keros, V., Rosenlund, B., Hultenby, K., Aghajanova, L., Levkov, L., & Hovatta, O. (2005).
21 Otimizando a criopreservação do tecido testicular humano: comparação de protocolos com
22 glicerol, propanodiol e dimetilsulfóxido como crioprotetores. *Human Reproduction*, 20 (6),
23 1676-1687.
- 24 Jark, P. C., Barros, F. S., Matiz, O. R. S., Sueiro, F. A. R., Costa, M. T., Dias, F. G. G., & Neto,
25 R. B. (2020). Estudo nosológico e retrospectivo de casos de tumor venéreo transmissível
26 extragenital em cães. *Research, Society and Development*, 9(10), e2419108359-e2419108359.
- 27 Lima, G. R. F., da Silva, A. T. D. S., de Araújo, V. M. J., Teixeira, G. G., dos Santos Mendes,
28 A. B., Anastácio, F. D. L., ... & Pinheiro, B. Q. (2021). Remissão total de linfoma multicêntrico
29 em cão com o protocolo Madison-Wisconsin: Relato de caso. *Research, Society and*
30 *Development*, 10(9), e4110917591-e4110917591.
- 31 Madhu, P., Reddy, K. P., & Reddy, P. S. (2016). Role of melatonin in mitigating chemotherapy-
32 induced testicular dysfunction in Wistar rats. *Drug and chemical toxicology*, 39(2), 137-146.
- 33 Mandarim-de-Lacerda, C. A. (1995). Métodos quantitativos em morfologia. *Eduerj*, 131p.
- 34 Martins, D. B., Lopes, S. T. A., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Schmatz, R., Corrêa, M., ...
35 & Veiga, A. P. M. (2011). Lipid peroxidation in rats treated with vincristine sulphate and
36 nandrolone decanoate. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63, 107-113.
- 37 Michalany, J. (1998). Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para o 1º
38 cirurgião, enfermeiras e citotécnico. 3º Ed. São Paulo. Michalany. 295p.
- 39 Miraglia, S. M., Hayashi, H. (1993). Histomorphometry of immature rat testis after heating.
40 *Journal of morphology*, 217(1), 65-74.

- 1 Miranda, P. G., de Miranda, R. R., Henriques, J. C. G., & Guedes, C. D. C. F. V. (2021). Efeitos
2 dentários tardios da quimioterapia e radioterapia em sobrevivente de câncer infantil: relato de
3 caso. *Research, Society and Development*, 10(15), e97101522296-e97101522296.
- 4 Morais, F. C. M. R., Ferreira, M. K. G., Silva, A., da Silva, W. C., & Silva, L. K. X. (2021).
5 Aspectos clínicos, hematológicos, citológicos, diagnóstico e tratamento de tumor venéreo
6 transmissível em cão. *Research, Society and Development*, 10(10), e177101018570-
7 e177101018570.
- 8 Moura, C. S., Guerra, M. M. P., Silva Júnior, V. A., Silva, C. G. C., Caju, F. M., & Alves, L.
9 C. (2006). Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com
10 diferentes doses de ivermectina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58,
11 799-808.
- 12 Nikpour, F., Tayefi, H., Mohammadnejad, D., & Akbarzadeh, A. (2018). Adverse effects of
13 vincristine chemotherapy on cell changes in seminiferous tubules and cetrorelix GnRH
14 antagonist inhibitory effects in mice. *Asian Pacific journal of cancer prevention APJCP*, 19(3),
15 683.
- 16 Okada, F. K., Stumpp, T., Miraglia, S. M. (2009). Carnitine reduces testicular damage in rats
17 treated with etoposide in the prepubertal phase. *Cell and tissue research*, 337(2), 269-280.
- 18 Olar, T. T., Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1983). Relationships among testicular size, daily
19 production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog.
20 *Biology of reproduction*, 29(5), 1114-1120.
- 21 Oliveira, A. C. D. N., José, S. A. P., da Silva, T. P., da Silva, G. C. L., & Nazareth, I. V. (2021).
22 A qualidade de vida de crianças durante o tratamento quimioterápico: uma revisão
23 integrativa. *Research, Society and Development*, 10(11), e547101119946-e547101119946.
- 24 Peixoto Júnior, A. A., Teles, B. C. V., Castro, E. F. B., Santos, A. A., de Oliveira, G. R., Ribeiro,
25 R. A., ... & Gondim, F. A. A. (2009). Vincristine delays gastric emptying and gastrointestinal
26 transit of liquid in awake rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42, 567-
27 573.
- 28 Rosenthal, R. C. (1981). Clinical applications of Vinca alkaloids [Veterinary drugs, toxicity,
29 dogs, cats]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(1), 1084-6.
- 30 Russell, L. D., França, L. R. (1995). Building a testis. *Tissue and Cell*, 27(2), 129-147.
- 31 Salehinezhad, F., Eshraghi, H., Kadivar, A., Shirian, S., Asghari, A., Aali, E., & Davoodian, N.
32 (2019). Amelioration effects of vitamin E, melatonin, L-carnitine, and atorvastatin, on
33 destructive effects of busulfan in the testes of male rats: A gene expression evaluation. *Kafkas*
34 *Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*.
- 35 Scherle W. (1970). A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology.
36 *Mikroskopie*, 26, 57-60.
- 37 Sherif, I. O., Sabry, D., Abdel-Aziz, A., & Sarhan, O. M. (2018). The role of mesenchymal
38 stem cells in chemotherapy-induced gonadotoxicity. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-9.
- 39 Vaisheva, F., Delbes, G., Hales, B. F., Robaire, B. (2007). Effects of the chemotherapeutic
40 Agents for Non-Hodgkin Lymphoma, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and
41 Prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Journal of*
42 *andrology*, 28(4), 578-587.

- 1 Vasiliausha, S. R., Beltrame, F. L., de Santi, F., Cerri, P. S., Caneguim, B. H., & Sasso-Cerri,
2 E. (2016). Seminiferous epithelium damage after short period of busulphan treatment in adult
3 rats and vitamin B12 efficacy in the recovery of spermatogonial germ cells. *International*
4 *journal of experimental pathology*, 97(4), 317-328.
- 5 Vendramini, V., Sasso-Cerri, E., Miraglia, S. M. (2010). Amifostine reduces the seminiferous
6 epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility
7 status. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 3.
- 8 Yaman, O., & Topcu-Tarladacalisir, Y. (2018). L-carnitine counteracts prepubertal exposure to
9 cisplatin induced impaired sperm in adult rats by preventing germ cell apoptosis. *Biotechnic &*
10 *Histochemistry*, 93(3), 157-167.
- 11 Zarbakhsh, S., Safari, R., Sameni, H. R., Yousefi, B., Safari, M., Khanmohammadi, N., &
12 Hayat, P. (2019). Effects of co-administration of bone marrow stromal cells and L-carnitine on
13 the recovery of damaged ovaries by performing chemotherapy model in rat. *International*
14 *journal of fertility & sterility*, 13(3), 196.
- 15 Zhu, B., Zheng, Y. F., Zhang, Y. Y., Cao, Y. S., Zhang, L., Li, X. G., & Zhao, Z. G. (2015).
16 Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis. *Journal of*
17 *Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(9), 780-787.

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

CAPÍTULO III: Efeitos de L-carnitine sobre alterações morfológicas testiculares e epitélio seminífero de ratos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere

Edson Vinícius Leite Veloso, José Emanuel de Souza Sales, Ruthyanna Camila Medeiros da Silva, Maria Eduarda Camargo Caldeira, Paula Páglia Braga Araújo, Raul Anderson de Souza Machado, Otávio Brilhante de Sousa, Danilo José Ayres de Menezes

Trabalho submetido a revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* (A4)

1 **Efeitos de L-carnitine sobre alterações morfológicas testiculares e ciclo do epitélio**
 2 **seminífero de ratos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere¹**

3
 4 Edson V.L. Veloso², Jose E.S. Sales ², Ruthyanna C.M. Silva ², Maria E.C. Caldeira²,
 5 Paula P.B Araújo^{2*}, Raul A.S. Machado², Otávio B. Sousa²
 6 and Danilo J.A Menezes³

7
 8 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1533-8499>

Edson V.L. Veloso

9 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1317-0856>

Jose E.S. Sales

10 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1296-3106>

Ruthyanna C.M.

11 Silva

12 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6897-7545>

Maria E.C. Caldeira

13 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4777-9862>

Paula P.B Araújo

14 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0784-7402>

Raul A.S. Machado

15 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5729-2081>

Otávio B. de Sousa

16 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6089-3283>

Danilo J.A de

17 Menezes

18
 19 **ABSTRACT.** - Veloso E.V.L., Sales J.E.S., Silva R.C.M., Caldeira M.E.C., Araújo P.P.B.,
 20 Machado R.A.S., Sousa O.B. & Menezes D.J.A. 2022. **Efeitos de L-carnitine sobre alterações**
 21 **morfométricas testiculares e ciclo do epitélio seminífero de ratos tratados com sulfato de**
 22 **vincristine na fase pré-púbere.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2022. Unidade de Medicina
 23 Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária, s/n, Cx Postal
 24 61 - Patos/PB. CEP: 58708-110, Brazil. E-mail: araujo.paglia@gmail.com

25 Vincristine sulfate is a chemotherapy drug used in the treatment of several types of
 26 neoplasms in humans and domestic animals. The drug acts on cell division causing the
 27 precipitation of tubulin and paralyzing the mitotic cycle in the M phase. The action of
 28 vincristine sulfate is non-selective, reaching neoplastic cells and normal cells in the process of
 29 division, making rapidly proliferating tissues sensitive to the action. of the drug; including the
 30 seminiferous epithelium. The appearance of neoplasms in prepubertal patients has become
 31 increasingly frequent, especially in the human species, creating the medical challenge of
 32 performing the treatment of oncological diseases, without compromising the morphological and
 33 functional integrity of normal tissues, such as immature testes, which need to preserve gametes
 34 for a later reproduction process. Thus, the aim of this study was to evaluate the protective action

1 of L-carnitine on morphometric parameters and on the cycle of the seminiferous epithelium of
2 rats treated with vincristine sulfate in the prepubertal phase. Ninety male Wistar rats were
3 divided into three groups of 30 animals, one group received 0.05mg/kg of vincristine sulfate
4 intraperitoneally (GV), one group received 250mg/kg of L-carnitine intraperitoneally, after one
5 hour the same dose of vincristine sulfate (GCV) was administered, another group received only
6 saline solution (GC). The three groups were subdivided according to the ages for euthanasia,
7 40, 64 and 127 days of life. After euthanasia both testes were collected and histological sections
8 were processed. Morphometric measurements were performed (diameter of the seminiferous
9 tubule, height of the seminiferous epithelium, diameter of the tubular lumen, minor axis of the
10 seminiferous tubule, area of the seminiferous tubule, area of the tubular lumen and area of the
11 seminiferous epithelium) and counting of the cell types of the seminiferous tubules and
12 frequency of the stages of the seminiferous epithelium cycle in 100 tube sections per testis. The
13 results indicated that vincristine sulfate causes serious deleterious effects in animals treated in
14 the prepubertal phase that persist and worsen into adulthood. L-carnitine mitigated the
15 deleterious effects of vincristine sulfate on the seminiferous epithelium in 64-day-old animals,
16 but was ineffective in preserving these effects in animals in the initial (40 days) and final (127
17 days) phases of this evaluation.

18

19 INDEX TERMS: L-carnitine, vincristine sulfate, cycle of the seminiferous epithelium.

20

21 **RESUMO.** - [Efeitos de L-carnitine sobre alterações morfológicas testiculares e ciclo do
22 epitélio seminífero de ratos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere]. O
23 sulfato de vincristine é uma droga quimioterápica empregada no tratamento de diversos tipos
24 de neoplasias da espécie humana e de animais domésticos. O fármaco atua sobre a divisão
25 celular causando a precipitação da tubulina e paralisando o ciclo mitótico na fase M. A ação do
26 sulfato de vincristine é não seletiva, atingindo células neoplásicas e células normais em
27 processo de divisão, tornando tecidos de rápida proliferação sensíveis a ação da droga;
28 incluindo o epitélio seminífero. O aparecimento de neoplasias em pacientes pré-púberes tem se
29 tornado cada vez mais frequentes, sobretudo na espécie humana, criando o desafio médico de
30 executar o tratamento das doenças oncológicas, sem comprometer a integridade morfológica e
31 funcional dos tecidos normais, a exemplo dos testículos imaturos, os quais necessitam preservar
32 os gametas para um posterior processo de reprodução. Desta forma, o objetivo desse estudo foi
33 avaliar a ação protetora de L-carnitine sobre parâmetros morfológicos e sobre o ciclo do
34 epitélio seminífero de ratos tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere. Foram

1 utilizados 90 ratos machos da linhagem Wistar divididos em três grupos de 30 animais, um
2 grupo recebeu 0,05mg/kg de sulfato de vincristine por via intraperitoneal (GV), um grupo
3 recebeu 250mg/kg de L-carnitine por via intraperitoneal, após uma hora foi administrada a
4 mesma dose de sulfato de vincristine (GCV), outro grupo recebeu apenas solução salina (GC).
5 Os três grupos foram subdivididos de acordo com as idades para eutanásia, 40, 64 e 127 dias
6 de vida. Após a eutanásia ambos os testículos foram coletados e processados cortes
7 histológicos. Foram realizadas medidas morfométricas (Diâmetro do túbulo seminífero, altura
8 do epitélio seminífero, diâmetro do lúmen tubular, eixo menor do túbulo seminífero, área do
9 túbulo seminífero, área do lúmen tubular e área do epitélio seminífero) e contagem dos tipos
10 celulares dos túbulos seminíferos e frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em
11 100 secções tubulares por testículo. Os resultados indicaram que sulfato de vincristine provoca
12 graves efeitos deletérios nos animais tratados na fase pré-púbere que perduram e se agravam na
13 vida adulta. L-carnitine mitigou os efeitos deletérios de sulfato de vincristine sobre o epitélio
14 seminífero nos animais de 64 dias de vida, porém foi ineficaz na preservação destes efeitos nos
15 animais nas fases inicial (40 dias) e final (127 dias).

16
17 TERMOS DE INDEXAÇÃO: L-carnitine, sulfato de vincristine, ciclo do epitélio seminífero.

INTRODUÇÃO

O sulfato de vincristine é uma droga quimioterápica largamente empregada no tratamento de diversos tipos de tumores no homem e em animais domésticos. A droga associa-se a proteína tubulina, e age na fase M da divisão celular, impedindo a multiplicação celular, e consequentemente, o crescimento das neoplasias (Levêque & Jehl, 2007; Silva et al. 2007; Faro et al. 2008; Brandão et al. 2010; Costa-Lotufo et al. 2010).

Todavia, a não seletividade do quimioterápico as células tumorais, faz com que tecidos normais, com altos índices de proliferação, também sejam alvos da droga. Os efeitos adversos causados pelo sulfato de vincristine são considerados fatores limitantes ao tratamento (Almeida, 2005; Nak et al. 2005; Faro et al. 2008; Adão 2013).

O surgimento frequente de neoplasias em pacientes jovens do sexo masculino, muitos deles ainda na fase pré-púbere, lança o desafio de assegurar a capacidade reprodutiva desses indivíduos, cuja idade precoce impossibilita a coleta e conservação de células gaméticas maduras, capaz de viabilizar o seu posterior emprego nas técnicas de reprodução assistida. É justamente nesse período que antecede o desenvolvimento da barreira hematotesticular, que o testículo está mais exposto a vários agentes danosos (Bordallo 2001).

Estudos avançam no desenvolvimento e análise de substâncias com ação citoprotetora, que impeçam as células normais de serem afetadas durante o tratamento, mas, sem interferir nos efeitos antitumorais da droga (Souza et al. 2000).

O objetivo desse estudo foi investigar se o uso da L-carnitine previne os efeitos adversos produzidos pela terapia com sulfato de vincristine na fase pré-púbere.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comitê de Ética. Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos/Paraíba, sendo aprovado sob protocolo CEUA/CSTR N° 185/2014.

Local do Trabalho. O experimento foi realizado no Biotério e nos Laboratórios de Pesquisa da Patologia Animal e Morfofisiologia do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande.

Formação dos grupos controle e tratado. Foram utilizados 90 (noventa) ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, pertencentes à linhagem Wistar, com 15 dias de idade, e peso corpóreo médio de 30 gramas.

1 Os animais foram provenientes de acasalamento de progenitores do Biotério do CSTR-
2 UFCEG. Após o nascimento foram separados (sexagem), por meio da inspeção da genitália
3 externa. Grupos de 06 (seis) ratos machos foram acomodados por fêmea matriz em gaiolas
4 plásticas durante o período de amamentação. Os animais foram desmamados aos 21 dias de
5 vida e distribuídos em três grupos principais: O grupo controle (GC) com 30 (trinta) animais;
6 um grupo tratado com sulfato de vincristine (GV), com 30 (trinta) animais; e um grupo tratado
7 com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV), também com 30 (trinta) animais.

8 Os grupos GC, GV e GCV foram subdivididos em três subgrupos de 10 (dez) animais
9 cada, de acordo com as idades em que foram eutanasiados: 40 (quarenta) dias de vida
10 (subgrupos GC40, GV40 e GCV40); 64 sessenta e quatro dias de vida (subgrupos GC64, GV64
11 e GCV64) e 127 (cento e vinte e sete) dias de vida (subgrupos GC127, GV127 e GCV127).

12 Os grupos foram designados por índices numéricos de acordo com as idades em que
13 foram submetidos a eutanásia. As idades foram escolhidas com base em fases importantes do
14 desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da espécie. Segundo Clegg (1960), os ratos
15 de 40 dias são pré-púberes, os ratos de 64 dias são púberes, mas não sexualmente maduros, e
16 os de 127 dias são sexualmente maduros.

17 Os grupos controles (GC) receberam solução salina por via intraperitoneal aos 15
18 (quinze) dias de idade, na mesma dose empregada nos grupos tratados. Objetivou-se com isso
19 simular as mesmas condições de manipulação do grupo tratado. Os animais do grupo tratado
20 (GV) receberam sulfato de vincristine em dose única por via intraperitoneal de 0,05 mg/kg de
21 peso vivo aos 15 (quinze) dias idade (Hodel, 1984). Os animais do grupo GCV receberam L-
22 carnitine em dose única por via intraperitoneal de 250 mg/kg de peso vivo aos 15 (quinze) dias
23 de idade (Okada, 2009). Uma hora após a aplicação, os animais receberam sulfato de vincristine
24 na mesma dose do grupo GV. O dia da administração do quimioterápico foi escolhido com base
25 no tempo de desenvolvimento da barreira hematotesticular e na maturação das células de
26 Sertoli, visto que até 18º dia de vida essas células ainda não estão completamente maduras e a
27 barreira hematotesticular ainda está em formação (Clegg, 1960; Russell, 1990).

28 Nas idades especificadas, os animais foram eutanasiados com propofol (Propovan®)
29 (12,5 mg/kg de peso corpóreo) segundo recomendações do fabricante; seguida de remoção de
30 ambos os testículos para posterior avaliação.

31 **Coleta e processamento das amostras.** Nas idades especificadas, os ratos foram
32 submetidos à eutanásia e os testículos foram removidos. As amostras foram pré-fixadas por
33 imersão em Bouin e, após 30 minutos, foram hemisseccionadas. As hemisseções retornarão à
34 solução de Bouin, permanecendo por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram aparadas,

1 cortadas, desidratadas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, imersas em xilol
2 (diafanização) e incluídas em parafina. O processamento das amostras ocorreu no Laboratório
3 de Patologia Animal (LPA) do Hospital Veterinário (HV) do Centro de Saúde e Tecnologia
4 Rural (CSTR), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos,
5 Paraíba em processo semelhante ao realizado por Michalany (1998).

6 Foram obtidas secções de 5µm de cada testículo (direito/esquerdo) por meio do
7 micrótomo manual LEICA RM2125 RT e navalhas descartáveis Easy Path DURAEDGE em
8 cortes aleatórios uniformemente variados. Três secções transversais, não simultâneas e
9 equidistantes do testículo direito e outras três do esquerdo de cada animal foram coradas com
10 Hematoxilina e Eosina (HE), possibilitando a realização da avaliação morfométrica, a
11 identificação dos tipos celulares, e a análise histológica dos testículos. A primeira secção de
12 cada bloco foi obtida de maneira aleatória, as secções seguintes foram obtidas com distância de
13 25 µm entre si.

14 Uma secção do testículo direito e outra do esquerdo de cada animal foram obtidas, e
15 tratadas histoquimicamente pelo PAS-Reativo de Schiff com contra coloração pela
16 hematoxilina de Harris, possibilitando a avaliação da frequência dos estádios do ciclo do
17 epitélio seminífero.

18 **Morfometria e Análise histológica.** A avaliação morfométrica foi realizada com
19 auxílio do software IMAGE-PRO EXPRESS 6.0 em computador acoplado ao microscópio
20 binocular de luz OLYMPUS BX40 com objetiva de 20x. Foram mensurados de forma aleatória
21 200 túbulos seminíferos em corte transversal por animal (100 em cada testículo). As secções
22 testiculares foram inteiramente e sequencialmente varridas de maneira aleatória e
23 uniformemente variada, evitando-se a análise em duplicidade de uma mesma área ou predileção
24 por áreas específicas. Foram mensurados o diâmetro dos túbulos, diâmetro do lúmen tubular,
25 altura do epitélio seminífero, área do túbulo, do lúmen e do epitélio seminífero, e eixos maiores
26 (diâmetro) e menores dos túbulos seminíferos. Todos os parâmetros foram mensurados de
27 forma individual e em seguida calculada a média ponderada de cada grupo.

28 As frequências das linhagens básicas de células germinativas, e das células de Sertoli
29 foram calculadas em 100 secções tubulares por animal, sob objetiva de 100x utilizando critérios
30 estabelecidos por Leblond & Clermont (1952) e complementados por Russell et al. (1990).
31 Espermatogônia tipo A, tipo B, intermediária, espermatócitos primários, espermátides jovens,
32 espermátides tardias e células de Sertoli foram observadas. Os espermatócitos secundários não
33 foram mensurados, pois, segundo Brilhante (1999), esse tipo celular incide sob baixa frequência
34 nos túbulos seminíferos devido ao curto período de ocorrência.

1 **Avaliação do ciclo do epitélio seminífero.** A avaliação do ciclo do epitélio seminífero
2 foi realizada com foco nas células germinativas e nas células de Sertoli. Foram analisadas 200
3 secções transversais de túbulos seminíferos em cada animal dos grupos experimentais
4 eutanasiados aos 40, 64 e 127 dias de vida. Os cortes histológicos foram avaliados em
5 microscópio de bancada da marca Olympus BX41, utilizando a objetiva de 50x. As secções
6 testiculares foram observadas integralmente e em ziguezague (seis secções por animal e
7 sessenta por grupo).

8 Os critérios de classificação dos estádios foram estabelecidos por Leblond & Clermont,
9 1952 e Hess, 1990. Considerando que a identificação dos estádios I a IV é dependente de boa
10 visualização da região do acrossomo (correspondente ao aparelho de Golgi) em espermátides
11 redondas iniciais, e dada a dificuldade em diferenciar alguns estádios, os estádios II e III foram
12 agrupados devido à dificuldade de distinção entre eles, conforme Russell et al. (1990) e Wing
13 & Christensen (1982). O mesmo foi feito com os estádios XII e XIII, que segundo alguns
14 estudos, podem também ser agrupados (Hoyt et al. 1995).

15 A frequência em que se verificam os estádios foi calculada usando a fórmula (Nakai et
16 al. 2004):

$$\text{Frequência de estágio} = \frac{\text{Número de secções tubulares no estágio}}{\text{Total de secções tubulares classificadas}} \times 100$$

17
18
19
20 **Análise Estatística.** As variáveis foram confrontadas e os dados foram submetidos ao
21 teste de normalidade. As variáveis com distribuição não-paramétrica foram submetidas ao teste
22 de Kruskal Wallis. A análise foi completada com o teste de comparação múltipla (Student
23 Newman-Keuls). Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$. Os testes
24 foram realizados por meio do software Bioestat 5.0.

25 26 **RESULTADOS**

27 Nenhum animal dos grupos experimentais veio à óbito durante o experimento. De forma
28 geral, os animais permaneceram clinicamente hígidos e com características comportamentais
29 dentro do padrão de normalidade para a espécie durante o experimento. Após uma semana da
30 utilização de sulfato de vincristine, os animais dos grupos GV e GCV apresentaram alopecia
31 no local da aplicação.

32 Os resultados foram comparados por meio das médias aritméticas dos grupos GC, GV
33 e GCV. Os dados morfométricas incluíram as médias do diâmetro do túbulo seminífero, altura

1 do epitélio seminífero, diâmetro do lúmen tubular e eixo menor do túbulo seminífero dos grupos
2 GC, GV e GCV (Tabela 1).

3 Os diâmetros dos túbulos seminíferos revelaram-se diminuídos nos grupos tratados com
4 sulfato de vincristine quando comparados aos seus referentes controles. A média do grupo
5 GV127 foi 23% menor ($p=0,0001$) quando comparado ao controle de mesma idade, já o grupo
6 GCV127 reduziu 20,6% em relação ao grupo GC127 ($p=0,0003$) e 3,03% em relação ao grupo
7 GV127, mas não houve diferenças entre os grupos GCV127 e GV127 ($p=0,684$). O grupo GV64
8 apresentou diâmetro do túbulo seminífero 4,88% menor que o grupo GC64 ($p=0,0018$), já o
9 grupo GCV64 variou 0,14% em relação ao grupo GC64, não havendo diferença entre ambos
10 ($p=0,819$). A média dos túbulos seminíferos do grupo GCV64 foi 4,74% maior ($p=0,003$) em
11 relação ao grupo GV64. O grupo GV40 obteve média 12,89% menor ($p=0,0004$) que o grupo
12 GC40, já o grupo GCV40 obteve média 17,60% menor ($p=0,0001$) em relação ao grupo GC40.
13 Não houve diferença ($p=0,611$) quando comparados os grupos GCV40 e GV40, havendo
14 oscilação de 5,40%. É válido ressaltar que todos os grupos tratados com sulfato de vincristine
15 apresentaram reduções significantes ($p\leq 0,05$) do diâmetro do túbulo seminífero quando
16 comparados aos respectivos controles. Já os animais tratados com L-carnitine e sulfato de
17 vincristine eutanasiados aos 64 dias de vida não apresentaram redução em relação ao controle
18 de mesma idade.

19 A altura do epitélio seminífero reduziu em todos os animais dos grupos tratados com
20 sulfato de vincristine quando comparados aos seus respectivos controles. O grupo GV127
21 obteve médias 59,52% menores ($p=0,0001$) que o grupo controle (GC127). Já o grupo GCV127
22 apresentou altura do epitélio seminífero 31,43% menor ($p=0,006$) quando comparado ao grupo
23 GC127. Não houve diferença ($p=0,071$) em relação aos grupos GV127 e GCV127, embora
24 tenha havido oscilação de 40,97% entre esses grupos. O grupo GV64 apresentou média 22,99%
25 menor ($p=0,0001$) que o grupo GC64, o grupo GCV64 apresentou variação de 1,97% em
26 relação ao grupo GC64, não havendo diferença ($p=0,647$). Houve redução ($p=0,0003$) de
27 21,43% na altura do epitélio seminífero dos animais do grupo GV64 quando comparados ao
28 grupo GCV64. Os animais do grupo GV40 apresentaram média 21,51% menor ($p=0,0001$) que
29 o grupo GC40, já o grupo GCV40 reduziu ($p=0,0013$) 17,70% em relação ao grupo GC40. Não
30 houve diferença ($p=0,242$) quando comparados os grupos GCV40 e GV40, havendo oscilação
31 de 4,62%.

32 Houve aumento das médias dos diâmetros dos lúmens dos túbulos seminíferos nos
33 animais dos grupos tratados com sulfato de vincristine de 64 (GV64) e 127 (GV127) dias. O
34 grupo GV127 apresentou diâmetro do lúmen tubular 24,49% maior ($p=0,006$) que o grupo

1 controle de mesma idade. O grupo GCV127 não diferiu ($p=0,321$) do grupo GC127 nesta
2 variável, havendo oscilação de 4,16%. O grupo GV127 apresentou média 27,63% maior
3 ($p=0,0002$) que o grupo GCV127. O grupo GV64 teve média de diâmetro de lúmen tubular
4 20,23% maior ($p=0,006$) que o grupo GC64, o grupo GCV64 oscilou 2,81% em relação ao
5 grupo GC64, não havendo diferença ($p=0,321$). Quando comparados os grupos GCV64 e
6 GV64, houve aumento ($p=0,0005$) de 17,92% do lúmen tubular dos animais do grupo GV64.
7 Já os animais do grupo GV40 não apresentaram diferença ($p=0,416$) quando comparado ao
8 grupo GC40, havendo variação de 4,08%. Os animais do grupo GCV40 apresentaram média
9 17,39% menor ($p=0,01$) para diâmetro do lúmen tubular quando comparado ao grupo GC40,
10 quando comparado ao grupo GV40, a redução ($p=0,0007$) foi de 20,76%.

11 O eixo menor dos túbulos seminíferos do grupo GV127 reduziu ($p=0,0001$) 25,29% em
12 comparação ao grupo GC127, o grupo GCV127 reduziu ($p=0,0003$) 23,68% em relação ao
13 grupo GC127. Quando comparados os grupos GCV127 e GV127, não houve diferença
14 ($p=0,779$), com oscilação de 2,10%. Não houve diferença ($p=0,165$) quando comparados os
15 grupos GV64 e GC64, com variação numérica de 1,3%. Também não houve diferença
16 ($p=0,202$) ao comparar GC64 com GCV64, com oscilação de 2,2%. Ao comparar GV64 com
17 GCV64, não se verificou diferença ($p=0,352$), com variação numérica de 3,48%. Os animais
18 do grupo GV40 tiveram média menor ($p=0,009$) para o eixo menor do túbulo seminífero quando
19 comparado ao controle de mesma idade, com redução de 12,17%. O grupo GCV40 apresentou
20 média 19,62% menor ($p=0,0005$) o grupo GC40, já em relação ao grupo GV40 não houve
21 diferença ($p=0,36$), com variação de 8,47%.

22 As médias da área do túbulo seminífero, área do lúmen tubular e área do epitélio
23 seminífero dos grupos GC, GV e GCV estão descritas na Tabela 2.

24 A área total do túbulo seminífero apresentou forte redução ($p=0,0001$) de 41,20% no
25 grupo GV127 quando comparado ao grupo GC127. O grupo GCV127 também reduziu
26 ($p=0,0002$) 37,53% em relação ao grupo GC127. Quando comparados os grupos GCV127 e
27 GV127 não houve diferença ($p=0,839$), com oscilação de 5,87%. Os animais do grupo GV64
28 também apresentaram média 5,37% menor ($p=0,437$) que o grupo GC64, o grupo GCV64
29 variou 2,53% em relação ao grupo GC64, não havendo diferença ($p=0,477$). O grupo GCV64
30 apresentou média 7,77% maior ($p=0,0103$) para a área do túbulo seminífero em relação ao
31 grupo GV64. Os animais do grupo GV40 apresentaram média 23,72% menor ($p=0,0011$) que
32 o grupo GC40, o grupo GCV40 também reduziu ($p=0,0001$) 33,51% em relação ao grupo
33 GC40. Quando comparados GCV40 e GV40 não houve diferença ($p=0,286$), com variação de
34 12,84%.

1 A área do lúmen tubular aumentou no grupo experimental GV127 ($p=0,0035$) quando
2 comparado ao respectivo controle, com aumento de 39,63%. O grupo GCV127 não revelou
3 diferença ($p=0,274$) quando comparado ao controle de mesma idade, com variação de 14,14%.
4 Houve aumento ($p=0,0001$) de 48,17% na área do lúmen tubular dos animais do grupo GV127
5 quando comparado ao grupo GCV127. A área do lúmen tubular aumentou ($p=0,0001$) 41,21%
6 no grupo experimental GV64 quando comparado ao referente controle. O grupo GCV64
7 também não apresentou diferença ($p=0,684$) quando comparado ao seu respectivo grupo
8 controle, com oscilação de 2,94%. Quando comparados os grupos GV64 e GCV64 houve
9 aumento ($p=0,0003$) de 39,43% da área do lúmen nos animais tratados apenas com o
10 quimioterápico. Quando comparados os grupos GC40 e GV40 não houve diferença ($p=0,297$),
11 com variação de 11,18%. Porém, o grupo GCV40 apontou redução da área do lúmen tubular
12 quando comparado ao grupo GC40 ($p=0,0052$) e GV40 ($p=0,0001$), com reduções de 36,43%
13 e 43,54% respectivamente.

14 A área do epitélio seminífero reduziu em todos os grupos experimentais tratados com
15 sulfato de vincristine (GV127, GV64 e GV40) e nos grupos GCV127 e GCV40. A média da
16 área do epitélio seminífero do grupo GV127 foi 59,67% menor ($p=0,0001$) que no grupo
17 GC127. O grupo GCV127 reduziu ($p=0,0018$) 41,57% em relação ao grupo GC127. Não houve
18 diferença ($p=0,17$) quando comparados os grupos GCV127 e GV127, embora tenha havido
19 oscilação de 30,97%. Os animais do grupo GV64 tiveram média 16,99% menor ($p=0,0004$) que
20 o grupo GC64. O grupo GCV64 não diferiu ($p=0,576$) em relação ao grupo GC64, oscilando
21 2,47%. Quando comparados os grupos GCV64 e GV64, houve redução ($p=0,0001$) de 19,04%
22 da área do epitélio seminífero do grupo GV64. Os animais do grupo GV40 apresentaram médias
23 27,67% menores ($p=0,0002$) que o grupo GC40. O grupo GCV40 obteve média 33,20% menor
24 ($p=0,0001$) que o grupo GC40. Não houve diferença ($p=0,878$) quando comparados os grupos
25 GCV40 e GV40, com variação de 7,63%.

26 As frequências dos tipos celulares espermatogônia A, espermatogônia B e intermediária,
27 espermatócito primário, espermátide jovem, espermátide tardia e células de Sertoli do epitélio
28 seminífero foram apresentadas por meio de médias aritméticas dos grupos GC, GV e GCV
29 (Tabela 3).

30 Quando comparados aos grupos controles, houve uma redução na frequência dos
31 túbulos seminíferos contendo espermatogônia do tipo A em todos os grupos GV127
32 ($p=0,0001$), GV64 ($p=0,0001$) e GV40 ($p=0,0001$) tratados com sulfato de vincristine, sem que
33 houvessem indícios de recuperação do epitélio seminífero à longo prazo (127 dias), sugerindo
34 existência de danos permanentes, de caráter irreversível e cumulativo, uma vez que a redução

1 foi percentualmente maior no grupo GV127 (52,72%) que nos grupos GV64 (17,41%) e GV40
2 (19,51%).

3 As espermatogônia diferenciadas do tipo B e intermediária tiveram frequência reduzida
4 ($p=0,0001$) no grupo GV127, com decréscimo de 21,62% quando comparado ao grupo GC127.
5 O grupo GCV127 também apresentou redução ($p=0,001$) de 18,31% em relação ao controle de
6 mesma idade. Não houve diferença ($p=0,30$) quando comparados os grupos GCV127 e GV127,
7 havendo variação de 4,04%. Não foram observadas diferenças ($p=0,113$) na frequência de
8 espermatogônia do tipo B e intermediária quando comparados os grupos GV64 e GC64, com
9 oscilação de 3,13%. Não foram observadas diferenças ($p=0,099$) quando comparados os grupos
10 GCV64 e GC64, com variação de 1,93%. Também não foram observadas diferenças ($p=0,298$)
11 quando comparados os grupos GCV64 e GV64, com oscilação de 1,22%. Quando comparados
12 os grupos GV40 e GC40 ($p=0,136$); GCV40 e GC40 ($p=0,113$); e GCV40 e GV40 ($p=0,325$),
13 não foram observadas diferenças, com variações de 4,87%; 4,64%; e 0,23%, respectivamente.

14 Nesse estudo, a frequência dos espermátócitos primários em túbulos seminíferos foi
15 19,05% menor ($p=0,0001$) no grupo GV127 que no grupo GC127. O grupo GCV127 também
16 apresentou redução ($p=0,0008$) de 9,1% no número de espermátócitos primários em relação ao
17 grupo GC127. Não houve diferença ($p=0,374$) quando comparados os grupos GCV127 e
18 GV127, embora tenha havido oscilação de 10,94%. Os grupos experimentais eutanasiados aos
19 64 e 40 dias não apresentaram diferenças quando comparados aos pares respectivos.

20 Em relação às espermátides jovens verificou-se redução ($p=0,0001$) de 59,6% nos
21 animais do grupo GV127 em comparação ao grupo GC127. O grupo GCV127 apresentou
22 redução ($p=0,011$) de 49,38% em comparação ao grupo GC127. Também foram observadas
23 diferenças ($p=0,011$) quando comparados os grupos GCV127 e GV127, com variação de
24 20,18%. Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nos grupos eutanasiados aos 64 e 40 dias
25 vida, quando comparados os grupos pareados.

26 A média dos túbulos seminíferos com espermátides tardias reduziu ($p=0,0002$) 60,7%
27 no grupo GV127 quando comparado ao grupo GC127. Também houve redução ($p=0,0001$) de
28 60,9% na comparação entre os grupos GCV127 e GC127. Quando comparados os grupos
29 GCV127 e GV127 não houve diferença ($p=0,878$), com variação de 0,5%. O grupo GV64
30 apresentou redução ($p=0,0002$) de 24,43% da frequência de espermátides tardias quando
31 comparado ao grupo GC64. Também houve redução ($p=0,0001$) de 24,93% do grupo GCV64
32 quando comparado ao grupo GC64. Quando comparados os grupos GCV64 e GV64 não houve
33 diferença ($p=0,819$), com oscilação de 0,66%. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos
34 eutanasiados aos 40 dias de vida.

1 As médias dos túbulos seminíferos com células de Sertoli não apresentaram alterações
2 ($p>0,05$) nos grupos experimentais de 40 e 64 dias de vida. Porém, o grupo GV127 apresentou
3 redução ($p=0,0001$) de 8,75% quando comparado ao controle de mesma idade. O grupo
4 GCV127 não apresentou diferenças ($p=0,0505$) quando comparado ao grupo GC127, com
5 oscilação de 2,34%. Os grupos GCV127 e GV127 mostraram-se diferentes ($p=0,028$) entre si,
6 com redução de 6,56% no grupo tratado apenas com o quimioterápico.

7 Os grupos controles GC40 (Fig. 1), GC64 (Fig. 2) e GC127 (Fig. 3) apresentaram
8 características morfológicas normais. As associações celulares da linhagem germinativa,
9 caracterizando os estádios do ciclo do epitélio seminífero estavam bem definidas, sem
10 alterações celulares evidentes.

11 Formações multinucleadas oriundas de espermátides jovens, descamação do epitélio
12 seminífero com presença de restos celulares e de células da linhagem germinativa no lúmen dos
13 túbulos seminíferos e vacuolizações foram alterações morfológicas comumente observadas nos
14 testículos dos animais dos grupos GV40 (Fig. 4), GV64 (Fig. 5) e GV127 (Fig. 6) tratados com
15 sulfato de vincristine.

16 Os animais tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine também apresentaram
17 alterações histológicas semelhantes nos grupos GCV40 (Fig. 7), GCV64 (Fig. 8) e GCV127
18 (Fig. 9), todavia a intensidade foi visivelmente menor, constatação corroborada pelos dados
19 quantitativos desse estudo, que indicam amenização dos efeitos deletérios do antineoplásico
20 nos animais tratados com L-carnitine.

21 Os estádios do ciclo do epitélio seminífero foram denominados com algarismos romanos
22 (I-XIV), seguindo metodologia de trabalhos anteriores (Hess et al. 1990, Leblond & Clermont,
23 1952). As médias das frequências dos estádios do ciclo do epitélio seminífero estão dispostas
24 na Tabela 4.

25 Os animais dos grupos controles (GC127, GC64 e GC40) apresentaram associações
26 celulares bem definidas e frequências dos estádios dos túbulos seminíferos em percentuais
27 adequados para a espécie.

28 O grupo GV127 apresentou diferenças em 9 dos 12 estádios avaliados quando
29 comparado ao controle de mesma idade. Houve aumento das frequências dos estádios I, II-III,
30 IV e V, com conseqüente redução da frequência dos estádios VI, VII, VIII, XI e XII-XIII.

31 No grupo GCV127, 8 dos 12 estádios (I, II-III, IV, VI, VII, VIII, IX e XII-XIII) não
32 apresentaram diferenças em relação ao controle de mesma idade. Os estádios V e XI
33 apresentaram frequências iguais ao grupo GV127, indicando que as condições que resultaram
34 em alterações da frequência desses estádios não foram impedidas pela ação de L-carnitine. Foi

1 observado o mesmo aumento da frequência do estádio V no grupo GCV127 quando comparado
2 ao grupo GV127. No estádio XI do grupo GCV127 verifica-se queda da frequência tal qual
3 ocorreu no grupo GV127.

4 O grupo GV64 apresentou diferenças em 8 dos 12 estádios avaliados quando comparado
5 ao grupo GC64. Houve aumento da frequência nos estádios VII, IX e X, ao passo em que as
6 frequências dos estádios I, II-III, V, XII-XIII e XIV reduziram.

7 No grupo GCV64, 5 dos 12 estádios (V, VII, X, XII-XIII e XIV) não apresentaram
8 diferenças em relação ao grupo GC64. Todos os estádios do grupo GCV64 diferiram do seu
9 congênere no grupo GV64. Todavia, houve aumento das frequências dos estádios I, II-III, IV e
10 IX, acompanhadas por reduções das frequências dos estádios VI, VIII e XI quando comparado
11 ao grupo GC64.

12 O grupo GV40 apresentou diferenças em 6 dos 12 estádios avaliados quando comparado
13 ao grupo controle de mesma idade. Houve aumento nas frequências dos estádios II-III, IV e IX,
14 acompanhada da redução da frequência dos estádios VI, VIII e XII-XIII.

15 O grupo GCV40 apresentou diferenças em 6 dos 12 estádios do ciclo do epitélio
16 seminífero, com aumento na frequência dos estádios II-III, IV e IX e redução da frequência dos
17 estádios VI, VIII e XII-XIII. Apenas no estádio XII-XIII houve diferença entre os grupos
18 GCV40 e GV40, onde observa-se uma atenuação na tendência de redução no grupo GCV40.

21 DISCUSSÃO

22 Outras pesquisas utilizando L-carnitine relatam efeitos citoprotetores parciais nos
23 testículos de ratos tratados com drogas quimioterápicas, incluindo a conservação do diâmetro
24 dos túbulos seminíferos (Lirdi et al. 2008; Okada 2009; Coskun 2013; Dehghani 2013; Zhu
25 2015).

26 A redução do diâmetro dos túbulos seminíferos nos animais tratados apenas com sulfato
27 de vincristine ocorreu em consequência da redução da altura do epitélio seminífero. É válido
28 ressaltar que a redução do diâmetro dos túbulos seminíferos foi atenuada pelo aumento do
29 diâmetro do lúmen tubular.

30 Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos GC64 e GCV64,
31 corroborando indícios de que os efeitos citoprotetores de L-carnitine ocorreram principalmente
32 nos animais de 64 dias de vida. Nas fases inicial e final de observação, houve redução da altura
33 do epitélio seminífero, indicando que existe uma faixa cronológica ótima para ação
34 citoprotetora de L-carnitine contra efeitos deletérios de sulfato de vincristine.

1 As substâncias citoprotetoras geralmente apresentam mecanismo de ação que envolvem
2 a produção de compostos antioxidantes, reduzindo a interação das células normais com os
3 radicais livres produzidos pelas reações envolvendo os fármacos quimioterápicos. De outra
4 forma, os citoprotetores podem reparar o DNA nuclear de células lesionadas, identificando-as
5 através da leitura de diferenças fisiológicas existentes nas células saudáveis e ausentes nas
6 células neoplásicas. Há ainda, substâncias que interagem de forma direta com os metabólitos
7 tóxicos de alguns quimioterápicos neutralizando-os (Souza et al. 2000).

8 Ainda não se sabe exatamente como L-carnitine atua na proteção de células normais
9 expostas a ação de drogas quimioterápicas. A determinação do seu mecanismo parece ser peça
10 chave na determinação do alcance citoprotetor de L-carnitine sobre efeitos agudos e tardios de
11 sulfato de vincristine. É possível que o uso prolongado de L-carnitine venha a maximizar os
12 efeitos citoprotetores da droga (Okada 2009; Dehghani 2013).

13 O diâmetro do túbulo seminífero e a altura do epitélio seminífero são variáveis
14 quantitativas que apresentam relação direta com a produção de espermatozoides, sendo fontes
15 importantes de dados para avaliar a atividade espermatogênica de uma espécie (Amann &
16 Schanbacher 1983; Olar, Amann & Pickett 1983; Kenagy & Trombulak 1986; França &
17 Russell 1998). Desta forma, tais reduções tratam-se na verdade de um reflexo do
18 comprometimento das gônadas dos animais tratados com sulfato de vincristine, deixando claro
19 que nos ratos, os efeitos danosos do medicamento se estendem desde o período de seu uso até
20 a vida adulta.

21 Em contraponto a redução do diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais tratados
22 com sulfato de vincristine, o diâmetro do lúmen tubular aumentou nos animais dos grupos
23 experimentais de 64 e 127 dias de vida tratados apenas com o quimioterápico. A redução do
24 diâmetro do túbulo seminífero com o aumento concomitante do diâmetro luminal tubular sugere
25 uma diminuição da área ocupada pelo epitélio germinativo. O aumento do diâmetro do lúmen
26 dos túbulos seminíferos é um forte indicativo de redução populacional das células do epitélio
27 seminífero. Resultados semelhantes já foram relatados por outros autores (Vaisheva, 2007;
28 Tayefi et al. 2012).

29 Reduções do diâmetro do túbulo seminífero já foram relatadas em estudos realizados
30 com outros quimioterápicos, incluindo doxorubicina (Brilhante 1999), cisplatina (Coskun
31 2013), busulfan (Vasiliausha 2012; Dehghani 2013), etoposide (Okada 2009), e ciclofosfamida
32 (Zhu 2015), sendo considerado uma variável quantitativa importante na determinação de danos
33 testiculares causados por essa classe de fármacos.

1 Aos 127 dias e aos 40 dias de vida não foram observadas diferenças no diâmetro tubular
2 entre os animais tratados com sulfato de vincristine e o grupo tratado com L-carnitine e sulfato
3 de vincristine. Desta forma, a substância citoprotetora promoveu a conservação do diâmetro
4 dos túbulos seminíferos, da altura do epitélio seminífero e do diâmetro do lúmen do epitélio
5 seminífero apenas nos ratos de 64 dias de vida. As razões que explicam a proteção de L-
6 carnitine no grupo GCV64 estão muito provavelmente, relacionadas aos mecanismos de ação
7 da substância sobre as células submetidas as agressões do quimioterápico. Aparentemente, os
8 efeitos protetores de L-carnitine não ocorrem de maneira rápida o suficiente para conservar o
9 diâmetro dos túbulos seminíferos aos 40 dias de vida, sendo esses efeitos observados apenas
10 aos 64 dias. Ao mesmo tempo, esses efeitos protetores não perduram ao longo do tempo,
11 fazendo com que os efeitos deletérios de sulfato de vincristine ressurgam aos 127 dias de vida.

12 O grupo GCV40 apresentou redução do diâmetro do lúmen tubular em relação aos
13 grupos GC40 e GV40, segundo Zhu (2015), L-carnitine pode aumentar os índices de algumas
14 variáveis relacionados a gônada masculina, incluindo aumento nos níveis de testosterona,
15 aumento na motilidade e viabilidade dos espermatozoides com diminuição dos danos gerados
16 as células da linhagem germinativa. Desta forma, a redução do lúmen dos túbulos seminíferos
17 observada no grupo GCV40 pode estar relacionada aos efeitos benéficos causados pela L-
18 carnitine.

19 As médias dos eixos menores dos túbulos seminíferos se mostraram reduzidas nos
20 grupos experimentais GV127, GCV127, GV40 e GCV40, quando comparados aos grupos
21 controles de mesma idade. Contudo, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos
22 GC64, GV64 e GCV64. Ou seja, considerando apenas essa variável aos 64 dias, não há indícios
23 de efeitos protetores de L-carnitine sobre os túbulos seminíferos, tampouco há sinais de efeitos
24 deletérios de sulfato de vincristine. Entretanto, as demais variáveis já explicitadas indicam que
25 L-carnitine foi eficaz na conservação dos túbulos seminíferos aos 64 dias de vida.

26 Ao mesmo tempo em que se observou aumento do diâmetro do lúmen dos túbulos
27 seminíferos, os animais dos grupos experimentais de 40 e 127 dias apresentaram reduções das
28 médias dos eixos menores e do diâmetro dos túbulos seminíferos, ou seja, o espaço que deveria
29 ser ocupado por células da linhagem germinativa foi reduzido em três frentes, eixo maior
30 (diâmetro), eixo menor do túbulo seminífero com aumento do lúmen tubular. Em outras
31 palavras, os túbulos se tornaram mais finos, o diâmetro do lúmen aumentou e a altura do epitélio
32 seminífero diminuiu.

33 Cabral et al. (1997), observaram que ratos albinos pré-púberes tratados com dose
34 localizada de 600-r de raios-x, apresentaram reduções importantes no peso testicular e eixos

1 testiculares maiores e menores em animais eutanasiados aos 35, 65 e 90 dias, já os animais
2 eutanasiados com 90 e 120 dias após o tratamento apresentaram redução no diâmetro dos
3 túbulos seminíferos e volume testicular total. Os animais que foram eutanasiados dez dias após
4 o tratamento também revelaram diminuição significativa do volume testicular total,
5 demonstrando que os efeitos deletérios testiculares crônicos podem ser tão frequentes e danosos
6 quanto os efeitos agudos.

7 A redução do eixo maior (diâmetro tubular) e do eixo menor dos túbulos seminíferos
8 são considerados fortes indicativos de atrofia dos túbulos seminíferos, em decorrência da ação
9 deletéria da droga (Vaisheva, 2007; Tayefi et al. 2012). Ao mesmo tempo, observou-se que a
10 L-carnitine não conferiu proteção ao tecido testicular tubular nas fases precoce (aos 40 dias) e
11 tardia (127 dias) do desenvolvimento testicular, fato confirmado pelas variáveis analisadas
12 neste estudo. Apenas os animais eutanasiados aos 64 dias de vida demonstraram preservação
13 das variáveis em níveis semelhantes ao grupo controle.

14 A área total dos túbulos seminíferos é composta pela área do epitélio seminífero e pela
15 área do lúmen tubular. A redução da área dos túbulos seminíferos foi observada em todos os
16 grupos tratados apenas com sulfato de vincristine. Os animais dos grupos GCV127 e GCV40
17 acompanharam a tendência de redução dos grupos tratados apenas com sulfato de vincristine.
18 Todavia, o grupo GCV64 manteve média estatisticamente igual ao grupo controle de mesma
19 idade. A manutenção, em média, da área do túbulo seminífero no grupo GCV64 em relação ao
20 controle respectivo, pode estar relacionada aos efeitos citoprotetores de L-carnitine.

21 Os aumentos da área do lúmen tubular observados nos animais de 127 e 64 dias tratados
22 com sulfato de vincristine contradizem os resultados descritos por Daleck (1995), que
23 estudando os efeitos do sulfato de vincristine sobre os testículos de cães adultos observou
24 diminuição do lúmen tubular. É possível que as diferenças existentes nas abordagens dos
25 estudos, mais precisamente entre as doses ministradas e as idades em que foram efetuados os
26 tratamentos possam ter ocasionado tais disparidades, como sugerido por Bordallo (2001).

27 Os grupos GCV64 e GCV127 não apresentaram diferenças quando comparados aos
28 respectivos controles, sugerindo que os efeitos citoprotetores de L-carnitine tenham reduzido
29 os efeitos deletérios do sulfato de vincristine sobre o epitélio seminífero, atenuando o aumento
30 da área do lúmen. Já o grupo GCV40 demonstrou redução da área do lúmen, possivelmente em
31 virtude dos efeitos positivos da droga citoprotetora, como já descrito em outras pesquisas (Zhu,
32 2015).

33 Paralelamente ao decréscimo da área dos túbulos seminíferos de todos os grupos
34 experimentais tratados exclusivamente com sulfato de vincristine, a área do lúmen tubular dos

1 grupos GV64 e GV127, tratados apenas com o quimioterápico aumentaram, conseqüentemente
2 a área ocupada pelo epitélio seminífero reduziu drasticamente, fornecendo forte indício da
3 mortalidade celular causada pela ação do antineoplásico.

4 Na maior parte das variáveis morfométricas analisadas, os grupos GCV127 e
5 GCV40 não diferiram dos grupos GV127 e GV40, indicando que o epitélio seminífero não foi
6 suficientemente protegido dos efeitos danosos do quimioterápico nas fases precoce e tardia do
7 desenvolvimento testicular. Todavia, o grupo GCV64 apresentou médias estatisticamente
8 iguais ao grupo controle de mesma idade em quase todas as variáveis morfométricas,
9 demonstrando eficácia de L-carnitine nesse interstício de tempo de maturação testicular (49
10 dias após a aplicação). Esta constatação sugere que a L-carnitine possui efeito citoprotetor
11 limitado, que se expressa mais precisamente a médio prazo, mas que declina em prazos maiores
12 de sua utilização.

13 Os resultados desse trabalho corroboram parte com os estudos realizados por Joshi &
14 Ambaye (1968), que ao analisar os efeitos de vinca rosea sobre os testículos de ratos, observou
15 danos às células da linhagem germinativa, principalmente espermatogônia indiferenciadas do
16 tipo A, sendo esse um dos tipos celulares mais danificados pelo quimioterápico.

17 Hodel et al. (1984) analisaram testículos de ratos tratados com procarbazina, sulfato de
18 vincristine e busulfan e relataram reduções de pesos testiculares em todos os animais
19 submetidos ao tratamento, sendo consequência direta da morte e perda de células da linhagem
20 germinativa dos túbulos seminíferos.

21 Segundo Parvinen et al. (1978), ratos tratados com altas doses de sulfato de vincristine
22 podem apresentar destruição das células de Sertoli através de depleção dos seus microtúbulos
23 e mitocôndrias. Além disso, observou-se uma paralisação dos processos de divisão celular
24 (mitose e meiose) seguida de morte das células da linhagem germinativa.

25 Reduções significativas do peso testicular e do diâmetro dos túbulos seminíferos
26 verificadas em animais tratados com radiação estão possivelmente ligadas a perdas de células
27 do epitélio seminífero, sobretudo das células da linhagem germinativa (Monesi, 1962).

28 Murugavel & Akbarsha (1991) analisaram os efeitos anti-espermatogênicos do
29 extrato da planta vinca rosea e concluíram que o princípio ativo, a vincristina causava
30 degeneração testicular com conseqüente atrofia dos túbulos seminíferos e danos as células de
31 Leydig.

32 Magelssen et al. (2006) afirmaram que a maioria dos pacientes portadores de
33 doença de Hodgkin torna-se azoospermicos após o tratamento combinado de mitoxantrona,

1 sulfato de vincristine, vimblastina e prednisona, porém, níveis pré-tratamento podem ser
2 restabelecidos em alguns pacientes.

3 É provável que as células multinucleadas tenham sofrido danos no seu DNA decorrente
4 da ação de sulfato de vincristine, essa alteração foi observada de maneira recorrente no grupo
5 GV40. Nos casos onde essas células entraram em apoptose, os restos celulares depositaram-se
6 no lúmen, a descamação do epitélio seminífero com acúmulo de restos celulares no lúmen
7 tubular foi uma alteração comumente observada no grupo GV64. A morte ou desprendimento
8 em massa das células da linhagem germinativa resultou na abertura de espaços (vacúolos) no
9 epitélio seminífero, essas alterações eram pouco frequentes no grupo GV40, mas foram ficando
10 mais comuns no grupo GV64 e atingiram seu ápice no grupo GV127, onde em algumas secções
11 tubulares não haviam células da linhagem germinativa presentes na parede.

12 Aglomerados de células germinativas e de restos celulares no lúmen dos túbulos
13 seminíferos originam-se do processo de descamação do epitélio seminífero. Tal descamação
14 provém da ação citotóxica de sulfato de vincristine sobre as células do epitélio seminífero.
15 Nesse estudo, descamação do epitélio seminífero foi observada nos animais do grupo tratado,
16 principalmente o grupo GV64, nesse grupo, chama a atenção a existência de espaços entre as
17 células da linhagem germinativa, indicando que o mecanismo de adesão as células de Sertoli
18 foi comprometido. O fato das espermatídes jovens soltas no lúmen tubular estarem com
19 morfologia aparentemente normal robustece a ideia de comprometimento da célula de Sertoli e
20 do seu mecanismo de adesão celular. Mais estudos são necessários para determinar se o
21 comprometimento das estruturas de sustentação do epitélio seminífero ocorre por parte das
22 células germinativas, por lesão as células de Sertoli ou por comprometimento de ambos os tipos
23 celulares. Os animais do grupo GV127 apresentaram danos severos ao epitélio seminífero,
24 intensa vacuolização e descaracterização dos tipos celulares.

25 Diversos estudos constataram a ocorrência de células gigantes, vacuolizações e
26 descamação de células do epitélio seminífero em testículos de ratos tratados com sulfato de
27 vincristine e outros antineoplásicos (Daleck et al. 1995; Nolte 1995; Cabral et al. 1997;
28 Vendramini et al. 2010; Vendramini et al. 2012; Veloso et al. 2018).

29 As associações celulares bem definidas e frequências dos estádios dos túbulos
30 seminíferos em percentuais observadas nos grupos controle são semelhantes a outras pesquisas
31 (Hess et al. 1990; Brilhante et al. 2012,). As oscilações encontradas ao comparar estudos
32 diferentes podem ser atribuídas a variações individuais e de linhagem dos animais integrantes
33 dos grupos experimentais (Leblond & Clermont 1952, Hess et al. 1990).

1 No grupo GV127, é notório um grave retardo do ciclo do epitélio seminífero com
2 represamento de grande parte dos túbulos seminíferos nos cinco primeiros estádios, sobretudo
3 no estágio I, com queda gradual da frequência nos estádios seguintes, sobretudo o estágio VIII,
4 e poucas secções conseguindo evoluir para os estádios finais.

5 Curiosamente, o grupo GCV127 foi o único a apresentar aumento da frequência dos
6 estádios X e XIV, é possível que as interferências do sulfato de vincristine sobre o ciclo do
7 epitélio seminífero se comportem de maneira distinta quando na presença do citoprotetor,
8 fazendo com que se manifestem em outros momentos do ciclo.

9 Aos 64 dias de vida, aparentemente o retardo do ciclo do epitélio seminífero é observado
10 nos últimos estádios do ciclo, com conseqüente redução da frequência dos estádios iniciais. No
11 rato, o ciclo do epitélio seminífero dura entre 12 a 13 dias para se completar, já a
12 espermatogênese dura entre 48 e 53 dias, o que corresponde a cerca de 4 ciclos compreendendo
13 desde a formação de células germinativas na base do epitélio até a sua liberação no lúmen dos
14 túbulos, esse processo é considerado uma constante biológica (Leblond & Clermont. 1952;
15 Hess 1990).

16 No grupo GV64, é provável que grande parte das células presentes nos túbulos
17 seminíferos já existissem no momento da aplicação do quimioterápico aos 15 dias de vida, na
18 forma de espermatócitos primários e espermátides jovens, tornando essas células alvo da ação
19 direta da droga. Todavia, no grupo GV127 apenas as células precursoras e células de Sertoli
20 permaneceram presentes desde o momento da administração da droga até o dia da eutanásia.
21 Provavelmente, a maioria das células do epitélio germinativo avaliadas aos 127 dias de vida
22 apresentaram apenas efeitos indiretos e sequelas da ação de sulfato de vincristine, uma vez que
23 essas células se originaram a partir da divisão das células tronco dias após a aplicação da droga.
24 Talvez, por essa razão, as frequências dos estádios do ciclo sejam tão diferentes quando
25 comparados os grupos GV64 e GV127. Ademais, com o passar dos dias, o próprio avanço da
26 espermatogênese e dos estádios do ciclo podem mudar consideravelmente os estádios onde se
27 observa retardo do processo e estádios com baixa frequência.

28 No geral, é possível perceber que houve uma distribuição mais equânime das
29 frequências dos estádios do grupo GCV64 quando comparado ao grupo GV64, muito embora
30 a quantidade estádios cuja frequência está alterada se equivale nesses dois grupos.

31 Aos 64 dias de vida, alguns estádios do ciclo do epitélio seminífero dos animais tratados
32 com L-carnitine apresentaram diferença em relação aos demais grupos de mesma idade. Neste
33 caso, a diferença se refere tanto ao grupo tratado, como ao grupo controle. Considerando que a
34 diferença ocorreu em comparação a ambos os grupos, não há como inferir com exatidão se a

1 ação protetora da L-carnitine contribuiu para a alteração das frequências dos estádios no ciclo
2 do epitélio seminífero aos 64 dias. Contudo, é possível que a proteção conferida por L-carnitine
3 tenha incidido nos mecanismos desencadeadores dos efeitos deletérios de sulfato de vincristine,
4 impedindo momentaneamente a deflagração das alterações, a longo prazo, essas alterações se
5 manifestam em tempos diferentes do ciclo do epitélio seminífero em relação ao grupo tratado
6 exclusivamente como antineoplásico. Resta explícita a necessidade de mais estudos que
7 determinem com exatidão a forma como L-carnitine confere proteção as células do epitélio
8 seminífero e as células de Sertoli.

9 Aos 127 dias, os efeitos citoprotetores de L-carnitine são mais evidentes quando se
10 observa o número de estádios cuja frequência manteve-se igual ao grupo controle. Portanto, os
11 resultados dessa pesquisa indicam que L-carnitine fornece alguma proteção aos testículos
12 tratados com sulfato de vincristine na fase pré-púbere e avaliados nas fases púbere e adulta.

13 Aos 40 dias de vida, assim como observado aos 127 dias de vida, é observado uma
14 tendência de retardo do ciclo com represamento das células da linhagem germinativa nos
15 primeiros estádios, e concomitante redução da frequência de alguns dos últimos estádios do
16 ciclo do epitélio seminífero. É válido ressaltar que ocorreram bem menos alterações nas
17 frequências dos estádios aos 40 dias de vida se comparado as idades mais avançadas, indicando
18 que os efeitos deletérios de sulfato de vincristine não só perduram no tempo como também se
19 agravam sobre a dinâmica espermatogênica.

20 Quando comparado ao grupo GC40 e GCV40, o grupo GV40 se destaca por revelar uma
21 pequena quantidade de secções tubulares com as espermátides alongadas, em alguns casos eram
22 inexistentes. Considerando as associações celulares usuais do ciclo do epitélio seminífero, em
23 vários túbulos seminíferos as espermátides jovens não estavam presentes, em outras secções,
24 as espermátides eram binucleadas. As alterações celulares dificultaram sobremaneira a
25 identificação dos estádios. Independentemente da idade, foram desconsideradas as secções cuja
26 perda de elementos celulares ou sua descaracterização impediu a identificação do estádio do
27 ciclo. Processo semelhante foi feito no grupo GV127, cujas secções apresentaram grau
28 avançado de perda celular. É possível que a supressão dessas secções tenha amortizado o real
29 impacto de sulfato de vincristine sobre o ciclo do epitélio seminífero dos grupos GV40 e
30 GV127, uma vez que os túbulos seminíferos mais danificados, que provavelmente incidiriam
31 num maior retardo da espermatogênese, não puderam ser incluídos no cálculo de frequência.

32 Os resultados observados no grupo GCV40 indicam que L-carnitine não foi eficaz na
33 preservação da frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero aos 40 dias de vida,
34 muito embora essa tenha sido a idade em que os efeitos do quimioterápico tenham sido mais

1 suaves, muito provavelmente devido ao tempo menor entre o dia de aplicação das drogas e a
2 idade da coleta das amostras (25 dias) quando comparado aos demais grupos experimentais.

3 O sincronismo do ciclo do epitélio seminífero é mantido por uma delicada relação de
4 dependência funcional mútua, existente entre as células de Sertoli e as células da linhagem
5 germinativa. Lesões nas células germinativas podem ocasionar danos funcionais indiretos as
6 células de Sertoli (Skinner & Griswold 1980; Djakiew & Dym 1988; Pineau et al. 1993), o
7 inverso também é verdadeiro por razões mais evidentes, como desestabilização da barreira
8 hematotesticular, falhas no transporte de nutrientes e outras substâncias necessárias a fisiologia
9 testicular (Abel et al., 2008; Johnson et al. 2008; Papaioannou et al. 2009; Alves et al. 2013).

10 Componentes produzidos pelas células germinativas testiculares podem estar
11 envolvidos na regulação da função das células de Sertoli (Han et al. 1993; Foucault et al. 1994),
12 de tal modo que alterações do epitélio germinativo culminam em mudanças funcionais das
13 células de Sertoli (Abel et al. 2008, Brilhante et al. 2012, Okada et al. 2020).

14 L-carnitine é uma substância encontrada em altas concentrações em células de Sertoli,
15 espermatozoides e células epididimárias, essa concentração aparenta ser diretamente
16 proporcional as variáveis quantitativas do espermograma, havendo melhora desses parâmetros
17 em pacientes inférteis tratados com L-carnitine (Enomoto et al. 2002; Lenzi et al. 2003). Neste
18 estudo, animais tratados previamente com L-carnitine demonstraram redução qualitativa e
19 quantitativa das alterações do ciclo do epitélio seminífero quando comparados ao grupo tratado
20 exclusivamente com sulfato de vincristine.

21 O sulfato de vincristine liga-se a proteína tubulina causando sua precipitação e
22 paralisação do ciclo celular na fase M (Frei et al. 1964). A espermatogênese consiste nas fases
23 germinativas, de crescimento, maturação e diferenciação. As fases germinativa e de maturação
24 incluem sucessivas divisões mitóticas e meióticas, por parte das espermatogônia e dos
25 espermatócitos respectivamente, que perduram por todas as fases do ciclo do epitélio seminífero
26 (Holstein et al. 2003). Desta forma, é plausível supor que os efeitos deletérios de sulfato de
27 vincristine se estenderão em maior ou menor grau por todos os estádios do ciclo, sendo
28 espermatogônia e espermatócitos primários mais suscetíveis as agressões diretas da droga. Não
29 obstante, o tratamento quimioterápico pode resultar em outras condições teciduais capazes de
30 lesionar e induzir morte celular, como produção de radicais livres (Lin et al. 2002) e
31 peroxidação lipídica (Martins et al. 2011). Outrossim, o meio intratubular é mantido por uma
32 delicada relação de dependência funcional mútua entre os diferentes tipos celulares, tornando
33 as agressões indiretas tão prejudiciais a espermatogênese quanto a ação direta da droga. Desta

1 forma, até mesmo células que já concluíram o processo de divisão como espermatídes e células
2 de Sertoli podem sofrer danos pelo sulfato de vincristine.

3 As multiplicações e diferenciações sucessivas da linhagem germinativa tornam as
4 células tronco e células precursoras essenciais para a manutenção do processo cíclico. De tal
5 forma que agressões incontornáveis que, no entanto, não induzam a morte celular imediata,
6 resultam na extensão de possíveis erros celulares às fases seguintes de multiplicação e
7 diferenciação. Danos as espermatogônia e espermatócitos primários podem gerar sequelas que
8 muitas vezes impactam gravemente a frequência dos estádios do ciclo a longo prazo.

9 Nesta pesquisa, é importante considerar que no momento de aplicação de sulfato de
10 vincristine, as células de Sertoli e a própria barreira hematotesticular estavam passando por
11 fases sensíveis de desenvolvimento, tornando-as mais suscetível a ocorrência de danos
12 primários causados pelo quimioterápico, bem como aumentando a exposição das células
13 germinativas a ação do antineoplásico. No rato, a multiplicação das células de Sertoli encerra
14 aos 15 dias de vida (Clermont & Perey 1957), e a barreira hemato-testicular começa a se formar
15 (Vitale et al. 1973; Weber et al. 2002), a gônada masculina é altamente suscetível as agressões
16 no período pré-púbere, empregado nessa pesquisa.

17 Nos animais tratados apenas com sulfato de vincristine, a vacuolização, retenção de
18 espermatídes e núcleos de células de Sertoli onde o nucléolo não era visível, foram alterações
19 observadas nessa pesquisa que sugerem grave dano as células de Sertoli, independentemente
20 da apoptose das células germinativas. Todavia, há também a possibilidade de lesões na barreira
21 hematotesticular, mediadas pela ação de radicais livres e peroxidação lipídica produzidos pelo
22 sulfato de vincristine (Cao et al. 2017a; Ye et al. 2019; Jiang et al. 2020), que por conseguinte
23 exporiam as células germinativas a ação deletéria do antineoplásico.

24 A espermatogênese é o processo de formação das células gaméticas masculinas, que se
25 dá por meio de uma atividade cíclica do epitélio seminífero por meio de mitoses, meioses e
26 diferenciação das células da linhagem germinativa. O ciclo do epitélio seminífero é um processo
27 meticulosamente orquestrado pelas células de Sertoli, cujas mudanças na sua função e
28 morfologia atendem as necessidades do processo espermatogênico, possibilitando sustentação
29 ao epitélio germinativo e o sincronismo dos estádios do ciclo, caracterizados por associações
30 específicas de células germinativas. Desta forma, alterações das células de Sertoli podem gerar
31 falhas no sincronismo e na evolução sucessiva dos estádios, promovendo alterações no ciclo
32 como um todo. Ademais, despreendimento das células do epitélio germinativo também pode ser
33 sequela dos danos as células de Sertoli, uma vez que sua base de sustentação foi comprometida
34 (Russel 1990).

1 Alterações do ciclo do epitélio seminífero já foram descritas como efeitos de 1,3
2 dinitrobenzeno (Hess et al. 1988) e 2,5 hexanodiona (Chapin et al. 1983), substâncias
3 reconhecidamente tóxicas para as células de Sertoli (Blackburn et al. 1988; Boekelheide et al.
4 2003). Outros estudos sugerem toxicidade de quimioterápicos para células germinativas e
5 células de Sertoli, incluindo etoposide (Stumpp et al. 2006; Okada et al. 2009, Okada et al.
6 2020), doxorubicina (Brilhante et al. 2012), vincristina (Nikpour & Rad 2016; Nikpour et al.
7 2018), vimblastina (Parvinen et al. 1978), cisplatina (Wang et al. 2015), busulfan (Xian et al.
8 2017) e ciclofosfamida (Liu et al. 2012; Cao et al. 2017b). Com efeito, alterações das células de
9 Sertoli sugerem danos celulares consideravelmente mais graves do que efeitos primários e
10 secundários decorrentes da morte de células germinativas, sobretudo quando se considera a
11 ausência de reposição das células de Sertoli após a maturidade sexual, tornando as sequelas
12 definitivas para a espermatogênese.

13 Rosenthal (1981) descreveu retardo da espermatogênese em animais tratados com
14 sulfato de vincristine, levando a crer que os efeitos deletérios da droga sobre as células da
15 linhagem germinativa se manifestem de forma tardia sobre o ciclo do epitélio seminífero.

16 A inativação ou retardo do desenvolvimento das células de Sertoli devido aos efeitos
17 deletérios dos quimioterápicos pode resultar em alterações funcionais da célula, contribuindo
18 sobremaneira para alterações do ciclo do epitélio seminífero (Maymon et al. 2004),
19 comprometendo a espermatogênese. Nesse estudo, o atraso ou interrupção da diferenciação das
20 células de Sertoli esclarece em parte, o aumento significativo da frequência dos primeiros
21 estádios do ciclo e a redução dos últimos estádios nos grupos tratados de 40 e 127 dias, quando
22 comparado aos grupos controle de mesma idade (Russell et al. 1993). Tendência inversa foi
23 observada aos 64 dias de vida, onde os últimos estádios do ciclo apresentaram aumento da
24 frequência em detrimento dos primeiros estádios, natureza cíclica da espermatogênese e as
25 diferenças cronológicas existentes entre as idades avaliadas e o tempo de aplicação das drogas
26 estão provavelmente relacionados a esta diferença (Leblond & Clermont 1952; Hess, 1990;
27 Brilhante et al. 2012).

28 Nesta pesquisa, é possível que frequências dos estádios tenham sido alteradas devido à
29 ação direta do sulfato de vincristine sobre as células de Sertoli, muito embora danos diretos as
30 células germinativas já tenham sido descritas (Zhang & Sun 1992; Brandriff et al. 1994), sendo
31 esta uma possibilidade concreta, sobretudo aos 40 dias de vida. Ademais, a administração de
32 sulfato de vincristine em fase pré-púbere parece ser fator decisivo na intensidade e perpetuação
33 das lesões, principalmente ao se considerar o processo natural de maturação das células de
34 Sertoli.

1 Nesta pesquisa, os animais tratados previamente com L-carnitine apresentaram menor
 2 retardo do processo espermatogênico que os animais tratados exclusivamente com o
 3 antineoplásico, sem, no entanto, equiparar-se ao ciclo normal do epitélio seminífero observado
 4 nos grupos controle. Embora não se saiba exatamente por quais mecanismos L-carnitine
 5 desempenha seus efeitos citoprotetores, diversas hipóteses e teorias tem sido levantadas nos
 6 mais distintos grupos de pesquisa, incluindo inibição de caspases desencadeadoras da apoptose
 7 (Mutomba et al. 2000; Vescovo et al. 2002), alteração da permeabilidade da membrana celular
 8 como forma de isolamento interno das células (Arrigoni-Martelli & Caso 2001), aumento da
 9 geração de energia potencializando a capacidade de restauração do DNA (Amendola et al.
 10 1991) e efeito antioxidante da substância, impedindo a formação de radicais livres capazes de
 11 lesionar o DNA e induzir apoptose celular (Solarska et al. 2010).

12 Independente do mecanismo de ação, os efeitos citoprotetores de L-carnitine já foram
 13 descritos em diversos tipos celulares submetidos e diferentes agentes agressores, físicos e
 14 químicos, incluindo outras drogas quimioterápicas (Shug et al. 1991; Revoltella et al. 1994;
 15 Topcu-Tarladacalisir et al. 2009; Kanter et al. 2010; Zare et al. 2011; Ahmed et al., 2014,
 16 Salama et al. 2015; Cabral et al. 2018; Khushboo et al. 2018; Yaman & Topcu-Tarladacalisir
 17 2018).

18 É necessário considerar a possibilidade de dano indireto as células de Sertoli em
 19 decorrência de lesões as células germinativas, entretanto, a administração de sulfato de
 20 vincristine em fase pré-púbere associado as alterações histológicas observadas sugerem dano
 21 direto as células de Sertoli. A L-carnitine reduziu os danos causados por sulfato de vincristine
 22 ao epitélio seminífero, garantindo relativa continuidade do processo espermatogênico na
 23 medida em que os estádios do ciclo continuaram ocorrendo em frequência mais similar aos
 24 grupos controle de mesma idade quando comparados aos animais tratados exclusivamente com
 25 o quimioterápico.

26 **CONCLUSÃO**

27 Nesta pesquisa, tornou-se evidente que o sulfato de vincristine apresenta citotoxicidade
 28 para o epitélio seminífero, alterando parâmetros morfométricos e histológicos do testículo, além
 29 de alterar significativamente as frequências de vários estádios do ciclo do epitélio seminífero
 30 nas três idades estudadas, como retardo do ciclo nos primeiros estádios aos 40 e 127 dias e
 31 retardo do ciclo nos últimos estádios do ciclo do epitélio seminífero aos 64 dias de vida. Os
 32 efeitos estão intimamente relacionados com o estágio reprodutivo em que se efetua a avaliação.

33 É plausível considerar que a administração crônica de L-carnitine seja benéfica na
 34 mitigação dos efeitos deletérios tardios de sulfato de vincristine, sobretudo quando se considera

1 o tratamento de pacientes na fase pré-púbere, na qual a gônada masculina está vulnerável a
2 penetração de substâncias exógenas cuja atividade sob as células do parênquima testicular se
3 estende ao longo do tempo. Mais estudos são necessários para determinar a patogênese das
4 lesões observadas nessa pesquisa, assim como os mecanismos pelos quais L-carnitine confere
5 sua proteção, informação crucial para elaboração de protocolos clínicos que maximizem seus
6 efeitos sobre os tecidos submetidos a quimioterapia.

7

8 **Declaração de conflito de interesse** - Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

9

10 REFERÊNCIAS

11

12 Abel M.H., Baker P.J., Charlton H.M., Monteiro A., Verhoeven G., De Gendt K., Guillou F. &
13 O'Shaughnessy P.J. 2008. Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell
14 receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology*, 149(7), 3279-3285.
15 <<https://doi.org/10.1210/en.2008-0086>>

16

17 Adão R., de Keulenaer G., Leite-Moreira A. & Brás-Silva C. 2013. Cardiotoxicidade associada à
18 terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. *Revista*
19 *Portuguesa de Cardiologia*, 32(5), 395-409. <<https://doi.org/10.1016/j.repc.2012.11.002>>

20

21 Ahmed M.M., Ibrahim Z.S., Alkafafy M. & El-Shazly S.A. 2014. L-carnitine protects against
22 testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. *Acta histochemica*, 116(6), 1046-
23 1055. <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.04.010>>

24

25 Almeida V.L.D., Leitão A., Reina L.D.C.B., Montanari C.A., Donnici C.L. & Lopes M.T.P. 2005.
26 Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que
27 interagem com o DNA: uma introdução. *Química nova*, 28, 118-129.
28 <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>>

29

30 Alves M.G., Rato L., Carvalho R.A., Moreira P.I., Socorro S. & Oliveira P.F. 2013. Hormonal
31 control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cellular and molecular life*
32 *sciences*, 70(5), 777-793. <<https://doi.org/10.1007/s00018-012-1079-1>>

33

- 1 Amann R.P. & Schanbacher B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of animal*
2 *science*, 57(2), 380-403. <https://doi.org/10.2527/animalsci1983.57Supplement_2380x>
3
- 4 Arrigoni-Martelli E. & Caso V. 2001. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls
5 from xenobiotics. *Drugs under experimental and clinical research*, 27(1), 27-49.
6 <PMid:11276827>
7
- 8 Boekelheide K., Fleming S.L., Allio T., Embree-Ku M.E., Hall S.J., Johnson K.J. & Thompson
9 S. 2003. 2, 5-Hexanedione-induced testicular injury. *Annual review of pharmacology and*
10 *toxicology*, 43(1), 125-147. <<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135930>> <
11 PMid:12471174>
12
- 13 Blackburn D.M., Gray A.J., Lloyd S.C., Sheard C.M. & Foster P.M. 1988. A comparison of the
14 effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rat. *Toxicology and applied*
15 *pharmacology*, 92(1), 54-64. <[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(88\)90227-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(88)90227-X)>
16
- 17 Brandão H.N., David J.P., Couto R.D., Nascimento J.A. & David J.M. 2010. Química e
18 farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química nova*, 33,
19 1359-1369. <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026>>
20
- 21 Brandriff B.F., Meistrich M.L., Gordon L.A., Carrano A.V. & Liang J.C. 1994. Chromosomal
22 damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP (nitrogen mustard,
23 vincristine, procarbazine, and prednisone) therapy with and without radiotherapy. *Human*
24 *genetics*, 93(3), 295-299. <<https://doi.org/10.1007/BF00212026>>
25
- 26 Brilhante ODS 1999. Estudo morfométrico e estereológico dos testículos de ratos albinos,
27 imaturos sexualmente, tratados subcronicamente com doxorubicina. Dissertação de Mestrado,
28 Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
29
- 30 Brilhante O., Okada F.K., Sasso-Cerri E., Stumpp T. & Miraglia S.M. 2012. Late morfofuncional
31 alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats.
32 *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-16. <[https://doi.org/10.1186/1477-7827-](https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-79)
33 [10-79](https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-79)>
34

- 1 Bordallo M.A.N., Guimarães M.M., Carriço M.K. & Dobbin J. 2001. Função gonadal de
2 sobreviventes de doença de Hodgkin tratados na infância e adolescência com quimioterapia.
3 Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 45, 87-95.
4 <<https://doi.org/10.1590/S0004-27302001000100012>>
5
- 6 Cabral MDGB, Hayashi H & Miraglia SM. 1997. Histomorphometry of sexually immature albino
7 rat testis after X ray-irradiation. Interciencia. Repositório institucional da Universidade Federal
8 de São Paulo, São Paulo. (Resumo)
9
- 10 Cabral R.E.L., Mendes T.B., Vendramini V. & Miraglia S.M. 2018. Carnitine partially improves
11 oxidative stress, acrosome integrity, and reproductive competence in doxorubicin-treated rats.
12 Andrology, 6(1), 236-246. <<https://doi.org/10.1111/andr.12426>>
13
- 14 Cao X.N., Shen L.J., Wu S., Yan C., Zhou Y., Xiong G., Wang Y.C., Liu Y., Liu B., Tang X.L.,
15 Guo M., Liu D.Y., Long C.L., Sun M., He D.W., Lin T. & Wei G.H. 2017a. Urban fine
16 particulate matter exposure causes male reproductive injury through destroying blood-testis
17 barrier (BTB) integrity. Toxicology letters, 266, 1-12.
18 <<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.004>>
19
- 20 Cao Y., Wang X., Li S., Wang H., Yu L. & Wang P. 2017b. The effects of l-carnitine against
21 cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis. Basic & clinical pharmacology &
22 toxicology, 120(2), 152-158. <<https://doi.org/10.1111/bcpt.12679>>
23
- 24 Chapin R.E., Morgan K.T. & Bus J.S. 1983. The morphogenesis of testicular degeneration
25 induced in rats by orally administered 2, 5-hexanedione. Experimental and molecular
26 pathology, 38(2), 149-169. <[https://doi.org/10.1016/0014-4800\(83\)90082-5](https://doi.org/10.1016/0014-4800(83)90082-5)>
27
- 28 Clegg E.J. 1960. The age at which male rats become fertile. Journal of reproduction and fertility,
29 1, 119-120.
30
- 31 Clermont Y. & Perey B. 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous
32 tubules in immature rats. American Journal of Anatomy, 100(2), 241-267.
33 <<https://doi.org/10.1002/aja.1001000205>>
34

- 1 Coşkun N., Hatipoğlu M.T., Özoğul C., Korkmaz C., Akyol S.N., Mıcılı S.C., Arik S.G. &
2 Erdoğan D. 2013. The protective effects of acetyl L-carnitine on testis gonadotoxicity induced
3 by cisplatin in rats. *Balkan medical journal*, 30(2), 235. <[https://doi.org/](https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2013.7340)
4 10.5152/balkanmedj.2013.7340> <PMid: 25207106>
5
- 6 Costa-Lotufo L.V., Montenegro R.C., Alves A.P.N., Madeira S.V.F., Pessoa C., Moraes M.E.A.
7 & Moraes M.O. 2010. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos
8 anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade
9 Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, 2(1), 47-58. <[https://doi.org/10.5935/1984-](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100006)
10 6835.20100006>
11
- 12 Daleck C.R., Franceschini P.H., Padilha Filho J.G., Alessi A.C., Garcia J.M., Martins M.I.M. &
13 da Costa Neto J.M. 1995. Alterações produzidas a nível de testículo e sêmen de cães submetidos
14 à administração de sulfato de vincristina. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal*
15 *Science*, 32(1), 51-56. <<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.1994.52090>>
16
- 17 Djakiew D. & Dym M. 1988. Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function.
18 *Biology of reproduction*, 39(5), 1193-1205. <<https://doi.org/10.1095/biolreprod39.5.1193>>
19
- 20 Enomoto A., Wempe M.F., Tsuchida H., Shin H.J., Cha S.H., Anzai N., Goto A., Sakamoto A.,
21 Niwa T., Kanai Y., Anders M.W. & Endou, H. 2002. Molecular Identification of a Novel
22 Carnitine Transporter Specific to Human Testis: insights into the mechanism of carnitine
23 recognition* 210. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36262-36271.
24 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M203883200>>
25
- 26 Faro A.M., Daleck C.R., Santana A.E., Nardi A.B., Motta F.R. & Eurides D. 2008. Avaliação
27 hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina,
28 prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. *Ars Veterinaria*, 24(1), 001-008.
29 Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, São Paulo.
30
- 31 Foucault P., Drosdowsky M.A. & Carreau S. 1994. Andrology: Germ cell and Sertoli cell
32 interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Human*
33 *Reproduction*, 9(11), 2062-2068. <<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138394>>
34

- 1 França L.R. & Russell L.D. 1998. The testis of domestic animals. Male reproduction: a
2 multidisciplinary overview, 197, 219.
3
- 4 Frei E., Whang J., Scoggins R.B., Van Scott E.J., Rall D.P. & Ben M. 1964. The stathmokinetic
5 effect of vincristine. *Cancer research*, 24(11 Part 1), 1918-1925.
6
- 7 Han I.S., Sylvester S.R., Kim K.H., Schelling M.E., Venkateswaran S., Blanckaert V.D.,
8 McGuinness M.P. & Griswold M.D. 1993. Basic fibroblast growth factor is a testicular germ
9 cell product which may regulate Sertoli cell function. *Molecular Endocrinology*, 7(7), 889-897.
10 <<https://doi.org/10.1210/mend.7.7.8413313>>
11
- 12 Hess R.A. 1990. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the
13 cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and
14 plastic-embedded testes. *Biology of reproduction*, 43(3), 525-542.
15 <<https://doi.org/10.1095/biolreprod43.3.525>>
16
- 17 Hess R.A., Linder R.E., Strader L.F. & Perreault S.D. 1988. Acute effects and long-term sequelae
18 of 1, 3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat ii. quantitative and qualitative
19 histopathology of the testis. *Journal of andrology*, 9(5), 327-342.
20 <<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1988.tb01057.x>>
21
- 22 Hodel C., Ettlin R.A. & Zschauer A. 1984. Morphological changes produced in rat testis by
23 anticancer drugs. In *Disease, Metabolism and Reproduction in the Toxic Response to Drugs*
24 *and Other Chemicals* (pp. 147-150). Springer, Berlin, Heidelberg.
25 <https://doi.org/10.1007/978-3-642-69132-4_18>
26
- 27 Holstein A.F., Schulze W. & Davidoff M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite
28 for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 1-16.
29 <<https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-107>>
30
- 31 Jiang Y.P., Ye R.J., Yang J.M., Liu N., Zhang W.J., Ma L., Sun T., Niu J.G., Zheng P. & Yu, J.Q.
32 2020. Protective effects of Salidroside on spermatogenesis in streptozotocin induced type-1
33 diabetic male mice by inhibiting oxidative stress mediated blood-testis barrier damage.
34 *Chemico-biological interactions*, 315, 108869. <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108869>>

1

2 Johnson L., Thompson Jr D.L. & Varner D.D. 2008. Role of Sertoli cell number and function on
3 regulation of spermatogenesis. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 23-51.
4 <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.029>>

5

6 Joshi M.S. & Ambaye R.Y. 1968. Effect of alkaloids from *Vinca rosea* L. on spermatogenesis in
7 male rats. *Indian journal of experimental biology*, 6(4), 256-257. <PMid: 5720688>

8

9 Kanter M., Topcu-Tarladacalisir Y. & Parlar S. 2010. Antiapoptotic effect of L-carnitine on
10 testicular irradiation in rats. *Journal of molecular histology*, 41(2-3), 121-128.
11 <<https://doi.org/10.1007/s10735-010-9267-5>>

12

13 Kenagy G. J. & Trombulak S.C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body
14 size. *Journal of Mammalogy*, 67(1), 1-22. <<https://doi.org/10.2307/1380997>>

15

16 Khushboo M., Murthy M.K., Devi M.S., Sanjeev S., Ibrahim K.S., Kumar N.S., Roy K.V. &
17 Gurusubramanian, G. 2018. Testicular toxicity and sperm quality following copper exposure in
18 Wistar albino rats: ameliorative potentials of L-carnitine. *Environmental Science and Pollution*
19 *Research*, 25(2), 1837-1862. <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0624-8>>

20

21 Leblond C.P. & Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous
22 epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548-573.
23 <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x>>

24

25 Lenzi A., Lombardo F., Sgrò P., Salacone P., Caponecchia L., Dondero F. & Gandini L. 2003.
26 Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover
27 trial. *Fertility and sterility*, 79(2), 292-300. <[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04679-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04679-4)>

28

29 Levêque D. & Jehl F. 2007. Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids. *The*
30 *Journal of Clinical Pharmacology*, 47(5), 579-588.
31 <<https://doi.org/10.1177/0091270007299430>>

32

- 1 Lin C.R., Cheng J.T., Lin F.C., Chou A.K., Lee T.C., Chen J.T. & Yang L.C. 2002. Effect of
2 thiopental, propofol, and etomidate on vincristine toxicity in PC12 cells. *Cell biology and*
3 *toxicology*, 18(1), 63-70. <<https://doi.org/10.1023/A:1014423330210>>
4
- 5 Lirdi L.C., Stumpp T., Sasso-Cerri E. & Miraglia S.M. 2008. Amifostine protective effect on
6 cisplatin-treated rat testis. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and*
7 *Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(7),
8 797-808. <<https://doi.org/10.1002/ar.20693>>
9
- 10 Magelssen H., Brydøy M. & Fosså S.D. 2006. The effects of cancer and cancer treatments on
11 male reproductive function. *Nature Clinical Practice Urology*, 3(6), 312-322.
12 <<https://doi.org/10.1038/ncpuro0508>>
13
- 14 Martins D.B., Lopes S.T.A., Mazzanti C.M., Spanevello R., Schmatz R., Corrêa M., Stefanello
15 N., Schetinger M.R., Morsch V. & Veiga A.P.M. 2011. Lipid peroxidation in rats treated with
16 vincristine sulphate and nandrolone decanoate. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*
17 *Zootecnia*, 63, 107-113. <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100017>>
18
- 19 Maymon B.B.S., Yogev L., Marks A., Hauser R., Botchan A. & Yavetz H. 2004. Sertoli cell
20 inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy. *Fertility and*
21 *sterility*, 81(5), 1391-1394. <<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.09.078>>
22
- 23 Michalany J. 1998. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião,
24 enfermeira e citotécnico. In: *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para*
25 *o cirurgião, enfermeira e citotécnico* (pp. 295-295).
26
- 27 Monesi V. 1962. Relation between X-ray sensitivity and stages of the cell cycle in spermatogonia
28 of the mouse. *Radiation research*, 17(6), 809-838. <<https://doi.org/3571315>>
29
- 30 Murugavel T. & Akbarsha M.A. 1991. Anti-spermatogenic effect of vinca rosea Linn. *Indian*
31 *journal of experimental biology*, 29(9), 810-812. <PMid: 1794861>
32
- 33 Mutomba M.C., Yuan, H., Konyavko M., Adachi S., Yokoyama C.B., Esser V., McGarry J.D.,
34 Babior B.M. & Gottlieb R.A. 2000. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and

- 1 palmitoylcarnitine. FEBS letters, 478(1-2), 19-25. <[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01817-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01817-2)>
- 3
- 4 Nak D., Nak Y., Cangül I.T. & Bilginer T. 2005. A clinico-pathological study on the effect of
5 vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00743.x>>
- 7
- 8 Nakai M., Van Cleeff J.K. & Bahr J.M. 2004. Stages and duration of spermatogenesis in the
9 domestic ferret (*Mustela putorius furo*). Tissue and Cell, 36(6), 439-446.
10 <<https://doi.org/10.1016/j.tice.2004.08.003>>
- 11
- 12 Nikpour F. & Rad J.S. 2016. Effect of GnRh on Vincristine–Induced Spermatogenic Defects on
13 Sertoli Cell and Defect Produced on The Blood-Testis Barrier (BTB): A Morphological Study.
14 Biomedical and Pharmacology Journal, 9(2), 761-767. <<https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1000>>
- 15
- 16 Nikpour F., Tayefi H., Mohammadnejad D. & Akbarzadeh A. 2018. Adverse effects of vincristine
17 chemotherapy on cell changes in seminiferous tubules and cetorelix GnRH antagonist
18 inhibitory effects in mice. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 19(3), 683.
19 <<https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.3.683>> <PMid: 29580040>
- 20
- 21 Nolte T., Harleman J.H. & Jahn W. 1995. Histopathology of chemically induced testicular atrophy
22 in rats. Experimental and Toxicologic Pathology, 47(4), 267-286.
23 <[https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(11\)80260-5](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80260-5)>
- 24
- 25 Okada F.K., Stumpp T. & Miraglia S.M. 2009. Carnitine reduces testicular damage in rats treated
26 with etoposide in the prepubertal phase. Cell and tissue research, 337(2), 269-280.
27 <<https://doi.org/10.1007/s00441-009-0801-2>>
- 28
- 29 Okada F.K., Stumpp T. & Miraglia S.M. 2020. Carnitine diminishes etoposide toxic action on
30 spermatogonial self-renewal and sperm production in adult rats treated in the prepubertal phase.
31 Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 68(5), 327-342.
32 <<https://doi.org/10.1369/0022155420916274>> <PMid: 32228279>
- 33

- 1 Olar T.T., Amann R.P. & Pickett B.W. 1983. Relationships among testicular size, daily production
2 and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. *Biology of*
3 *reproduction*, 29(5), 1114-1120. <<https://doi.org/10.1095/biolreprod29.5.1114>>
4
- 5 Papaioannou M.D., Pitetti J.L., Ro S., Park C., Aubry F., Schaad O., Vejnar C.E., Kühne F.,
6 Descombes P., Zdobnov E.M., McManus M.T., Guillou F., Harfe B.D., Yan W., Jégou B. &
7 Nef, S. 2009. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Developmental*
8 *biology*, 326(1), 250-259. <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.011>>
9
- 10 Parvinen L.M., Söderström K.O. & Parvinen M. 1978. Early effects of vinblastine and vincristine
11 on the rat spermatogenesis: analyses by a new transillumination-phase contrast microscopic
12 method. *Experimentelle Pathologie*, 15(2), 85-96. <[https://doi.org/10.1016/S0014-](https://doi.org/10.1016/S0014-4908(78)80072-6)
13 [4908\(78\)80072-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4908(78)80072-6)>
14
- 15 Pineau C., Syed V., Bardin C.W., Jégou B. & Cheng C.Y. 1993. Germ cell-conditioned medium
16 contains multiple factors that modulate the secretion of testins, clusterin, and transferrin by
17 Sertoli cells. *Journal of andrology*, 14(2), 88-98. <[https://doi.org/10.1016/S0014-](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03167-8)
18 [5793\(02\)03167-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03167-8)>
19
- 20 Revoltella R.P., Dal Canto B., Caracciolo L. & D'Urso C.M. 1994. L-carnitine and some of its
21 analogs delay the onset of apoptotic cell death initiated in murine C2. 8 hepatocytic cells after
22 hepatocyte growth factor deprivation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell*
23 *Research*, 1224(3), 333-341. <[https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90265-8](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90265-8)>
24
- 25 Rosenthal R.C. 1981. Clinical applications of vinca alkaloids. *Journal of the American Veterinary*
26 *Medical Association*, 179(11), 1084-1086. <PMid: 6948802>
27
- 28 Russell L.D. 1990. Mammalian spermatogenesis. Histological and histopathological evaluation
29 of the testis, 1-40. <<http://ci.nii.ac.jp/naid/10005161022/en/>>
30
- 31 Russell L.D., Ettlin R.A., Sinha Hikim A.P. & Clegg E.D. 1990. The classification and timing of
32 spermatogenesis. Histological and histopathological evaluation of the testis, 1, 41-58.
33 <http://ci.nii.ac.jp/naid/10005662675/en/>
34

- 1 Russell L.D., Ettlin R.A., Hikim A.P.S. & Clegg E.D. 1993. Histological and histopathological
2 evaluation of the testis. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x>>
3
- 4 Salama A.F., Kasem S.M., Tousson E. & Elsisy M.K. 2015. Protective role of L-carnitine and
5 vitamin E on the testis of atherosclerotic rats. *Toxicology and industrial health*, 31(5), 467-474.
6 <<https://doi.org/10.1177/0748233712472523>> <PMid: 23406956>
7
- 8 Skinner M.K. & Griswold M.D. 1980. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein.
9 *Journal of Biological Chemistry*, 255(20), 9523-9525. <[https://doi.org/10.1016/S0021-](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43419-9)
10 9258(18)43419-9>
11
- 12 Silva M.C.V., Barbosa R.R., dos Santos R.C., Chagas R.S.N. & Costa W.P. 2007. Avaliação
13 epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população
14 canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. *Acta veterinaria brasílica*, 1(1).
15 <<https://doi.org/10.21708/avb.2007.1.1.260>>
16
- 17 Solarska K., Lewińska A., Karowicz-Bilińska A. & Bartosz G. 2010. The antioxidant properties
18 of carnitine in vitro. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 15(1), 90-97.
19 <<https://doi.org/10.2478/s11658-009-0036-y>>
20
- 21 Souza C.A., Vigorito A.C., Aranha F.J., Oliveira G.B., Eid K.A. & Ruiz M.A. 2000. Terapêutica
22 citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. *Revista*
23 *Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 22, 123-128. <[https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-84842000000200008)
24 84842000000200008>
25
- 26 Shug A., Paulson D., Subramanian R. & Regitz V. 1991. Protective effects of propionyl-L-
27 carnitine during ischemia and reperfusion. *Cardiovascular drugs and therapy*, 5(1), 77-83.
28 <<https://doi.org/10.1007/BF00128246>>
29
- 30 Stumpp T., Freymüller E. & Miraglia S.M. 2006. Sertoli cell function in albino rats treated with
31 etoposide during prepubertal phase. *Histochemistry and cell biology*, 126(3), 353-361.
32 <<https://doi.org/10.1007/s00418-006-0168-3>>
33

- 1 Tayefi N.H., Mohammadnejad D. & Nikpour F. 2012. Protective role of GNRH antagonist
2 (cetorelix) on side effect of vincristine on diameter of seminiferous tubules of mice.
3
- 4 Topcu-Tarladacalisir Y., Kanter M. & Uzal M.C. 2009. Papel da L-carnitina na prevenção de
5 danos nos túbulos seminíferos induzidos por radiação gama: um estudo microscópico de luz e
6 eletrônica. *Arquivos de toxicologia*, 83 (8), 735-746. <[https://doi.org/10.1007/s00204-008-](https://doi.org/10.1007/s00204-008-0382-y)
7 0382-y>
8
- 9 Veloso E.V., Figueirêdo L., Menezes D.J., Sousa O.B. & Santos J.R. 2018. Efeitos de sulfato de
10 vincristine sobre os testículos de ratos albinos, tratados na fase pré-púbere. *Pesquisa Veterinária*
11 Brasileira, 38(6), 1217-1224. <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4782>>
12
- 13 Vendramini V., Sasso-Cerri E. & Miraglia S.M. 2010. Amifostine reduces the seminiferous
14 epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility
15 status. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 1-13. <[https://doi.org/10.1186/1477-](https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-3)
16 7827-8-3>
17
- 18 Vendramini V., Robaire B. & Miraglia S.M. 2012. Amifostine–doxorubicin association causes
19 long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Human*
20 *Reproduction*, 27(8), 2457-2466. <<https://doi.org/10.1093/humrep/des159>>
21
- 22 Vescovo G., Ravara B., Gobbo V., Sandri M., Angelini A., Barbera M.D., Dona M., Peluso G.,
23 Calvani M., Mosconi L. & Libera L.D. 2002. L-Carnitine: a potential treatment for blocking
24 apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *American Journal of*
25 *Physiology-Cell Physiology*, 283(3), C802-C810.
26 <<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00046.2002>> <PMid: 12176737>
27
- 28 Vitale R., Fawcett D.W. & Dym M. 1973. The normal development of the blood-testis barrier and
29 the effects of clomiphene and estrogen treatment. *The Anatomical Record*, 176(3), 333-344.
30 <<https://doi.org/10.1002/ar.1091760309>>
31
- 32 Wang L., Peng J., Huang H., Wang Q., Yu M. & Tao L. 2015. Simvastatin protects Sertoli cells
33 against cisplatin cytotoxicity through enhanced gap junction intercellular communication.
34 *Oncology reports*, 34(4), 2133-2141. <<https://doi.org/10.3892/or.2015.4192>>

- 1
- 2 Weber M.A., Groos S., Aumüller G. & Konrad L. 2002. Post-natal development of the rat testis:
3 steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. *Andrologia*, 34(1),
4 41-54. <<https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2002.00465.x>>
- 5
- 6 Wing T.Y. & Christensen A.K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules.
7 *American Journal of Anatomy*, 165(1), 13-25. <<https://doi.org/10.1002/aja.1001650103>>
- 8
- 9 Xian Y., Wu M., Liu Y., Hao J., Wu Y., Liao X. & Li G. 2017. Increased Sat2 expression is
10 associated with busulfan-induced testicular Sertoli cell injury. *Toxicology in Vitro*, 43, 47-57.
11 <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.023>>
- 12
- 13 Yaman O. & Topcu-Tarlacalisir Y. 2018. L-carnitine counteracts prepubertal exposure to
14 cisplatin induced impaired sperm in adult rats by preventing germ cell apoptosis. *Biotechnic &*
15 *Histochemistry*, 93(3), 157-167. <<https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1401661>>
- 16
- 17 Ye J., Luo D., Xu X., Sun M., Su X., Tian Z., Zhang M., Yu C. & Guan Q. 2019. Metformin
18 improves fertility in obese males by alleviating oxidative stress-induced blood-testis barrier
19 damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
20 <<https://doi.org/10.1155/2019/9151067>>
- 21
- 22 Zare Z., Mohammadi M., Eimani H. & Shafaroudi M.M. 2011. Prevention of di (2-ethylhexyl)
23 Phthalate-induced Testicular Disturbance in Mice by Co-administration of L-carnitine.
24 *International journal of fertility & sterility*, 5(3), 186. <PMid: 25101163>
- 25
- 26 Zhang Y. & Sun K. 1992. Unscheduled DNA synthesis induced by the antitumor drug vincristine
27 in germ cells of male mice. *Mutation Research Letters*, 281(1), 25-29.
28 <[https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90032-D](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90032-D)>

29
30
31

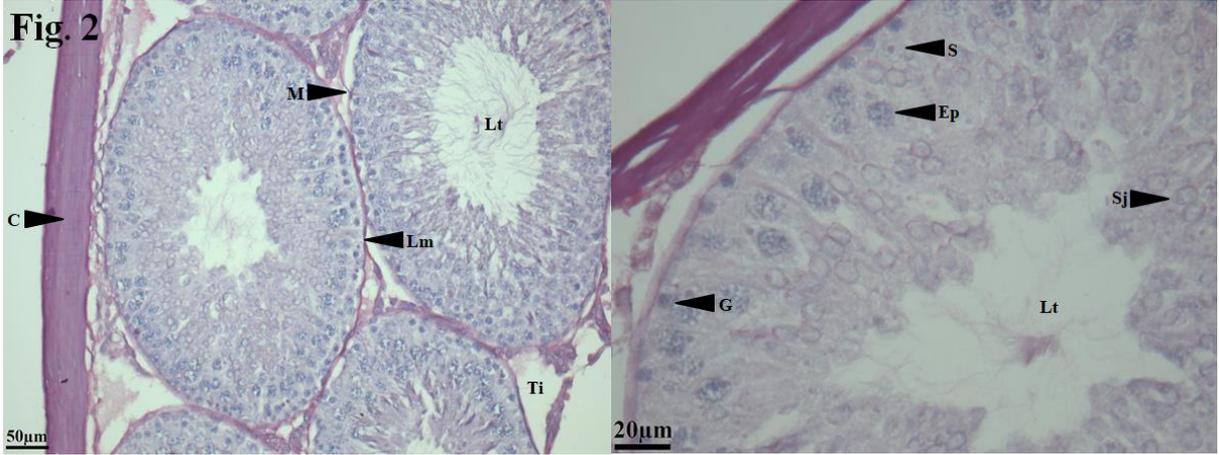
Legenda das Figuras

32 Fig.1. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 40
33 dias de vida (GC40). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Cápsula testicular (C); lúmen tubular (Lt);
34 tecido intersticial (Ti). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VI, espermatócito primário (Ep); núcleo
35 da célula de Sertoli (S); espermátide jovem (Sj); espermatogônia (G). Reação de ácido periódico de Schiff.
36 Obj.50x. Patos/PB, 2022.



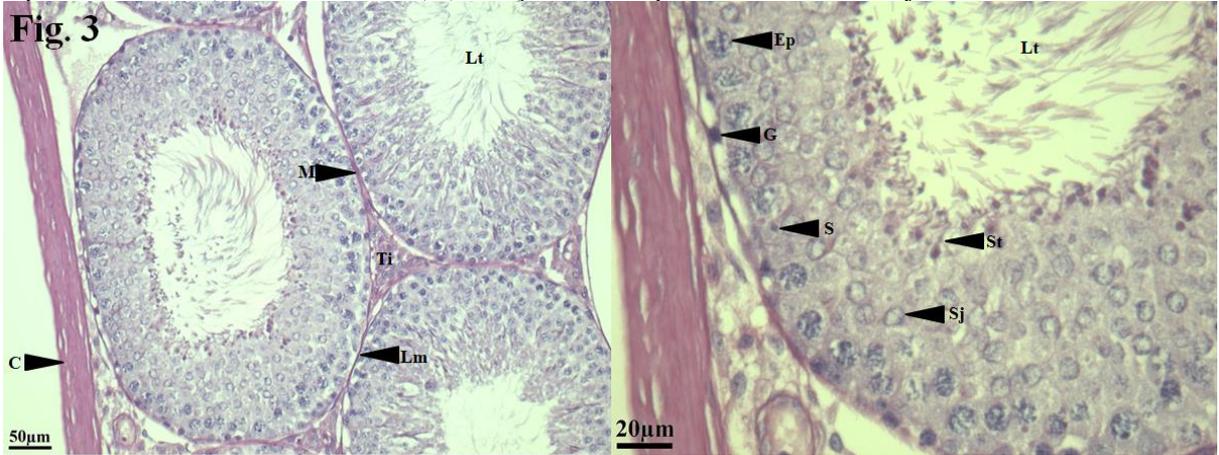
1
2
3
4
5
6
7

Fig.2. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 64 dias de vida (GC64). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); célula mioide (M); lâmina limitante (Lm). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio IX, espermatogônia (G); núcleo da célula de Sertoli (S); espermátide jovem (Sj); espermatócito primário (Ep). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.



8
9
10
11
12
13
14

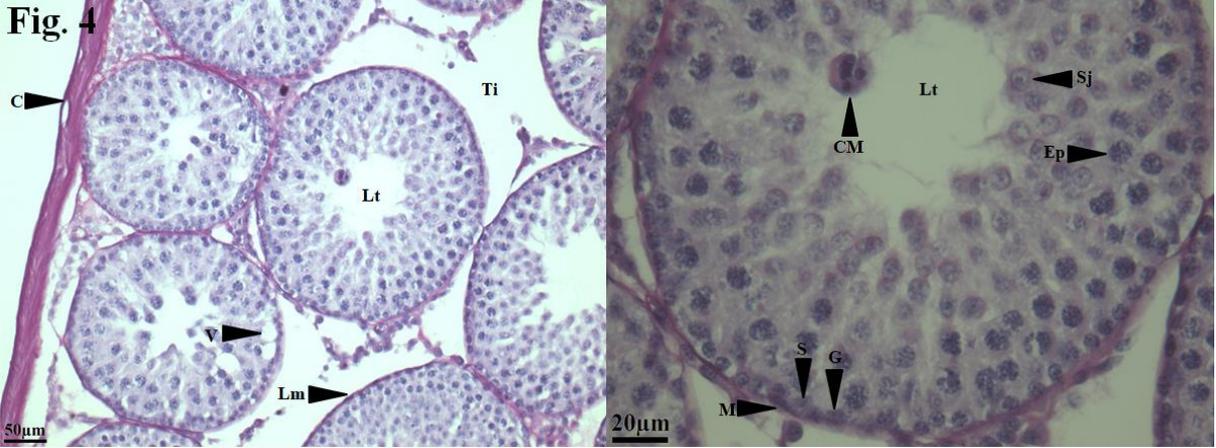
Fig.3. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos do grupo controle e sacrificados aos 127 dias de vida (GC127). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); célula mioide (M); lâmina limitante (Lm). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VIII, núcleo da célula de Sertoli (S); espermatogônia (G); espermatócito primário (Ep); espermátide jovem (Sj); espermátide tardia (St); lúmen tubular (Lt). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.



15
16
17
18
19

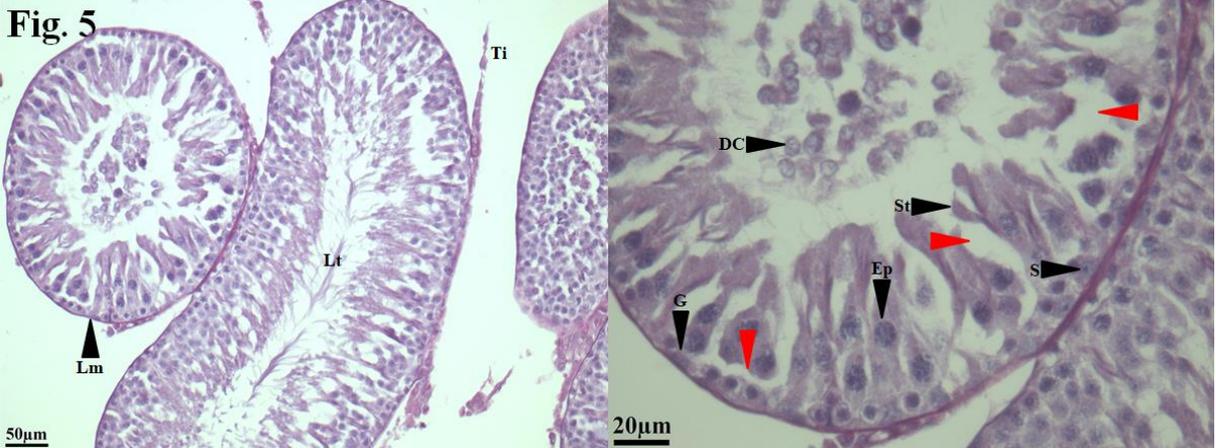
Fig. 4. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GV40). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observam-se efeitos deletérios no epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); lâmina

1 limitante (Lm); vacuolização (V). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VII, núcleo da célula de
 2 Sertoli (S); espermatogônia (G); célula mioide (M); célula multinucleada (CM); lúmen tubular (Lt); espermatócito
 3 primário (Ep); espermátide jovem (Sj). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.



4

5
 6 Fig 5. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e
 7 sacrificados aos 64 dias de vida (GV64). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observam-se restos
 8 celulares oriundos da descamação do epitélio seminífero. Tecido intersticial (Ti); lâmina limitante (Lm); lúmen
 9 tubular (Lt). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio XII-XIII, restos celulares da descamação do
 10 epitélio seminífero (DC); núcleo da célula de Sertoli (S); espermatogônia (G); espermatócito primário (Ep);
 11 espermátide tardia (St); espaços existentes entre células do epitélio seminífero (Seta vermelha). Reação de ácido
 12 periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.



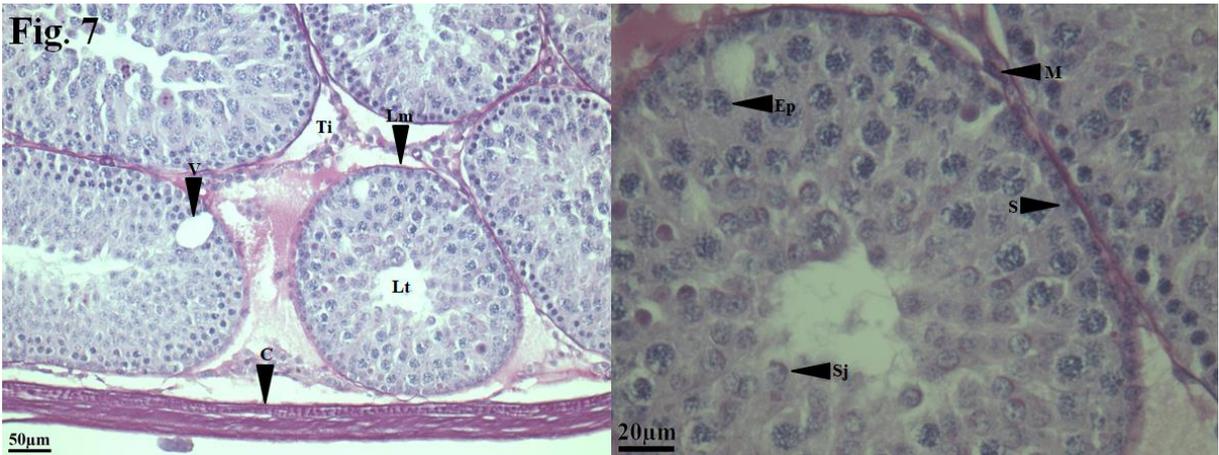
13

14
 15 Fig 6. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com sulfato de vincristine e
 16 sacrificados aos 127 dias de vida (GV127). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Evidencia-se
 17 vacuolização severa dos túbulos seminíferos, descaracterização celular e desorganização do epitélio seminífero.
 18 Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V); lâmina limitante (Lm).
 19 Destaque (a direita) para secção tubular em estágio XII-XIII, vacuolização (V); lúmen tubular (Lt); espermatócito
 20 primário (Ep); espermátide tardia (St). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.



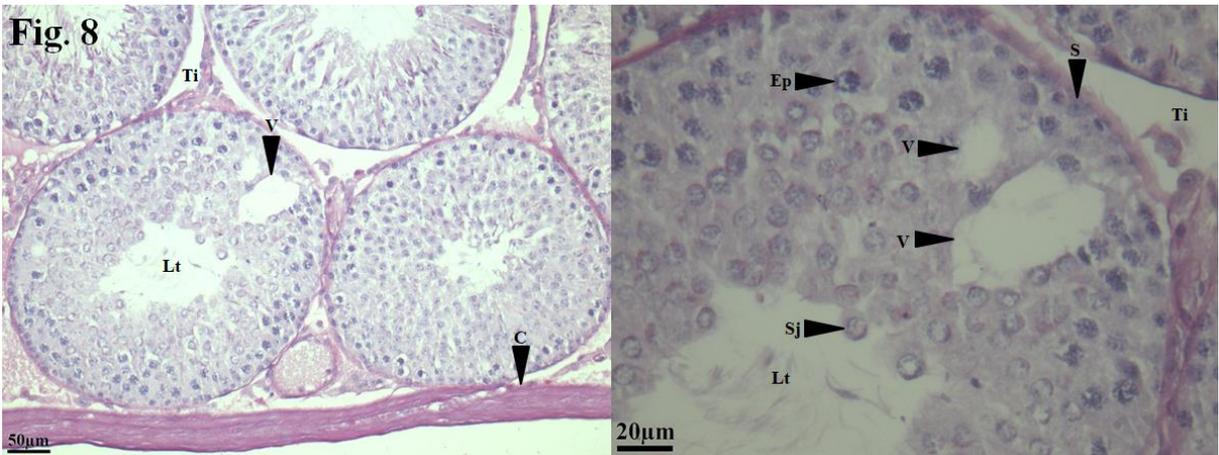
1
2
3
4
5
6
7
8
9

Fig 7. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 40 dias de vida (GCV40). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observa-se redução dos efeitos deletérios no epitélio seminífero, observa-se vacuolização, porém, em menor grau. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V); lâmina limitante (Lm). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VII, espermatócito primário (Ep); espermatíde jovem (Sj); núcleo da célula de Sertoli (S); célula mioide (M). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.



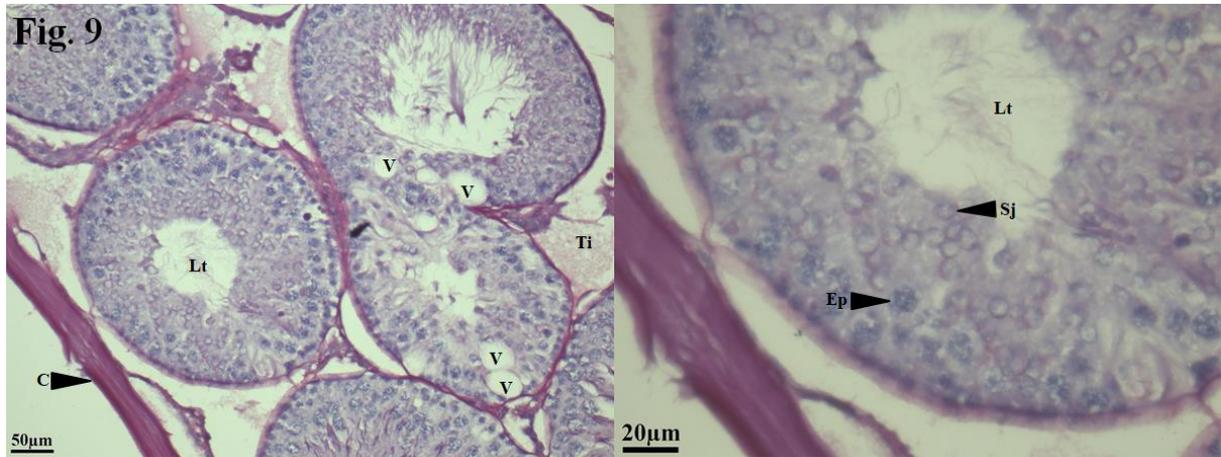
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Fig 8. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine e sacrificados aos 64 dias de vida (GCV64). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observa-se vacuolização, porém, em menor grau. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular (Lt); vacuolização (V). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio VII, núcleo da célula de Sertoli (S); lúmen tubular (Lt); espermatócito primário (Ep); espermatíde jovem (Sj); vacuolização (V); tecido intersticial (Ti). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.



19

1
2 Fig 9. Fotomicrografia de seções tubulares dos testículos de ratos albinos tratados com L-carnitine e sulfato de
3 vincristine e sacrificados aos 127 dias de vida (GCV127). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.20x. Observa-
4 se aumento das vacuolizações do epitélio seminífero. Cápsula testicular (C); tecido intersticial (Ti); lúmen tubular
5 (Lt); vacuolização (V). Destaque (a direita) para secção tubular em estágio IX, lúmen tubular (Lt); espermatócito
6 primário (Ep); espermátide jovem (Sj). Reação de ácido periódico de Schiff. Obj.50x. Patos/PB, 2022.
7



8
9
10 **Título das tabelas**

11
12 Tabela 1. Diâmetro do túbulo seminífero (DT), altura do epitélio seminífero (ALES), diâmetro do lúmen
13 tubular (DL), eixo menor do túbulo seminífero (EMTS), com os respectivos desvios padrões (\pm DP) em
14 grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados com L-carnitine
15 e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64,
16 GC127 e GV127, GCV127). Patos/PB, 2022.

17 Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).
18 Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).
19

VARIÁVEIS				
GRUPOS	DT (μm)	ALEP (μm)	DL (μm)	EMTS (μm)
GC127 \pm DP	416 \pm 16,37a	125,4 \pm 6,25a	165,2 \pm 10,26a	316,07 \pm 11,55a
GV127 \pm DP	320,29 \pm 34,67b	50,75 \pm 21,17b	218,78 \pm 25,02b	236,12 \pm 33,45b
GCV127 \pm DP	330,3 \pm 49,39b	85,98 \pm 29,17b	158,32 \pm 29,93a	241,2 \pm 42,98b
GC64 \pm DP	421,55 \pm 10,92a	131,86 \pm 8,04a	157,83 \pm 14,4a	324,01 \pm 15,61a
GV64 \pm DP	400,94 \pm 7,41b	101,54 \pm 3,64b	197,86 \pm 6,7b	319,77 \pm 8,14a
GCV64 \pm DP	420,92 \pm 15,06a	129,25 \pm 7,00a	162,4 \pm 11,88a	331,3 \pm 13,20a
GC40 \pm DP	335,94 \pm 10,43a	111,81 \pm 4,44a	112,32 \pm 10,55a	261,87 \pm 18,78a
GV40 \pm DP	292,62 \pm 9,39b	87,75 \pm 6,23b	117,1 \pm 9,63a	229,99 \pm 7,57b
GCV40 \pm DP	276,8 \pm 38,58b	92,01 \pm 13,11b	92,78 \pm 15,98b	210,49 \pm 30,26b

20
21 Tabela 2. Área do túbulo seminífero (ART), área do lúmen tubular (ARL) e área do epitélio seminífero
22 (AREP) com os respectivos desvios padrões (\pm DP) em grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com
23 sulfato de vincristine (GV) e tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias de
24 idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127 e GV127, GCV127). Patos/PB, 2022.

25 Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).
26 Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).
27

VARIÁVEIS			
GRUPOS	ART (μm^2)	ARL (μm^2)	AREP (μm^2)
GC127 \pm DP	104028,5 \pm 7210,53a	15331,4 \pm 1730,9a	88697,0 \pm 6146a
GV127 \pm DP	61166,1 \pm 14841,3b	25396 \pm 4143,6b	35769 \pm 15546b
GCV127 \pm DP	64982,1 \pm 19196,76b	13163,06 \pm 3749,74a	51819,03 \pm 19833,58b
GC64 \pm DP	107211,05 \pm 6306,33a	14295,6 \pm 2980,5a	92915,39 \pm 4329,8a

GV64± DP	101443,67±3304,8b	24318,66±1561,6b	77125,01±2910,8b
GCV64± DP	109999,78±7676,98a	14729,16±2425,60a	95270,61±7164,88a
GC40± DP	69636,76±5614,82a	6840,44±1624,45a	62796,3±4147,5a
GV40± DP	53117,84±2354,55b	7702,29±1236,97a	45415,5±2302,2b
GCV40± DP	46295,41±11072,27b	4348,11±1342,43b	41947,3±10006,79b

Tabela 3. Valores percentuais médios das frequências dos tipos celulares espermatogônia A (GA), espermatogônia intermediária e B (GIB), espermátócito primário (EP), espermátide jovem (SJ), espermátide tardia (ST) e células de Sertoli (S) e desvio padrão (\pm DP) nos túbulos seminíferos em grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) aos 40, 64 e 127 dias de idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127 e GV127, GCV127). Patos/PB, 2022.

Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

VARIÁVEIS

GRUPOS	GA (%)	GIB (%)	EP (%)	SJ (%)	ST (%)	S (%)
GC127±DP	97,4±2,3a	71,07±2,6a	100±0a	100±0a	100±0a	100±0a
GV127±DP	46,05±5,3b	55,7±3,9b	80,95±1,4b	40,4±3,5b	39,3±2,9b	91,25±6,9b
GCV127±DP	50,7±3,22b	58,05±1,44b	90,9±2,06b	50,62±2,1c	39,1±2,59b	97,66±2,68a
GC64±DP	93±3,7a	54,25±3,3a	100±0a	95,55±3,5a	98,85±0,3a	100±0a
GV64±DP	76,8±4,3b	52,55±3,3a	99,45±0,7a	94,15±3,3a	74,7±3,7b	99,7±0,4a
GCV64±DP	80,45±2,92b	53,2±1,05a	100±0a	95,85±1,85a	74,2±3,12b	100±0a
GC40±DP	74,8±4,1a	44,1±4a	100±0a	66,25±3,2a	54,45±2,8a	100±0a
GV40±DP	60,2±6,8b	41,95±3,1a	99,65±0,6a	66,3±3,2a	54,65±2,8a	100±0a
GCV40±DP	63,8±2,6b	42,05±1,23a	100±0a	65,9±1,22a	54,1±2,28a	100±0a

Tabela 4. Médias das frequências dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e respectivo desvio padrão (\pm DP) nos túbulos seminíferos de grupos de ratos albinos controles (GC), tratados com sulfato de vincristine (GV) e tratados com L-carnitine e sulfato de vincristine (GCV) de 40, 64 e 127 dias de idade (GC40, GV40, GCV40, GC64, GV64, GCV64, GC127 e GV127, GCV127). Patos/PB, 2022.

Letras diferentes-Médias diferiram entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

Letras iguais-Médias não diferiram entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p > 0,05$).

GRUPOS

FR (%)	GC127	GV127	GCV127	GC64	GV64	GCV64	GC40	GV40	GCV40
I±DP	13±1a	34±2b	13,3±1,4a	13,1±0,7a	9,3±1,1b	15,8±1,1c	17,8±1,2a	18,7±1,2a	18,8±0,7a
II-III±DP	8±1,2a	12±1,2b	7,3±1,1a	6,6±0,9a	3,3±1,1b	12±0,9c	10±1,1a	15,4±1,6b	15,5±1,7b
IV±DP	5±1,2a	8±1,7b	4,1±0,9a	4,1±0,8a	3,8±1,1a	6±0,8b	6±0,8a	12,2±1,7b	8±2,5b
V±DP	6±0,8a	8±1b	7,5±1,4b	5±1,6a	2,3±0,8b	5,1±1,1a	9±1,6a	7,8±0,7a	7±0,6a
VI±DP	8±0,8a	6±1b	8,3±1,8a	5,9±2,2a	5,8±1a	3,4±1,1b	9±0,6a	5,9±1,3b	5,4±1,1b
VII±DP	14,6±1,9a	12±1,4b	15,3±1,2a	15±2a	19,5±1,7b	14,8±1,1a	13±1a	11,5±1,6a	13±0,6a
VIII±DP	12,9±0,9a	4±1,5b	11,8±1,6a	13,1±3a	13,8±1,4a	9,9±1,1b	8±0,8a	5,8±1b	4,9±1,5b
IX±DP	7±0,8a	6±1,2a	6,4±1a	6,4±2,1a	13,9±2,3b	10,6±1,7c	2,4±1,5a	4,7±0,9b	4,1±0,7b
X±DP	3±0,9a	2±1,2a	4,3±1b	5,1±0,8a	9,3±1,2b	4±1,2a	3±0,8a	3,7±1,3a	3,6±0,5a
XI±DP	7,6±0,8a	4±1,1b	5,4±1,9b	7,4±1,2a	6,7±1,6a	3,1±1,2b	2,5±1,7a	3,9±1,6a	3,5±1,1a
XII-XIII±DP	12,8±1,1a	2±0,9b	11,7±1,8a	12,3±0,6a	8,5±2,1b	11±1,2a	16±2,6a	6,1±1,1b	9±0,6c
XIV±DP	2,1±1,4a	2±0,8a	4,6±1,8b	6±1,5a	3,8±3b	4,3±1,4a	3,3±1,3a	4,3±1,2a	3,4±1,4a

1 CONCLUSÕES

2
3 Os resultados obtidos nesse estudo permitiram chegar as seguintes conclusões:

- 4
- 5 1. Os fatores fundamentais que colaboram para o aparecimento de alterações morfológicas
6 irreversíveis são a dose total do fármaco administrada e a idade em que os animais são
7 submetidos ao tratamento.
 - 8 2. A administração de 0,05 mg/kg de peso vivo por via intraperitoneal de sulfato de
9 vincristine em ratos albinos de 15 dias de vida causa redução em parâmetros como peso
10 corpóreo nos animais dos grupos GV40 e GCV40, pesos testiculares absoluto e relativo,
11 eixos testiculares maiores e menores, volume testicular total, diâmetro dos túbulos
12 seminíferos, eixo menor do túbulo seminífero (exceto no GV64), altura do epitélio
13 seminífero, volumes dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial testicular (em
14 GV127), área do túbulo seminífero, área do epitélio seminífero, além de aumento do
15 diâmetro do lúmen do túbulo seminífero e da área do lúmen do túbulo seminífero
16 (exceto em GV40).
 - 17 3. Ratos albinos tratados com 0,05mg/kg de peso vivo por via intraperitoneal de sulfato de
18 vincristine na fase pré-púbere demonstram na vida adulta severo grau de atrofia
19 testicular provocada por graves danos as células do epitélio seminífero, acarretando
20 diminuição do volume dos túbulos seminíferos e do número de células da linhagem
21 germinativa e células de Sertoli. As alterações do epitélio seminífero incluem
22 vacuolização, formações multinucleadas de espermatídes jovens, presença de
23 fragmentos celulares e células da linhagem germinativa no lúmen tubular (descamação
24 do epitélio seminífero) e redução do diâmetro dos túbulos seminíferos.
 - 25 4. A administração de 0,05 mg/kg de peso vivo por via intraperitoneal de sulfato de
26 vincristine em ratos albinos de 15 dias de vida provoca danos ao tecido de sustentação,
27 incluindo células de Sertoli, promovendo o colapso da estruturação morfológica dos
28 testículos.
 - 29 5. O tipo celular mais frequentemente atingido pela droga ou por seus metabólitos são as
30 espermatogônias do tipo A, as espermatídes tardias e as células de Sertoli.
 - 31 6. A administração prévia de L-carnitine é capaz de conferir mitigação dos efeitos
32 deletérios de sulfato de vincristine sobre os tecidos testiculares nos animais avaliados,
33 sobretudo aos 64 dias de vida. O ciclo do epitélio seminífero dos animais tratados com
34 L-carnitine apresentou alterações qualitativas e quantitativas menores em relação aos

1 animais tratados exclusivamente com o quimioterápico. Mais estudos são necessários
2 para determinar o mecanismo de ação do citoprotetor, para assim esclarecer quais
3 protocolos podem ser empregados visando estender os efeitos de L-carnitine,
4 principalmente aos grupos experimentais avaliados aos 40 e 127 dias de vida.

5 7. Mesmo sem o completo conhecimento a respeito dos mecanismos de ação de L-carnitine
6 sobre células tratadas com antineoplásicos, o efeito protetor sobre o epitélio
7 germinativo, em maior ou menor grau, parece estar consolidado. Muitos experimentos
8 descrevem reduções de efeitos deletérios sob condições específicas, tornando o
9 esclarecimento do mecanismo de ação ainda mais necessário para estender os efeitos
10 protetores aos mais diversos protocolos quimioterápicos.

11 8. A realização de mais estudos laboratoriais *in vitro* e *in vivo*, além de ensaios clínicos
12 cegos randomizados, são necessários para esclarecer as dúvidas remanescentes,
13 possibilitando o emprego mais eficaz de L-carnitine na proteção de células da linhagem
14 germinativa e células somáticas durante o tratamento quimioterápico, sobretudo em
15 casos de pacientes pré-púberes, assegurando sua capacidade reprodutiva na vida adulta.

16 9. Sulfato de vincristine causa grave retardo do ciclo do epitélio seminífero, expresso pelo
17 represamento de células em fases específicas do processo espermatogênico, causando
18 aumento da frequência de alguns desses estádios. L-carnitine foi capaz de reduzir
19 substancialmente as alterações na frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero
20 causadas pelo sulfato de vincristine.