

Uso da metformina no tratamento de doenças metabólicas e da saúde reprodutiva masculina

Use of metformin in metabolic diseases and male reproductive health 's treatment

Ribeiro J.C.¹, Alves M.G.¹, Oliveira P.F.^{1,2}

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

Diabetes e obesidade são duas doenças metabólicas intimamente ligadas e cujo tratamento é essencial devido à sua implicação na homeodinâmica do metabolismo. A metformina é um fármaco capaz de estimular a síntese de insulina e reduzir a resistência à mesma, cuja prescrição é considerada como a primeira linha de tratamento contra a diabetes. Este facto levou a que tenham sido desenvolvidos vários estudos sobre o efeito deste fármaco em múltiplos órgãos e tecidos. No entanto, os estudos publicados sobre o efeito da metformina no sistema reprodutor masculino são em muito menor número quando comparado com os que incidem sobre o estudo dos efeitos no sexo oposto. Neste trabalho, foi feita uma análise crítica dos estudos disponíveis em que foram descritos os efeitos deletérios que doenças metabólicas, como diabetes (tipo 1 e tipo 2) e obesidade, têm na fertilidade masculina e os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos. São também apresentados e discutidos os efeitos que a metformina tem na fertilidade masculina. De facto, é possível concluir que há sólidas evidências de que em indivíduos metabolicamente doentes a metformina tem efeito protetor sobre a função reprodutora, no entanto, em indivíduos saudáveis o efeito pode ser deletério, salientando a importância de estudos mais aprofundados nesta área.

Palavras-chave: Diabetes, fertilidade masculina, metformina, obesidade.

ABSTRACT

Diabetes and obesity are two closely linked metabolic diseases which treatment is essential due to their implication on metabolic homeodynamics. Metformin is a drug that can stimulate insulin synthesis and reduce insulin resistance, the prescription of which is the first line of treatment against diabetes. This has spurred several studies on the effect of this drug on multiple organs and tissues. However, published studies on the effect of metformin on the male reproductive system are much smaller than those of the opposite sex. In this paper, a critical analysis of available studies describing the negative effects that metabolic diseases such as diabetes (type 1 and type 2) and obesity have on male fertility and the possible mechanisms by which metformin treatment can regulate these effects have been described. The known effects that this pharmacological agent has on male fertility are further presented and discussed. Indeed, it can be concluded that there is solid evidence that in metabolically ill individuals, metformin has a protective effect on reproductive function however, in healthy individuals, the effect may be deleterious, highlighting the importance of further studies in this area.

Keywords: Diabetes, male fertility, metformin, obesity.

¹ Departamento de Microscopia, Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) e Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Universidade do Porto, 4050-313 Porto, Portugal.

² QOPNA & LAQV, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

Autor para correspondência: Pedro Oliveira; pfobox@gmail.com. Universidade do Porto, 4200-135 Porto, Portugal.

Submetido/Submitted: 14 dezembro 2019 | Aceite/Accepted: 22 dezembro 2019

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Diabetes *mellitus* é uma doença metabólica crónica cuja incidência tem vindo a aumentar, tendo já atingido proporções pandémicas. Estatísticas recentes sugerem que no ano de 2045, cerca de 700 milhões de pessoas vão sofrer de diabetes *mellitus*¹, o que releva números assustadores para o futuro. Esta patologia assenta num metabolismo deficiente de carboidratos, sendo caracterizada por níveis elevados de glucose circulante². Esta situação é consequência de um decréscimo da sensibilidade à insulina, secreção insuficiente de insulina ou uma combinação de ambos os fatores³. A diabetes tipo 2 ocorre em cerca de 90% dos casos de diabetes *mellitus*, sendo que está fortemente associada com um estilo de vida pouco saudável. De facto, a maioria de casos de diabetes de tipo 2 advêm de um estilo de vida sedentário e dieta inadequada, o que conduz a excesso de peso e resistência à insulina⁴. Quando não diagnosticada, ou quando o seu tratamento não é o apropriado, diabetes e excesso de peso resultam numa série de outras complicações de natureza macro e microvasculares que podem limitar o estilo de vida do paciente⁵. Sendo estas disfunções metabólicas tão comuns nos dias de hoje, e tendo em conta o impacto negativo que esta condição tem, não só ao nível de saúde pública, como também a nível sociológico e económico na sociedade⁶, a indústria farmacêutica continua a desenvolver fármacos capazes de regular os níveis de glicemia utilizando abordagens cada vez mais inovadoras e seguras. No entanto, uma das primeiras classes de fármacos antidiabéticos (biguanidas) são ainda prescritos em grande escala, particularmente a metformina,

que é classificada como a primeira linha de tratamento para indivíduos diabéticos tipo 2⁷.

As propriedades antidiabéticas de metformina relacionam-se com a sua capacidade de aumentar a síntese e secreção de insulina pelas células β -pancreáticas e bloquear a gliconeogénese no fígado⁶. Sendo um ativador da proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), a metformina modula o metabolismo da glucose e dos lípidos, tendo um forte impacto no estado energético das células. Estudos *in vivo*⁸ demonstraram que este fármaco pode também aumentar o consumo de glucose, bem como a sensibilização das células musculares à ação da insulina. Outros estudos demonstraram ainda que a metformina promove a inativação da enzima acetil-coenzima A carboxilase, que catalisa um passo limitante da lipogénese⁹.

Fármacos antidiabéticos tendem a alterar o metabolismo da glucose de modo a regularizar os seus níveis em circulação no plasma. Apesar dos esforços da indústria farmacêutica, estes fármacos continuam a ter uma ação generalizada, modulando também o metabolismo da glucose em outros tecidos para além do seu principal alvo. Um exemplo deste fenómeno é o que acontece nos tecidos responsáveis do sistema reprodutor masculino após exposição à metformina¹⁰⁻¹². Curiosamente, o número de estudos sobre o impacto da metformina na fertilidade masculina é significativamente mais reduzido do que os que incidem sobre aspetos da fertilidade feminina, seguindo a tendência do que se verifica no diagnóstico da fertilidade de um casal, onde o papel masculino é continuamente relegado para segundo plano. Tendo em conta que o metabo-

lismo da glucose nas células testiculares responsáveis pela fertilidade masculina é um aspeto essencial para o desenvolvimento correto da espermatogénese, é importante estudar se a prescrição deste fármaco pode desregular estes processos determinantes para a capacidade reprodutiva dos homens. De facto, metade dos casos de infertilidade num casal, ocorrem devido a um problema por parte do homem ou um problema conjunto com a companheira¹³. Neste artigo vamos discutir estudos que evidenciam o impacto negativo que doenças metabólicas como diabetes tipo 2 ou a obesidade têm na fertilidade masculina e de que modo o tratamento com metformina pode melhorar esse aspeto.

Efeito da metformina nos parâmetros espermáticos de homens com doenças metabólicas.

A testosterona é uma hormona essencial para o sucesso da espermatogénese, não só porque é essencial para concluir a fase meiótica da espermatogénese, mas também porque mantém a estrutura da barreira hemato-testicular¹⁴. Pacientes com diabetes tipo 2, especialmente quando sofrem também de obesidade, têm maior probabilidade de apresentar baixos níveis de testosterona circulante e subfertilidade¹⁵. De facto, a literatura sugere que a origem desta desregulação nos níveis de androgénios pode ser provocada por hipogonadismo hipogonadotrófico no doente¹⁶. A corroborar esta premissa, estudos verificaram que hipoandrogenismo causa uma desregulação nos parâmetros espermáticos de homens, estando associado a condições como azoospermia (caracterizada pela ausência de espermatozoides no sémen) e oligozoospermia (caracterizada pela

pequena concentração de espermatozoides no sémen)¹⁷⁻¹⁹.

O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal masculino é controlado pelo padrão de secreção das hormonas sexuais. Neurónios secretores situados no hipotálamo libertam a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) para a hipófise com um pulso e frequência específicos. Esse sinal ativa as células da hipófise que passam a produzir e libertar a hormona luteinizante (LH) para a circulação²⁰ que, por sua vez, vai atuar no seu recetor presente nas células de Leydig e assim estimular a secreção de testosterona²¹. A testosterona exerce posteriormente um *feedback* negativo no hipotálamo e hipófise para regular a secreção de GnRH e LH, o que faz com que o mau funcionamento deste processo altere o metabolismo corporal do indivíduo, bem como a sua fertilidade. Infelizmente, doenças metabólicas como diabetes tipo 2 desregulam este eixo. Apesar de ser um tema controverso e até com alguma informação aparentemente contraditória, vários estudos têm demonstrado os efeitos negativos das doenças metabólicas nos parâmetros espermáticos^{22,23}. De modo a estudar o efeito da metformina na qualidade espermática de indivíduos com excesso de peso e elevada resistência à insulina, pacientes com estas características foram sujeitos a um tratamento com doses crescentes de metformina e foi descrita uma melhoria nos parâmetros espermáticos dos indivíduos. O tratamento com metformina começou com uma dose de 850 mg/dia durante a primeira semana; na segunda semana a dose dobrou para 1700 mg/dia e na terceira semana foi administrada uma dose de 2550 mg/dia, que se prolongou até ao final da experiência (6 meses de trata-

mento). Este tratamento melhorou tanto a concentração, como a mobilidade e a morfologia dos espermatozoides para níveis semelhantes aos vistos em homens saudáveis¹⁵. Embora este seja o único estudo do género realizado em humanos, estudos em modelos animais diabéticos e/ou obesos suportaram estes resultados^{22,24}.

Curiosamente, a metformina não só melhora os parâmetros espermáticos em indivíduos com doenças metabólicas, mas também tem efeitos benéficos na criopreservação de espermatozoides. Foi realizado um estudo em que foi feita a incubação do ejaculado de roedor com 5000 μM de metformina durante 30 minutos antes da sua congelação. Após duas semanas de criopreservação, os espermatozoides que foram submetidos a esse pré-tratamento não só apresentaram melhor capacidade de fertilização de oócitos, como também aumentou o número de embriões capazes de passar a fase com quatro células, depois do processo de fertilização *in vitro*²⁵. Este efeito benéfico tem sido sugerido como uma resposta mediada pela capacidade da metformina de reduzir o *stress* oxidativo ao ativar a AMPK²⁶.

O tratamento de indivíduos diabéticos e obesos com metformina pode ainda interferir com a regulação hormonal dos indivíduos. A metformina é também capaz de aumentar a secreção de LH e, por sua vez, aumentar os níveis de testosterona em circulação nesses indivíduos¹⁵. Para além disso, a resistência à insulina e hiperglicemia estão associados à diminuição do pulso de secreção da GnRH²⁷, que por sua vez, diminui a secreção da LH, culminando numa menor secreção de testosterona²⁸.

A resistência à insulina é também responsável por diminuir a bioatividade de óxido nítrico (diminui vasodilatação); desregular o sistema nervoso autónomo simpático; e causar hipertensão²⁹. Todas estas condições estão na origem da disfunção erétil. Do mesmo modo, a testosterona é um importante regulador hormonal da fisiologia peniana e está envolvida na ereção³⁰. Por estes motivos, indivíduos com diabetes e excesso de peso tendem a ter um maior risco de apresentar disfunção erétil³¹. No entanto, foi descrito que o tratamento com metformina não só restaura os níveis de testosterona¹⁵, como também melhora a vasodilatação e exerce um efeito protetor no sistema nervoso simpático em doentes com doenças metabólicas²⁹. Num estudo feito em humanos com resistência à insulina, o tratamento com metformina (1700 mg/dia) durante 4 meses, melhorou significativamente a disfunção erétil nesses pacientes, tendo por base o questionário da *International Index of Erectile Function 5*³².

Estes estudos vêm demonstrar que a restauração dos níveis de LH e testosterona conseguidos no tratamento de indivíduos diabéticos com metformina pode ser um passo essencial para melhorar a fertilidade masculina, uma vez que a função principal da LH é a ativação do processo de síntese de esteroides (esteroidogénese) nas células de Leydig. Para consolidar este papel benéfico da metformina na saúde reprodutiva de indivíduos diabéticos e/ou com excesso de peso (ou obesos), tem sido demonstrado que o tratamento com este fármaco restaura o apetite sexual³², o que promove melhoria na vida sexual do paciente.

Efeito do tratamento com metformina na funcionalidade das células testiculares

Depois de libertada pela hipófise, a LH vai entrar no sistema circulatório e atuar nas células de Leydig, estimulando a produção de testosterona, através de um processo de esteroidogénese³³. Pacientes com doenças metabólicas, como diabetes de tipo 2 e/ou obesidade, têm um risco acrescido de possuir a esteroidogénese desregulada uma vez que tendem a ter um estado inflamatório contínuo e, por sua vez, concentração aumentada de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e espécies reativas de oxigénio (ROS) em circulação³⁴. Estudos *in vitro* em células de Leydig de murganhos, descreveram que TNF- α inibe a expressão da proteína StAR, que é essencial para a ocorrência da esteroidogénese³⁵, podendo explicar assim o decréscimo nos níveis circulantes de testosterona descritos em alguns pacientes diabéticos³⁶. No entanto, a metformina mostrou ser capaz de restaurar os níveis de testosterona e de LH no tecido testicular de ratos com diabetes tipo 1. Os autores deste estudo descreveram que o tratamento com metformina parece exercer um efeito protetor na função reprodutiva masculina ao melhorar o estado antioxidante dos tecidos³⁷. Devido ao elevado nível de glucose em circulação, os tecidos tendem a produzir ROS em excesso. A metformina, com o seu efeito antioxidante, tem sido descrita como sendo capaz de reverter a excessiva formação de ROS e assim regular a esteroidogénese³⁷.

Um estudo em roedores expôs uma possível explicação para o aumento de secreção de testosterona aquando do tratamento de indivíduos diabéticos e/ou com excesso de peso (ou obesos)

tratados com metformina. Ratos com diabetes tipo 1 tratados com doses de 300 mg/kg de metformina durante 4 semanas, exibiram um aumento na expressão da proteína StAR, o que levou a um aumento na concentração de testosterona circulante para níveis semelhantes aos de animais saudáveis³⁸. Nesses animais, o tratamento com metformina (300 mg/kg) reduziu significativamente a expressão de enzimas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas nos tecidos testiculares. Para além disso, o tratamento com metformina foi capaz de evitar as alterações severas na morfologia testicular (que incluíram um decréscimo no diâmetro dos túbulos seminíferos e um aumento na percentagem de túbulos seminíferos sem células germinativas) observada nos animais do grupo diabético sem tratamento³⁹. Adicionalmente, este agente farmacológico também conseguiu aumentar a produção de testosterona em circulação, ao inibir a expressão da aromatase no tecido adiposo⁴⁰. Ao inibir a expressão desta enzima, diminui a aromatização dos androgénios a estrogénios observada nos indivíduos metabolicamente doentes⁴¹.

Como, referido, os níveis de testosterona são essenciais para o normal desenvolvimento da espermatogénese, a aromatização dos androgénios pode refletir-se na quantidade e qualidade dos espermatozoides produzidos. Isto é devido, em grande parte, à importância da testosterona na fisiologia das células somáticas responsáveis pelo desenvolvimento das células germinativas: as células de Sertoli. Estas células são responsáveis por suportar física e nutricionalmente as células germinativas em desenvolvimento. De facto, estudos feitos em roedores com diabetes tipo 2

reportaram um decréscimo na expressão de recetores de androgénios nas células de Sertoli. Mais ainda, a deficiência em testosterona levou a uma expressão diminuída de transportadores membranares de glucose (GLUT1 e GLUT3), assim como de enzimas importantes no processo de glicólise⁴², sendo que o processo glicolítico é a via prioritária no metabolismo da glucose nas células de Sertoli. Embora esta preferência metabólica não seja a mais eficaz energeticamente, permite a produção e secreção de lactato para o fluido intratubular de modo a que este possa ser usado pelas células germinativas em desenvolvimento, sendo que este é essencial para o normal desenvolvimento da espermatogénese⁴³. No entanto, a deficiência em testosterona, que normalmente se observa em indivíduos diabéticos, resulta numa diminuição da expressão e a atividade da lactato desidrogenase, a enzima responsável pela produção do lactato⁴². O mesmo grupo de trabalho estudou o efeito do tratamento de células de Sertoli de

murganhos cultivadas em meio hiperglicémico e tratadas com metformina. Quando incubadas com concentrações farmacológicas de metformina (50 μ M), as células de Sertoli produziram e secretaram maior quantidade de lactato¹⁰. Estes resultados foram vistos como um bom indicador de proteção do evento espermatogénico, visto que o lactato, além de ser o substrato preferencial para produção de energia, possui propriedades antiapoptóticas para as células germinativas^{44,45}. Tendo isto em conta, estes mecanismos podem ser os responsáveis pelo aumento do potencial fértil associado ao tratamento com metformina de pacientes com doenças metabólicas.

A literatura publicada parece evidenciar que a metformina tem um efeito protetor na fertilidade de homens metabolicamente doentes. Isto é sugerido tendo em conta a secreção das hormonas gonadotrofinas, mas também pela produção e secreção de testosterona, bem como pelos efeitos no metabolismo das células de Sertoli (Figura 1).

Este conjunto de evidências parece aju-

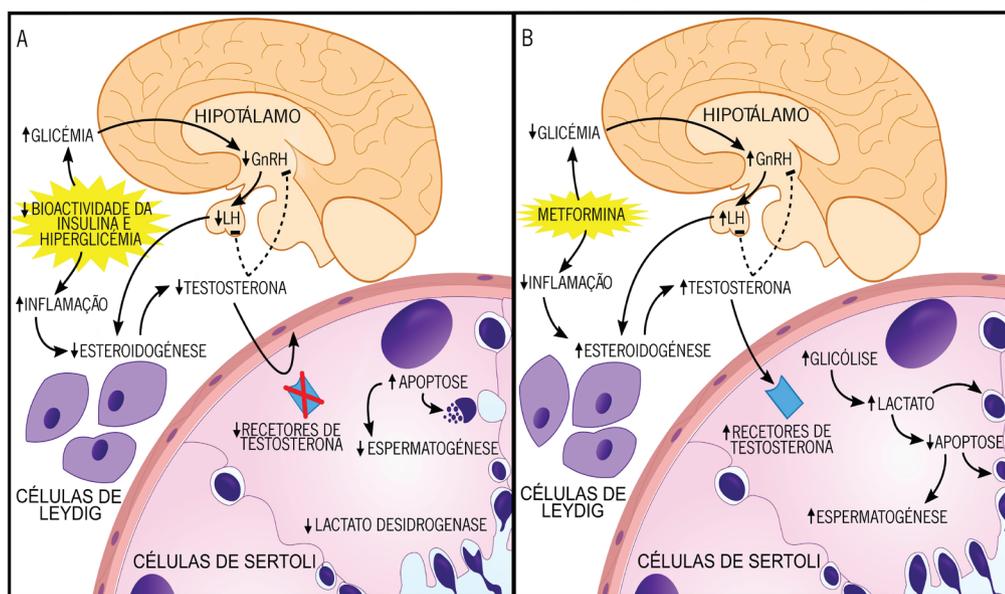


Figura 1. Possível mecanismo de desregulação da fertilidade de homens metabolicamente doentes (Painel A) e efeito protetor da metformina (Painel B). Legenda: GnRH – hormona libertadora de gonadotrofinas; LH – hormona luteinizante; ↑ aumento; ↓ diminuição; ↑/L- promoção/inibição.

dar a compreender como se dá a melhoria dos parâmetros espermáticos e fertilidade nos estudos em modelos animais e humanos acima descritos, após o tratamento com metformina. No entanto, todos estes estudos procuraram compreender o que acontecia em condições em que ocorriam ou se mimetizavam doenças metabólicas como diabetes e/ou excesso de peso. Felizmente, o efeito do tratamento com metformina em modelos saudáveis também foram estudados por alguns investigadores.

O lado negro da metformina na fertilidade masculina

Embora os efeitos benéficos da metformina no controlo da glucose sistémica sejam muitos, há que considerar alguns efeitos secundários. O tratamento com metformina é considerado relativamente seguro e sem efeitos secundários graves. De um modo geral o tratamento com metformina acarreta uma certa possibilidade de ocorrerem efeitos gastrointestinais adversos, bem como uma pequena probabilidade de ocorrer acidose láctica. Tendo isto em conta, este fármaco não é aconselhado para o tratamento de pacientes diabéticos com problemas diagnosticados de coração ou fígado já que pode piorar estas condições⁶. Alguns estudos publicados vieram ainda demonstrar que dependendo do tipo e forma de tratamento com metformina, esta pode ter alguns efeitos negativos na fertilidade masculina.

Estudos feitos em modelos animais saudáveis tratados por 21 dias com metformina (30 mg/kg/dia) mostraram que ratos tratados tinham menor tamanho testicular e diâmetro dos túbulos seminíferos. Os autores determinaram que tal facto se devia à diminuição do

número de células de Sertoli, e era por isso responsável por uma diminuição nos valores dos parâmetros espermáticos desses animais⁴⁶. Noutro estudo desenvolvido em aves saudáveis em idade pré-pubertal em que foi feito um tratamento com metformina (150 mg/kg/dia) durante 3 semanas, verificou-se uma diminuição no número de células de Sertoli ao induzir uma diminuição da sua proliferação. Os autores descreveram que este tratamento pareceu atrasar o desenvolvimento das células germinativas, tendo em conta a fisiologia dos túbulos seminíferos após o tratamento⁴⁷. A capacidade da metformina em diminuir a proliferação celular já é conhecida e até já foi discutida a hipótese de a usar no tratamento de tumores⁴⁸. No entanto, em indivíduos saudáveis, esta capacidade apresentada por este fármaco parece ter efeitos negativos no desenvolvimento dos órgãos sexuais, dado que um estudo em roedores⁴⁹ demonstrou resultados semelhantes aos descritos no estudo com aves discutido anteriormente. Estes trabalhos alertam para os efeitos deletérios que a metformina pode ter na fertilidade de indivíduos saudáveis. No entanto, já é de conhecimento geral que a toma de fármacos não é aconselhada quando não se verifica uma condição de diagnóstico que o justifique. Tendo isto em consideração, Forcato e colaboradores desenvolveram um estudo onde se focaram no efeito na fertilidade das crias do sexo masculino de roedoras diabéticas tratadas com metformina durante gestação⁵⁰. Nesse estudo, as mães dos animais foram tratadas desde o primeiro dia de gestação até ao vigésimo dia de lactação com uma dose de 300 mg/kg/dia de metformina. As crias do

sexo masculino, de mães tratadas com metformina, apresentavam uma menor concentração espermática quando atingiram idade reprodutiva, assim como um comportamento sexual diferente em relação às crias de mães não tratadas. Estes animais registaram um maior número de penetrações até atingirem a ejaculação e mais tempo até à primeira cópula, apesar de não haver diferenças significativas relativamente ao peso e tamanho testicular entre os dois grupos⁵⁰. Este estudo evidencia que é possível um indivíduo saudável estar em contacto com metformina e sofrer uma desregulação na sua fertilidade, visto que este fármaco pode ser prescrito, em algumas ocasiões, para o tratamento de diabetes gestacional⁵¹. De facto, um estudo feito em bebés de mulheres grávidas com diabetes gestacional que foram tratadas com 1500 mg/dia de metformina entre a 22^a a 34^a semanas de gestação e após o nascimento, não observou nenhuma diferença no peso dos testículos da descendência⁵¹. No entanto, não é possível estudar o potencial reprodutivo uma vez que a idade reprodutiva do ser humano é muito superior ao dos modelos animais, o que dificulta a verificação dos resultados obtidos no modelo animal, deixando assim esta questão ainda em discussão.

CONCLUSÃO

Os estudos referenciados ajudam a compreender o impacto das doenças metabólicas (diabetes e obesidade) e do tratamento com metformina na fertilidade masculina. De um modo geral, o tratamento com metformina está associado a um papel protetor da fertilidade masculina quando é aplicado a indivíduos

os com doenças metabólicas. Este fármaco restaura a secreção de hormonas gonadotrofinas como a LH, tendo um efeito positivo na esteroidogénese, bem como no metabolismo das células de Sertoli. No entanto, quando os estudos são realizados em indivíduos saudáveis, a metformina parece ter efeitos deletérios no potencial reprodutivo masculino, promovendo uma diminuição da concentração espermática e alterações na morfologia testicular. Apesar disso, muitas questões permanecem em aberto e mais estudos serão necessários para saber os mecanismos de ação que o tratamento com metformina desencadeia no sistema reprodutor masculino de indivíduos doentes (diabetes, obesidade, etc.), mas também em indivíduos metabolicamente saudáveis. O conhecimento destes mecanismos moleculares vai permitir elucidar de que modo a metformina afeta a reprodução de homens e a saúde reprodutiva masculina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;138:271-81.
2. American Diabetes A. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Suppl 1):S55-S64.
3. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Suppl 1):S13-S27.
4. Riobo Servan P. Obesity and diabetes. *Nutr Hosp.* 2013;28 Suppl 5:138-43.

5. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S64-71.
6. Meneses MJ, Silva BM, Sousa M, Sa R, Oliveira PF, Alves MG. Antidiabetic Drugs: Mechanisms of Action and Potential Outcomes on Cellular Metabolism. *Curr Pharm Des*. 2015;21(25):3606-20.
7. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995;333(9):550-4.
8. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-74.
9. Ford RJ, Fullerton MD, Pinkosky SL, Day EA, Scott JW, Oakhill JS, et al. Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity. *Biochem J*. 2015;468(1):125-32.
10. Alves MG, Martins AD, Vaz CV, Correia S, Moreira PI, Oliveira PF, et al. Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism. *Br J Pharmacol*. 2014;171(4):1033-42.
11. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol*. 2012;9(6):330-8.
12. Ferreira C, Sousa M, Rabaca A, Oliveira PF, Alves MG, Sa R. Impact of Metformin on Male Reproduction. *Curr Pharm Des*. 2015;21(25):3621-33.
13. Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(9):1115-37.
14. Lie PP, Cheng CY, Mruk DD. Signaling pathways regulating the blood-testis barrier. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(3):621-5.
15. Morgante G, Tosti C, Orvieto R, Mucacchio MC, Piomboni P, De Leo V. Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95(6):2150-2.
16. Pivonello R, Menafrà D, Riccio E, Garifalos F, Mazzella M, de Angelis C, et al. Metabolic Disorders and Male Hypogonadotropic Hypogonadism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:345.
17. Akarsu C, Caglar G, Vicdan K, Isik A, Tuncay G. Pregnancies achieved by testicular sperm recovery in male hypogonadotrophic hypogonadism with persistent azoospermia. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(4):455-9.
18. Meseguer M, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Gil-Salom M. Testicular sperm extraction (TESE) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in hypogonadotropic hypogonadism with persistent azoospermia after hormonal therapy. *J Assist Reprod Genet*. 2004;21(3):91-4.
19. Bang JK, Lim JJ, Choi J, Won HJ, Yoon TK, Hong JY, et al. Reversible infertility associated with testosterone therapy for symptomatic hypogonadism in infertile couple. *Yonsei Med J*. 2013;54(3):702-6.
20. Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod*. 2006;74(6):993-8.
21. Su L, Mruk DD, Cheng CY. Drug transporters, the blood-testis barrier

- er, and spermatogenesis. *J Endocrinol.* 2011;208(3):207-23.
22. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Pouretezari M. Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice. *Iran J Reprod Med.* 2013;11(1):53-60.
23. Bosman E, Esterhuizen AD, Rodrigues FA, Becker PJ, Hoffmann WA. Effect of metformin therapy and dietary supplements on semen parameters in hyperinsulinaemic males. *Andrologia.* 2015;47(9):974-9.
24. Kamaruzaman KA, Aizat WM, Mat Noor M. Gynura procumbens Improved Fertility of Diabetic Rats: Preliminary Study of Sperm Proteomic. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;2018:9201539.
25. Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V, Froment P. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology.* 2014;68(2):262-8.
26. Attia SM, Helal GK, Alhaider AA. Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. *Chem Biol Interact.* 2009;180(2):296-304.
27. Costanzo PR, Suarez SM, Scaglia HE, Zylbersztein C, Litwak LE, Knoblovits P. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in eugonadal men with type 2 diabetes mellitus. *Andrology.* 2014;2(1):117-24.
28. George JT, Veldhuis JD, Tena-Sempere M, Millar RP, Anderson RA. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;79(1):100-4.
29. Patel JP, Lee EH, Mena CI, Walker CN. Effects of metformin on endothelial health and erectile dysfunction. *Transl Androl Urol.* 2017;6(3):556-65.
30. Isidori AM, Buvat J, Corona G, Goldstein I, Jannini EA, Lenzi A, et al. A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: from pathophysiology to treatment-a systematic review. *Eur Urol.* 2014;65(1):99-112.
31. Demir O, Demir T, Kefi A, Secil M, Comlekci A, Yesil S, et al. Penile vascular impairment in erectile dysfunction patients with metabolic syndrome: penile Doppler ultrasound findings. *Urol Int.* 2009;82(2):175-8.
32. Rey-Valzacchi GJ, Costanzo PR, Finger LA, Layus AO, Gueglio GM, Litwak LE, et al. Addition of metformin to sildenafil treatment for erectile dysfunction in eugonadal nondiabetic men with insulin resistance. A prospective, randomized, double-blind pilot study. *J Androl.* 2012;33(4):608-14.
33. Diemer T, Hales D, Weidner W. Immune-endocrine interactions and Leydig cell function: the role of cytokines. *Andrologia.* 2003;35(1):55-63.
34. Moon YS, Kim DH, Song DK. Serum tumor necrosis factor-alpha levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism.* 2004;53(7):863-7.
35. Budnik LT, Jähner D, Mukhopadhyay AK. Inhibitory effects of TNF α on mouse tumor Leydig cells: possible role of ceramide in the mechanism of action. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;150(1-2):39-46.
36. Li Y, Zhang M, Liu X, Cui W, Ram-

persad S, Li F, et al. Correlates and prevalence of hypogonadism in patients with early- and late-onset type 2 diabetes. *Andrology*. 2017;5(4):739-43.

37. Nasrolahi O, Khaneshi F, Rahmani F, Razi M. Honey and metformin ameliorated diabetes-induced damages in testes of rat; correlation with hormonal changes. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(12):1013-20.

38. Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M. Down-regulation of steroidogenesis-related genes and its accompanying fertility decline in streptozotocin-induced diabetic male rats: ameliorative effect of metformin. *Andrology*. 2019;7(1):110-23.

39. Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M. Diabetes-induced testicular oxidative stress, inflammation, and caspase-dependent apoptosis: the protective role of metformin. *Arch Physiol Biochem*. 2018:1-12.

40. Samarajeewa NU, Ham S, Yang F, Simpson ER, Brown KA. Promoter-specific effects of metformin on aromatase transcript expression. *Steroids*. 2011;76(8):768-71.

41. Polari L, Yatkin E, Martinez Chacon MG, Ahotupa M, Smeds A, Strauss L, et al. Weight gain and inflammation regulate aromatase expression in male adipose tissue, as evidenced by reporter gene activity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;412:123-30.

42. Rato L, Alves MG, Duarte AI, Santos MS, Moreira PI, Cavaco JE, et al. Testosterone deficiency induced by progressive stages of diabetes mellitus impairs glucose metabolism and favors glycolysis in mature rat Sertoli cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;66:1-10.

43. Oliveira PF, Martins AD, Moreira AC, Cheng CY, Alves MG. The Warburg effect revisited lesson from the Sertoli cell. *Med Res Rev*. 2015;35(1):126-51.

44. Dias T, Martins A, Reis V, Socorro S, Silva B, Alves M, et al. Glucose Transport and Metabolism in Sertoli Cell: Relevance for Male Fertility. *Current Chemical Biology*. 2013;7:282-93.

45. O'Donnell JM, Kudej RK, LaNoue KF, Vatner SF, Lewandowski ED. Limited transfer of cytosolic NADH into mitochondria at high cardiac workload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(6):H2237-H42.

46. Adaramoye O, Akanni O, Adesanoye O, Labo-Popoola O, Olaremi O. Evaluation of toxic effects of metformin hydrochloride and glibenclamide on some organs of male Rats. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria*. 2012;27:137-44.

47. Faure M, Guibert E, Alves S, Pain B, Rame C, Dupont J, et al. The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell populations. *Reproduction*. 2016;151(5):527-38.

48. Mitsuhashi A, Kiyokawa T, Sato Y, Shozu M. Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: a preoperative prospective trial. *Cancer*. 2014;120(19):2986-95.

49. Rindone GM, Gorga A, Regueira M, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Galardo MN, et al. Metformin counteracts the effects of FSH on rat Sertoli cell proliferation. *Reproduction*. 2018;156(2):93-101.

50. Forcato S, Novi D, Costa NO, Borges LI, Goes MLM, Ceravolo GS, et al. In utero and lactational exposure to metformin in-

duces reproductive alterations in male rat offspring. *Reprod Toxicol.* 2017;74:48-58.
51. Terti K, Toppari J, Virtanen HE, Sadow S, Ronnema T. Metformin Treat-

ment Does Not Affect Testicular Size in Offspring Born to Mothers with Gestational Diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2016;13(1):59-65.