



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas


Durval Santos Marques

Programação metabólica do testículo em ratos injetados com leptina nos primeiros dias de vida

Rio de Janeiro
2012

Durval Santos Marques

Programação metabólica do testículo em ratos injetados com leptina nos primeiros dias de vida



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M357 Marques, Durval Santos.
Programação metabólica do testículo em ratos injetados com leptina nos primeiros dias de vida / Durval Santos Marques. – 2012.
64 f. : il.

Orientadora: Cristiane da Fonte Ramos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Testículo – Teses. 2. Espermatozoides – Teses. 3. Leptina – Metabolismo – Teses. I. Ramos, Cristiane da Fonte. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 611.631

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Durval Santos Marques

Programação metabólica do testículo em ratos injetados com leptina nos primeiros dias de vida

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Aprovada em 27 de Junho de 2012.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Vanessa de Souza Mello
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Marcio Antônio Babinski
Universidade Federal Fluminense.

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À mulher que dedicou seu esforço e seu trabalho a mim,
querida mãe que foi a pessoa mais importante em minha
vida, Diva da Silva Santos (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora prof^a. Dr^a Cristiane da Fonte Ramos, mulher incansável, por ter me dado à chance de chegar até este momento, sua dedicação, confiança, compromisso e por compartilhar seu conhecimento e ter me ajudado durante todo esse processo.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, pelo cuidado extremo com a qualidade do curso, e aos docentes da Unidade de Pesquisa Urogenital, Departamento de Anatomia Humana da UERJ, por incentivarem os alunos a prosseguirem com a ciência.

Aos amigos: Jorge Alves, Eduardo Leze, Fernanda Cavalcante e Rafaela Veiga, por toda a colaboração, amizade e companheirismo dessa equipe nos momentos que passamos em nossa lida diária.

A Flávia Gombar pelas análises dos espermatozoides, pela colaboração, companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa do laboratório de Estrutura e Ultraestrutura da Unidade de Pesquisa Urogenital. Pelo companheirismo, carinho, força dada em todos os momentos que precisei e pelos ensinamentos que foram importantes no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda do Laboratório de Morfometria Metabolismo e Doença Cardiovascular (LMMC), por primar pelo crescimento científico de seus alunos, pelas aulas de biometria, estereologia e por ter aberto as portas de seu laboratório para que parte importante dessa pesquisa fosse concluída.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo suporte financeiro na forma de Bolsa de Mestrado (Processo nº E-26/102.585/2010).

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis!

Fernando Pessoa

RESUMO

MARQUES, Durval Santos, *Programação metabólica do testículo em ratos injetados com leptina nos primeiros dias de vida*. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A leptina tem importante papel na regulação do sistema reprodutivo além de seu papel principal na regulação do peso corporal e ingestão alimentar. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração de leptina durante o período neonatal na função testicular da prole adulta. Vinte e quatro filhotes de 12 mães foram divididos em 2 grupos: Grupo leptina: injetados com 50 μ L de leptina (80ng/gMC, subcutânea) nos primeiros 10 dias de vida e Grupo Controle: injetados com o mesmo volume de solução salina. Os animais foram sacrificados aos 90 dias de vida. Parâmetros analisados: consumo alimentar, massa corporal, crescimento linear, início da puberdade, perfil lipídico, níveis séricos de estradiol e testosterona, expressão gênica e expressão proteica de ObRa, ObRb, aromatase, AR, ER, morfometria testicular, número, morfologia e viabilidade de espermatozoides. Dados expressos como média \pm erro padrão. Significância estatística determinada pelo teste t de *Student*. A Injeção de leptina levou a uma redução ($p \leq 0,008$) no consumo alimentar do dia 26 ao 40 e do dia 70 em diante, a massa corporal ($p \leq 0,03$) e o crescimento linear ($p \leq 0,05$) foram reduzidos do dia 26 até o dia 45. A massa da hipófise ($p \leq 0,0006$), hipotálamo ($p \leq 0,01$), próstata ($p \leq 0,003$), testículo ($p \leq 0,008$), epidídimo ($p \leq 0,004$) e bexiga ($p \leq 0,009$) foram significativamente reduzidas. Houve adiantamento do início da puberdade ($C=45,0 \pm 0,3$; $L=41,6 \pm 0,3$; dias, $P \leq 0,0001$). No perfil lipídico, houve aumento nos níveis séricos de TG ($C=116,5 \pm 15,9$; $L=172,6 \pm 19,7$; mg/dL, $P \leq 0,05$) e redução nos níveis de HDL ($C=33 \pm 1,5$; $L=24 \pm 3,5$; mg/dL, $P \leq 0,02$). Níveis séricos de testosterona foram reduzidos pela leptina ($C=5,2 \pm 1,0$; $L=1,1 \pm 0,3$; mg/mL, $P \leq 0,003$). Todos os genes avaliados por PCR em tempo real mostraram aumento na sua expressão: ObRa ($C=0,32 \pm 0,04$; $L=0,69 \pm 0,16$; $P \leq 0,04$), ObRb ($C=0,37 \pm 0,06$; $L=0,71 \pm 0,16$; $P \leq 0,03$), AR ($C=0,28 \pm 0,02$; $L=0,71 \pm 0,16$; $P \leq 0,02$), Aromatase ($C=0,31 \pm 0,04$; $L=0,53 \pm 0,09$; $P \leq 0,04$), ER- α ($C=0,79 \pm 0,03$; $L=0,93 \pm 0,03$; $P \leq 0,01$), ER- β ($C=0,29 \pm 0,03$; $L=0,73 \pm 0,16$; $P \leq 0,02$). A expressão proteica de ObR ($C=4,4 \pm 0,29$; $L=6,6 \pm 0,84$; $P \leq 0,05$), ER- α ($C=0,4 \pm 0,02$; $L=0,6 \pm 0,05$; $P \leq 0,03$) e aromatase ($C=0,4 \pm 0,03$; $L=0,5 \pm 0,02$; $P \leq 0,04$) aumentaram, enquanto que a expressão proteica de AR ($C=0,16 \pm 0,01$; $L=0,09 \pm 0,01$; $P \leq 0,009$) foi reduzida. Análise morfométrica mostrou que a leptina aumentou a área total do túbulo seminífero ($C=64,6 \pm 3,1$; $L=73,9 \pm 1,7$; μm^2 , $P \leq 0,01$), aumentou a área luminal ($C=40,6 \pm 2,3$; $L=48,7 \pm 0,9$; μm^2 , $P \leq 0,004$) e altura do epitélio ($C=21,5 \pm 1,2$; $L=24,6 \pm 1,1$; μm , $P \leq 0,03$), reduzindo comprimento do túbulo seminífero ($C=2200 \pm 350$; $L=1100 \pm 110$; cm, $P \leq 0,006$). O grupo tratado apresentou aumento no número total de espermatozoides ($C=20 \times 10^7 \pm 2 \times 10^7$; $L=30 \times 10^7 \pm 5 \times 10^7$; CIs/mL, $P \leq 0,009$) e no número de anormalidades ($C=40,6 \pm 1,9$; $L=45,8 \pm 1,2$, $P \leq 0,049$). Concluímos que a leptina tem papel importante na morfologia e função testicular e parece ter efeito direto neste tecido uma vez que a expressão gênica e proteica foram alterados pela administração da leptina.

Palavras-Chave: Leptina. Testículo. Espermatozoide. Programação metabólica.

ABSTRACT

Leptin has an important role in regulating the reproductive system besides its main role in the regulation of body weight and food intake. The aim of this study was to evaluate the effect of leptin administration during the neonatal period in the testis function of the adult offspring. Twenty-four pups from 12 dams were separated into 2 groups: Leptin group: injected with 50 μ L of leptin (80ng/gBW, subcutaneous); control group: injected with the same volume of saline solution for the first 10 days of life. All animals were killed at 90 days of life. Parameters analyzed: Body weight, linear growth and food consumption; onset of puberty, lipid profile, testosterone and estradiol serum levels, gene (Real time PCR) and protein expression (Western blot) of OBRa, OBRb, aromatase, AR, ER, testicular morphometry, spermatozoa number, morphology and viability. Data were expressed as mean \pm standard error. Statistical significance was determined by student's t-test. Leptin injection led to a reduction in food consumption ($p \leq 0.008$) from day 26 to 40 and from day 70 onward while body weight ($p \leq 0.03$) and linear growth ($p \leq 0.05$) were reduced from 26 to 45 days of life. Pituitary ($p \leq 0.0006$), hypothalamus ($p \leq 0.01$), prostate ($p \leq 0.003$), testis ($p \leq 0.008$), epididymis ($p \leq 0.004$) and bladder ($p \leq 0.009$) weights were significantly reduced by leptin injection. Leptin injection also advanced the onset of puberty (C=45.0 \pm 0.3; L=41.6 \pm 0.3; days, $P \leq 0.0001$). In relation to lipid profile, leptin administration led to an increase in TG (C=116.5 \pm 15.9; L=172.6 \pm 19.7; ng/dL, $P \leq 0.05$) and a reduction in HDL (C=33 \pm 1.5; L=24 \pm 3.5; ng/dL, $P \leq 0.02$) serum levels. Testosterone serum levels (C=5.2 \pm 1.0; L=1.1 \pm 0.28; ng/mL, $P \leq 0.003$) were also reduced by leptin. All gene evaluated by real time PCR showed an increase in its expression: OBRa (C=0.32 \pm 0.04; L=0.69 \pm 0.16; $P \leq 0.04$), OBRb (C=0.37 \pm 0.06; L=0.70 \pm 0.16; $P \leq 0.03$), AR (C=0.28 \pm 0.02; L=0.71 \pm 0.16; $P \leq 0.02$), Aromatase (C=0.31 \pm 0.04; L=0.53 \pm 0.09; $P \leq 0.04$), ER- α (C=0.79 \pm 0.03; L=0.92 \pm 0.03; $P \leq 0.01$), ER- β (C=0.29 \pm 0.03; L=0.7286 \pm 0.16; $P \leq 0.02$). On the other hand, the protein expression of OBR (C=4.4 \pm 0.29; L=6.6 \pm 0.84; $P \leq 0.05$), ER- α (C=0.4 \pm 0.02; L=0.44 \pm 0.02; $P \leq 0.03$) and aromatase (C=0.4 \pm 0.03; L=0.5 \pm 0.01; AU, $P \leq 0.04$) were increased while AR (C=0.16 \pm 0.01; L=0.09 \pm 0.01; $P \leq 0.009$) was reduced by leptin administration. The morphometric analysis showed that leptin led to an increase in the total area (C=64.6 \pm 3.1; L=56.1 \pm 2.1; μm^2 $P \leq 0.01$) and luminal areas (C=40.6 \pm 2.3; L=48.7 \pm 0.9; μm^2 $P \leq 0.004$) and in the epithelial height (C=21.5 \pm 1.2; L=24.6 \pm 1.1; μm $P \leq 0.03$), while the length of seminiferous tubule was reduced (C=2200 \pm 350; L= 1100 \pm 110; cm $P \leq 0.006$). Leptin administration led to an increase in the total number of spermatozoa (C=20 \times 10⁷ \pm 2 \times 10⁷; L=30 \times 10⁷ \pm 5 \times 10⁷; $P \leq 0.009$) and in the number of abnormalities (C=40.6 \pm 1.9; L=45.8 \pm 1.2; $P \leq 0.049$). We can conclude that leptin has an important role in the morphology and testis function. The leptin effect seems to be direct in this tissue since the gene and protein expression of OBR, AR, ER and aromatase and spermatozoa number were changed by leptin administration.

Keywords: Leptin. Testis. Spermatozoa. Programming metabolic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração de túbulo seminífero com células germinativas.....	19
Figura 2 -	Ilustração das isoformas dos receptores de leptina.....	23
Figura 3 -	Foto de acompanhamento da separação do prepúcio e exposição da glândula, indicando início da puberdade.....	31
Figura 4 -	Fotomicrografia de corte transversal de túbulo seminífero.....	35
Fórmula -	Fórmula e cálculo Comprimento túbulos seminíferos.....	35
Figura 5 -	Consumo alimentar, Massa corporal e Comprimento linear de animais tratados com solução salina (C) ou Leptina (L) (80ng/g peso corporal) nos dez primeiros dias de vida.....	38
Figura 6 -	Peso da Hipófise, hipotálamo, Próstata, Testículo, Epidídimo e Bexiga de animais tratados com solução salina (C) ou Leptina (L) (80ng/g peso corporal) nos dez primeiros dias de vida.....	39
Figura 7 -	Início da puberdade nos animais tratados com Leptina (80ng/g peso corporal) nos primeiros dias de vida.....	40
Figura 8 -	Perfil lipídico de animais tratados com solução salina (C) ou Leptina (L) (80ng/g peso corporal) nos dez primeiros dias de vida. Triglicerídeos, Colesterol e HDL.....	40
Figura 9 -	Expressão Gênica nos animais tratados com solução salina (C) ou leptina (L) (80ng/g peso corporal) nos primeiros dias de vida. Ob-Ra, Ob-Rb, AR, Aromatase, ER- α e ER- β	41
Figura 10 -	Expressão Proteica por Western Blot nos animais tratados com salina (C) e leptina (L) (80ng/g peso corporal) nos primeiros dias de vida. Ob-R, ER- α , ER- β , AR e Aromatase.....	42
Figura 11 -	Concentrações séricas de testosterona e estradiol de animais tratados com salina (C) ou leptina (L) (80ng/g peso corporal) nos dez primeiros dias de vida.....	43
Figura 12 -	Morfometria dos testículos de animais tratados com salina ou leptina (80ng/g peso corporal) nos primeiros dias de vida. Área total dos túbulos seminíferos, Altura do epitélio seminífero, Área do lúmen seminífero, Comprimento linear total do túbulo seminífero.	43
Figura 13 -	Fotomicrografia dos túbulos seminíferos de animais tratados com salina (C) e leptina (L) (80ng/g peso corporal) nos primeiros dias de vida.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para as ampliações na técnica de PCR em tempo real.....	33
Tabela 2 - Tabela de anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de western blot.....	34
Tabela 3 - Análise de espermatozoides de animais tratados com leptina.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Receptor de androgênio
actina	Proteína Actina
Fos	Proteína marcadora de atividade neuronal
ER- α	Receptor de estrogênio alfa
ER- β	Receptor de estrogênio beta
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Ob-Ra	Isoforma a do Receptor de Leptina (Isoforma curta)
Ob-Rb	Isoforma b do Receptor de Leptina (Isoforma longa)
Ob-Rc	Isoforma c do Receptor de Leptina (Isoforma curta)
Ob-Rd	Isoforma d do Receptor de Leptina (Isoforma curta)
OB-Re	Isoforma e do Receptor de Leptina (Isoforma Solúvel)
Ob-Rf	Isoforma f do Receptor de Leptina (Isoforma curta)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
TBP	Proteína de Ligação do gene TATA -Box

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm	Mais ou menos
\leq	Menor ou igual
β	Beta
α	Alfa
$^\circ$	Grau(s)
π	Pi
μ	Micro
®	Marca registrada

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1	Função testicular.....	19
1.2	Regulação hormonal do testículo.....	20
1.2.1	<u>Androgênio e seu receptor.....</u>	21
1.2.2	<u>Estrogênios e seus receptores.....</u>	21
1.2.3	<u>Aromatase.....</u>	22
1.3	Leptina e seus Receptores.....	22
1.3.1	<u>Leptina e função hipotalâmica.....</u>	24
1.3.2	<u>Leptina e sistema reprodutor.....</u>	24
1.3.3	<u>Leptina e puberdade.....</u>	26
1.3.4	<u>Leptina e programação metabólica.....</u>	27
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Comitê de Ética.....	30
4.2	Modelo Experimental.....	30
4.3	Acompanhamento da Puberdade.....	31
4.4	Radioimunoensaio (RIE).....	32
4.5	Perfil Lipídico.....	32
4.6	PCR em Tempo Real.....	32
4.7	Western Blot.....	33

4.8	Procedimentos histológicos	34
4.9	Morfometria do Testículo	35
4.9.1	<u>Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero</u>	35
4.9.2	<u>Comprimento total dos túbulos seminíferos</u>	35
4.10	Análise dos espermatozoides	36
4.10.1	<u>Morfologia dos espermatozoides</u>	36
4.10.2	<u>Viabilidade dos espermatozoides</u>	37
4.11	Análise estatística	37
5	RESULTADOS	38
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO - Comitê de Ética em Pesquisa	64

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais da anatomia, histologia e fisiologia do Sistema Reprodutor Masculino Humano:

Os testículos se desenvolvem dentro da cavidade abdominal e descem para a bolsa escrotal logo após o nascimento, onde a temperatura é mantida alguns graus abaixo da temperatura corpórea [1]. O testículo é um órgão par que sob controle do eixo hipotálamo-hipófise desempenha basicamente duas funções: produção de espermatozoides e síntese de esteroides [2-4]. Cada testículo apresenta dois polos (superior e inferior), duas margens (lateral e medial) e duas faces, uma anterior e uma posterior, coberta pelo epidídimo. O testículo é composto de numerosos túbulos seminíferos (células de *Sertoli* e germinativas) e espaço intersticial (células de *Leydig*). Revestindo cada testículo, há uma cápsula de tecido conjuntivo - a túnica albugínea. Externamente à albugínea, nas regiões laterais e anteriores, se localiza a túnica vaginal [5]. A túnica albugínea projeta-se para o interior formando o mediastino do testículo e dele partem septos fibrosos, dividindo o órgão em 200 a 300 lóbulos piramidais. Cada lóbulo possui tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células intersticiais e de um a quatro túbulos seminíferos, onde são produzidos os espermatozoides [1,6].

O epidídimo é um ducto altamente enovelado que liga o ducto eferente ao deferente e é o sítio onde o espermatozoide ganha motilidade e torna-se fértil [7]. Localiza-se na face póstero-lateral do testículo homolateral. Cada um deles apresenta uma porção superior dilatada (cabeça), uma porção central (corpo) e uma extremidade inferior afilada (cauda) [8-10]. É formado por epitélio colunar pseudo-estratificado com estereocílios. As células epiteliais se apoiam na lamina basal cercada por células musculares [1]. Cada segmento apresenta 5 tipos celulares epiteliais (células principal, estreita, apical, clara e basal) distintos com cada um diferindo em estrutura e função nos diversos segmentos, resultando num padrão complexo de expressão gênica e regulação ao longo do comprimento do órgão [11-13].

Testículos, epidídimos e elementos do funículo espermático são cobertos e protegidos pela bolsa escrotal, constituída de fâscias e de músculos, na região genital, e é dividida por uma rafe mediana em dois compartimentos independentes [14,15].

Os ductos deferentes ascendem medialmente aos epidídimos, até cruzarem a face medial dos ureteres, atingindo a face posterior da bexiga, e continuarem em direção inferior sobre a face medial das vesículas seminais para entrarem na próstata, onde ficam dilatados e tortuosos, sendo denominados de ampolas do deferente [14,15]. É caracterizado por um lúmen estreito e uma camada espessa de músculo liso. Sua mucosa forma dobras longitudinais e é coberta por epitélio pseudo-estratificado com estereocílios [1].

Vesículas seminais têm formato alongado, piriforme, com uma extremidade superior alargada e uma extremidade inferior ou colo que se une aos ductos deferentes. Apresentam várias cavidades em seu interior e grande parte de sua parede (80%) é formada por musculatura lisa. Anteriormente, relacionam-se à porção da bexiga correspondente ao trígono vesical, e posteriormente são separadas do reto pelo septo retoprostático. Lateralmente, relacionam-se ao plexo venoso periprostático [14-17]. Apresenta epitélio pseudo-estratificado prismático ou epitélio cuboide [1]. Sua secreção corresponde a aproximadamente 60% do volume do sêmem é alcalina e contém frutose, prostaglandina e proteínas de coagulação (vitamina C), que são substâncias necessárias para nutrição e motilidade do espermatozoide. A natureza alcalina deste líquido é necessária para neutralizar o ambiente ácido da uretra e o trato genital feminino [14].

Ductos ejaculatórios desembocam na uretra prostática, em pequenos óstios situados na parte anterior do colículo seminal (verumontano), um em cada lado do óstio do utrículo prostático [14,16].

A próstata humana tem a função de produzir e armazenar um fluido incolor e ligeiramente alcalino (pH 7,29) que constitui 10-30% do volume do fluido seminal, que juntamente com os espermatozoides constituem o sêmen. Nas secreções prostáticas humanas o conteúdo proteico é menor que 1% e incluem enzimas proteolíticas, antígeno prostático específico (PSA), substâncias que neutralizam bactérias, ácido cítrico, cálcio, fosfatase ácida, frutose, zinco e prostaglandinas [14]. É um órgão constituído de componentes glandulares e não glandulares, o componente glandular é composto por um conjunto de 30-50 estruturas epiteliais túbulos-alveolares, envolvidas por um estroma muscular contrátil não glandular. O estroma produz fatores de crescimento importantes para o desenvolvimento da próstata normal [18,19].

Anatomicamente a próstata apresenta uma base, ápice, face anterior e duas faces ínfero-laterais. Na parte superior, sua base é contínua com o colo vesical; na inferior, o ápice da próstata repousa sobre a fáschia superior do diafragma urogenital; e na anterior, sua superfície relaciona-se com a sínfise púbica, separada dela pela gordura extraperitoneal no espaço retropúbico. Posteriormente, relaciona-se intimamente com a superfície anterior do reto, separada dele pelo septo retoprostático. Segundo *McNeal* a próstata apresenta três zonas distintas: A zona periférica que representa 70% do volume prostático no adulto jovem é representada por uma fileira dupla de ductos que se originam no recesso póstero-lateral da parede da uretra, irradiando-se lateralmente, são laterais e posteriores e não mantêm relação anatômica com o colículo seminal, a zona central que representa 25%, e a zona de transição que representa 5%. Essas zonas anatômicas possuem sistemas ductais distintos [14].

A principal característica anatômica da uretra, situada cranialmente à base do colículo seminal, é a presença de esfíncter muscular cilíndrico que circunda a submucosa da uretra até a região do colo vesical [14-16].

O pênis é formado anatomicamente por dois corpos cavernosos situados dorsalmente e um corpo esponjoso (corpo cavernoso da uretra), ventralmente. Este último envolve a uretra e expande-se formando a glândula. A maior parte da uretra peniana é revestida por epitélio pseudo-estratificado colunar, que na glândula passa a ser estratificado pavimentoso e possui glândulas de *Littre* (secretoras de muco). O prepúcio é uma dobra retrátil de pele que contém tecido conjuntivo com músculo liso [1,14,15].

A raiz do pênis é formada por uma extremidade central dilatada, bulbo (do corpo esponjoso), e duas porções laterais, ramos ou pilares do pênis (dos corpos cavernosos). O bulbo do pênis localiza-se no intervalo entre os dois ramos e fixa-se na face inferior do diafragma urogenital. Continua anteriormente pelo corpo esponjoso e é envolvido pelos músculos bulbo-esponjosos. Os ramos do pênis são formações alongadas, intimamente aderidas à porção inferior do ísquio e do púbis, e revestidos pelos músculos isquiocavernosos. Abaixo da pele, observa-se a tela subcutânea, chamada de fáschia superficial do pênis. Inferior a ela encontra-se uma continuação da fáschia perineal profunda, fáschia profunda do pênis ou fáschia de *Buck*, que é forte e membranácea e envolve os corpos cavernosos e o corpo esponjoso do

pênis. Abaixo da fáscia profunda encontra-se um envoltório fibroso denso, a túnica albugínea do pênis [14,15,20,21].

A ereção do pênis é um processo hemodinâmico controlado por impulsos nervosos sobre o músculo liso das artérias do pênis e sobre o músculo liso das trabéculas que cercam os espaços vasculares dos corpos cavernosos. No estado flácido, o fluxo de sangue é pequeno, mantido pelo tônus intrínseco da musculatura lisa e por impulsos contínuos de inervação simpática. A ereção acontece quando impulsos vasodilatadores do parassimpático causam o relaxamento dos vasos e músculo liso dos corpos cavernosos, que são preenchidos por sangue, de maneira menos rígida na glândula e no corpo esponjoso, de forma que este não obstrua a uretra [14].

Glândula de *Cowper* ou glândula bulbouretral é um órgão par que se situa na porção membranosa da uretra. São túbulos-alveolares, revestidas por epitélio simples cúbico secretor de muco (lubrificante). Células musculares esqueléticas e lisas estão presentes nos septos que dividem a glândula em lóbulos [1]. Esta glândula contribui para a lubrificação uretral. Também tem sido demonstrado que sua secreção tem um papel na coagulação do sêmen [22].

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Função testicular

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina que pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, e o compartimento de túbulos seminíferos. Os componentes do compartimento intertubular são as células de *Leydig* (cujas principais funções são a secreção de andrógenos), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos [21,23]. O compartimento dos túbulos seminíferos é constituído pela túnica própria, onde se encontram as células peritubulares mióides, lâmina basal, epitélio seminífero e lume [24].

Particularmente, o epitélio seminífero representado na figura 1 é formado pela associação do componente somático, a célula de *Sertoli*, com o componente germinativo, as células espermatogênicas, que se encontram em diferentes fases de desenvolvimento. A principal função deste epitélio é a formação do gameta masculino, o espermatozoide [24].

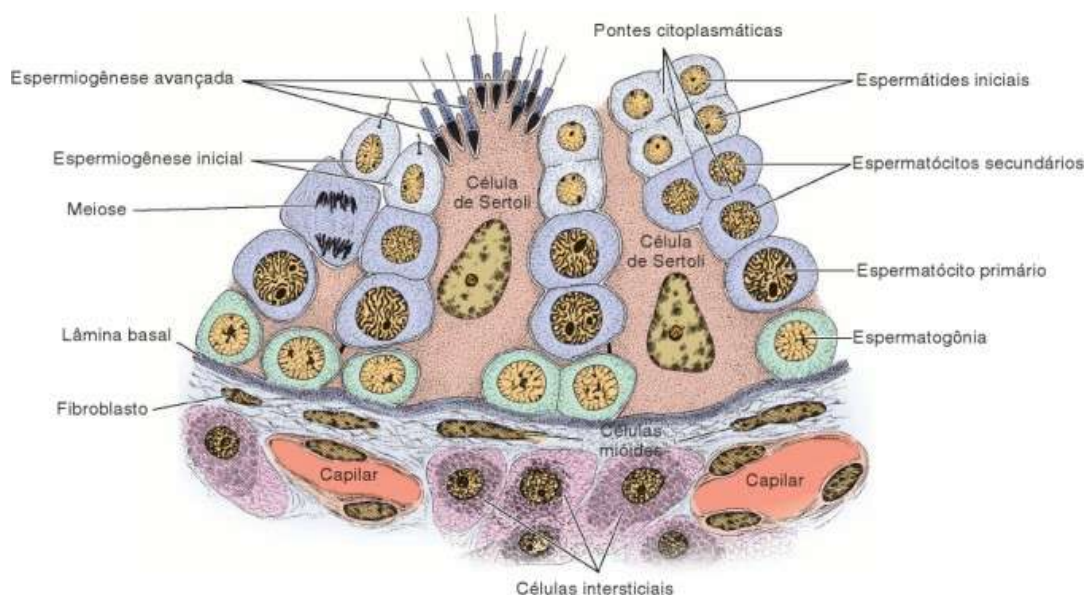


Figura 1 - Ilustração de um corte de túbulo seminífero. Células da linhagem espermatogênica, células de *Sertoli*, camada de células mióides, conjuntivo, vasos sanguíneos e células intersticiais. Imagem Junqueira e Carneiro: Histologia básica, Rio de Janeiro 2004 [1].

No entanto, para que ocorra a formação deste gameta há a necessidade de uma orquestrada interação entre os diferentes componentes do testículo, principalmente entre as células germinativas e os componentes somáticos tais como as células de *Sertoli*, células mióides e células de *Leydig* [25,26].

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos [26]. No rato, existem aproximadamente 30 túbulos seminíferos por testículo, perfazendo cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo [27]. De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180 μ m a 300 μ m [28].

1.2 Regulação hormonal do testículo

O testículo é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que, através do sistema vascular porta, alcança a hipófise estimulando a produção e secreção das gonadotrofinas (hormônio luteinizante LH e folículo estimulante FSH). O LH e o FSH se ligam a receptores transmembranares na membrana plasmática de diferentes tipos de células testiculares. As funções do hipotálamo e da hipófise são reguladas via mecanismo de *feedback*, onde a testosterona (produzida pelas células de *Leydig* em resposta ao LH) inibe GnRH, e assim a secreção de LH e FSH, e a inibina (produzida pelas células de *Sertoli* em resposta ao FSH) inibe mais especificamente a secreção de FSH [29].

A secreção do GnRH ocorre em intervalos periódicos resultando por sua vez, em liberação episódica das gonadotrofinas. A natureza pulsátil do sinal é importante para manter a atividade secretória do LH e do FSH, já que a infusão contínua do GnRH diminui a secreção desses hormônios por gerar desensitização nas células gonadotróficas [30].

O FSH e LH são secretados pelos gonadotrofos hipofisários. Ambos são glicoproteínas compostas de duas cadeias polipeptídicas designadas α e β . Compartilham a mesma subunidade α com a tireotrofina (TSH – hormônio estimulante da tireoide) e com a gonadotrofina coriônica (HCG – gonadotrofina coriônica humana), sendo que as diferentes características funcionais desses

hormônios são determinadas pelas subunidades β . É necessária a presença de ambas as subunidades para que haja uma completa atividade biológica [31].

Embora a maior parte das células gonadotróficas na hipófise sintetize tanto FSH como LH, sinais externos tais como frequência do pulso do GnRH, proveniente do hipotálamo (pulso de alta frequência favorece a síntese de LH) e a modulação através do mecanismo de retroalimentação *feedback* com os esteróides sexuais e os peptídeos gonadais parecem ser importantes para diferenciar a regulação desses hormônios [21].

1.2.1 Androgênio e seu receptor

Durante o desenvolvimento neonatal, os andrógenos produzidos nos testículos fetais são os hormônios mais importantes no controle da masculinização do trato reprodutivo e da genitália. A ação de andrógenos é mediada por seus receptores (AR), os quais pertencem à superfamília de receptores de esteróides, cujos membros agem primariamente como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes-alvo [33,34]. Na idade adulta, a ação de andrógenos nos túbulos seminíferos é essencial para o estabelecimento da fertilidade com espermatogênese normal [35-37].

1.2.2 Estrogênios e seus receptores

Os estrogênios estão envolvidos no desenvolvimento testicular embrionário, crescimento e atividade da próstata no adulto, e regulação da secreção de gonadotrofinas e hormônio liberador de gonadotrofinas. Os receptores estrogênicos (ER) que são expressos em 2 isoformas, ER- α e ER- β , estão presentes nos testículos, ductos eferentes, epidídimo e próstata de muitas espécies [38], no entanto, o ER- α é descrito como ausente no parênquima testicular de algumas espécies, incluindo o homem [39]. O ER- α é abundante no epitélio dos ductos eferentes e sua função primária é regular a expressão de proteínas envolvidas na reabsorção de fluidos e transporte de íons. Além disso, ele também é responsável por manter a morfologia epitelial diferenciada dos ductos eferentes [38]. O ER- β foi

originalmente descoberto na próstata de ratos [40], mas atualmente foi descrito no tecido epitelial e estroma do testículo e epitélio do epidídimo [38]. A expressão do ER- β no parênquima testicular humano ocorre praticamente em todos os tipos celulares do interstício e túbulo seminífero, com exceção das espermatídes alongadas [39,41-44]. Ainda não está bem esclarecida a função deste receptor no sistema reprodutor masculino, pois camundongos *knockout* para o ER- β são férteis e parecem ter testículo e epidídimo normais [45].

Enquanto o papel exercido pelas gonadotrofinas e pela testosterona no controle da espermatogênese encontra-se bem definido, o conhecimento atual é muito mais limitado quanto ao papel dos estrogênios e de fatores celulares intrínsecos.

1.2.3 Aromatase

A enzima aromatase (citocromo P450 - pertencente ao complexo enzimático microsomal chamado aromatase) transforma irreversivelmente andrógenos em estrógenos e está presente no retículo endoplasmático liso de quase todos os tipos de células nos testículos dos mamíferos. Em roedores, todas as células dos testículos exceto células mióides, expressam a enzima aromatase. A biossíntese local dos estrogênios ocorre via aromatização dos androgênios através desta enzima e pode agir como um importante regulador do balanço entre as concentrações de androgênios e estrogênios, tanto a nível tecidual quanto plasmático [46,47].

Carreau e colaboradores descreveram a presença do RNAm e da enzima aromatase em células de *Leydig*, peritubular, células de *Sertoli*, espermatogônias, espermátocitos, espermatídes e no próprio espermatozoide maduro. [48].

1.3 **Leptina e seus receptores**

A Leptina, descoberta por clonagem posicional do gene da obesidade (*ob*) [49], é um hormônio sintetizado principalmente nos adipócitos que atua como importante regulador da ingestão alimentar e homeostase energética [50].

Atualmente, sabe-se que a leptina, além dessa função, também exerce papel fundamental na regulação do sistema reprodutor [51,52].

A leptina age nas células através de receptores pertencentes à classe I da citocina. Existem, pelo menos, seis isoformas de receptores de leptina classificadas em três categorias: longa (Ob-Rb), curta (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf) e solúvel (Ob-Re) [53,54]. Todas essas isoformas têm em comum um domínio extracelular de mais de 800 aminoácidos e um domínio transmembranar com 34 aminoácidos. O domínio intracelular é variável, característico a cada uma das isoformas, porém apenas a isoforma longa, por possuir o domínio intracelular completo, revela adequação para ativar todas as vias de sinalização intracelular do hormônio [51], figura 2.

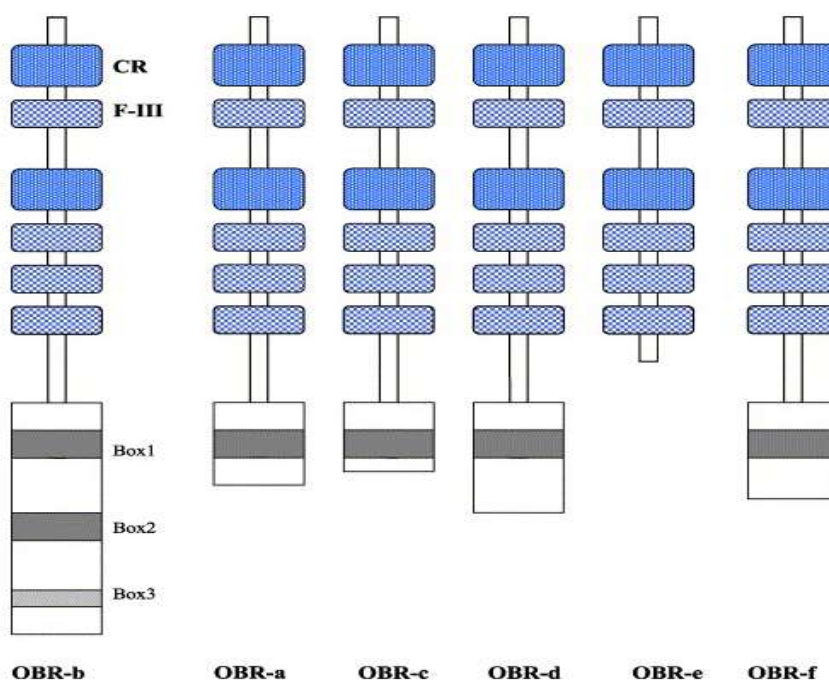


Figura 2 - Isoformas dos receptores de Leptina, CR= Domínio comum dos receptores de Citocinas, F- III = Domínio comum da Fibronectina tipo III, Box 1, 2, 3. = Domínio Intracelular. Adaptado de *K. Hegyi et al. / Cell Biology International 28 (2004) 159–169 [51]*.

Enquanto à isoforma longa (Ob-Rb) é expressa em grande quantidade no hipotálamo, os tecidos periféricos, incluindo os tecidos do sistema urogenital de machos e fêmeas expressam além da isoforma longa (Ob-Rb), as isoformas curtas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rf) que sugere efeito direto da leptina sobre estes órgãos. A

isoforma solúvel (Ob-Re) parece ser responsável pelo transporte plasmático do hormônio [51,55].

Alguns estudos sugerem que a deficiência ou a resistência à leptina podem resultar no desenvolvimento de doenças crônicas, tais como; obesidade, diabetes e infertilidade em humanos [51,56].

1.3.1 Leptina e função hipotalâmica

O hipotálamo parece mediar os efeitos da leptina circulante sobre o massa e a ingestão alimentar. Mais especificamente, as regiões ventro-basais do hipotálamo (núcleos arqueado, ventro-medial e dorso-medial) contêm as maiores concentrações do receptor Ob-Rb em todo o cérebro [57]. Além do mais, a expressão da proteína c-Fos (marcador da atividade neuronal), encontra-se aumentada nestas mesmas regiões após administração da leptina [58]. As regiões hipotalâmicas com maior concentração de receptores de leptina estabelecem comunicação entre si e enviam sinais para o sistema nervoso autônomo e regiões corticais, fornecendo o substrato anatômico (comunicação convergente e divergente na sinapse) onde se dão as alterações comportamentais e metabólicas causadas pela leptina [59].

Inicialmente, os efeitos da leptina pareciam ser apenas a nível central, no entanto, devido à distribuição quase onipresente de receptores, a leptina influencia uma gama diversificada de funções fisiológicas, tanto no sistema nervoso central quanto em nível de tecidos periféricos [60-66].

1.3.2 Leptina e sistema reprodutor

Concentrações de leptina circulante têm sido relacionadas ao IMC (índice de massa corporal) e à quantidade total de gordura corporal [66,68]. Embora, a leptina seja, principalmente, produzida e secretada para a corrente sanguínea pelos adipócitos brancos, esta não é a única fonte potencial do hormônio. Tecidos como ovários e testículos dentre outros se mostraram capazes de produzir pequenas quantidades de leptina [55,69-74].

A leptina tem um papel fundamental como sinalizador metabólico para o sistema reprodutivo, informando que as reservas calóricas e de gordura estão disponíveis para a demanda exigida na reprodução [75-77]. Alguns trabalhos têm relatado a presença dos receptores de leptina nos órgãos do sistema reprodutor tais como: útero [78], ovário [78], próstata [79,80], testículo [81], e epidídimo [82]. As primeiras indicações de que a leptina teria um papel no sistema reprodutor foi a constatação de que ratos do gênero ob/ob (resistentes a leptina) eram inférteis [83], e que a fertilidade desses animais podia ser recuperada pelo tratamento com leptina [84]. Embora muitos trabalhos mostrem que a leptina desempenha um papel importante na reprodução de roedores e humanos [85], os mecanismos pelos quais a leptina regula a função reprodutiva ainda não foram esclarecidos [86-87].

A avaliação dos níveis de leptina em meninos saudáveis ao longo do desenvolvimento puberal revelou que, ao contrário das meninas, as concentrações de leptina aumentaram entre cinco e dez anos de idade, mas sempre seguido de um declínio [88].

Evidências indicam que o hipotálamo é o alvo primário para a maioria das ações deste hormônio sobre o eixo reprodutivo. Porém, baseado na caracterização da distribuição dos receptores e nos efeitos da leptina em sistema *in vivo*, locais adicionais para a ação do receptor deste hormônio têm sido sugeridos, incluindo a hipófise, os testículos e os ovários [89].

Caprio e colaboradores [90] investigaram o desenvolvimento da expressão do Ob-R nos testículos de ratos desde o início da gestação até a idade adulta e encontraram um padrão peculiar da expressão do Ob-R nas células de *Leydig*. Nos testículos, o Ob-R imunorreativo esteve presente na vida embrionária tardia, sendo ausente na vida pré-puberal e aparecendo novamente na idade adulta. O padrão de desenvolvimento do Ob-R nos testículos foi diferente do observado no hipotálamo, onde este receptor está presente durante todo o desenvolvimento.

Os esteróides sexuais modulam a expressão e a secreção da leptina de maneira oposta: o estrógeno estimula a liberação de leptina pelos adipócitos *in vitro*, enquanto os andrógenos diminuem a expressão gênica e a secreção da mesma. Correlação negativa entre os níveis de testosterona e leptina tem sido descrita em humanos, sendo atribuída ao efeito direto dos andrógenos na secreção de leptina pelos adipócitos [85].

A ação da leptina sobre a testosterona não ocorre somente de forma sistêmica, sendo constatada interação entre estes dois hormônios nos testículos. A avaliação do efeito testicular direto da leptina revela sua habilidade para inibir a secreção de testosterona, resposta análoga a observada em termos de esteroidogênese ovariana após estimulação pela leptina *in vitro* [89]. Desta forma, especula-se que exista um complexo modo de ação da leptina em múltiplos locais do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que envolve tanto a resposta estimulatória quanto a inibitória [81].

Alguns estudos tem demonstrado que há um aumento na expressão de RNAm da enzima aromatase em pré-adipócitos específicos de homens, outros estudos em câncer mostram ainda que a leptina estimula a produção de estrogênios pelo aumento da aromatase em células epiteliais mamárias humanas e em células da granulosa. Estes estudos demonstram uma importante ligação entre a exposição da leptina *in vitro* e *in vivo* e seus efeitos na regulação de estrogênios e na expressão da enzima aromatase [91-94].

1.3.3 Leptina e puberdade

A puberdade é o processo de maturação sexual pelo qual a capacidade reprodutiva é alcançada. As alterações na aparência física e comportamental que caracterizam a puberdade são o resultado direto do aumento das concentrações de esteroides sexuais, testosterona nos meninos e estradiol nas meninas. A produção desses hormônios é impulsionada por aumento dos níveis de gonadotrofinas pela hipófise, que por sua vez é regulada pela liberação de GnRH hipotalâmico [95].

A puberdade assim como a reprodução bem sucedida são dependentes e relacionadas à capacidade do corpo em armazenar energia dos alimentos. Devido ao nível de leptina estar relacionado diretamente ao estado de armazenamento da gordura corporal, acredita-se que a leptina poderia influenciar a fertilidade e os ciclos reprodutivos, direta e indiretamente [96].

A leptina mesmo em baixas concentrações estimula a liberação em nível hipofisário do hormônio LH e FSH *in vitro* [97]. Níveis de leptina aumentados em meninas e meninos antes do início da puberdade têm sido observados e correlacionados com este período [88,98]. Ainda, níveis séricos elevados de leptina

precedem o aumento de outros hormônios reprodutivos relacionados à puberdade como FSH, LH e estradiol [88,99-101].

1.3.4 Leptina e programação metabólica

O conceito de programação metabólica indica que alterações hormonais e do estado nutricional em importantes períodos durante o desenvolvimento (perinatal), afetam o funcionamento de órgãos e sistemas de maneira permanente. Dessa forma, programam estruturas e funções dos tecidos e sistemas no organismo [102-107]. Alguns estudos sugerem que alterações nas concentrações de leptina no período perinatal poderiam causar programação metabólica [107,108].

Modelos experimentais têm sido usados para demonstrar programação metabólica em sistemas no organismo através de injeções de leptina (hiperleptinemia) nos primeiros dias de vida, como; programação da função da medula adrenal, alterações de parâmetros cardiovasculares [109], programação da massa corporal, ingestão alimentar, disfunções endócrino-metabólicas das proles adultas [107,110,111], resistência à ação anorexigênica da leptina, menor expressão de seu receptor hipotalâmico [111], hipertireoidismo [112].

2 JUSTIFICATIVA

Com base no pouco conhecimento descrito na literatura sobre o papel da leptina no sistema urogenital, mais especificamente no testículo, este projeto foi elaborado a fim de avaliar diferentes parâmetros da função testicular em animais adultos que receberam injeções de leptina no período neonatal.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar se a administração de leptina nos primeiros dias de vida influencia a função testicular dos animais na idade adulta.

Objetivos específicos:

Avaliar se a administração de leptina nos primeiros dias de vida influencia:

- 1) O consumo alimentar, comprimento, massa corporal a massa da hipófise e hipotálamo e massa dos órgãos do sistema urogenital dos animais adultos;
- 2) A data do início da puberdade;
- 3) A expressão gênica e proteica dos receptores de leptina, androgênio, estrogênio e da enzima aromatase no testículo dos animais adultos;
- 4) O perfil lipídico e a concentração sérica de testosterona e estradiol dos animais adultos;
- 5) A morfometria testicular dos animais adultos;
- 6) O número, morfologia e a viabilidade dos espermatozoides dos animais adultos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

Projeto aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o número CEUA - 036/2010 (anexo 1).

4.2 Modelo experimental

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Anatomia na Unidade de pesquisa urogenital e Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doenças Cardiovasculares da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, seguindo-se os princípios descritos em *Brazilian law for scientific use of animals*, para os cuidados no uso e manuseio com os animais [113].

Doze ratas Wistar, nulíparas, foram mantidas em biotério com temperatura ($25 \pm 1^{\circ}$) e ciclo claro-escuro (07:00-19:00h) controlados. Aos três meses de idade, os animais foram acasalados na proporção de duas fêmeas para um macho, recebendo ração comercial (23% de proteína) até o nascimento dos filhotes, quando as mães foram divididos em dois grupos:

1- Controle (**C**): com livre acesso à água e à dieta normal (ração comercial com 23% de proteína), cada filhote recebeu uma dose diária de 50 μ L de solução salina por injeção subcutânea nos primeiros dez dias de vida;

2- Leptina (**L**): com livre acesso à água e à dieta normal (ração comercial com 23% de proteína), cada filhote recebeu uma dose diária de 50 μ L de leptina (80 ng/g de massa corporal) por injeção subcutânea nos primeiros dez dias de vida [114].

No dia do nascimento (dia 0), a ninhada foi ajustada em seis filhotes por mãe até o final da lactação (21 dias de idade). A fim de evitar alterações em decorrência da variabilidade materna, foram utilizados dois filhotes machos, oriundos de cada mãe, totalizando doze filhotes por grupo.

Foi avaliado diariamente a massa corporal e comprimento (naso-anal). Ao desmame (21 dias) todos os animais receberam ração comercial até o sacrifício na idade adulta (90 dias de idade). No transcorrer desse intervalo, consumo de ração, massa corporal e comprimento linear foram avaliados a cada cinco dias.

No momento do sacrifício, todos os animais foram anestesiados com Tiopental® via intraperitoneal (30mg/kg massa corporal). O sangue foi retirado por punção cardíaca, processado e o soro armazenado a -20°C para posterior dosagem hormonal e do perfil lipídico.

O testículo do lado direito foi excisados, pesado e estocado em *freezer* -80°C para posterior análise por PCR (reação em cadeia de polimerase) em tempo real e *western blot*. O testículo do lado esquerdo foi fixado em formalina 10% para quantificação morfométrica, os outros órgãos foram retirados e pesados.

4.3 Acompanhamento da puberdade

Os animais a partir do 30° dia de vida foram avaliados diariamente para acompanhamento da separação do prepúcio. A retração prepucial completa com a exposição da glândula é indicativa do início da puberdade [115], Figura 3.

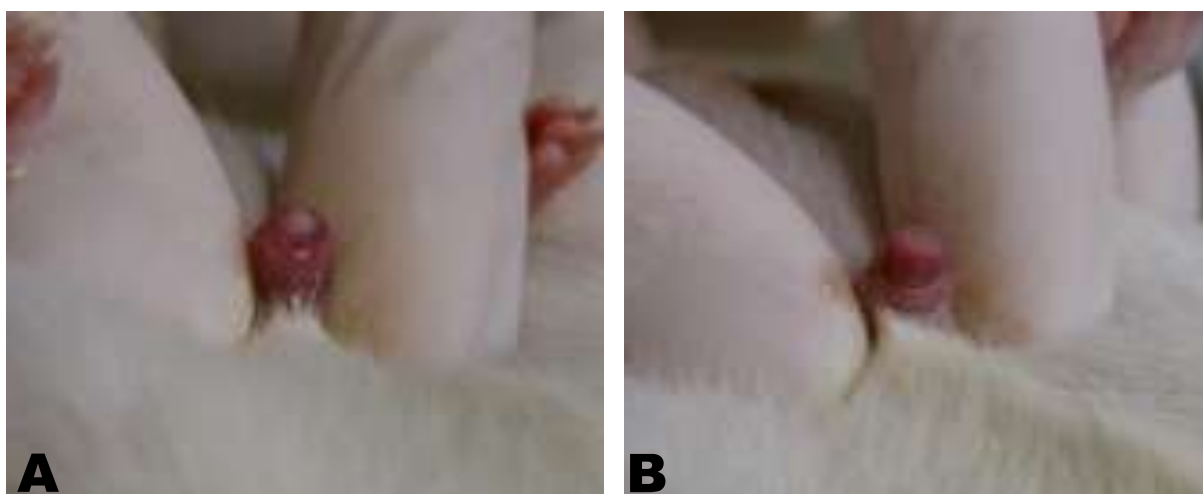


Figura 3- Fotografia de rato controle, acompanhamento da separação do prepúcio e exposição da glândula, indicando início da puberdade A. Separação prepucial incompleta, B. Separação Completa. (Captura da imagem por câmera Sony®, modelo: H5).

4.4 Radioimunoensaio (RIE)

As concentrações séricas de testosterona e estradiol foram determinadas no soro através de teste específico para o hormônio (*INC Pharmaceuticals, INC, CA, U.S.A*). O coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi de 4,6 e 7,5% para testosterona com sensibilidade do RIE em 0,05 ng/mL e de 2,4 e 6,9% para estradiol com sensibilidade do RIE em 0,05 ng/ml.

4.5 Perfil lipídico

O perfil lipídico foi avaliado utilizando o kit Bioclin para triglicerídeos (K055-2), colesterol total (K083-2) e colesterol HDL (K071).

4.6 PCR em tempo real

Para análise de PCR em Tempo Real, o RNA foi isolado pelo método de Trizol® conforme protocolo sugerido pelo fabricante (Invitrogen). A concentração e pureza do RNA foram determinadas usando espectrofotômetro Nanodrop-1000. O RNA total (1µg) foi tratado com DNase (*Invitrogen*) antes de ser transcrito reversamente com a enzima Superscript® RT (*Invitrogen*). O cDNA resultante foi usado para amplificação por PCR em tempo real, utilizando termociclador Bio-Rad C-1000, com *primers* específicos para cada gene e reagente *SyBR Green* (*Invitrogen*). A quantidade relativa de RNAm foi calculada a partir do ponto, onde cada curva emerge da linha de base (Ct), pelo método de delta-delta CT. As reações foram feitas em triplicata e normalizadas pela expressão dos genes constitutivos TBP (Proteína de Ligação TATA-Box) e β -actina. As sequências dos *primers* utilizados estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados para as ampliações na técnica de PCR em tempo real.

Gene	Sequência
TBP	GTTCTGGGAAAATGGTGTGC CAGCCTTATGGGGAACTTCA
β actina	CTGTCCCTGTATCGCTCTGGTC TGAGGTAGTCCGTCCGGTCCC
Aromatase	TGGAGTGTGCATCTGCCAT TGCTGTGTGTCTTCAGGGAG
AR	GGCAAAGGCACTGAAGAGAC CCCAGAGCTACCTGCTTCAC
Ob-Ra	TACCAACCTCCCAACAGTCC AGCATATGCCCCAACCTGAAC
Ob-Rb	CTGAAGAAAATCACGGGGAA TGAACAGACAGTGAGCTGGG
ER-β	GAAGCTGAACCACCCAATGT CAATCATGTGCACCAGTTCC
ER-α	TCCGGCACATGAGTAACAAA TGAAGACGATGAGCATCCAG

4.7 Western Blot

Quinhentos miligramas de tecido foram homogeneizados em 500 μ L de tampão TEG (50mM TRIS pH 7,4, 1,5mM EDTA, 50mM NaCl, glicerol 10%) acrescido de DTT (5mM) e leupeptina (10 μ g/ml), pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 33000 RPM em ultracentrífuga (*Marca: Hitachi, Modelo: Himac – CP 80WX*) por 120 minutos e o sobrenadante separado e congelado. A dosagem de proteína foi realizada pela técnica de *Bradford* [116]. Sessenta microgramas de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em cuba semi-seca (*Modelo: TE 70 – Fabricante: Amersham Biosciences*), posteriormente incubadas com anticorpos primários específicos (ver tabela 2). Após incubação *overnight* a membrana foi incubada com anticorpo secundário correspondente por 1 hora (ver tabela 2). Após lavagens consecutivas, foi feita a detecção das bandas por quimioluminescência (*Kit*

Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), A revelação foi feita em filme fotográfico e a quantificação realizada através de *software Image J* (Versão 1.45s) por densitometria de bandas e normalizadas pela expressão da proteína β - actina.

Tabela 2: Tabela de anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de *western blot*.

Anticorpo Primário	Diluições	Fabricante
Beta actina (sc 81178)	1:200	
ObR-R (sc 8391)	1:200	
ER- α (sc 8002)	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
ER- β (sc 53494)	1:200	
AR (sc 816)	1:200	
Aromatase (ab 69653)	1:500	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Anticorpo Secundário	Diluições	Fabricante
Goat anti-mouse (sc 2005) - Conjugated HRP.	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Rabbit anti-goat (sc 2768) - Conjugated HRP.	1:2000	
Goat anti-rabbit (12-348) - Conjugated HRP.	1:2000	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

4.8 Procedimentos histológicos

As amostras de testículo foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e fixadas por imersão em formalina 10% em tampão fosfato salino (PBS) por um período mínimo de 24 horas.

O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina: desidratado em álcool e clarificado em xilol para posterior inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos com 5 μ m de espessura e posteriormente corados por HE (Hematoxilina e Eosina).

4.9 Morfometria do testículo

4.9.1 Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos apresentando contorno o mais circular possível, utilizando-se objetiva de 10x, com aumento final de 100x (Microscópio Marca: *Olympus*, modelo: *BX51 - LC Evolution camera*, formato *TIFF*, *36-bit Color*, *1280 x 1024 pixels*). Nas mesmas secções foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até a borda luminal (Figura 4). O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo foi representado pela média de quatro medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

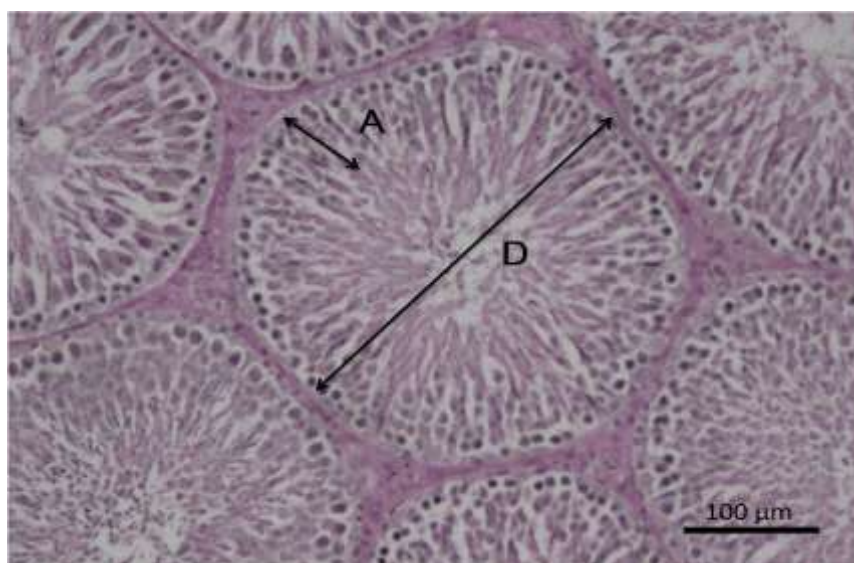


Figura 4 - Fotomicrografia de secção transversal de túbulo seminífero. D:diâmetro do túbulo seminífero; A: altura do epitélio seminífero. Rato do grupo Controle (C). HE. Aumento de 100 x.

4.9.2 Comprimento total dos túbulos seminíferos

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos por testículo, expresso em centímetros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos

seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada de acordo com a literatura [117,118]:

$$CT=VTS/\pi R^2$$

Onde, VTS é o volume total dos túbulos seminíferos no testículo, e πR^2 é a área da secção transversal de túbulos seminíferos ($R = \text{diâmetro tubular}/2$). O comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo corresponde à razão entre o comprimento tubular total e a massa líquida do testículo.

4.10 Análise dos espermatozoides

Os espermatozoides foram obtidos a partir da cauda do epidídimo de ratos adultos de 90 dias [119]. O epidídimo foi retirado no momento do sacrifício, sua cauda separada e cortada em 5 (cinco) fragmentos e seu conteúdo disperso em RPS (Solução de Fosfato de Ringer): (NaCl 119 mM, KCl 5mM, MgSO₄ 1,2mM, glicose 10mM, fosfato de sódio 16,3mmM; pH 6,9). Foram realizadas 7 (sete) lavagens sucessivas do tecido em RPS com o objetivo de se obter a retirada total de espermatozoides. Foi analisado um total de 200 espermatozoides por animal quantificados em câmara de *Neubauer*.

4.10.1 Morfologia dos espermatozoides

Uma alíquota da amostra de espermatozoides foi incubada com Eosina Y 0,5% e 200 células foram analisadas por microscopia de luz em aumento de 400x (Microscópio Marca: *Olympus*, modelo: *BX51 - LC Evolution camera*, formato *TIFF*, *36-bit Collor*, *1280 × 1024 pixels*), onde foram analisadas alterações de cabeça (sem curvatura, sem curvatura característica, condensação de cromatina e acéfalos), de peça intermediária e de cauda (cauda quebrada, enovelada e angulada) [120].

4.10.2 Viabilidade dos espermatozoides

Uma alíquota da amostra de espermatozoides foi incubada por 30 minutos a 37⁰C em tampão hiposmótico (citrato 2,5 mM e frutose 7,5 mM) e 200 células foram analisados em microscopia de luz em aumento de 200x (Microscópio Marca: *Olympus*, modelo: *BX51 - LC Evolution camera*, formato *TIFF*, *36-bit Collor*, *1280 x 1024 pixels*). Foram analisadas alterações na cauda do espermatozoide baseado na semipermeabilidade da membrana, que provoca aumento do volume da célula em condições hipo-osmóticas devido ao influxo de água [121].

4.11 **Análise estatística**

Foi utilizado o programa *Graphpad Prism*® 5.0. Após análise de normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados pelo teste *t Student* não pareado. O nível de significância utilizado foi de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

A figura 5 mostra os resultados de consumo alimentar, massa corporal e comprimento linear (naso-anal). Os animais do grupo tratado com Leptina (L) apresentaram consumo alimentar significativamente reduzido do 26º ao 40º dia de vida ($p \leq 0,008$) e do 70º ao 90º dia ($p \leq 0,03$) em relação ao grupo controle (C). Em relação a massa corporal não houve diferença significativa entre os grupos do nascimento até o desmame. Na vida adulta o grupo (L) apresentou massa corporal significativamente menor ($p \leq 0,04$) em relação ao grupo (C) do 26º ao 45º dia de vida. Em relação ao comprimento linear os resultados foram semelhantes a massa corporal, havendo uma redução ($p \leq 0,05$) do comprimento entre o 26º ao 45º dia de vida no grupo (L), sem alteração do nascimento ao desmame.

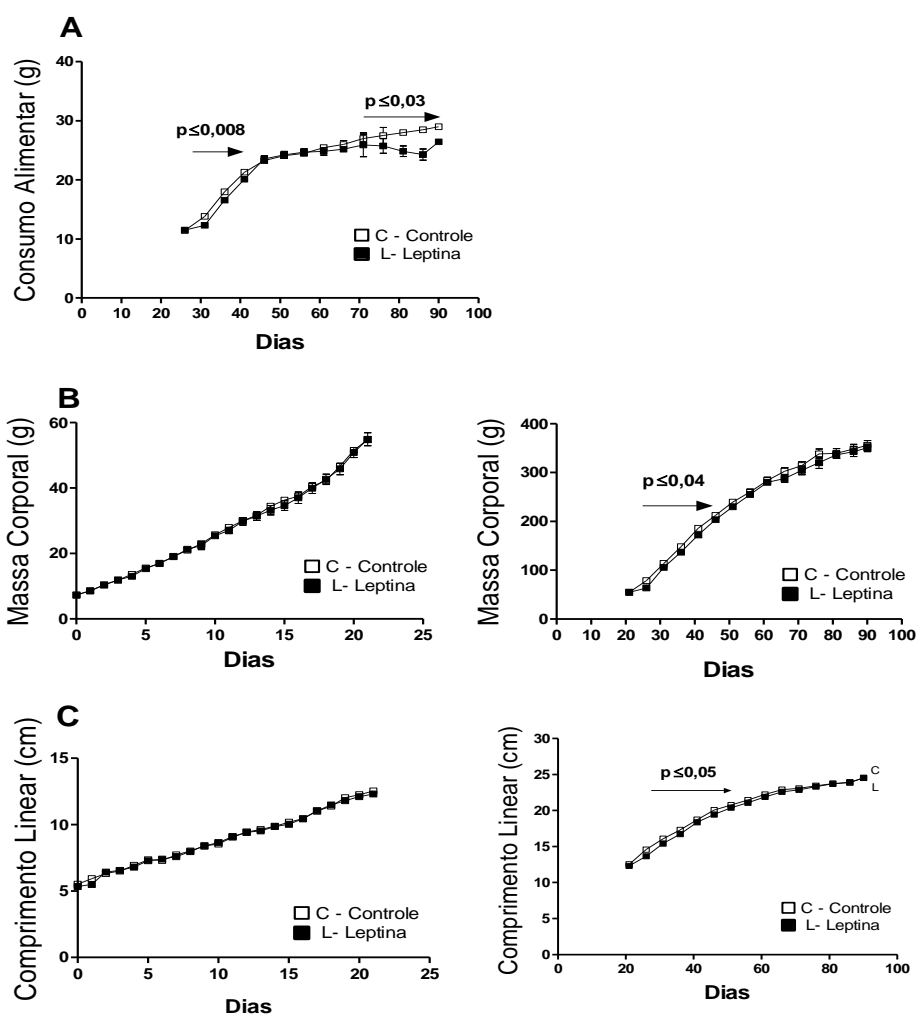


Figura 5 - Consumo alimentar (A), Massa corporal (B) e Comprimento linear (C) de animais tratados com salina (C) ou leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos dez primeiros dias de vida. Dados são expressos como média \pm erro padrão de 12 animais.

Os dados de massa dos órgãos são apresentados na figura 6. O tratamento com Leptina causou redução significativa na massa da hipófise ($p \leq 0,0006$), do hipotálamo ($p \leq 0,01$), da próstata ($p \leq 0,003$), do testículo ($p \leq 0,008$), do epidídimo ($p \leq 0,004$) e da bexiga ($p \leq 0,009$).

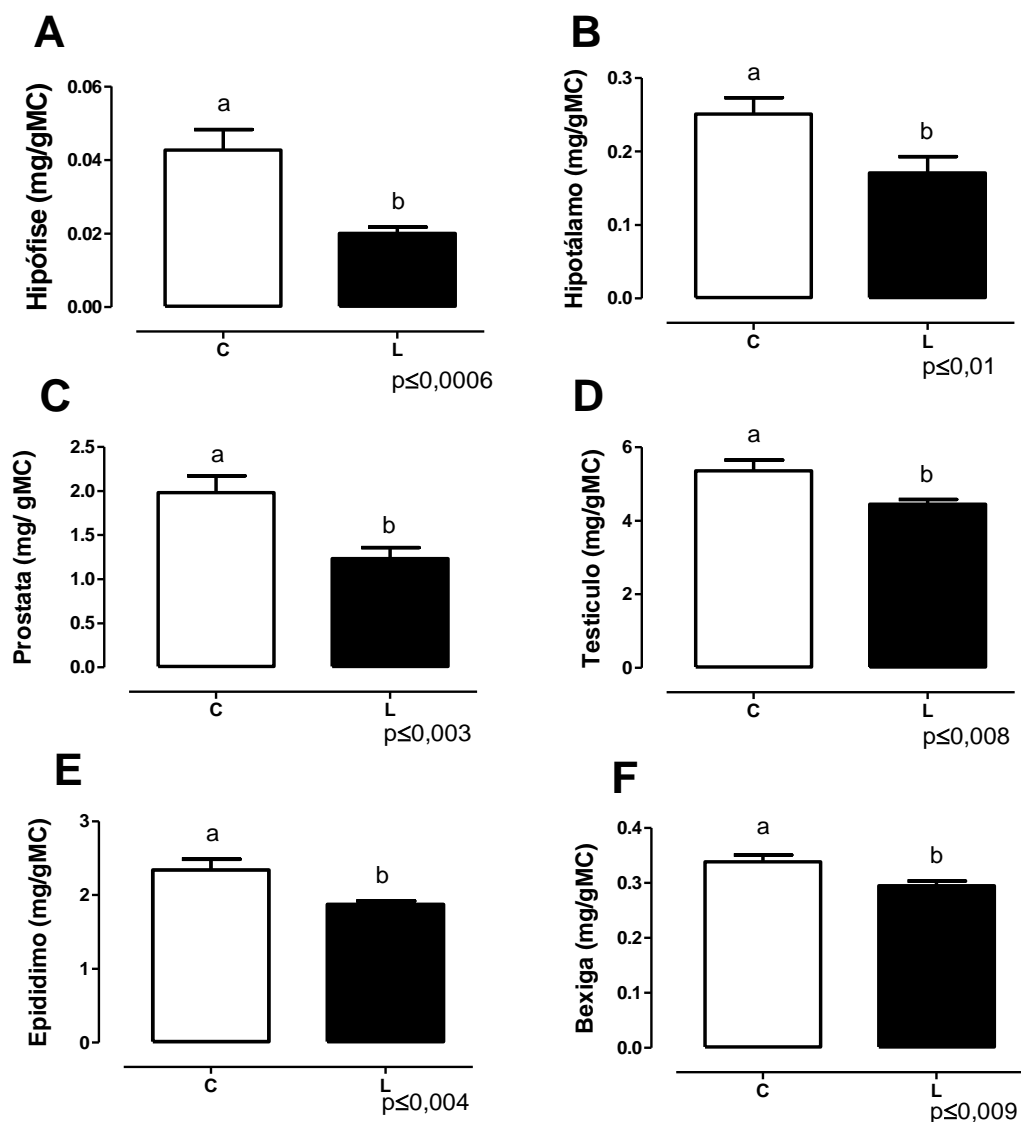


Figura. 6 - Massa da Hipófise (A), hipotálamo (B), Próstata (C), Testículo (D), Epidídimo (E), Bexiga (F) de animais tratados com salina (C) ou leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos dez primeiros dias de vida. Dados são expressos como média \pm erro padrão de 12 animais. Letras diferentes representam significância estatística.

Os animais que receberam leptina apresentaram um adiantamento significativo na data da puberdade ($p \leq 0.0001$) conforme observado na figura 7.

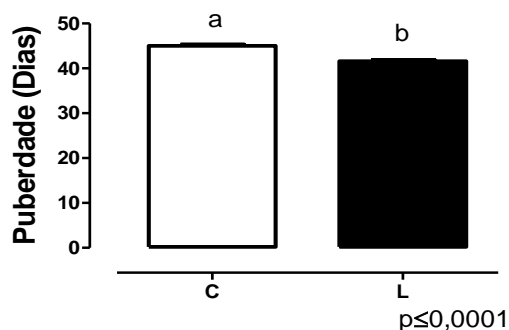


Figura 7 - Início da puberdade nos animais tratados com salina (C) ou leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos primeiros dias de vida. Dados são expressos como média \pm erro padrão de 12 animais. Letras diferentes representam significância estatística.

Em relação ao perfil lipídico demonstrado na figura 8, o grupo L apresentou aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos níveis de triglicerídeos, redução nos níveis de HDL ($P \leq 0,02$) e nenhuma alteração no colesterol total.

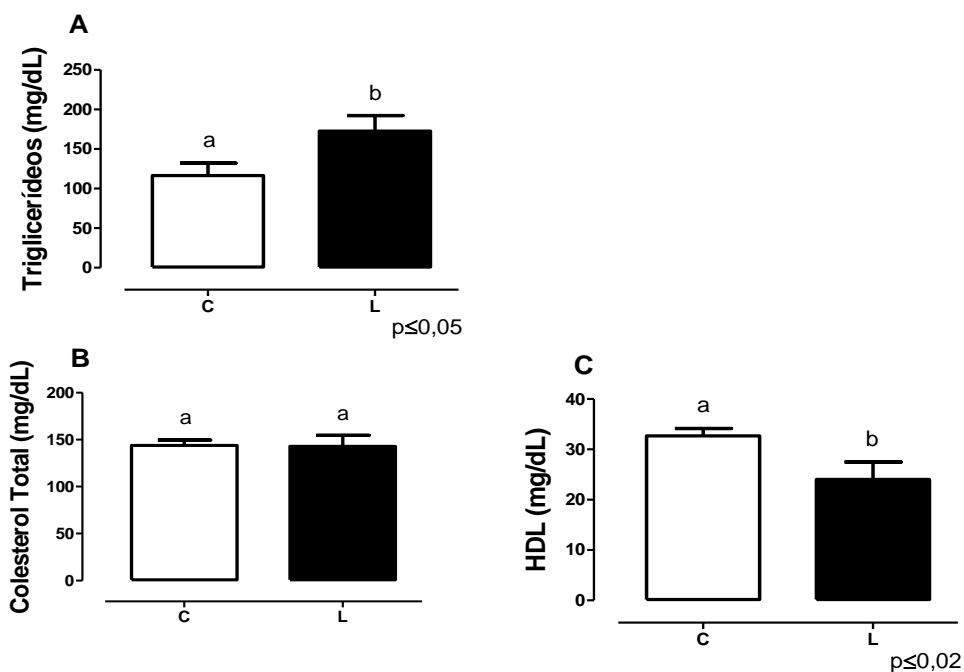


Figura 8 - Perfil lipídico de animais tratados com salina (C) ou leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos dez primeiros dias de vida. Triglicerídeos (A), Colesterol (B), HDL (C). Dados são expressos como média \pm erro padrão de 12 animais. Letras diferentes representam significância estatística.

Os dados da expressão gênica no testículo apresentados na figura 9, demonstram aumento significativo em todos os genes avaliados no grupo (L).

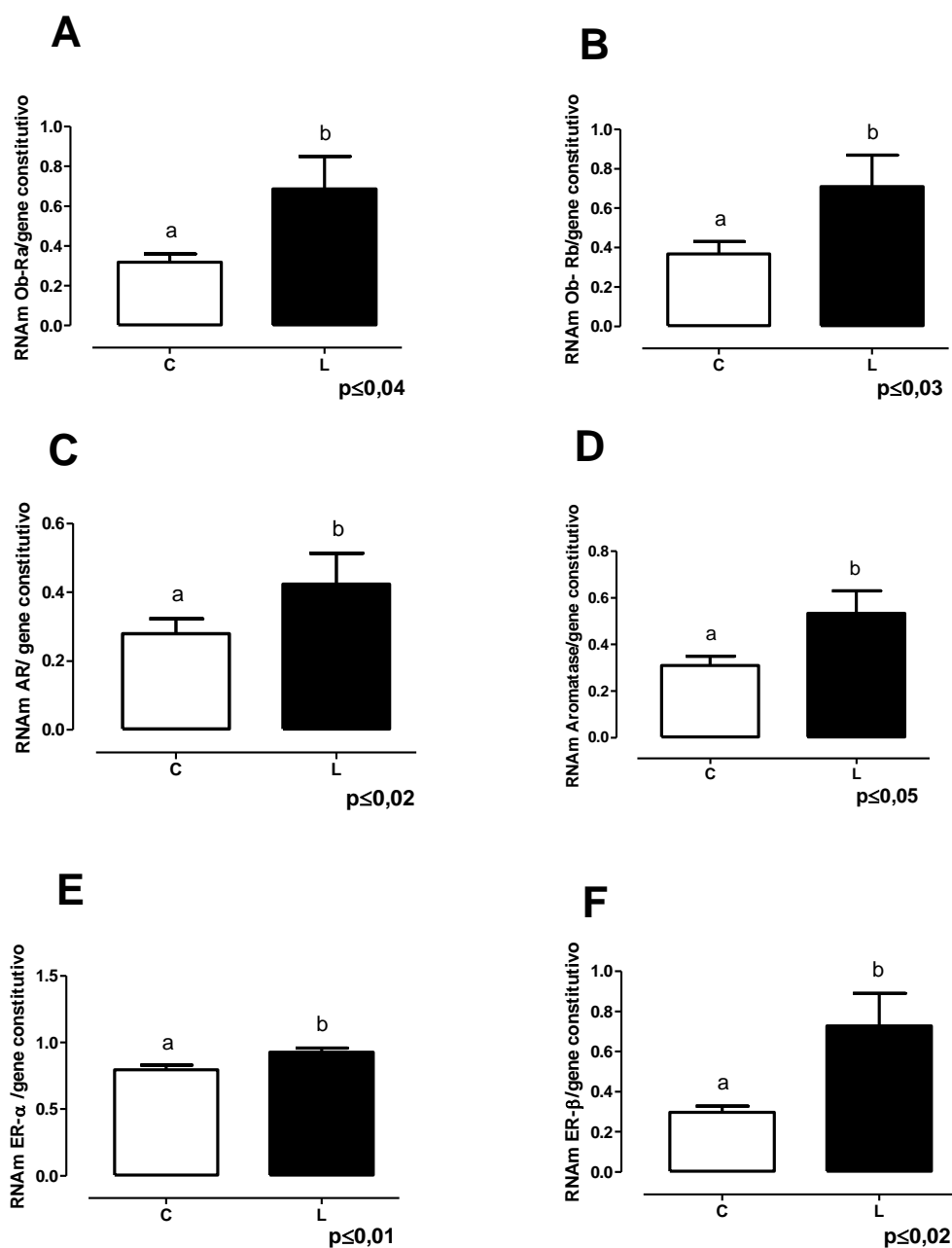


Figura 9 - Expressão Gênica nos animais tratados com salina "C" ou leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos primeiros dias de vida. Ob-Ra (A), Ob-Rb (B), AR (C), Aromatase (D), ER-α (E) e ER-β (F). β actina e TBP foram usados como gene constitutivo. Dados são expressos como média ± erro padrão de 12 animais. Letras diferentes representam significância estatística.

Os dados da expressão proteica nos testículos apresentados na figura 10, demonstram que a administração de leptina levou a aumento significativo no Ob-R, ER- α e enzima Aromatase e diminuição da expressão de AR. Nenhuma diferença significativa no ER β entre os grupos.

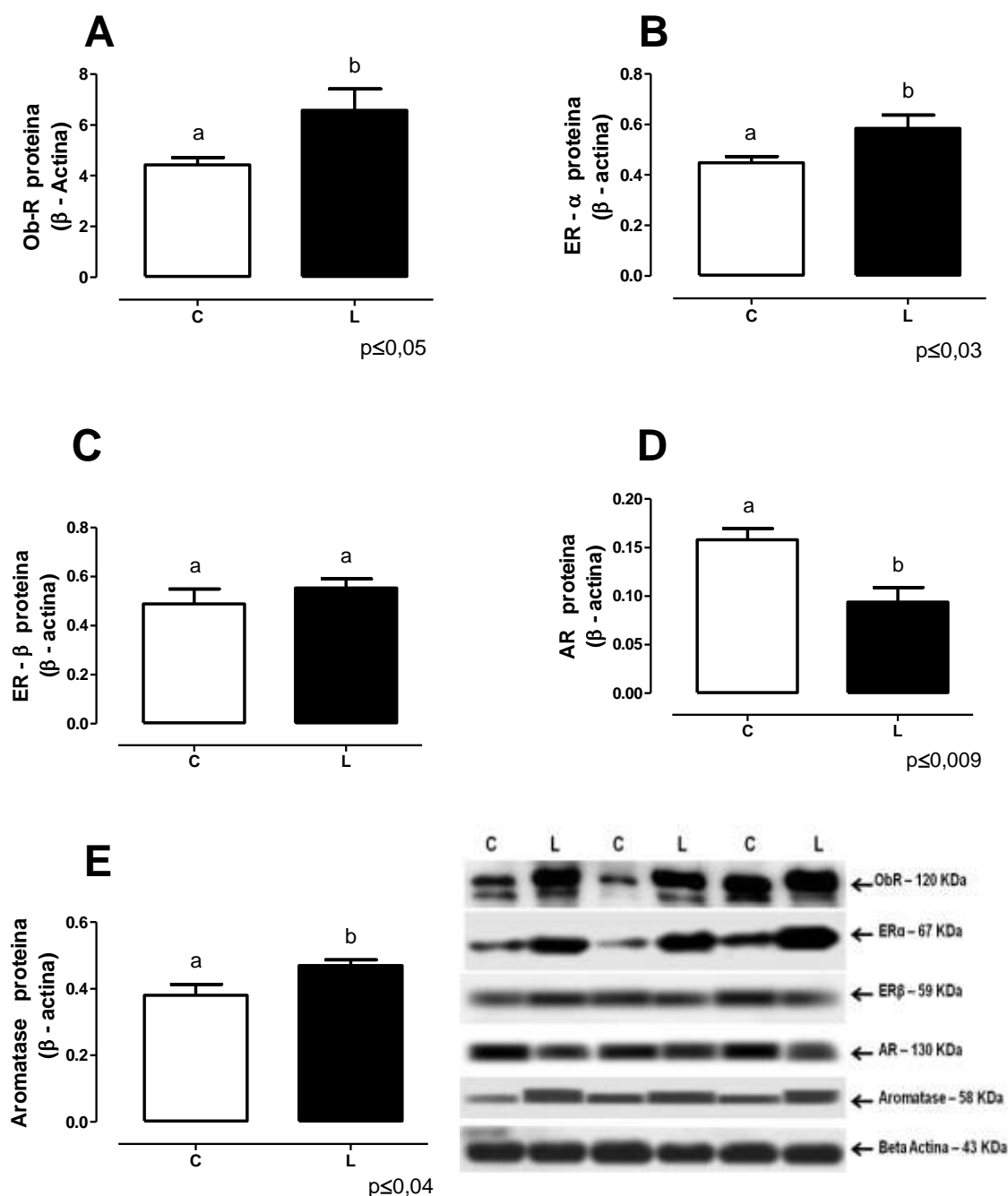


Figura 10 - Expressão Proteica por Western Blot nos animais tratados com salina (C) ou leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos primeiros dias de vida. Ob-R (A), ER- α (B), ER- β (C), AR (D) e Aromatase (E). Dados são expressos como média \pm erro padrão de 12 animais. Letras diferentes representam significância estatística.

A administração de leptina reduziu significativamente as concentrações séricas de testosterona, não havendo diferença significativa nas concentrações séricas de estradiol comparadas ao grupo controle (figura 11).

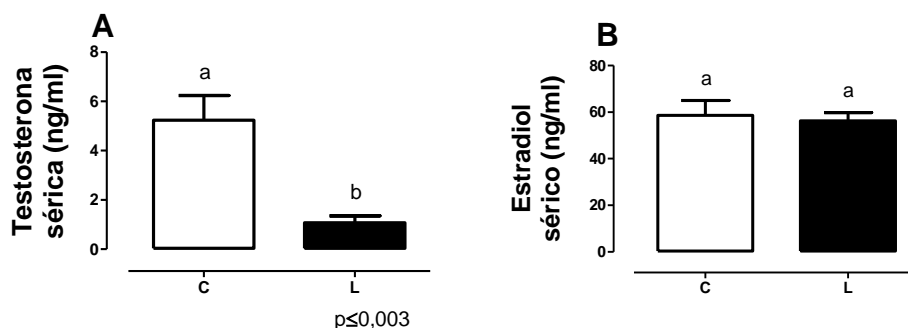


Figura 11 – Concentrações séricas de testosterona e estradiol de animais tratados com salina (C) ou leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos dez primeiros dias de vida. Testosterona (A), Estradiol (B), HDL (C). Dados são expressos como média \pm erro padrão de 12 animais. Letras diferentes representam significância estatística.

A morfometria do testículo está apresentada nas figuras 12 e 13. A administração de leptina levou a um aumento significativo na área total do túbulo seminífero ($p \leq 0,01$), na altura do epitélio seminífero ($p \leq 0,03$), na área do lúmen seminífero ($p \leq 0,004$) e uma diminuição no comprimento total do túbulo ($p \leq 0,006$).

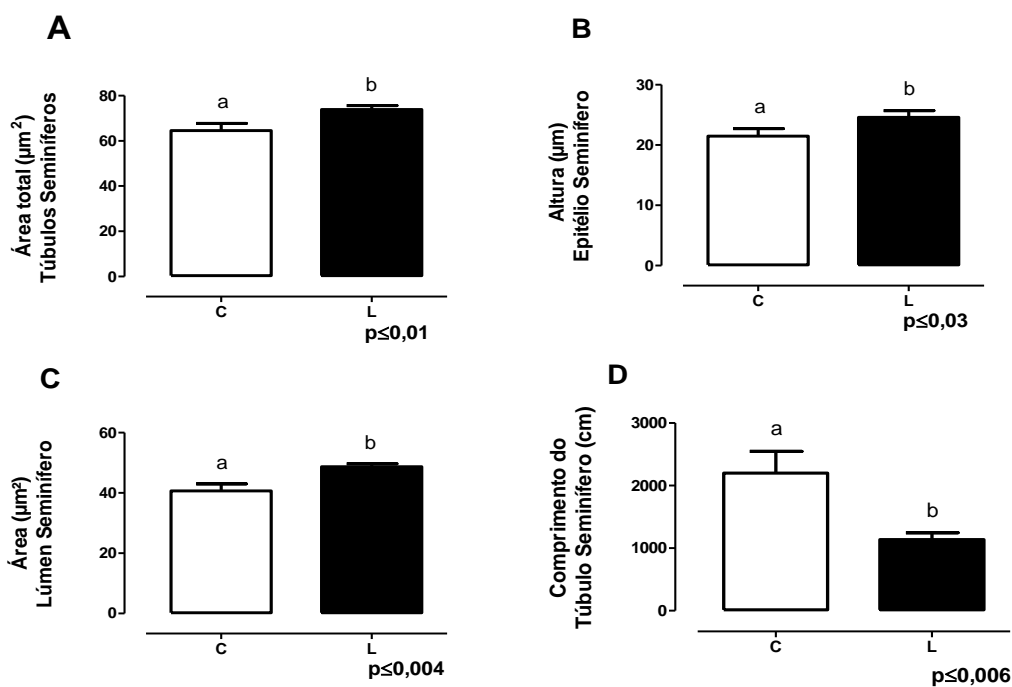


Figura 12 - Morfometria dos testículos de animais tratados com salina "C" e leptina (L) (80ng / g massa corporal) nos primeiros dias de vida. Área total dos túbulos seminíferos (A), Altura do epitélio seminífero (B), Área do lúmen seminífero (C), Comprimento linear total do túbulo seminífero (D). Dados são expressos como média \pm erro padrão de 12 animais. Letras diferentes representam significância estatística.

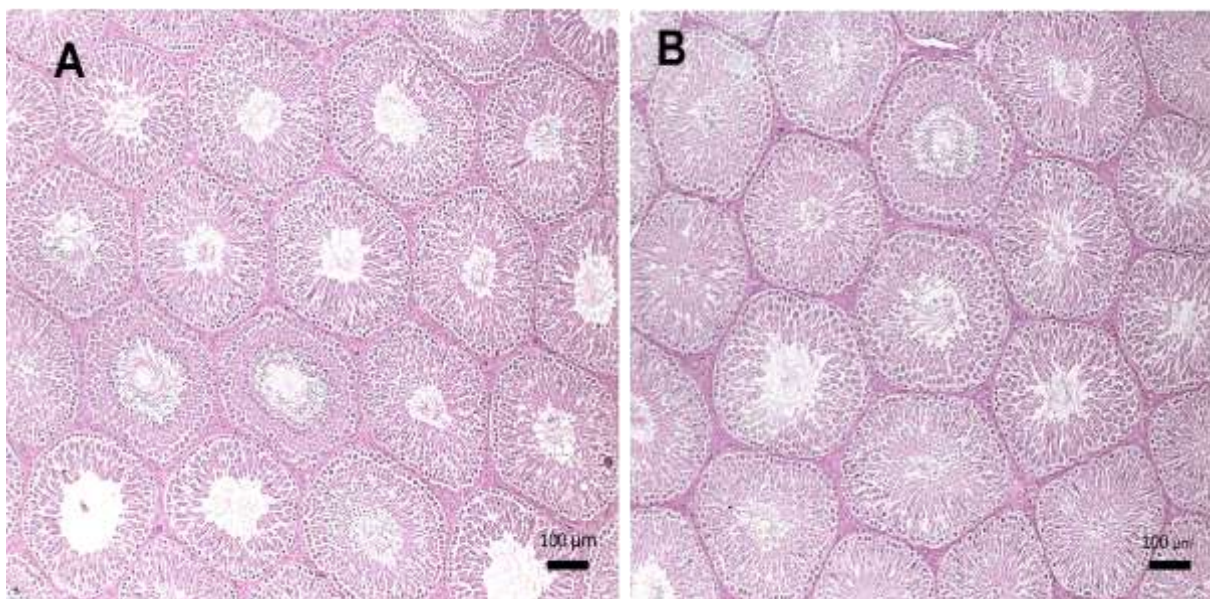


Figura 13- Fotomicrografia dos túbulos seminíferos de animais tratados com salina (A) e leptina (B) (80ng/g massa corporal) nos primeiros dias de vida aumento de 100x.

A tabela 3 mostra a análise dos espermatozoides. A administração de leptina levou a um aumento significativo no número de espermatozoides totais ($p \leq 0,009$) e não houve diferença na viabilidade entre os grupos.

Tabela 3. Análise de espermatozoides de animais tratados com salina (C) e leptina (L) (80ng/g massa corporal) nos primeiros dias de vida.

Análise dos Espermatozoides			
	C	L	Valor de p
Células totais (10^7)	$1,8 \times 10 \pm 0,2$	$3,49 \times 10 \pm 0,5$	0,009
Viabilidade	$56,5 \pm 2,0$	$50,47 \pm 2,8$	0,133
Morfologia (%)			
Anormais	$40,58 \pm 2,0$	$45,83 \pm 1,2$	0,049

6 DISCUSSÃO

Um grande avanço no entendimento da regulação da ingestão alimentar foi a descoberta de uma adipocina secretada pelo tecido adiposo, a leptina [49]. Após atravessar a barreira hemato encefálica, a leptina alcança seu principal sítio de ação no hipotálamo onde desempenha papel fundamental no controle do apetite e na regulação do gasto energético [50]. Inicialmente foi considerada como um hormônio produzido exclusivamente pelo tecido adiposo, porém hoje se sabe que a leptina é produzida também por vários outros tecidos do organismo, incluindo os órgãos do sistema reprodutor [55,69-74].

A função testicular é sabidamente regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. O hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofina estimula as gonadotrofinas hipofisárias, LH e FSH, as quais agem a nível testicular levando a um aumento da espermatogênese e da produção de testosterona e estradiol. Por retroalimentação negativa GnRH, LH e FSH são inibidos [29,30]. No entanto, após a descoberta que tanto a leptina quanto seus receptores são expressos a nível testicular [81,82,86,87], acredita-se que este hormônio seja tão ou mais importante que as gonadotrofinas hipofisárias no controle da função testicular.

Até o momento pouco se sabe sobre o papel regulador da leptina ao nível do sistema reprodutor em especial ao nível testicular. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar alguns parâmetros da estrutura e da função testicular num modelo de programação metabólica pela leptina, tendo em vista que outros trabalhos já demonstraram que este hormônio é capaz de programar a função de diferentes órgãos [100,101,109,122]. Trabalhos recentes do nosso grupo mostram que a leptina regula a morfometria e a expressão de diferentes genes na próstata de ratos e de humanos *in vivo* e *in vitro* [80,123,124].

Neste trabalho foi demonstrado que a leptina injetada no início da vida foi capaz de reduzir a ingestão alimentar, apesar desta alteração não ter ocorrido em todo o período avaliado. Logo após o desmame até a puberdade, a redução da ingestão alimentar foi acompanhada de uma redução da massa corporal e do comprimento linear, entretanto após este período tanto a massa corporal quanto o comprimento linear não mostraram alteração apesar da redução na ingestão alimentar entre os dias 70 e 90.

Em trabalho recente [125] foi demonstrado que uma única administração de leptina no dia 2 pós-natal (3µg/g massa corporal) levou a redução de ingestão alimentar dos animais na vida adulta sem modificação da massa corporal. Essa diferença foi mais acentuada com o avançar da idade. Esse fato nos leva a acreditar que em nosso modelo experimental, se o acompanhamento dos animais tivesse sido mais prolongado alterações mais evidentes no consumo alimentar poderiam ter sido observadas.

Sabe-se hoje que a leptina age no hipotálamo, principalmente ao nível dos núcleos arqueado, ventromedial, dorsomedial e lateral, onde através da isoforma longa do seu receptor inibe as vias neuronais que estimulam a ingestão alimentar (orexígenas) e diminuem o gasto energético, assim como ativa as vias neuronais que inibem a alimentação (anorexígenas) [57].

Além do tecido adiposo que é o principal produtor e secretor de leptina para a circulação, a mucosa gástrica parece contribuir com uma grande parcela dos níveis de leptina circulante. No entanto, apesar das proteínas serem idênticas, algumas diferenças no estímulo e no mecanismo de secreção da leptina entre os dois tecidos foram observadas. O tecido adiposo secreta leptina continuamente ao passo que a mucosa gástrica libera leptina imediatamente em resposta ao estímulo da ingestão alimentar e de alguns hormônios gástricos como secretina, colecistoquinina, etc. Desta forma, acredita-se que a leptina gástrica responde a ingestão alimentar levando a saciedade, enquanto a leptina do tecido adiposo agiria no controle em longo prazo do gasto energético [126].

Apesar de no momento não sabermos como ocorre a programação metabólica pela leptina a nível gástrico e do tecido adiposo, é descrito que a gênese e a principal expansão do tecido adiposo ocorrem durante a gestação e início da vida pós-natal [125,127]. Podemos supor então que o tecido adiposo tenha sido programado pela injeção de leptina nos primeiros dez dias de vida. Acreditamos porém que a diferença na regulação do processo secretório e na ação da leptina gástrica e do tecido adiposo possa ter contribuído para a falta de resposta integrada entre ingestão alimentar e massa corporal observada neste estudo.

Além da leptina, vários outros hormônios agem direta ou indiretamente a nível hipotalâmico regulando a ingestão alimentar e o gasto energético. Dentre eles podemos citar a grelina, os hormônios tireóideos, insulina, estrogênio, catecolaminas, etc. A interação apropriada e adequada entre esses hormônios irá

influenciar a ingestão e o gasto energético estabelecendo uma dinâmica entre o hipotálamo e os tecidos periféricos [128].

Através do seu efeito hipotalâmico indireto sobre a produção tireóidea do hormônio T3 [129], leptina influencia o gasto energético. Além disto, já foi demonstrado que a leptina injetada no início da vida parece programar a função tireóidea dos animais [112]. Então a regulação da leptina sobre os hormônios tireóideos também podem ter contribuído para a não observação da redução alimentar e da massa corporal por todo o período estudado.

Apesar de no momento do sacrifício os dois grupos de animais não apresentarem diferença na massa corporal, a massa de todos os órgãos avaliados (hipotálamo, hipófise, próstata, testículo, epidídimo e bexiga) foi significativamente menor nos animais que receberam leptina no início da vida. Podemos sugerir mediante este resultado e o fato de todos esses tecidos apresentarem receptores para leptina [59,78-82], que este hormônio tenha exercido um efeito direto nos diferentes tecidos avaliados.

Sabe-se hoje que além do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, a leptina é um dos principais reguladores da função reprodutiva e tanto a sua síntese como os seus receptores são amplamente expressos nos tecidos do sistema urogenital [85-88]. Camundongos ob/ob apresentam maior massa corporal e uma redução na massa testicular [130]. Esses resultados e os resultados apresentados neste estudo (redução da massa testicular sem alteração na massa corporal) reforçam a hipótese de um efeito direto da leptina nos tecidos do sistema urogenital.

De uma maneira geral, a leptina parece agir como um sinal para o sistema reprodutor neuroendócrino e quando as concentrações séricas de leptina são reduzidas devido a reservas insuficientes de energia, esta proteína age inibindo o eixo reprodutivo neuroendócrino em ambos os sexos [131]. Estudos genéticos mostram que a leptina é necessária para o início da puberdade [132,133] servindo como sinal metabólico para ativação do GnRH no final do período pré-puberal [134]. Os dados apresentados aqui confirmam esse fato, mostrando que a administração de leptina no início da vida programou os animais levando a um adiantamento na data de início da puberdade.

Vários trabalhos têm demonstrado que a leptina exerce um efeito direto autócrino e parácrino na síntese e degradação de lipídios no tecido adiposo e nos tecidos que armazenam triacilglicerol [135]. No entanto, a grande diversidade de

modelos experimentais utilizados para avaliar o papel da leptina no metabolismo lipídico, torna difícil comparar nossos resultados dentro de um mesmo contexto fisiológico. De qualquer forma todos os trabalhos concordam que a leptina exerce um importante papel no metabolismo lipídico e os resultados apresentados aqui indicam uma programação do metabolismo lipídico pela leptina.

O papel da leptina no controle da função reprodutiva masculina é controverso, já que este hormônio apresenta funções tanto estimulatórias quanto inibitórias [81].

Não identificamos na literatura nenhum artigo que tenha avaliado a morfologia testicular em modelo de administração de leptina no período pós-natal. Camundongos ob/ob que apresentam deficiência de leptina apresentam anormalidades na morfologia testicular e espermatogênese alterada [130].

Nossos resultados indicam que a leptina tem um efeito positivo sobre o testículo, pois apesar da redução na massa desse órgão, a leptina causou um aumento na área total, área do lúmen e na altura do epitélio seminífero, o que poderia ser indicativo de maior atividade testicular. O comprimento total do túbulo está reduzido o que acreditamos ser um fator compensatório que culminou em menor massa testicular.

A administração de leptina em ratos adultos por um período de 42 dias levou a resultados diferentes daqueles observados neste estudo [145]. Análise morfométrica do testículo mostrou redução da altura do epitélio e do diâmetro tubular. Acreditamos que esta discrepância possa ser consequente a administração prolongada da leptina, que em excesso teve efeitos adversos no órgão.

Somado a alteração da morfologia testicular, os animais do presente estudo apresentam um aumento no número de espermatozoides. É descrito na literatura que camundongos ob/ob são inférteis e esse fato é revertido pelo tratamento com leptina [84,131]. Podemos correlacionar a alteração da morfologia testicular e o aumento no número de espermatozoides a maior expressão gênica e proteica dos receptores de leptina, estrogênio alfa e da enzima aromatase, que sabidamente são importantes para a função testicular.

A maior expressão gênica e proteica dos receptores de leptina no testículo reforça a hipótese que a leptina tenha programado a função deste órgão. A leptina administrada no início da vida regulou positivamente a expressão dos seus receptores, levando a uma resposta deste órgão ao hormônio.

Em ratos a maturação testicular inicia-se logo após o nascimento [136-138], período no qual foi administrada a leptina, o que poderia ter programado a maturação testicular nesses animais. Androgênio e FSH parecem ser necessários para iniciar o processo de espermatogênese [139,140] porém, a administração de testosterona em ratos maduros não influencia este processo [141]. Em relação ao estradiol, quando administrado isoladamente parece ter efeito negativo, porém se administrado junto com FSH, aumenta a resposta testicular a este hormônio [142].

Camundongos com deficiência de ER alfa e da enzima aromatase [143] são inférteis ao contrário de camundongos com deficiência de ER beta que não apresentam alteração na fertilidade [144].

A administração prolongada de leptina em ratos adultos [145] levou a redução do número de espermatozoides totais. Acreditamos que como descrito anteriormente, o excesso de leptina pode causar efeitos adversos no tecido. Em homens o efeito da leptina sobre o número e qualidade do esperma é controverso podendo ser tanto positivo [146] quanto negativo [147].

Os espermatozoides que deixam o testículo para entrar no epidídimo são gametas não funcionais. É durante o trânsito através do epidídimo que o espermatozoide amadurece, adquire motilidade e habilidade para fertilizar o ovócito [148]. Então, não podemos deixar de considerar que as alterações de viabilidade e morfologia dos espermatozoides podem ter sido causadas também durante a sua passagem pelo epidídimo. Assim como o testículo este órgão sofre influência de estrogênio [149], androgênio [150] e leptina [151]. Estudo adicional a respeito do papel da leptina no epidídimo está sendo desenvolvido no laboratório.

Além do estrogênio e da leptina, androgênio exerce importantes funções no testículo. Este hormônio produzido pelas células de *Leydig* influencia a espermatogênese agindo na célula de *Sertoli* onde causa diferenciação celular [152], conversão da espermátide redonda a alongada [153] e também age no processo de liberação do espermatozoide [154]. A administração de leptina no início da vida levou a uma redução nas concentrações séricas de testosterona e não alteração no estradiol. Além disto, houve aumento na expressão gênica do receptor de androgênio e redução da expressão da proteína.

Estudos anteriores já demonstraram que FSH estimula o RNAm e a proteína do receptor de androgênio em cultura de células de *Sertoli* [155,156]. Contudo, androgênio aumenta a expressão da proteína, ao mesmo tempo em que diminui ou

não tem efeito na expressão do RNAm para AR [155,156]. Diferenças também são observadas na resposta dos diferentes tipos celulares testiculares ao androgênio em relação à regulação do seu receptor, sugerindo que a regulação hormonal do receptor de androgênio é específica para cada tipo celular [157].

Já foi demonstrado que leptina inibe a esteroidogênese em testículo de ratos adultos [81], o que está de acordo com os resultados apresentados aqui de redução na concentração de testosterona sérica. Ou seja, a administração de leptina parece programar a esteroidogênese testicular de forma a reduzir a síntese de testosterona. Ainda de acordo com a literatura [155,156], os baixos níveis de testosterona sérica também poderiam explicar, pelo menos em parte [155,156] a alteração do receptor de androgênio a nível gênico e protéico.

Ao contrário do que ocorre em ovário onde a leptina parece inibir a aromatase [158] demonstramos neste estudo que no testículo a leptina aumenta tanto a expressão gênica quanto protéica da enzima. Demonstramos recentemente que na próstata a leptina também aumenta a expressão gênica desta enzima [80,123]. É possível que além da aromatização do testículo e da próstata, a aromatização em outros tecidos periféricos possa ter contribuído para a não alteração das concentrações séricas do estradiol.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que a leptina exerce um papel importante na morfologia e função testicular e como acontece com outros tecidos, programa a função deste órgão quando administrada no início da vida.

Podemos concluir também que o efeito da leptina parece ser direto no órgão por alterar a morfologia testicular, níveis séricos de testosterona, expressão gênica e proteica dos receptores de estrogênio, androgênio, leptina, enzima aromatase e número de espermatozoides.

REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
2. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res*. 2002; 57:149-179.
3. Liu F, Jin S, Li N. Comparative and functional analysis of testis-specific genes. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34:28-35.
4. Richard M. Sharpe. Local Control of testicular Function. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1983; 68: 265-287.
5. Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech*. 2010; 73: 241-278.
6. Clermont Y. Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Exp Cell Res*. 1958; 15:438–440.
7. Orgebin-Crist M-C. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Ann Biol Anim Biochem Biophys*. 1967; 7:373–389.
8. Reid BL, Cleland KW. The structure and function of the epididymis. 1. The histology of the rat epididymis. *Aust J Zool*. 1957; 5:223–246.
9. Hamilton DW. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. In: Greep RO, & Astwood EB, eds. *Handbook of Physiology*. Sec 7. Vol 5. Washington, DC: American Physiological Society; 1975; 259–301.
10. Hermo L, Oko R, Morales CR. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Rev Cytol*. 1994; 154:106–189.
11. Cornwall GA, Lareyre JJ, Matusik RJ. Gene expression and epididymal function. In: Robaire B, & Hinton BT, eds. *The Epididymis, From Molecules to Clinical Practice*. New York, NY: Klumer Academic/Plenum Publishers; 2002; 169–199.

12. Dacheux JL, Dacheux F. Protein secretion in the epididymis. In: Robaire B, & Hinton BT, eds. *The Epididymis, From Molecules to Clinical Practice*. New York, NY: Klumer Academic/Plenum Publishers; 2002; 151–168.
13. Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, & Hinton BT, eds. *The Epididymis, From Molecules to Clinical Practice*. New York, NY: Klumer Academic/Plenum Publishers; 2002; 81–102.
14. Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan Jr ED. *Campbell's urology*. 8. ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002.
15. Drake LR, Vogl W, Mitchell AWM. *Gray's anatomia para estudantes*. Rio de Janeiro. Elsevier; 2005.
16. Alison F. Branding. *The Physiology of the Mammalian urinary Outflow Tract*. *Experimental Physiology*. 1999; 84:215-221.
17. Aumüller G, Riva A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia*. 1992; 24:183-96.
18. Ware JL. Growth factors and their receptors as determinants in the proliferation and metastasis of human prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1993; 12: 287-301.
19. Chung LW, Baseman A, Assikis V. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol*. 2005; 173: 10-20.
20. Hsu GL, Hsieh CH, Wen HS. Anatomy of the human penis: the relationship of the architecture between skeletal and smooth muscles. *J Androl*. 2004; 25:426-431.
21. Setchell BP, Breed WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: *Physiology of Reproduction* (ed. Neill JD), Elsevier. 2006; 771-825.
22. Chughtai B, Sawas A, O'Malley RL. A neglected gland: a review of Cowper's gland. *Int J Androl*. 2005; 28(2):74-77.
23. Szczech GM, Russell LD. Commentary on application of refined morphologic evaluation of the testis to the practice of toxicologic pathology. *Toxicol Pathol*. 1997; 25(2):230-237.
24. Hess RA, França LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Landes Bioscience, 2007; (ed.Cheng CY), pp. 1-15.

25. Russell LD, Sinha-Hikim AP, Ghosh S. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A. (Ed). *Function of somatic cells in the testis*. New York: Springer-Verlag, 1994; 55-83.
26. França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: Regadera J, Martinez Garcia (ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, 1998; 197-219.
27. Bascom KF, Ostrud HL. Quantitative studies of testicle. II Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anat. Rec.* 1925; 31:159-169.
28. Roosen-Runge EC. *The process of spermatogenesis in mammals*. Cambridge: University Press, 1977.
29. Sweerdloff RS, Wang C. Physiology of hypothalamic-pituitary function. Em: *Campbell's Urology*. P.C. Walsh, A.B. Retik, E.D. Vaughan, A.J. Wein Eds., Philadelphia, Saunders. 1998; 1239-1253.
30. Weiss J, Cote CR, Jameson JL. Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated luteinizing hormone secretion in vitro occurs within the duration of an endogenous GnRH pulse. *Endocrinology*. 1995; 136:138-143.
31. Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testes and the male reproductive tract. Em: *William's Textbook of Endocrinology*. 8^a ed. Wilson J.D. and Foster, D.W.W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1992; p. 799-852,
32. Schwartz NB. The 1994 Stevenson Award Lecture. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: a tale of two gonadotropins. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995; 73:675-684.
33. Hughes IA. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology* 2001; 142:3281-3287.
34. Sultan C, Paris F, Terouanne B. Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Hum Reprod Update*. 2001; 7:314-322.
35. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press. 1994; 1363-1433.
36. Hill CM, Anway MD, Zirkin BR. Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. *Biol Reprod*. 2004; 71:1348-1358.

37. Sharpe RM. Sertoli cell endocrinology and signal transduction: androgen regulation. In: Griswold M, Skinner M, eds. Sertoli cell biology. San Diego: Academic Press. 2005; 199–216.
38. Hess RA, Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Animal reproduction*. 2004; 1(1):5-30.
39. Saunders PT, Millar MR, Macpherson S. ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 8: 2706-2715.
40. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 5925-5930.
41. Makinen S, Makela S, Weihua Z. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol Hum Reprod*. 2001; 7:497-503.
42. Gaskell TL, Robinson LL, Groome NP. Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during 38 the second trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88: 424-432.
43. Aschim EL, Saether T, Wiger R. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 92: 97-106.
44. Shapiro E, et al. Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptors alpha and beta in human fetal testis and epididymis. *J Urol*. discussion 1698; 174: 1695-1698; 2005.
45. Kregel JH, Hodgins JB, Couse JF. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 15677-15682.
46. Simpson ER, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*. 1994; 15:342-355.
47. Carreau S, et al. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1:35.
48. Carreau S, Wolczynski S, Galeraud-Denis I. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010; 365(1546):1571-1579.
49. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425–432.

50. Stephens TW, et al. The Role of Neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995; 377: 530-532.
51. Bluher S, Christos SM. Leptin in reproduction - Current Opinion in Endocrinology. *Diabetes & Obesity*. 2007; 14: 458–464.
52. Conway GS, Jacobs HS. Leptin: a hormone of reproduction. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 633-635.
53. Lee GH, Proenca R, Montez JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*.1996; 379, 632–635
54. Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett.* 1996; 26;392(2):87-90.
55. Muren H, et al. Ontogeny of leptin and its receptor expression in mouse testis during the postnatal period. *Molecular Reproduction and Development.* 2008; 75: 874–880.
56. Chan JL, Matarese G, Shetty GK, et al. Differential regulation of metabolic, neuroendocrine, and immune function by leptin in humans. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103:8481–8486.
57. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996; 98:1101-1106.
58. Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, et al. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:741-746.
59. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 1994; 348:41-79.
60. Frühbeck, G. A heliocentric view of leptin. *Proc. Nutr. Soc.* 2001; 60: 301–318.
61. Frühbeck, G. Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr. Rev.* 2002; 60: 47–55.
62. Baratta, M. Leptin – from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med. Sci. Monit.* 2002; 8: 282–292.
63. Muoio DM, Dohm, GL. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 16: 653–666.
64. Harvey J, Ashford M L J. Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* 2003; 44: 845–854.

65. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, et al. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1101–1106.
66. Bjørbæck C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Rec. Prog. Horm. Res.* 2004; 59: 305–331.
67. Banks WA. The many lives of leptin. *Peptides.* 2004; 25: 331–338.
68. Frühbeck G, Jebb SA, Prentice AM. Leptin: physiology and Pathophysiology *Clin. Physiol.* 1998; 18: 399–419.
69. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* 1997; 3:1029–1033.
70. Bado A, Levasseur S, Attoub S, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature.* 1998; 394:790–793.
71. Morash B, Li A, Murphy PR, et al. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology.* 1999; 140:5995–5998.
72. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 2000; 62:413–437.
73. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 1999; 140:4939–4947.
74. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4144–4148.
75. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 1996; 137:3144–3147.
76. Chehab FF. The reproductive side of leptin. *Nat. Med.* 1997; 3: 952–953.
77. Rosenbaum M, Leibel RL. Leptin: a molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. *Trends Endocrinol. Metab.* 1998; 9:117–124.
78. Di Yorio MP, Bilbao MG, Pustovrh MC, et al. Leptin modulates the expression of its receptors in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in a differential way. *J Endocrinol.* 2008;198:355-366.
79. Hoon Kim J, Lee SY, Myung SC, et al. Clinical significance of the leptin and leptin receptor expressions in prostate tissues. *Asian J Androl.* 2008;10:923-928.

80. Alves-Pereira JL, Colli S, Marques DS, et al. Molecular and morphometric analysis of the rat ventral prostate injected with leptin. *Regul Pept.* 2012; 176:6-12.
81. Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP. et al. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *Journal of Endocrinology.* 2001; 170:413-423.
82. Rago V. et al. Leptin and its receptor are expressed in the testis and in the epididymis of young and adult pigs. *Anat Rec (Hoboken).* 2009; 292:736-745.
83. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* 1979; 59:719–809.
84. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob:ob males. *Endocrinology.* 1997; 138:1190–1193.
85. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2002; 188:9-13.
86. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, et al. Receptor isoformas B219/OB Novel: possível papel da leptina na hematopoiese e reprodução . *Nat Med* 2. 1996; 2: 585-589.
87. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, et al. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia.* 2007; 39:22-27.
88. Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, et al. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 2849–2855.
89. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, et al. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *Journal of Endoc.* 1997; 161:211–218.
90. Caprio M, Fabbrini E, Ricci G, et al. Ontogenesis of Leptin Receptor in Rat Leydig Cells. *Biology of Reprod.* 2003; 68:1199–1207.
91. Catalano S, Marsico S, Giordano C, et al. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J Biol Chem.* 2003; 1; 278:28668-28676.
92. Machinal-Quélin F, Dieudonné MN, Leneuve MC, Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282:853-863.

93. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*. 1996; 45:1455–1462.
94. Dieudonné MN, Sammari A, Dos Santos E, et al. Sex steroids and leptin regulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase I and P450 aromatase expressions in human preadipocytes: Sex specificities. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006; 99:189-196.
95. Styne DM. Physiology of puberty. *Horm Res*. 1994; 41:3-6.
96. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996; 1:334:292-295.
97. Yu WH, Kimura M, Walczewska A. et al. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 4:1023-1028.
98. Mantzoros CS, Flier JS, Rogol AD. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82:1066-1070.
99. Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82:2904-2910.
100. Carlsson B, Ankarberg C, Rosberg S, et al. Serum leptin concentrations in relation to pubertal development. *Arch Dis Child*. 1997; 77:396-400.
101. Palmert MR, Radovick S, Boepple PA. The impact of reversible gonadal sex steroid suppression on serum leptin concentrations in children with central precocious puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1998; 83:1091–1096.
102. Walker P, Courtin F. Transient neonatal hyperthyroidism results in hypothyroidism in the adult rat. *Endoc*. 1985; 116: 2246–2250.
103. Pracyck JB, Seidler FJ, McCook EC & Slotkin TA. Pituitary-thyroid axis reactivity to hyper- and hypothyroidism in the perinatal period: ontogeny of regulation and long term programming of responses. *J Dev Physiol*. 1992; 18:105–109.
104. Dorner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 1994; 26:213–221.
105. Cravo CO, Teixeira CV, Passos MC, et al. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm Metab Res*. 2002; 34: 400–405.

106. Passos MCF, Ramos CF, Dutra SCP, et al. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res.* 2002; 34: 40–43.
107. Teixeira CV, Ramos CDF, Mouco T, et al. Leptin injection during lactation alters thyroid function in adult rats. *Horm Metab Res.* 2003; 35: 367–371.
108. Passos MCF, Vicente LL, Lisboa PC & Moura EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult animals whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res.* 2004; 36: 625–629.
109. Trevenzoli IH, Valle MM, Machado FB, et al. Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol.* 2007; 15:629-637.
110. De Oliveira Cravo C, Teixeira CV, Passos MC, et al. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm Metab Res.* 2002; 34: 400–405.
111. Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, et al. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr.* 2006; 95: 830–837.
112. Toste FP, Alves SB, Dutra SC, et al. Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm. Metab. Res.* 2006a; 12: 827-831.
113. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2009; 24:69-74.
114. Malendowicz LK, Macchi C, Nussdorfer GG & Nowak KW: Acute effects of recombinant murine leptin on rat pituitary-adrenocortical function. *Endocr. Res.*1998; 24: 235–246.
115. Korenbrot CC, Huhtaniemi IT, Weiner I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod* 1977;17: 298–303.
116. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
117. Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cellpopulation, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biol Reprod.* 1981; 24:703–712.
118. Almeida FF, Leal MC, França LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod.* 2006; 75:792-799.

119. Gangadharan B, Murugan MA, Mathur PP. Effect of methoxychlor on antioxidant system of goat epididymal sperm in vitro. *Espermatozoides - Asian J Androl.* 2001 ; 3:285-288.
120. Filler R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In *Male reproductive toxicology*. Edited by: Chapin RE, Heindel JH. San Diego, California: Academic Press, Inc; 1993; 334-343.
121. Drevius LO, Eriksson H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res.* 1966; 42:136-156.
122. Passos MC, Lins MC, Lisboa PC, et al. Maternal leptin treatment during lactation programs the thyroid function of adult rats. *Life Sci.* 2007; 80:1754-1758.
123. Colli S, Silveira Cavalcante F, Peixoto Martins M, et al. Leptin role in the rat prostate ventral lobe. *Fertil Steril.* 2011; 95:1490-1493.
124. Leze E, Alves-Pereira JL, Colli S, Cavalcante FS, José Sampaio F, da Fonte Ramos C. Leptin Regulates Proliferation and Apoptosis in Human Prostate. *Scientific World Journal*, In Press, DOI: 10.1100/2012/842301.
125. Granado M, García-Cáceres C, Fuente-Martín E, et al. Effects of acute changes in neonatal leptin levels on food intake and long-term metabolic profiles in rats. *Endocrinology.* 2011; 152:4116-4126.
126. Cammisotto P, Bendayan M. A review on gastric leptin: the exocrine secretion of a gastric hormone. *Anat Cell Biol.* 2012; 45:1-16.
127. Ailhaud G, Grimaldi P, Négrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr.* 1992; 12:207-233.
128. Somogyi V, Gyorffy A, Scalise TJ, et al. Endocrine factors in the hypothalamic regulation of food intake in females: a review of the physiological roles and interactions of ghrelin, leptin, thyroid hormones, oestrogen and insulin. *Nutr Res Rev.* 2011; 22:1-23.
129. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, et al. *Endocrinology.* 1997; 138, 2569–2576.
130. Bhat GK, et al. Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse. *J Androl.* 2006; 27:302-310.
131. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod.* 1999; 60:216-222.

132. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998; 26;392:398-401.
133. Strobil A, et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*. 1998; 18:213-215.
134. Macut D, et al. Is there a role for leptin in human reproduction? *Gynecol Endocrinol*. 1998; 12:321-326.
135. Reidy SP, Weber J. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000; 125:285-298.
136. Clermont L, Perey B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat*. 1957; 100:241–267.
137. Kula K. The completion of spermatogenic cells in the course of spermatogenesis in immature rats. *Folia Morphol. (Warsz.) XXXIV*. 1977; 67–173.
138. Russell LD, Alger LE, Nequin LG. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endoc*. 1987; 120:1615–1632.
139. Kula K, Rodriguez-Rigau LJ, Steinberger E. Synthesis of testosterone and 5-reduced androgens during initiation of spermatogenesis in the rat. *Andrologia* 1983; 15:627–634.
140. Kula K. Gonadotropins, androgens and estradiol versus the function of the seminiferous epithelium: an enlarged model for the hormonal control of the initiation of spermatogenesis. *Pol. Endocrinol*. 1990; 41:305–314.
141. Kula K. Induction of precocious maturation of spermatogenesis in infant rats by human menopausal gonadotropin and inhibition by simultaneous administration of gonadotropins and testosterone. *Endoc*. 1988; 122: 34–39.
142. Kula K, et al. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 178:89-97.
143. O'Donnell L, et al. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001; 22:289-318.
144. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:15677–15682
145. Haron MN, D'Souza UJ, Jaafar H, et al. Exogenous leptin administration decreases sperm count and increases the fraction of abnormal sperm in adult rats. *Fertil Steril*. 2010; 93:322-324.

146. Lampiao F, du Plessis SS. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian J Androl.* 2008; 10:799-807.
147. Hofny ER, et al. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril.* 2010; 94:581-584.
148. Orgebin-Crist M-C. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Ann Biol Anim Biochem Biophys.* 1967; 7: 373–389.
149. Joseph A, Shur BD, Hess RA. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biol Reprod.* 2011; 84:207-217.
150. Robaire B, Seenundun S, Hamzeh M, Lamour SA. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian J Androl.* 2007; 9:545-553.
151. Rago V, et al. Leptin and its receptor are expressed in the testis and in the epididymis of young and adult pigs. *Anat Rec (Hoboken).* 2009; 29:736-745.
152. Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol* 1997; 137:107– 117.
153. O'Donnell L, et al. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology.* 1994; 135:2608-2614.
154. O'Donnell L, et al. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis.* 2011; 1:14-35.
155. Blok LJ, et al. Follicle-stimulating hormone regulates androgen receptor mRNA in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 63:267–271.
156. Blok LJ, Themmen APN, Peter AHFM, et al. Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 88:153–164.
157. Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, et al. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod.* 2000; 63:368-376.
158. Zachow RJ, et al. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. *Biol Reprod.* 1999; 61:1104-1109.

ANEXO – Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS
(CEUA – IBRAG - UERJ)

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/036/2010 sobre "Estudo do sistema urogenital nos diferentes modelos experimentais", sob a responsabilidade de **Cristiane da Fonte Ramos (UERJ)**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ em 31/08/2010. Este certificado expira em 31/08/2014.

Rio de Janeiro, 31 de Agosto de 2010.

Patricia Cristina Lisboa

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) - IBRAG - UERJ
Rua São Francisco Xavier, 524
Maracanã - Rio de Janeiro, RJ - 21545-013

1.555